

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Frères Mentouri-Constantine  
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires

**INATAA**

**THESE**

*Présentée pour l'obtention du diplôme de*

**DOCTORAT EN SCIENCES**

*Spécialité : Sciences Alimentaires*

*Option : Biotechnologies Alimentaires*

*par*

Moufida AGGOUN-ARHAB

**Thème**

Caractérisation de la composition en  
microconstituants des margines issues de la  
production oléicole et utilisabilité comme  
complément dans la ration chez la vache laitière

*Soutenue publiquement le : 28 / 04 /2016.*

Devant le jury :

<b>Présidente :</b>	Pr. BEKHOUCHE F.	INATAA, UFMC (Algérie).
<b>Directrice de thèse :</b>	Pr. BARKAT M.	INATAA, UFMC (Algérie).
<b>Co-Directeur de thèse :</b>	Dr. GRAULET B.	Centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes (France).
<b>Examineurs :</b>	Pr. HAMIDECHI M.A.	Université UFMC (Algérie).
	Pr. ZELLAGUI A.	Université Larbi Ben M'Hidi, (Oum-El-Bouaghi, Algérie).
	Dr. DJABRI B.	Université Larbi Tébessi (Tébessa, Algérie).

Année 2015-2016

## Avant-propos

Le travail de thèse a été effectué en partie au Laboratoire de Micronutriments de l'Equipe Digestion Microbienne et Absorption de l'Unité Mixte de Recherches sur les Hérbivores du centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes, France et en partie à la ferme Kadri Brahim de Constantine, Algérie. J'ai réalisé un séjour en France de 18 mois à l'Unité précitée, d'octobre 2011 à mars 2013, qui m'a permis de réaliser les différentes analyses et dosages. Cette thèse, dont l'intitulé est : « **Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière** » a été co-financée par les ministères des affaires étrangères Algérien et Français.

Madame Malika BARKAT, Professeur à l'INATAA de l'université Frère Mentouri Constantine, UFMC Algérie et Monsieur Benoit GRAULET, Docteur et Chargé de Recherches à l'INRA d'Auvergne Rhône-Alpes, France ont assuré, respectivement la direction et co-direction de ce travail de recherche.

## *Dédicace*

*A la mémoire de ma **mère** loin d'ici mais jamais absente*

*A mon très cher **papa***

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait  
exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je te  
porte.*

*Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie pleine de santé  
et de bonheur*

*A mon époux Rabah et mon trésor, Mohamed Wadie,  
avec mes excuses pour mes longues absences, en témoignage de  
ma profonde affection.*

*A tous ceux qui me sont chers*

## **Remerciements**

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire des Micronutriments, dirigé par Monsieur Benoît GRAULET, Docteur et Chargé de Recherches au Centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes (France), mon co-encadrant, auquel je réserve une attention toute particulière. Je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans votre laboratoire durant mes séjours en France, et la mise à ma disposition de tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez fait bénéficier de vos conseils et suggestions pertinentes qui m'ont aidé à avancer dans ce travail, vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin. Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect. Merci pour tout.*

*Je remercie Madame Malika BARKAT, Professeur à l'INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, UFMC ma directrice de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour son encadrement, sa disponibilité et son aide précieuse.*

*Je voudrais exprimer ma gratitude à l'ensemble des membres du jury de cette thèse, Madame Farida Bekhouche, Professeur à l'INATAA et présidente du jury ; Messieurs Mohamed Abdelhafid Hamidechi, Professeur à l'UFMC ; Amar Zellagui, Professeur à l'Université Larbi Ben M'hidi, Oum-El-Bouaghi et Belgacem Djabri, Maître de Conférences et Directeur de laboratoire de recherche à l'Université Larbi Tébessi, Tébessa, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'apporter leur jugement sur ce travail.*

*Je voudrais adresser un grand merci à Monsieur Abdelghani Boudjellal, Directeur de l'INATAA, qui m'a encouragé, aidé et accompagné pendant toute la période de constitution de mon dossier de bourse, je lui dois ma reconnaissance la plus sincère.*

*J'adresse un merci tout particulier à Madame Béatrice Chauveau-Duriot, Assistante Ingénieure au laboratoire de Micronutriments du Centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes (France) pour son soutien moral et sa précieuse aide.*

*Je ne saurais oublier l'ensemble du personnel de l'équipe Digestion Microbienne et Absorption, du Centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes (France), en particulier Pierre Amblard, Josiane Portelli et Agnes Cornu pour leur aide précieuse dans la réalisation des manipes et pour l'atmosphère qu'ils ont su créer.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Mohamed Kaja, Directeur de la de la ferme Kadri Brahim de Constantine, ainsi que tout le personnel de la ferme, qui, sans leur collaboration et leur aide, je n'aurais pu surmonter bon nombre de difficultés dans mon travail.*

*Enfin, j'adresse mes remerciements aux propriétaires des huileries qui m'ont fourni les margines, je leur dois ma reconnaissance la plus sincère.*

# Résumés

## Résumé

La production de l'huile d'olive génère des quantités considérables de margines, un polluant puissant déversé dans la nature sans aucun traitement préalable mais qui pourrait être considéré comme une source potentielle de produits naturels de haute valeur additive, en raison de leur teneur en composés phénoliques et d'autres antioxydants naturels. Le but de ce travail était de tenter de valoriser ce co-produit par les ruminants. Ainsi, la stratégie proposée était de distribuer les margines aux vaches laitières en production. Cette valorisation à grande échelle a nécessité deux étapes préalables: i) explorer la variabilité de composition chimique des margines issues de 2 procédés d'extraction de l'huile d'olive (centrifugation en 3-phases vs système de presse) et de 3 variétés d'olives (*Azerradj*, *Chemlal*, *Sigoise*); ii) estimer leur dégradation *in vitro* par le microbiote du rumen en système batch.

A l'exception du pH, de la teneur en matière sèche ou matière organique, il y avait une différence significative de la teneur en cendre selon le procédé d'extraction et la variété d'olive. La teneur en caroténoïdes était de 2,2 fois plus élevée avec 3-phases qu'avec le système de presse alors que le contenu en tocophérol était comparable pour les deux paramètres retenus. Parmi les composés phénoliques quantifiés, le tyrosol était le plus abondant alors que la concentration en oleuropéine était très variable. Les différences dans les concentrations de composés phénoliques ont été plus prononcées entre les variétés d'olive qu'entre process.

La biodégradation anaérobie *in vitro* des margines révèle leur utilisation importante par le microbiote du rumen. Comparativement au foin de vesce-avoine, les margines produisent une faible quantité de gaz, en plus, leur fermentation *in vitro* génère un faible volume de méthane. Ceci leur permet d'améliorer l'efficacité de la flore microbienne ruminale dans la production de la biomasse et l'inhibition de la production du méthane, source majeure de perte d'énergie pour l'animal. Ce résultat nous permet de recommander leur utilisation comme additif alimentaire dans la ration des ruminants.

La distribution des margines dans la ration des vaches laitières nous a permis de définir les conditions de présentation des margines aux ruminants (forme, adaptation, niveau d'apport) et leur acceptabilité pour cet ingrédient. Nos résultats ont montré que le niveau de production quantitatif (production laitière) et la composition fine du lait (vitamine A, E et composés phénoliques) ne semble pas être impactés significativement. L'absence d'écarts significatifs entre lots d'animaux est dû au fait que les margines qui ont été distribuées aux vaches n'étaient pas particulièrement riches en micro-constituants, comparativement aux fourrages.

**Mots clés :** Composés phénoliques, caroténoïdes, tocophérols, margines, variétés d'olive, procédés d'extraction, composition chimique, vache laitière, fermentation ruminale.

## **Abstract**

Olive oil production yields a considerable amount of wastewater, a powerful pollutant that is currently discarded but could be considered as a potential source of valuable natural products due to its content in phenolic compounds and other natural antioxidants. The aim of this work was to valorize this by-product by ruminants. Thus, the proposed strategy was to distribute olive mill wastewater (OMWW) to dairy cows in production. This large-scale recovery required two prior steps: i) explore the variability in OMWW composition from Algerian olive oil mills considering extraction processes (traditional discontinuous press vs 3-phases centrifugal system) and olive varieties (*Azerradj*, *Sigoise*, *Chemlal*) and, ii) estimate its *in vitro* degradability in presence of ruminale microbiota in batch systems. Whereas pH, dry or organic matter content didn't vary, there was a significant difference in ash content according to extraction process and olive variety. Carotenoid content was 2.2-fold higher with 3-phases than with press systems whereas tocopherol content was not significantly different. Among the phenolic compounds quantified, tyrosol was usually the most abundant whereas oleuropein concentrations were highly variable. Differences in phenolic compound concentrations were more pronounced between olive varieties than between processes.

The anaerobic biodegradation of OMWW reveals their extensive use by the rumen microbiota. Compared to vetch hay oats, they produce a small amount of gas. In addition, *in vitro* fermentation generates a low volume of methane. This allows OMWW to improve the efficiency of ruminal microbial flora in the biomass production and inhibition of methane production, a major source of energy loss for the animal. This result allows us to recommend their use as a food additive in the diet of ruminants

The distribution of OMWW in the diet of dairy cows has allowed us to define the conditions for presentation of OMWW to dairy cows (shape, adaptation, and intake level) and their acceptability. Our results showed that the level of quantitative output (milk production) and fine composition of milk (vitamin A, E and phenolic compounds) did not seem to be affected significantly. The lack of significant differences between groups of animals is due to the fact that the OMWW distributed to the cows were not particularly rich in micro-components compared to forage.

**Key words:** Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols, olive wastewater, olive variety, olive milling, chemical composition, dairy cow, ruminal fermentation.

## المخلص

إن إنتاج زيت الزيتون يولد كميات كبيرة من المخلفات المائية تدعى المرج. تعتبر هذه الأخيرة كملوثات قوية يتم رميها في الطبيعة دون أي معالجة مسبقة ولكن يمكن أن تكون مصدرا لمواد طبيعية ذات قيمة مضافة عالية، لاحتوائها على مركبات الفينول والعديد من المواد الطبيعية المضادة للأكسدة. الهدف من هذه الدراسة هو محاولة تبيين المرج من طرف المجترات. إن الاستراتيجية المقترحة هي إدخال هذه المخلفات في النظام الغذائي للأبقار الحلوب في مرحلة الإنتاج. تتطلب عملية التثمين على نطاق واسع خطوتين أوليتين هما : (أ) تحديد نوع المتغيرات التي تتحكم في التركيب الكيميائي للمرج وفق طريقتين مختلفتين لاستخراج زيت الزيتون (نظام الطرد المركزي ذي 3 مراحل مقابل نظام الضغط) و 3 أصناف من الزيتون (أزراج، شمالال و سيقواز)، (ب) قابلية هضمها من طرف الكائنات الحية الدقيقة أو الميكروفلورا المتواجدة في كرش الأنعام.

بينت نتائج التحاليل المخبرية أنه، باستثناء درجة الحموضة (pH) ، المادة الجافة والعضوية، كان هناك فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة الأملاح وفقا لطريقة إستخراج الزيت و أصناف الزيتون. أما محتوى الكاروتينويد فكان أعلى ب 2,2 مرة مع نظام 3 مراحل مقابل نظام الضغط. بينما كان محتوى التوكوفيرول عديم الفروق ذات الدلالة الإحصائية بالنسبة للمتغيرين المدروسين. أما بالنسبة للمركبات الفينولية كان tyrosol الأكثر وفرة في حين كان تركيز oleuropein متغير جدا، فيما كانت الاختلافات في مستويات مركبات الفينول أكثر دلالة إحصائية بين أصناف الزيتون منها بين طرائق الاستخراج.

إن التحلل البيولوجي اللاهوائي للمرج كشف عن استخدامها الواسع من طرف الميكروفلورا ضف إلى ذلك إنتاج كمية صغيرة من الغاز، أما عملية التخمر فولدت حجما منخفضا من غاز الميثان، مما يسمح لهم تحسين كفاءة ميكروفلورا الكرش في إنتاج الكتلة الحيوية وتنشيط إنتاج غاز الميثان، هذا الأخير الذي يعتبر المصدر الرئيسي لفقدان الطاقة عند الحيوان. هاته النتيجة تسمح لنا أن يوصي باستخدام المرج كمادة مضافة في النظام الغذائي للأنعام.

إن إدراج المرج في النظام الغذائي للأبقار الحلوب سمح لنا بتحديد شروط تقديمه للأنعام ( الشكل، التكيف، ومستوى الإدراج) والقبول لهذا العنصر. أظهرت نتائجنا أن مستويات الإنتاج الكمي (إنتاج الحليب) والنوعي (فيتامين A، E و المركبات الفينولية) لا يبدو قد تأثرت بشكل كبير. ويرجع ذلك إلى أن المرج التي وزعت على الأبقار ذات قيمة غذائية ضعيفة، سيما من حيث المكونات الصغرى بالمقارنة مع العلف.

**الكلمات المفتاحية:** المركبات الفينولية ، الكاروتينات ، التوكوفيرول ، المرج، أصناف الزيتون، طرائق استخلاص الزيتون، التركيب الكيميائي ، بقرة حلوب ، التخمر في الكرش.

# Table des matières

Résumés (Français, Anglais, Arabe)

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Généralités sur l'olivier .....</b>	<b>6</b>
1.1. Origine de l'olivier .....	6
1.2. L'oléiculture en Algérie .....	6
1.3. Profil variétal de l'olivier en Algérie .....	8
<b>II. Technologie de fabrication de l'huile d'olive .....</b>	<b>10</b>
2.1. Synoptique de fabrication d'huile d'olives .....	10
2.1.1. Opérations préliminaires .....	10
2.1.2. Le broyage.....	10
2.1.3. Le malaxage .....	10
2.1.4. Séparation des phases .....	11
2.2. Procédés d'extraction d'huiles d'olives .....	11
2.2.1. Procédés en discontinu ou système à presse .....	11
2.2.2. Procédés en continu ou système à centrifugation .....	12
2.2.2.1. Système d'extraction par centrifugation à trois phases.....	12
2.2.2.2. Système d'extraction par centrifugation à deux phases.....	13
2.3. Avantages et inconvénients des techniques .....	15
<b>III. Les margines .....</b>	<b>19</b>
3.1. Caractérisation chimique des margines .....	19
3.2. Composés vitaminiques .....	21
3.2.1. Les caroténoïdes .....	21
3.2.1.1. Propriétés générales .....	21
3.2.1.2. Structure générale et propriétés physico-chimiques .....	21
3.2.1.3. Intérêts nutritionnels .....	23
3.2.1.4. Caroténoïdes des olives et des margines .....	25

3.2.2. Les tocophérols .....	25
3.2.2.1. Définition et structure chimique .....	25
3.2.2.2. Propriétés chimiques et fonctions biologiques.....	25
3.2.2.3. Tocophérols des olives et des margines .....	27
3.3. Composés phénoliques .....	27
3.3.1. Structure chimique et diversité .....	27
3.3.2. Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres .....	30
3.3.2.1. Propriétés chimiques majeures des polyphénols .....	30
3.3.2.2. Mécanismes d'action contre les radicaux libres .....	30
3.3.3. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques .....	31
3.3.4. Applications industrielles des polyphénols .....	32
3.3.5. Les composés phénoliques des margines .....	34
3.3.6. Intérêts biologiques des biophénols des margines .....	38
3.3.7. Caractéristiques microbiologiques .....	38
3.4. Impacts environnementaux des margines .....	40
3.4.1. Pollution de l'eau .....	40
3.4.2. Pollution de l'air .....	42
3.4.3. Pollution des sols .....	42
3.5. Traitements et valorisations des margines .....	42
3.6. Cas particulier de valorisation : utilisation en alimentation animale .....	48
<b>IV. Digestion des aliments chez les ruminants .....</b>	<b>50</b>
4.1. Anatomie du tube digestif des ruminants .....	50
4.1.1. Réseau et rumen .....	50
4.1.2. Feuillet .....	51
4.1.3. Caillette .....	51
4.1.4. Intestin grêle .....	52
4.1.5. Gros intestin .....	52
4.2. Fonctionnement du rumen : l'écosystème ruminal .....	53
4.2.1. Les bactéries .....	53
4.2.2. Les protozoaires .....	53
4.2.3. Les archaebactéries .....	53
4.2.4. Les champignons .....	54
4.3. Conditions indispensables au fonctionnement du rumen .....	54

4.4. Digestion des aliments dans le rumen .....	55
4.4.1. Digestion des glucides .....	56
4.4.2. Digestion des lipides .....	57
4.4.3. Digestion des matières azotées .....	58
4.4.4. Digestion des caroténoïdes .....	59
4.4.4.1. Apports de caroténoïdes dans l'alimentation des ruminants .....	59
4.4.4.2. Transfert des caroténoïdes de la ration au lait chez les ruminants .....	60
4.4.5. Digestion des tocophérols .....	66
4.4.5.1. Apports de vitamine E dans l'alimentation des ruminants .....	66
4.4.5.2. Transfert de vitamine E de la ration au lait chez les ruminants.....	67
4.4.6. Digestion des composés phénoliques .....	70
4.4.6.1. Les polyphénols des fourrages .....	70
4.4.6.2. Métabolisme des composés phénoliques et transfert à la glande mammaire .....	70
4.4.6.3. Importance des composés phénoliques dans la santé des ruminants, le rendement et les propriétés organoleptiques du lait .....	71

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

<b>Partie 1. Etude de la composition chimique des margines et caractérisation de ses facteurs de variation .....</b>	<b>73</b>
1. Rappel des objectifs de l'étude .....	73
2. Questionnaire d'enquête .....	73
3. Echantillonnage .....	74
4. Analyses chimiques .....	75
4.1. Acidité (pH) .....	75
4.2. Matière sèche (MS) .....	75
4.3. Matières minérale (MM) et organique (MO) .....	75
4.4. Contenu et composition des caroténoïdes et de la vitamine E des margines .....	75
4.4.1. Procédure d'extraction .....	75
4.4.2. Quantification des caroténoïdes et de la vitamine E des margines par analyse en chromatographie liquide ultra-performante (UPLC) .....	77
4.5. Quantification des composés phénoliques des margines par analyse en spectrométrie de masse (MS) .....	78
4.5.1. Extraction des composés phénoliques des margines .....	78

4.5.2. Quantification des composés phénoliques par HPLC-MS .....	78
5. Analyses statistiques .....	81
<b>Partie 2. Biodégradation anaérobie des margines et de leurs extraits phénoliques bruts par le microbiote du rumen .....</b>	<b>82</b>
1. Rappel des objectifs de l'étude .....	82
2. Echantillonnage .....	82
3. Evaluation de la valeur nutritionnelle des margines .....	82
3.1. Caractérisation chimique des margines brutes .....	82
3.1.1. Détermination de la matière sèche .....	83
3.1.2. Détermination de la matière minérale .....	83
3.1.3. Détermination de la matière azotée totale .....	83
3.1.4. Dosage des sucres totaux .....	83
3.2. Evaluation de la biodégradation des margines brutes par les microorganismes du rumen via la production des biogaz (voie biologique) .....	84
3.2.1. Description du système de fermentation en batch (seringue) .....	84
3.2.2. Inoculum .....	84
3.2.3. Composition du milieu de culture .....	85
3.2.4. Inoculation et incubation .....	85
3.2.5. Paramètres fermentaires mesurés .....	85
4. Suivi de la biodégradation <i>in vitro</i> des mixtures de margines brutes et foin de vesce-avoine .....	86
4.1. Détermination de la concentration en azote ammoniacal .....	86
4.2. Détermination de la digestibilité apparente .....	88
5. Impact des composés phénoliques extraits de margines monovariétales sur l'activité métabolique du microbiote du rumen .....	88
5.1. Extraction des composés phénoliques des margines .....	89
5.2. Dosage des phénols totaux .....	89
5.3. Dosage des tannins totaux .....	90
5.4. Dosage des tannins condensés .....	90
5.5. Dosage des flavonoïdes .....	90
5.6. Test de précipitation des protéines ( <i>test de diffusion radiale</i> ) .....	91
6. Analyses statistiques .....	93
<b>Partie 3. Impact de la distribution de margines en complément de rations à base de</b>	

<b>fourrages classiquement distribués en Algérie sur la composition en microconstituants du lait chez la vache laitière .....</b>	<b>94</b>
1. Rappel des objectifs de l'étude .....	94
2. Stratégie expérimentale .....	94
2.1. Plan expérimental .....	94
2.2. Aliments .....	95
2.3. Plan de rationnement .....	95
3. Prélèvements .....	96
4. Analyses de laboratoire .....	96
4.1. Paramètres de performance de la production laitière .....	96
4.2. Extraction et dosage des caroténoïdes et des vitamines des laits .....	96
4.3. Extraction des composés phénoliques du lait avec déconjugaison .....	97
4.4. Analyse en HPLC .....	98
5. Analyses statistiques .....	98

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

<b>Partie 1. Etude de la composition chimique des margines et caractérisation de ses facteurs de variation .....</b>	<b>99</b>
1. Profil des huileries et traitement des olives au moment de leur trituration .....	99
1.1. La cueillette des olives .....	99
1.2. Conservation des olives au niveau des unités de fabrication de l'huile d'olive .....	101
1.3. Traitement des olives selon le procédé de leur trituration .....	101
1.4. Gestion des margines générées .....	103
2. Caractérisation chimique des margines .....	105
2.1. Le pH .....	105
2.2. Les matières sèche (MS) et organique (MO) .....	105
2.3. La matière minérale (MM) .....	107
2.4. Teneur et composition en caroténoïdes et en tocophérols des margines .....	107
2.5. Teneur et composition en biophénols des margines .....	111
<b>Partie 2. Biodégradation anaérobie des margines et de leurs extraits phénoliques bruts par le microbiote du rumen .....</b>	<b>119</b>
1. Biodégradation <i>in vitro</i> des margines en système batch .....	119
1.1. Caractérisation chimique des margines vs foin de vesce-avoine .....	119
1.2. Production de biogaz <i>in vitro</i> en présence du microbiote d'ovin et paramètres	

fermentaires mesurés (pH, N-NH <sub>3</sub> , AGV <sub>t</sub> , DMS et ME) .....	121
2. Biodégradation <i>in vitro</i> des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine .....	124
2.1. Suivi de la fermentation des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine par la production des biogaz .....	124
2.2. Paramètres fermentaires mesurés .....	127
3. Impact du contenu phénolique des margines sur la biodégradation anaérobie du foin de vesce-avoine .....	127
3.1. Impact du contenu phénolique des margines monovariétales sur l'activité métabolique du microbiote ruminal .....	127
3.1.1. Production de biogaz .....	127
3.1.2. Paramètres fermentaires mesurés .....	128
<b>Partie 3. Impact de la distribution de margines en complément de rations à base de fourrages classiquement distribués en Algérie sur la composition en micro-constituants du lait chez la Vache .....</b>	<b>131</b>
1. Caractéristiques physico-chimiques et en micro-constituants vitaminiques des margines incorporées dans la ration alimentaires des vaches en production et leur évolution au cours de l'expérimentation .....	131
1.1. Paramètre chimiques .....	131
1.2. Les micro-constituants vitaminiques .....	132
1.2.1. Teneurs et composition en micronutriments des margines .....	132
1.2.2. Evolution de la teneur et de la composition en micronutriments des margines au cours de la période d'expérimentation .....	133
2. Effet de la supplémentation en margines sur les performances de production des vaches laitières .....	134
3. Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en caroténoïdes, vitamine A et E du lait .....	136
4. Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en composés phénoliques du lait .....	138
4.1. Composés phénoliques du lait .....	138
4.2. Composés phénoliques du lait de vaches supplémentées en margine .....	140
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>142</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>144</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

AB :	acide benzoïque
AC :	acide caféique
ac. :	acide
ACh :	acide chlorogénique
ACi :	acide cinnamique
ADN :	acide désoxyribonucléique.
AE :	acétate d'éthyle.
AGNE:	acide gras non estérifié
AGV :	acides gras volatils
AH :	acide hippurique
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AOAC :	Association of Official Analytical Chemists.
APP :	acide 3-phénylpropionique
AQ :	acide quinique
ARN :	acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub> :	acide ribonucléique messenger
As	arsenic
B	barium
Br	brome
BSA :	sérum-albumine bovine.
°C :	degré Celsius
Ca :	calcium
CaBP :	calcium binding protein
Cd :	cadmium
CH <sub>4</sub> :	méthane
Cl :	chlore
CM :	chylomicrons
CMV :	complément minéral et vitaminique
Co :	cobalt
CO <sub>2</sub> :	dioxyde de carbone
COI :	Conseil Oléicole International
CP :	composés phénoliques
CPP :	capacité à précipitation des protéines

Cr	chrome
Cu	cuivre
CUV :	composés UV-visibles
DBO :	demande biologique en oxygène
DCO:	demande chimique en oxygène
DMS :	digestibilité apparente de la matière sèche
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
FAO :	Food and Agriculture Organization
Fe :	fer
FT :	flavonoïdes totaux
HCO <sub>3</sub> :	monohydrogénocarbonate
HDL :	high density lipoprotein
Hg :	mercure
HIV :	human immunodeficiency virus
HPLC:	high performance liquid chromatography
ITAFV :	Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne
K :	potassium
LDL :	low density lipoprotein
LPL :	lipoprotéine lipase
MFS:	methylgreen-formalin-saline
Mg :	magnésium
MM :	matière minérale
MMP-9:	<i>matrix metalloproteinase-9</i>
Mn :	manganèse
MO :	matière organique
Mo :	molybdène
MS :	mass spectrométrie
MSI :	matière sèche ingérée
MS <sub>i</sub> :	matière sèche initiale
MSr <sub>B</sub> :	matière sèche résiduelle moyenne de blanc
MSr <sub>s</sub> :	matière sèche résiduelle de substrat incubé
Na :	sodium
Ni :	nickel
NK :	natural killer
P :	phosphore
PL :	production laitière

PMA :	phorbol myristate acétate
PT :	phénols totaux
PVPP :	polyvinylpolypyrrolidone.
RBP	Retinol Binding Protein
RT:	retention time
Se :	sélénium
SI :	standard interne
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
T° :	température
TB :	taux butyreux
TC :	tanins condensés
THF :	tétrahydrofurane
TP :	taux protéique
TTP:	$\alpha$ -tocophérol transfert protein
UI :	unités internationales
u-PA .	plasminogène activateur.
UPLC :	ultra performance liquid chromatography
VLDL:	very low density lipoproteins

## Liste des tableaux

N° du tableau	Page
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Tableau 1 :</b> Orientations variétales de l'olivier en Algérie (Loussert et Brousse 1978 ; COI, 2000 <i>In</i> Benrachou (2013) ; Mendil et Sebai, 2006) .....	07
<b>Tableau 2:</b> Composition chimique des margines : valeurs moyennes, maximales et minimales selon les données de la littérature.....	18
<b>Tableau 3 :</b> Principales classes de composés phénoliques (Bruneton, 1999) .....	29
<b>Tableau 4 :</b> Composés phénoliques et leurs concentrations des margines cités dans la littérature .....	33
<b>Tableau 5 :</b> Résumé des bioactivités des principaux biophénols des margines citées dans la littérature .....	37
<b>Tableau 6 :</b> Traitements et domaines d'applications possibles des margines (Zbakh et El Abbassi, 2012) .....	41
<b>Tableau 7 :</b> Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive (Martilotti, 1993) .....	49
<b>Tableau 8 :</b> La teneur en vitamine E des principaux aliments des ruminants (Meschy, 2007) .....	67
<b>Matériel et méthodes</b>	
<b>Tableau 9 :</b> Effectifs des échantillons de margines issues de la trituration des différentes variétés d'olives par pressage ou par centrifugation à 3 phases .....	74
<b>Tableau 10 :</b> Description des conditions chromatographiques pour l'extraction des caroténoïdes et vitamines E des margines .....	77
<b>Tableau 11 :</b> Conditions d'analyses en HPLC pour la détection des composés phénoliques .....	79
<b>Tableau 12 :</b> Conditions de spectrométrie de masse (MS) par composé recherché .....	80
<b>Tableau 13 :</b> Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque .....	87
<b>Tableau 14 :</b> Critères de répartition des vaches en lot témoin et expérimental .....	95

N° du tableau	Page
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>Tableau 15</b> : Profile des huileries et de traitement des olives pendant le processus d'extraction de l'huile d'olive .....	100
<b>Tableau 16</b> : Caractéristiques physicochimiques des échantillons de margines .....	104
<b>Tableau 17</b> : Composition et contenu en caroténoïdes des margines ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de MS) selon la variété et le procédé de trituration des olives .....	106
<b>Tableau 18</b> : Composition et contenu en tocophérols des margines ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de MS) selon la variété et le procédé de trituration des olives .....	108
<b>Tableau 19</b> : Composés phénoliques des margines ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de MS) quantifiés par analyse en HPLC/MS selon la variété d'olive et le procédé d'extraction .....	110
<b>Tableau 20</b> : Contenu en composés phénoliques des margines (g/l) issues des variétés <i>Azzeradj</i> , <i>Chemlal</i> et <i>Sigoise</i> pressées par mode traditionnel ou 3-phases .....	114
<b>Tableau 21</b> : Composition chimique des margines issues du système continu à 3-phases et du foin de vesce-avoine (g/100 g de MS) .....	119
<b>Tableau 22</b> : Biodégradation <i>in vitro</i> des margines estimée par la production de biogaz et les paramètres fermentaires déterminés après 24h d'incubation (pH, N-NH <sub>3</sub> , AGV <sub>t</sub> , DMS et ME) .....	120
<b>Tableau 23</b> : Biodégradation <i>in vitro</i> des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine estimée par la production de biogaz et les paramètres fermentaires déterminés après 24h d'incubation (pH, N-NH <sub>3</sub> et DMS) .....	123
<b>Tableau 24</b> : Effets associatifs obtenus à partir de la biodégradation anaérobie des associations margines-foin de vesce-avoine .....	125
<b>Tableau 25</b> : Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés <i>Azerraj</i> , <i>Chemlal</i> et <i>Sigoise</i> sur la production de gaz ruminale cumulée <i>in vitro</i> .....	126
<b>Tableau 26</b> : Production laitière, taux butyreux et protéiques, urée et taux cellulaires des laits en fin de période expérimentale .....	135

## Liste des figures

N° de la figure	Page
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Figure 1</b> : Meule de granit à deux roues (a), presse hydraulique (b), scourtins contenant les grignons secs à la sortie de la presse (c) (Veillet, 2010) .....	12
<b>Figure 2</b> . Sortie d'une centrifugeuse 3-phases, à droite les grignons humides, à gauche l'émulsion huile/eau (Veillet, 2010) .....	13
<b>Figure 3</b> : Principaux processus d'extraction de l'huile d'olive (Dermeche et <i>al.</i> , 2013).	14
<b>Figure 4</b> : Avantages et inconvénients des systèmes de broyage (Veillet, 2010) .....	15
<b>Figure 5</b> : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation solide/liquide (Veillet, 2010) .....	16
<b>Figure 6</b> : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation huile/eau (Veillet, 2010) .....	17
<b>Figure 7</b> : Classification du $\beta$ -carotène parmi les grands groupes de pigments d'origine naturelle (Mouthon, 2000) .....	22
<b>Figure 8</b> : Structures des caroténoïdes (McQuinn et <i>al.</i> , 2015) .....	23
<b>Figure 9</b> : Structure des tocophérols et des tocotriénols (Chanforan, 2010) .....	26
<b>Figure 10</b> : Structure chimique de l'ion phénoxyde .....	30
<b>Figure 11</b> : Estomacs des ruminants .....	50
<b>Figure 12</b> : Voies biochimiques de la fermentation et de la production d'AGV (Cluvelier et <i>al.</i> , non daté) .....	56
<b>Figure 13</b> : Schéma de la digestion des lipides chez les ruminants (Cluvelier et <i>al.</i> , non daté) .....	57
<b>Figure 14</b> : Schéma de la digestion des matières azotées chez les ruminants (Cluvelier et <i>al.</i> , non daté) .....	59
<b>Matériel et méthodes</b>	
<b>Figure 15</b> : Courbe étalon des sucres totaux .....	84
<b>Figure 16</b> : Courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal .....	88
<b>Figure 17</b> : Courbe étalon correspondant aux dosages des phénols totaux .....	89
<b>Figure 18</b> : Courbe étalon correspondant aux dosages des tannins totaux .....	90
<b>Figure 19</b> : Courbe étalon correspondant au dosage des tannins condensés .....	91
<b>Figure 20</b> : Courbe étalon correspondant aux dosages des flavonoïdes totaux .....	91
<b>Figure 21</b> : Courbe étalon correspondant au dosage des tanins totaux mesurés par la	

méthode de diffusion radiale .....	92
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>Figure 22</b> : Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés <i>Azerradj</i> , <i>Chemlal</i> et <i>Sigoise</i> sur le pH du milieu fermentaire enregistré après 24h d'incubation...	129
<b>Figure 23</b> : Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés <i>Azerraj</i> , <i>Chemlal</i> et <i>Sigoise</i> sur la production en azote ammoniacal du milieu fermentaire après 24h d'incubation.....	130
<b>Figure 24</b> : Valeurs de quelques paramètres physico-chimique des margines et leur évolution au cours de la période expérimentale .....	131
<b>Figure 25</b> : Composition et teneur en caroténoïdes et tocophérol des margines .....	133
<b>Figure 26</b> : Composition et teneur en micro-constituants vitaminiques des margines pendant la période expérimentale .....	134
<b>Figure 27</b> : Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en caroténoïdes du lait .....	137
<b>Figure 28</b> : Effet de la supplémentation en margines sur la teneur en vitamines A et E du lait .....	138
<b>Figure 29</b> : Composés phénoliques identifiés dans le lait de vache avant la supplémentation en margines.....	139
<b>Figure 30</b> : Chromatogramme des composés phénoliques du lait de vache après la supplémentation en margines .....	140
<b>Figure 31</b> : Superposition des chromatogrammes des laits de mélange, en rouge mélange des laits de vaches du lot margine ; en bleu mélange des laits de vaches témoin .....	141

# Introduction générale

Aujourd'hui, près d'un milliard d'oliviers (*Olea europaea L.*) sont cultivés à travers le monde sur presque tous les continents et ils occupent une superficie de 10 millions d'hectares. Dans la région Méditerranéenne se trouvent 98% de la superficie cultivée et des arbres en production (Wiesman, 2009). Il existe plus de cent variétés d'oliviers, cultivées pour produire des olives qui auront l'une des deux utilisations principales suivantes : la première est l'utilisation en tant que fruit entier ou encore appelée "olives de table", la seconde est pour la production d'huile d'olive. La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10 % de la récolte totale d'olives. La grande majorité des olives est donc destinée à la fabrication de l'huile d'olive, dont la production a atteint un record de 3,1 millions de tonnes pour la campagne 2011-2012, selon les estimations du Conseil Oléicole International (COI, 2012). La région Méditerranéenne à elle seule fournit 97% de la production totale mondiale. Grâce à ses vertus sanitaires et nutritionnelles, la consommation de l'huile d'olive n'a cessé d'augmenter, avec une répercussion sur sa production qui s'est accrue de 40% à travers le monde dans la dernière décennie (Dermeche et *al.*, 2013).

L'Algérie compte parmi les principaux pays producteurs de l'huile d'olive. L'oléiculture est la première richesse arboricole du pays, elle constitue une source de subsistance pour plusieurs familles. Selon les statistiques de l'Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne Algérien (ITAFV, non daté), l'oléiculture Algérienne a enregistré, entre 1999 et 2014, une croissance de 130% en termes de superficie passant de 165.000 hectares à 380.000 ha, tandis que la production d'huile d'olive est passée de 19.000 tonnes à 45.000 tonnes, avec des pics atteignant 74.000 tonnes. L'entrée en production des nouvelles plantations (215.000 ha) devrait hisser la production à 120.000 tonnes d'huile à l'horizon 2020. Quant à la production d'olives de table, elle est passée de 80.000 tonnes sur la période 1990-1999 à 200.000 tonnes actuellement et devrait atteindre 300.000 tonnes en 2020. En effet, des investissements ont été consentis dans le cadre de plusieurs programmes nationaux pour la réhabilitation des oliveraies et la modernisation de l'industrie oléicole. Parallèlement, les surfaces agricoles destinées à l'oléiculture ont été augmentées depuis la fin des années 90, permettant de ce fait, une forte augmentation de la production (Mendil, 2009). A terme, cela devrait permettre de créer de nouveaux centres d'activité économique dans des zones défavorisées du territoire (steppiques, sahariennes et sub-sahariennes) et de réduire l'importation des autres huiles de table.

Typiquement, l'extraction de l'huile d'olive se déroule en trois étapes : (i) le broyage des olives, où les cellules du fruit éclatent ce qui permet la libération de l'huile ; (ii) le malaxage, étape pendant laquelle la pâte est mélangée lentement pour augmenter le rendement en huile, et ; (iii) la séparation de l'huile, où l'huile est extraite/séparée des sous-produits qui en résultent.

Cette dernière étape peut être effectuée selon l'un des procédés d'extraction suivants: i) le système de presse ou de super presse, correspond à la production traditionnelle de l'huile d'olives selon un procédé discontinu, ii) le système de centrifugation à deux ou iii) trois phases, qui sont les plus modernes. L'eau est ajoutée dans certaines de ces étapes pour améliorer le rendement de l'extraction. Le mélange entre l'eau de végétation, naturellement contenu dans les olives et l'eau ajoutée au cours du procédé est appelé "margine". Seuls les systèmes de presse ou de centrifugation à 3-phases génèrent des margines. Même si ces deux processus sont moins respectueux à l'environnement, ils sont encore largement en cours d'utilisation, en particulier autour de la zone méditerranéenne où ils induisent la production de grands volumes de margines, estimés à 30 millions de m<sup>3</sup>/an (El-Abbassi et *al.*, 2012a) pendant une très courte période de l'année allant de novembre à février.

Les margines sont considérées comme l'un des effluents les plus nocifs produits par les industries agro-alimentaires (Cardinali et *al.*, 2010) en raison de leur charge polluante et de leur toxicité pour l'ensemble de l'écosystème (plantes, microorganismes et organismes aquatiques et aériens) due à leur pH acide, et leur richesse en matière organique, en particulier en polyphénols (El-Abbassi et *al.*, 2012b ; Dermeche et *al.*, 2013). Il a été évalué qu'elles sont 200-400 fois plus toxiques que les eaux usées municipales (Cossu et *al.*, 1993). Par conséquent, 10 millions de m<sup>3</sup> de cet effluent liquide correspondraient à une charge équivalente des eaux usées générées par environ 20 millions de personnes (McNemara et *al.*, 2008). Ainsi, le traitement et/ou la valorisation des margines constitue un enjeu majeur des pays Méditerranéens.

De nombreuses pistes de détoxification ou de valorisation (physiques, chimiques et biologiques ou leurs combinaisons) des margines ont été ou sont explorées actuellement visant à rendre les margines moins toxiques ou plus faciles à traiter : adsorbant des rejets de l'industrie textile (Meski et *al.*, 2012), fongicide (Yangui et *al.*, 2010), source d'amendement des sols (Mechri et *al.*, 2010), production de biogaz (Oz et Uzun, 2015), de composte (Aviani et *al.*, 2010) ou comme source d'énergie (Mann et *al.*, 2010), de pectine (Aouidi et *al.*, 2009) ou d'antioxydants (Gerasopoulos et *al.*, 2015). Ces méthodes sont toutefois limitées parce qu'elles sont soit trop coûteuses pour trouver une large application ou inefficaces pour répondre aux normes strictes des effluents et pourraient générer d'énorme quantité de boues encore plus difficile à gérer (Nassar et *al.*, 2014). Une autre piste serait de les valoriser par distribution aux animaux d'élevage, particulièrement à des ruminants.

A notre connaissance, trois essais dans ce sens ont été réalisés et leurs résultats diffusés. Dans le premier cas, les margines ont été distribuées sous forme d'eau de boisson à des volailles (Fedeli & Camurati, 1981) ce qui semble avoir permis de réduire les coûts de production et la mortalité des animaux. Dans le second cas, les margines ont été distribuées à des brebis de 18 mois (jusqu'à 40 % de la matière sèche (MS) de la ration ; Gasa *et al.*, 1991). Les résultats montrent que l'ingestion volontaire de la MS n'a pas été affectée par le niveau d'inclusion des margines et que celles-ci peuvent être distribuées chez les animaux à l'entretien. Enfin, plus récemment, distribuées pendant 3 mois à hauteur de 5 % dans l'alimentation de truites en croissance, les margines ont entraîné une réduction de la croissance (probablement par un effet antinutritionnel des polyphénols sur les protéines de la ration), une modification de la formule sanguine et une augmentation des quantités de récepteurs aux œstrogènes ce qui pourrait indiquer une activité phyto-œstrogénique de ces composés et avoir des conséquences sur la reproduction et les fonctions sexuelles des animaux à long terme (Sicuro *et al.*, 2010). Cependant, aucune anomalie n'a alors pu être détectée sur la physiologie et l'activité digestive. Néanmoins, le risque pourrait bien être nettement moins élevé chez les ruminants que chez d'autres espèces. En effet, il est bien admis que les polyphénols peuvent subir des remaniements moléculaires lors de leur passage dans le tube digestif, sous l'action des microorganismes. Chez les Monogastriques (dont l'Homme), ces transformations interviennent au niveau du colon (Selma *et al.* 2009) où seule une fraction des polyphénols ingérés parvient, ceux-ci pouvant être absorbés dès l'intestin grêle. Au contraire, chez les Ruminants, les biotransformations digestives (qui permettraient la réduction voire la perte de la toxicité des polyphénols) sont beaucoup plus précoces dans le tractus puisqu'elles sont localisées majoritairement dans le rumen ce qui rend la distribution des margines dans la ration des ruminants envisageable.

De nombreuses études sont réalisées pour évaluer les effets des composés biologiquement actifs (dont les polyphénols) présents dans les huiles essentielles sur les fermentations ruminales (Calsamiglia *et al.*, 2007). A notre connaissance, seuls les travaux de Dickinson *et al.* (1988) ont permis de bien décrypter la bioconversion de la formononétine en daidzéine (par déméthylation) puis en équol (par réduction) par les microbes ruminants et représentent une référence en la matière. Néanmoins, ces résultats obtenus pour des isoflavones ne peuvent pas être généralisés ou même simplement extrapolés à d'autres polyphénols végétaux de structure chimique très différente comme les dérivés du tyrosol (hydroxytyrosol et oleuropéine), majoritaires dans les margines d'olives. Le comportement digestif de ces derniers a été exploré chez l'Homme par Corona *et al.*, (2006). Ainsi, l'oleuropéine est rapidement déglycosylée et convertie en tyrosol et hydroxytyrosol dans l'estomac. Ces 2 composés sont absorbés tels quels par la paroi de l'intestin

et transformés en dérivés O-méthylés, glucuronidés ou glutathionylés. Ces molécules et leurs dérivés ont, chez les Monogastriques, des effets bénéfiques pour la santé, principalement dans le cadre de la lutte contre le stress oxydant. Néanmoins, le devenir de ces composés dans le rumen reste inconnu à l'heure actuelle et les résultats obtenus chez les monogastriques ne peuvent donc pas s'appliquer directement à la vache laitière, par exemple, puisqu'on ne sait pas si les molécules qui résultent de leur biotransformation ruminale présentent la même biodisponibilité pour l'animal et les mêmes propriétés biologiques. De plus, leur transfert à la glande mammaire et leur sécrétion dans le lait pourraient être possibles puisqu'il a été récemment décrit que la composition des composés phénoliques présents dans le lait pouvait refléter la composition de la ration des vaches (Besle et *al.*, 2010). L'addition de margines dans la ration des vaches pourrait modifier la composition en phénols du lait et par conséquent sa qualité nutritionnelle, soit par la présence du tyrosol et de l'hydroxytyrosol s'ils sont capables de résister au séjour dans le rumen, soit par la présence de certains de leurs dérivés résultant des bioconversions digestives d'une part et/ou du métabolisme animal d'autre part (Corona et *al.*, 2006).

Notre hypothèse de travail est que les margines pourraient être utilisées comme supplément alimentaire qui apporterait aux vaches des composés phénoliques ou vitaminiques permettant d'améliorer entre autre la valeur nutritionnelle du lait. Les facteurs régissant la composition des margines sont mal caractérisés (Sicuro et *al.*, 2010) bien qu'ils soient un préalable à une valorisation à grande échelle. Ce travail avait pour **objectifs** :

- 1) D'estimer la variabilité de composition des margines en fonction du procédé de production oléicole et de la variété d'olives.
- 2) D'étudier la biodégradation anaérobie des margines et de leurs extraits phénoliques bruts par le microbiote du rumen.
- 3) D'étudier la possibilité de distribuer des margines à des vaches laitières.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons mené dans une première partie une étude sur les techniques de fabrication de l'huile d'olive, des méthodes les plus traditionnelles aux systèmes continus actuels afin de comprendre les mécanismes d'extraction et d'identifier les opérations unitaires qui ont le plus d'influence sur la composition qualitative et quantitative des margines. Nous avons aussi démontrée, à travers une synthèse des données de la littérature, qu'il y a une grande variabilité de la composition chimique des margines. A la fin de cette première partie, nous avons décrits les différentes filières de valorisation des margines en mettant l'accent sur l'utilisation en alimentation animale, en passant par leurs impacts environnementaux.

Dans une seconde partie, nous avons mis en place un protocole d'étude destiné à évaluer la variabilité de composition des margines selon le procédé d'obtention de l'huile (presse ou centrifugation à 3-phases). Pour cela, nous avons sélectionné une quinzaine d'unités de production oléicoles réparties dans 4 wilayas de l'est Algérien : Constantine, Guelma, Skikda et Batna. Les conditions de production (variétés d'olives, temps et modes de conservation des olives, des margines,...) ont été déterminées par voie d'enquête à l'huilerie lors du prélèvement.

La finalité de ce travail est la valorisation des margines de l'huile d'olives par distribution aux Ruminants, capables d'en assimiler les polyphénols permettant ainsi leur détoxification. Les margines ont été distribuées à des vaches laitières en production en complément de rations à base de fourrages classiquement distribués en Algérie, le foin de vesce-avoine. Les effets sur les performances de production et la composition fine du lait (composés phénoliques mais aussi caroténoïdes et vitamines A et E) ont été déterminés par comparaison à des vaches recevant la même ration fourragère sans le supplément de margines.

Les concentrations des composés (vitaminiques et phénoliques) des margines et des laits sont déterminées après extraction et purification par des solvants organiques suivies des analyses par chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC) pour les vitamines et chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour les composés phénoliques, couplées à des analyses spectrométriques d'absorbance (détecteur à barrette de diodes) et de spectroscopie de masse (MS).

En troisième partie, les résultats sont présentés et discutés en les comparant à ceux publiés dans la littérature scientifique.

Enfin, dans la conclusion générale, nous tentons de mettre en avant les points importants apportés par notre travail, ainsi que nos perspectives.

Chapitre 1  
Synthèse  
bibliographique

## I. Généralités sur l'olivier

### 1.1. Origine de l'olivier

L'olivier est parmi les plus vieux arbres cultivés dans le monde (Liphschitz et *al.*, 1991). Les premiers vainqueurs des jeux olympiques au 7<sup>e</sup> siècle avant Jésus Christ se voyaient couronnés de rameaux d'olivier et recevaient des jarres d'huile d'olive en récompense de leurs performances. De tout temps l'olivier a été associé à des vertus telles que la sagesse, la paix, la victoire, la richesse, la fertilité et la fidélité (Fiorino et Nizzi Griffi, 1992).

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

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

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. En effet, l'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre Algérie et Rome, durant l'époque romaine et constituait l'une des bases essentielles des activités économiques des populations rurales. Des historiens et géographes, tels que Polybe au I<sup>er</sup> siècle avant J.-C., Idrissi au X<sup>e</sup> siècle et Marmole au XVI<sup>e</sup> siècle, décrivaient avec admiration les olivettes qui assuraient la prospérité de l'Algérie. De nos jours nous rencontrons, dans certains coins reculés des hauts plateaux dénudés de toute végétation pérenne, de nombreux vestiges de pressoirs d'olives datant de l'époque Romaine (Alloum, 1987).

### 1.2. L'oléiculture en Algérie

L'oléiculture est la première richesse arboricole de l'Algérie. Elle constitue une source de subsistance pour de nombreuses familles. L'olivieraie occupe 45% du verger arboricole total et compte 32 millions d'arbres dont 80% sont destinés à la production d'huile d'olive (Mendil, 2009), estimée à 55.000-70.000 tonnes/an (Vossen, 2013).

**Tableau 1 :** Orientations variétales de l'olivier en Algérie (Loussert et Brousse 1978 ; COI, 2000 *In* Benrachou (2013) ; Mendil et Sebai, 2006).

Variétés	Aire de culture	Destination	Rendement en huile (L/100kg d'olives)	Caractéristiques
<i>Aberkane</i>	Kabylie	Table + Huile	-	-
<i>Ascolana</i>	Ouest	Table	-	Fertilité excellente et régulière. Bonne rusticité de l'arbre. Résiste au froid.
<i>Azerraj</i>	Petite Kabylie	Table + Huile	24-28	Très bon pollinisateur de <i>Chemlal</i> . Arbre rustique, résistant à la sécheresse, gros fruit (5g), de forme allongée.
<i>Blanquette</i>	Originaire de Guelma, assez répandue dans le Nord-est (Constantine, Skikda, Guelma)	Table + Huile	18-22	Tardive, vigueur moyenne, résistante au froid et moyennement à la sécheresse, fruit moyen de forme ovoïde, multiplication par bouturage herbacé de 43.3%.
<i>Bouchouk la Fayette</i>	Intéressante pour la région de Bougaâ	Table + Huile	-	Intéressante pour la région de Bougaâ.
<i>Boukhenfas</i>	Centre-nord	Huile	-	-
<i>Bouricha, Olive d'El Harrouche</i>	Collo-Oued El Kebir, d'El Harrouche, Skikda.	Huile	18-22	Cultivée dans les régions à forte pluviométrie. Rustique, résistante au froid et à la sécheresse, fruit de faible poids, de forme allongée.
<i>Chemlal Syn. Achemlal</i>	Kabylie, s'étend du Mont-Zekkar à l'ouest aux Bibans à l'est	Huile	18-22	Huile très appréciée, résiste en culture sèche. Inconvénients: autostérile, floraison tardive. Fruit de poids faible (2g et ½) de forme allongée.
<i>Coratina</i>	Centre et Est	Huile	-	Variété italienne très rigoureuse et très productive.
<i>Cornicabra</i>	Ouest Algérien (Oranie, Tlemcen)	Table + Huile	-	Très bon pollinisateur de <i>Sigoise</i> , originaire d'Espagne.
<i>Dahbia ou Dabha</i>		Huile	-	Bonne résistance au froid.
<i>Ferkani, Fefane</i>	Ferfane (Tébessa), diffusée dans la région des Aurès	Huile	28-32	Vigueur moyenne, résistante au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme allongée, taux d'enracinement de boutures herbacées de 52.30%, variété en extension en régions steppiques et présaharienne.
<i>Frontoio, Frantoiano, correglio, Razzo</i>	Centre et Est	Huile	-	Variété italienne, bon pollinisateur de <i>Chemlal</i> . Facilité d'adaptation, excellente résistance au froid. Olive de taille moyenne, allongée. Huile de grande qualité.
<i>Hamma de Constantine, Grosse de Hamma, syn. Quelb Ethour</i>	Hamma, Constantine	Table + huile	16-20	Meilleure variété de la région constantinoise pour la conservation, nécessite des irrigations. Précoce, rustique, résistante à la sécheresse, très gros fruit de forme allongée.

Le potentiel oléicole est concentré dans les régions montagneuses et se répartit principalement dans trois régions : le Centre nord, principalement Tizi-ouzou, Bouira et Bejaia avec 54,3 % de la surface totale, l'Est (Jijel, Guelma, Skikda, et Mila) avec 28,3 % et l'Ouest qui occupe à peine 17% (Tlemcen, Sig et Mascara). La plupart des oliveraies (80 %) est donc cultivée sur des terrains accidentés et marginaux, peu fertiles et caractérisés par une pluviométrie moyenne comprise entre 400 et 900 mm/an. Le reste (20 %) est situé dans les plaines occidentales où la pluviométrie moyenne annuelle est de 300-400 mm. A noter que les olives des régions Centre et Est sont destinées à la production de l'huile, alors que celles de l'Ouest sont pour la conserverie.

La production d'huile d'olives est une activité traditionnelle en Algérie. L'activité compte près de 1650 huileries, dont seulement 165 huileries modernes (Vossen, 2013). Dans ce contexte, l'Algérie vise à moderniser le secteur de l'huile d'olive afin d'améliorer la qualité et la quantité du produit à travers plusieurs programmes nationaux.

### **1.3. Profil variétal de l'olivier en Algérie**

D'après Hauville (1953) *In* Dominguez-Garcia et al. (2012), l'Algérie dispose de 150 cultivars d'olives représentés majoritairement par des arbres vieux, cultivés localement et utilisant des critères locaux pour leur appellation. Ces critères peuvent refléter des caractères morphologiques ou agronomiques, comme par exemple la période de maturation du fruit (exemple "*Chetoui*"; maturation tardive d'hiver) ou leur site d'origine (exemple "*Chemlal*" de Kabylie). Dans une étude récente, basée sur des données morphologiques et agronomiques, ont été reconnus seulement 36 cultivars (Mendil et Sebai, 2006 *In* Dominguez-Garcia et al., 2012). Les principales variétés cultivées en Algérie (locales et introduites) ainsi que leur répartition sont données dans le tableau 1.

Suite du tableau 1

Variétés	Aire de culture et importance	Destination	Rendement en huile (l/100kg d'olives)	Caractéristiques
<i>Limli</i>	Originnaire de Sidi-Aïch, Dejaïa, localisée sur les versants montagneux de la basse vallée de la Soummam jusqu'au littoral.	Huile	20-24	Conseillée dans la région de jijel à Sidi-Aich. Précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse ; petit fruit (2g) de forme ovoïde.
<i>Longue de Miliana</i>	Originnaire de Miliana (Centre), localisée dans El Khemis, Cherchel et le littoral de Tnès(Ouest)	Table +Huile	16-20	Précoce, sensible au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme ronde.
<i>Neb Djmel</i>	Sud Est Algérien	Table + Huile	-	Variété des régions présaharienne
<i>Picholine Marocaine</i>	Ouest du pays	Huile	-	Très commune avec la <i>Sigoise</i> (même caractère)
<i>Ronde de Miliana</i>	Centre et Ouest	Table +Huile	-	Très localisée dans la région de Miliana
<i>Rougette ou Roussette, syn. Hamra</i>	Originnaire de Jijel (Est) diffusé au nord Constantinois.	Huile	18-22	Précoce, résistante au froid et à la sécheresse, fruit ovoïde de faible poids, taux d'enracinement très faible. Coexiste en mélange avec <i>Blanquette</i> .
<i>Rougette de Mitidja</i>	Plaine de Mitidja	Huile	18-20	Rustique, fruit moyen de forme allongée, taux d'enracinement des boutures herbacées de 48,30%,
<i>Sevillane ou Gordale</i>	Ouest (Plaine d'Oran)	Table	-	Importée d'Espagne. Très intéressante par le gros calibre des fruits
<i>Sigoise, olive de Tell ou picholine Marocaine.</i>	Ouest Algérien (Oranie, Tlemcen).	Table + Huile	18-22	Très estimée pour la conservation et l'huilerie, rustique, peu résistante au froid. rendement élevé en huile, variété auto-fertile. Fruit assez gros (3-3,5g), ovoïde
<i>Souidi</i>	Valée d'Oued Arab, Chachar, Khenchla	-	16-20	Variété tardive, résistante au froid et à la sécheresse, fruit moyen de forme allongée, taux d'enracinement très faible.

- Données non disponibles

**NB :** On représente dans ce tableau, seulement les variétés les plus importantes. Il existe plusieurs variétés. Cependant, une même variété peut avoir différentes dénominations suivant les régions (Loussert et Brousse 1998, *In* Benrachou, 2013).

## **II. Technologie de fabrication de l'huile d'olive**

### **2.1. Synoptique de fabrication d'huile d'olives**

L'huile d'olive est une huile obtenue à partir du fruit de l'olivier, à l'exclusion des huiles obtenues par extraction avec des solvants, par des procédures de ré-estérification, ou par n'importe quel mélange avec d'autres types d'huiles (Veillet, 2010). A la différence des autres huiles végétales, l'huile d'olive ne requiert aucune étape de raffinage ni aucune transformation chimique. Grâce à cette simplicité procédurale, l'huile d'olive a pu être fabriquée depuis l'antiquité. La technique a subi de nombreuses évolutions au cours du temps qui peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les évolutions relatives au broyage des olives et les évolutions relatives à la séparation des différentes phases. Entre ces deux grandes étapes, la pâte d'olive est malaxée afin d'être homogénéisée et de permettre la coalescence des gouttelettes d'huile.

#### **2.1.1. Opérations préliminaires**

Lors de leur arrivée chez un moulinier, les olives sont pesées puis passent généralement dans un système de laveuse-effeuilleuse qui va les nettoyer et permettre d'en retirer les impuretés (terre, cailloux, feuilles...). Celles-ci peuvent d'une part, altérer les propriétés organoleptiques de l'huile (couleur, odeur, goût) et d'autre part, user les broyeurs métalliques.

#### **2.1.2. Le broyage**

Le broyage (ou trituration) des olives a pour but de détruire les cellules des olives afin que celles-ci puissent ensuite libérer leur contenu. A ce stade du procédé, les olives sont réduites en une pâte plus ou moins homogène qui devra être malaxée.

#### **2.1.3. Le malaxage**

Outre le rôle d'homogénéisation de la pâte, le malaxage permet la coalescence des gouttes d'huile : les microgouttelettes d'huile qui viennent d'être libérées de leurs lipovacuoles cellulaires vont se regrouper afin de former des gouttes de plus grande taille qui seront plus faciles à extraire de la pâte.

### **2.1.4. Séparation des phases**

#### **2.1.4.1. Séparation des phases liquides-solides**

La pâte malaxée va ensuite être pressée ou centrifugée horizontalement afin de séparer les phases solides et liquides. La phase solide contient les restes des noyaux ainsi que la peau et la pulpe des olives dépourvue de son huile. Cette phase solide s'appelle "grignons" et constitue l'un des deux principaux coproduits de la fabrication de l'huile d'olive.

#### **2.1.4.2. Séparation des phases liquides-liquides**

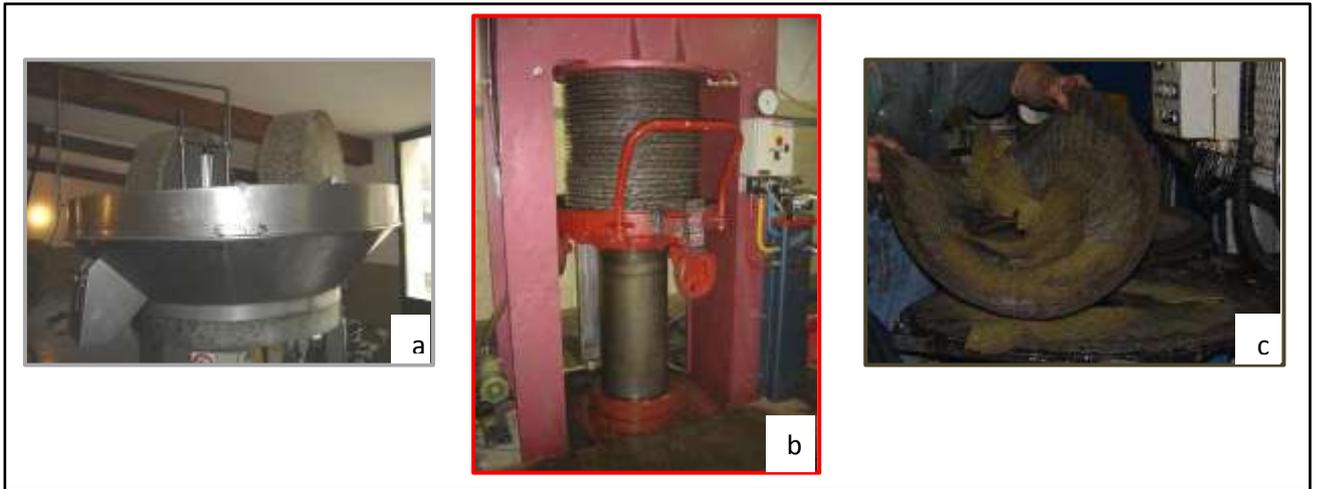
La phase liquide est un mélange d'eau et d'huile qu'il faut séparer. Cela se fait soit par simple décantation gravitationnelle, soit par centrifugation. Dans les deux cas la phase aqueuse appelée "margines" est séparée de l'huile et constitue le second coproduit de la fabrication de l'huile d'olive.

## **2.2. Procédés d'extraction d'huiles d'olives**

### **2.2.1. Procédés en discontinu ou système à presse**

Le système de presse correspond à la production traditionnelle de l'huile d'olives selon un procédé discontinu. En effet, dans un premier temps, les olives sont broyées dans des moulins équipés de meules de granite : le poids de la pierre et sa rotation sur les olives vont détruire les olives et ainsi libérer le contenu cellulaire des drupes (figure 1a). Une pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ, composée de grignons et d'un moût contenant l'huile et les margines. Elle est transférée ensuite dans des scourtins (disques en fibre coco ou de nylon) placés dans la presse hydraulique qui va permettre la séparation des phases liquide ou solide (figure 1b). Alors que les grignons demeurent dans les scourtins, la phase liquide est collectée dans une cuve à décantation ou une centrifugeuse pour séparer la phase aqueuse (margines) et la phase organique (huiles). Cette opération dure environ 45 minutes. Comme peu ou pas d'eau est ajoutée au cours du procédé utilisant la presse, ces grignons sont dits "secs" (figure 1c), par opposition aux grignons humides obtenus par d'autres procédés.

Certaines huileries font appel à un cycle de double pression, aussi appelé "système super presse". Le procédé marche sans ajout d'eau. Les margines sont alors constituées principalement des eaux de végétation, auxquelles s'ajoutent les eaux de lavage. Ce procédé conduit aux margines les plus concentrées.



**Figure 1** : Meule de granit à deux roues (a), presse hydraulique (b), scourtins contenant les grignons secs à la sortie de la presse (c) (Veillet, 2010)

### 2.2.2. Procédés en continu ou système à centrifugation

Le progrès technologique a permis le développement de systèmes automatisés et moins fastidieux que les presses : il s'agit des centrifugeuses horizontales à 2 ou à 3 phases, aussi improprement nommées décanteurs. Les centrifugeuses horizontales à 3 phases ont été les premières à être développées.

#### 2.2.2.1. Système d'extraction par centrifugation à trois phases

Il s'agit d'un système de type mouture/centrifugation à trois phases. Le broyage est réalisé par des broyeurs mécaniques à marteaux, couteaux ou disques. Ces broyeurs, placés sur un axe entraîné par un moteur électrique à une vitesse de 1000 à 3000 tours par minute, fonctionnent en continu et la pâte est alors obtenue instantanément. Les broyeurs métalliques ont tendance à augmenter l'émulsion entre l'huile et l'eau, par conséquent le temps de malaxage et/ou le nombre de bacs de malaxage sont plus importants que pour les systèmes à meule de granit.

Le malaxage se fait par rotation lente d'une vis sans fin qui va retourner continuellement la pâte. Le temps de malaxage varie en général entre 15 et 30 minutes.

Les systèmes métalliques sont particulièrement adaptés pour des systèmes de production en continu. Dans ce cas, le moulinier n'a jamais à manipuler directement la pâte d'olive car celle-ci est convoyée automatiquement d'un appareil à un autre.

Une fois la pâte d'olive est homogénéisée et la coalescence est effectuée, l'étape suivante consiste en la séparation de la phase solide et de la phase liquide, la pâte est donc injectée par

une pompe dans une centrifugeuse dont l'axe est horizontal appelée décanteur. Il permet la séparation de la pâte en trois phases :

- Les grignons
- L'huile avec un peu d'eau
- Les margines avec un peu d'huile.

Les deux phases liquides n'étant pas bien séparées, elles sont regroupées et envoyées dans une centrifugeuse verticale. A la sortie de la centrifugeuse, on retrouve d'un côté des grignons très humides et de l'autre une émulsion huile/eau (figure 2).



**Figure 2 :** Sortie d'une centrifugeuse 3-phases,  
à droite les grignons humides,  
à gauche l'émulsion huile/eau  
(Veillet, 2010)

Le principal inconvénient de ce type de système est qu'il requiert un grand ajout d'eau pour fonctionner. L'eau ajoutée va se mélanger aux margines et donc grandement augmenter le volume de coproduits à éliminer. Le volume d'eaux résiduaire est 2 à 3 fois supérieur à celui produit par le système en discontinu, les margines sont, par conséquent moins concentrées.

#### **2.2.2.2. *Système d'extraction par centrifugation à deux phases***

Les avancées technologiques et une meilleure compréhension des phénomènes se passant au sein de la centrifugeuse ont permis de développer des centrifugeurs horizontaux à 2 phases. L'intérêt majeur de ce type de système est qu'aucune étape supplémentaire n'est requise après centrifugation : lorsque l'appareil est bien réglé, l'huile d'olive sera directement séparée des grignons humides. Ce décanteur à deux phases permet l'obtention de rendements en huile légèrement plus élevés que ceux obtenus par le décanteur conventionnel à trois phases et le système de presse. En outre, il n'entraîne pas d'augmentation du volume des margines. Ces trois principaux procédés d'extraction sont résumés dans la figure 3.

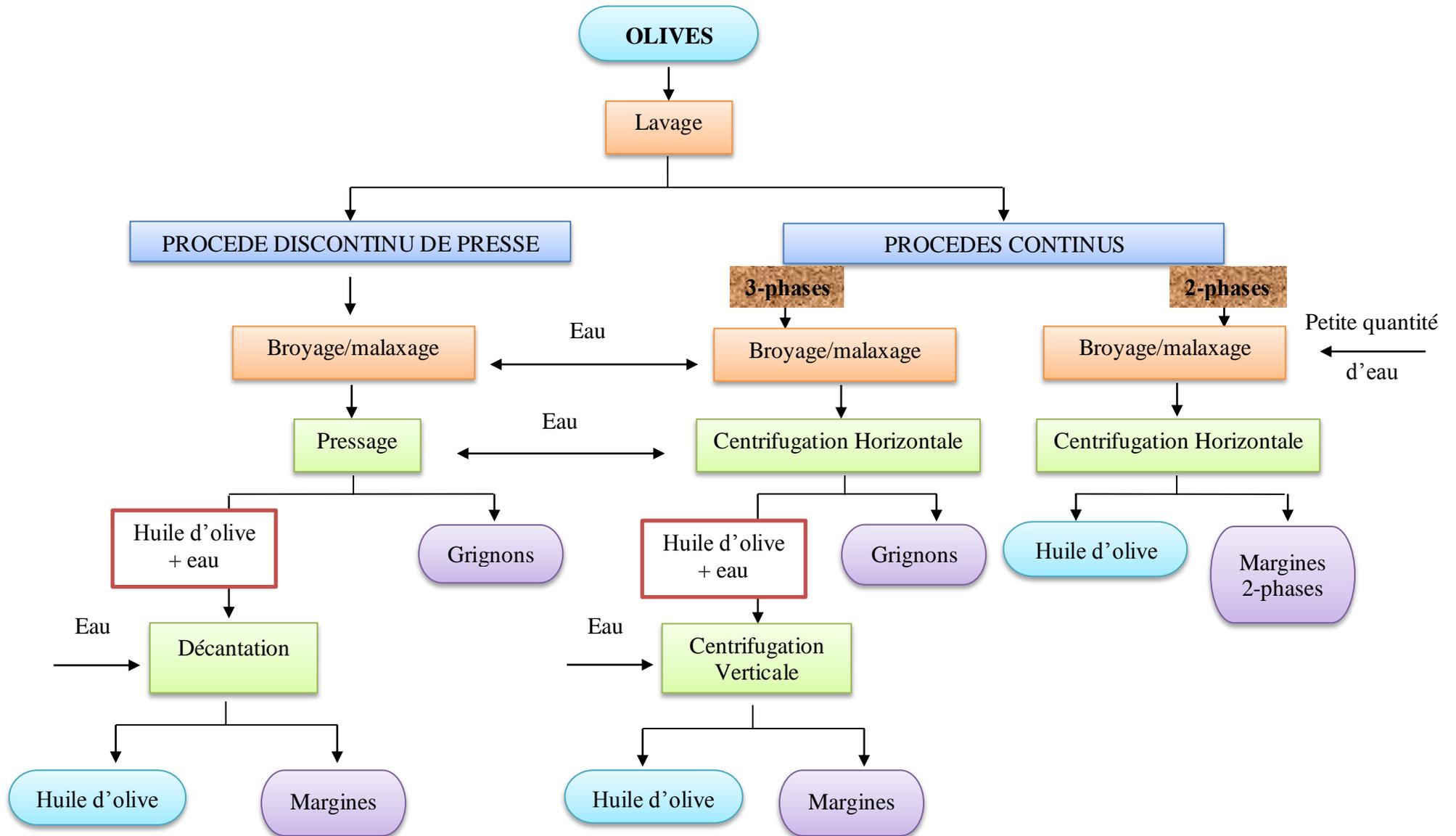
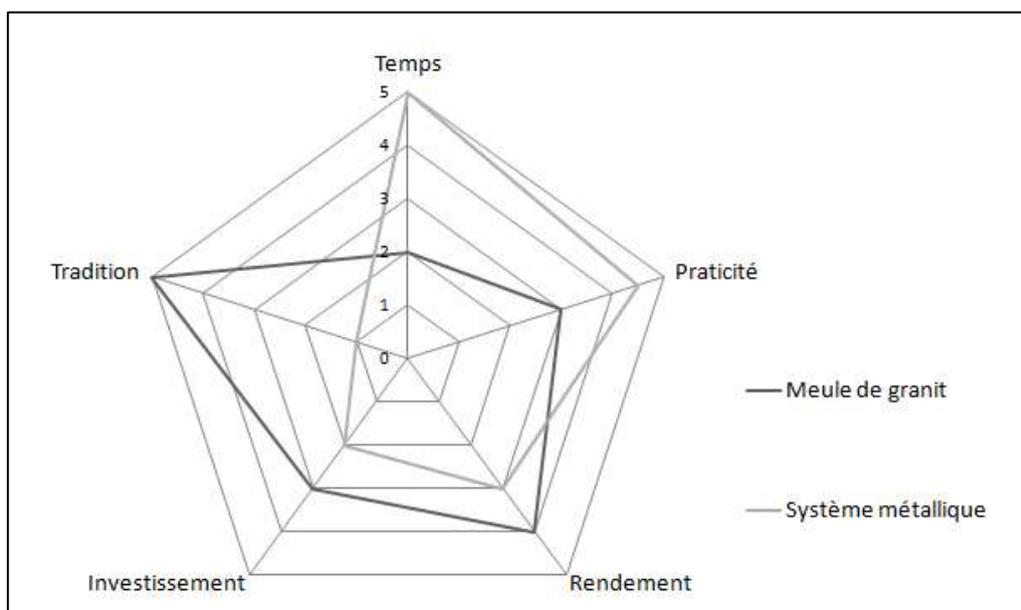


Figure 3 : Principaux processus d'extraction de l'huile d'olive

### 2.3. Avantages et inconvénients des techniques

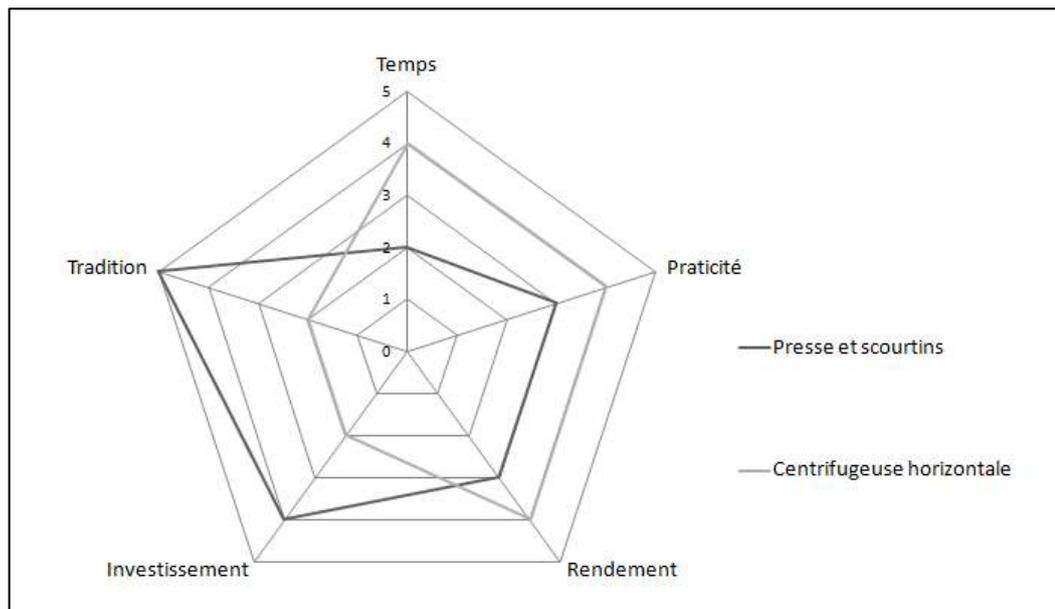
Si de nombreuses techniques sont disponibles sur le marché, c'est que chacune d'elles présente des avantages et des inconvénients. Tout d'abord concernant le procédé de broyage des olives : les deux types de systèmes à comparer sont les meules de granit et les systèmes métalliques dans leur ensemble.

La figure 4 est une représentation graphique en radar des avantages et inconvénients des deux systèmes : plus on se place sur l'extérieur de la toile (vers 5), plus le critère est favorable. Ce graphique met en avant la rapidité des systèmes métalliques et leur praticité. En effet, là où il faut 20 à 30 minutes de broyage pour un système de meules de granit, quelques secondes suffisent pour les broyeurs métalliques. De plus, ces systèmes s'intègrent mieux dans un procédé continu et l'encombrement du matériel est inférieur à celui des meules tournantes. Si on ne s'intéresse qu'au processus du broyage, les systèmes à meule pourraient donner de meilleurs rendements du fait de leur plus faible degré d'émulsion huile/eau. Ceci n'est pas réel dans les faits car les systèmes de centrifugation sont suffisamment puissants pour rompre cette émulsion et ne pas réduire les rendements. L'atout principal des meules tournantes est qu'elles rappellent les pratiques traditionnelles qui peuvent ensuite être valorisées sur les étiquettes : le consommateur a envie de produits naturels, faits de façon traditionnelle, donc les meules sont un réel atout d'un point de vue commercial pour les mouliniers.



**Figure 4 :** Avantages et inconvénients des systèmes de broyage (Veillet, 2010)

Dans les procédés traditionnels, les meules tournantes sont suivies d'un système de presse. Là encore l'impact visuel de ce type de procédé joue un rôle déterminant pour le consommateur, même si pour le moulinier ce système présente quelques désavantages par rapport aux systèmes plus modernes (figure 5). En effet, les centrifugeuses horizontales travaillent plus rapidement que la presse, prennent moins de place et surtout sont beaucoup plus faciles à intégrer dans un moulin en continu. Les installations à cycle continu permettent de réduire la main d'œuvre et d'augmenter la capacité de production globale d'huile d'olive. Des systèmes de convoyage de pâte par pompage existent entre le bac de malaxage et la centrifugeuse, ce qui évite toute manipulation de pâte pour le moulinier. Au contraire, dans les systèmes de presse, le moulinier a au minimum à vider les scourtins après la presse et les nettoyer régulièrement afin d'éviter les phénomènes de moisissure. L'autre intérêt des centrifugeuses est le faible temps de contact entre la pâte d'olive et l'air ambiant, ce qui limite les phénomènes d'oxydation de la pâte et donc de l'huile.



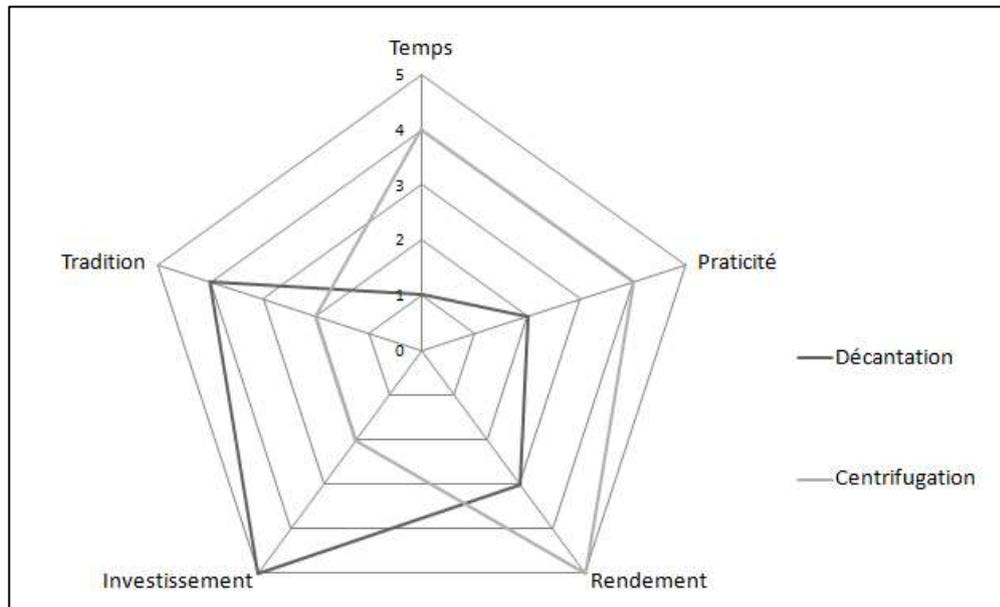
**Figure 5 :** Avantages et inconvénients des systèmes de séparation solide/liquide (Veillet, 2010)

Les mêmes critères de différenciation ont été utilisés pour évaluer les avantages et inconvénients des deux principaux systèmes de séparation de l'huile et de l'eau (figure 6). On peut constater que la centrifugation possède un réel avantage par rapport à la décantation en ce qui concerne le temps de séparation des phases. En effet l'huile n'a besoin que de passer quelques secondes dans la centrifugeuse pour être séparée des margines alors que selon le degré

d'émulsion, ce processus peut prendre plusieurs heures par décantation gravitationnelle. La centrifugation est également un atout pour rompre les émulsions générées par les systèmes de broyage métalliques et elle s'intègre très bien dans les systèmes de moulin en continu. L'investissement reste plus lourd que celui pour la simple décantation car dans ce cas seules des cuves avec une ou deux sorties sont nécessaires.

De même que pour l'utilisation des meules tournantes, l'utilisation de cuves de décantation fait appel aux aspects traditionnels de la fabrication de l'huile d'olive. Ce critère peut constituer un argument de vente s'il est mis en valeur par le moulinier.

Du point de vue environnemental, le système de centrifugation à 3 phases présente des inconvénients dus principalement à la consommation élevée d'eau chaude dont le volume peut parfois dépasser celui des olives mises en œuvre, ce qui se traduit par une production accrue de margines. Dans les systèmes traditionnels, l'extraction se fait sans addition significative d'eau, ce qui se répercute sur la charge des margines en matières organique et en suspension. En effet, les margines des unités traditionnelles sont plus chargées et plus concentrées que celles issues des unités modernes.



**Figure 6 :** Avantages et inconvénients des systèmes de séparation huile/eau  
(Veillet, 2010)

**Tableau 2:** Composition chimique des margines : valeurs moyennes, maximales et minimales selon les données de la littérature.

Paramètres /Unités	Valeurs			Références
	Moyennes $\pm$ écarts types	minimales	maximales	
pH	4,94 $\pm$ 0,43	3,6	5,08	1-4, 8, 22-23, 37-38, 43, 49-50, 58, 60, 65, 69, 83, 85, 89, 100-101, 117, 121-122, 127, 133-134, 136-137, 146, 148-150, 152-156, 159-161, 166, 173, 177, 185-186, 192, 215, 226, 230, 236, 242, 244, 249-250, 262, 265-267, 276, 281, 289-291, 305, 356, 364, 383, 404-405, 414-415,
Humidité (%)	88,74 $\pm$ 2,84	84,83	94,83	1, 146-148, 149, 173, 192, 215, 230, 265, 281, 291
MO (g/l)	60,50 $\pm$ 43,22	20	129,93	1, 37, 150, 262, 265-266,
MM (g/l)	16,42 $\pm$ 14,01	0,61	39	1, 2, 37, 127, 149, 150, 160, 166-167, 291
As (mg/l)	< 0,016	-	-	154, 305
B (mg/l)	4,18 $\pm$ 1,29	2,49	4,93	152,153, 266
Br (mg/l)	18,42	-	-	266
Ca (mg/l)	621,94 $\pm$ 449,94	60	1570	37, 60, 65, 149, 153- 154, 161, 265, 266, 267, 276, 291, 305, 411, 415,
Cd ((mg/l)	-	< 0,005	0,01	121, 161
Cl (mg/l)	916,93 $\pm$ 566,3	489	1990	1, 2, 37, 65, 150, 161, 265, 266, 267, 291, 415
Co (mg/l)	0,06 $\pm$ 0,06	0	0,04	153, 154, 155, 305
Cr (mg/l)	0,71 $\pm$ 0,86	0	2,5	121, 153, 154, 155, 161
Cu (mg/l)	0,76 $\pm$ 1,10	0	2,96	37, 60, 121, 152- 154, 161
Fe (mg/l)	38,99 $\pm$ 26,92	9,8	70	37, 60, 153- 155
HCO <sub>3</sub> (mg/l)	5200	-	-	37
Hg (mg/l)	-	< 0,0005	< 0,51	121, 161, 305
K ((mg/l)	6272,43 $\pm$ 6697,34	34700	1050,9	1, 2, 3, 22, 37, 38, 60, 65, 121, 133, 153- 154, 265- 267, 289- 291, 305, 411
Mg (mg/l)	328,2 $\pm$ 186,50	104	680	1, 37, 60, 121, 153-154, 161, 230, 265, 267, 291, 305, 411
Mn (mg/l)	151,52 $\pm$ 396,09	0,9	900	37, 60, 121, 153-155, 305
Mo (mg/l)	1,59 $\pm$ 0,74	0,34	1,88	153-155
Na (mg/l)	1048,62 $\pm$ 1146,91	70	4430	1, 2, 3, 37, 65, 121, 149,150, 153-154, 266-267, 411, 415

### III. Les margines

#### 3.1. Caractérisation chimique des margines

Les margines sont des sous-produits de la production d'huile d'olives obtenus lors de leur trituration au cours des procédés de centrifugation à 3 phases ou de presse. Cet effluent liquide, caractérisé par une intense couleur brun-violet ou brun-rouge à noir et une odeur de l'huile d'olive (Daassi et *al.*, 2014) est composé des eaux de végétation du fruit de l'olivier, des eaux du process (lavage et traitement) et une portion de la pulpe et de l'huile résiduelle (Lanciotti et *al.*, 2005).

La composition chimique typique générale des margines est donnée dans le tableau 2. Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 3,6 et 5,08, un pourcentage d'humidité de 84,83 à 94,83 %. Elles ont généralement une forte salinité due à l'ajout important de sel pour la conservation des olives (Tsioulpas et *al.*, 2002). La fraction minérale est comprise entre 0,61 et 39 g/l et constituée principalement de potassium, ce qui a conduit plusieurs chercheurs à tester leur pouvoir fertilisant. Les métaux lourds, tels que l'arsenic (As), le cuivre (Cu), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le sélénium (Se), le mercure (Hg) et le nickel (Ni) sont présents, pour la plupart à l'état de traces (tableau 2). La matière organique des margines, avec une concentration de 20 à 129,93 g/l, comporte :

- une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives, matières en suspension et colloïdales,
- une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient des sucres, lipides, acides organiques, pectines, composés phénoliques (Hamdi, 1991), vitamines et traces de pesticides (Kapellakis et *al.*, 2008).

Suite du tableau 2

Paramètres/ Unités	Valeurs			Références
	Moyennes ± écarts types	Minimales	Maximales	
Ni (mg/l)	21,05 ± 74,83	0,1	184	121, 153, 154, 155, 161, 305
P (mg/l)	253,13 ± 301,59	30	940	38, 60, 100-101, 121, 133, 146, 148, 152, 215, 262, 265, 411
Pb (mg/l)	2,01 ± 3,65	0	7,8	121, 153- 155, 161, 305
Se (µg/l)	< 0,16	-	-	305
Phosphates (mg/l)	664 ± 455,12	320	1330	1-3, 38, 166
Sulphates (mg/l)	877,24 ± 937,28	174,48	1500	1, 37, 266
Sulfures (mg/l)	Absent	-	-	1
Zn (mg/l)	6,76 ± 7,58	24	2,01	60, 121, 153-155, 262
Phénols totaux (mg/l)	5528,17 ± 2334,24	6650	215	1-4, 22, 37, 43, 50, 58, 60, 65, 69, 83, 89, 117, 121, 127, 133-134, 136, 146, 148, 153-154, 159-160, 161, 166, 173, 185-186, 236, 242, 244, 265, 289, 305, 321, 356, 364, 383, 404, 411, 414
Flavonoïdes (mg/l), dont	6670	-	-	127
Flavonols (mg/l)	70	-	-	127
<i>o</i> -diphénols (mg/l)	5070 ± 3442,83	1200	9200	83, 117, 133, 147, 291
Sucres totaux (mg/l)	12714 ± 11824	370	41650	38, 69, 83, 117, 121, 136, 146-148, 149, 154, 226, 244
Sucres réducteurs (mg/l)	22400 ± 11798	120	36300	1-2, 133, 159, 185, 242, 244
Arabinose (mg/l)	62,5 ± 63,64	30	130	154
Glucose (mg/l)	2880 ± 5210	765	12000	1, 133, 154, 289
Mannitol (mg/l)	40 ± 28,28	30	70	154
Xylose (mg/l)	550 ± 113	510	670	154
Protéines totales (g/l)	1,62 ± 0,52	0,99	2,6	2-3, 22, 38, 146-148, 185
MG (g/l)	6,02 ± 5,73	0,0015	21	1, 38, 69, 133, 146-147, 173,185, 230, 383, 404, 414-415
Azote totale (mg/l)	1018 ± 620	25,4	2900	1, 8, 22, 91, 100-101, 127, 133, 136, 151-152, 160, 161, 166, 215, 226, 244, 262, 265, 276, 281, 289-290, 321, 411
Ammoniaque (mg/l)	2356 ± 3740	170	7950	38, 85, 166, 305
Nitrates (mg/l)	96 ± 145	0,4	332,47	2-3, 38, 85, 161, 266, 305
Nitrites (mg/l)	5457 ± 9434	4	16350	2-3

## 3.2. Composés vitaminiques

Les vitamines sont définies comme un groupe de composés organiques complexes essentiels présents en petites quantités dans les aliments naturels et les produits alimentaires. Ils sont divisés en vitamines liposolubles, comme les vitamines A, D, E et K ou hydrosolubles (les vitamines B et C ; McDowell et *al.*, 2000).

### 3.2.1. Les caroténoïdes

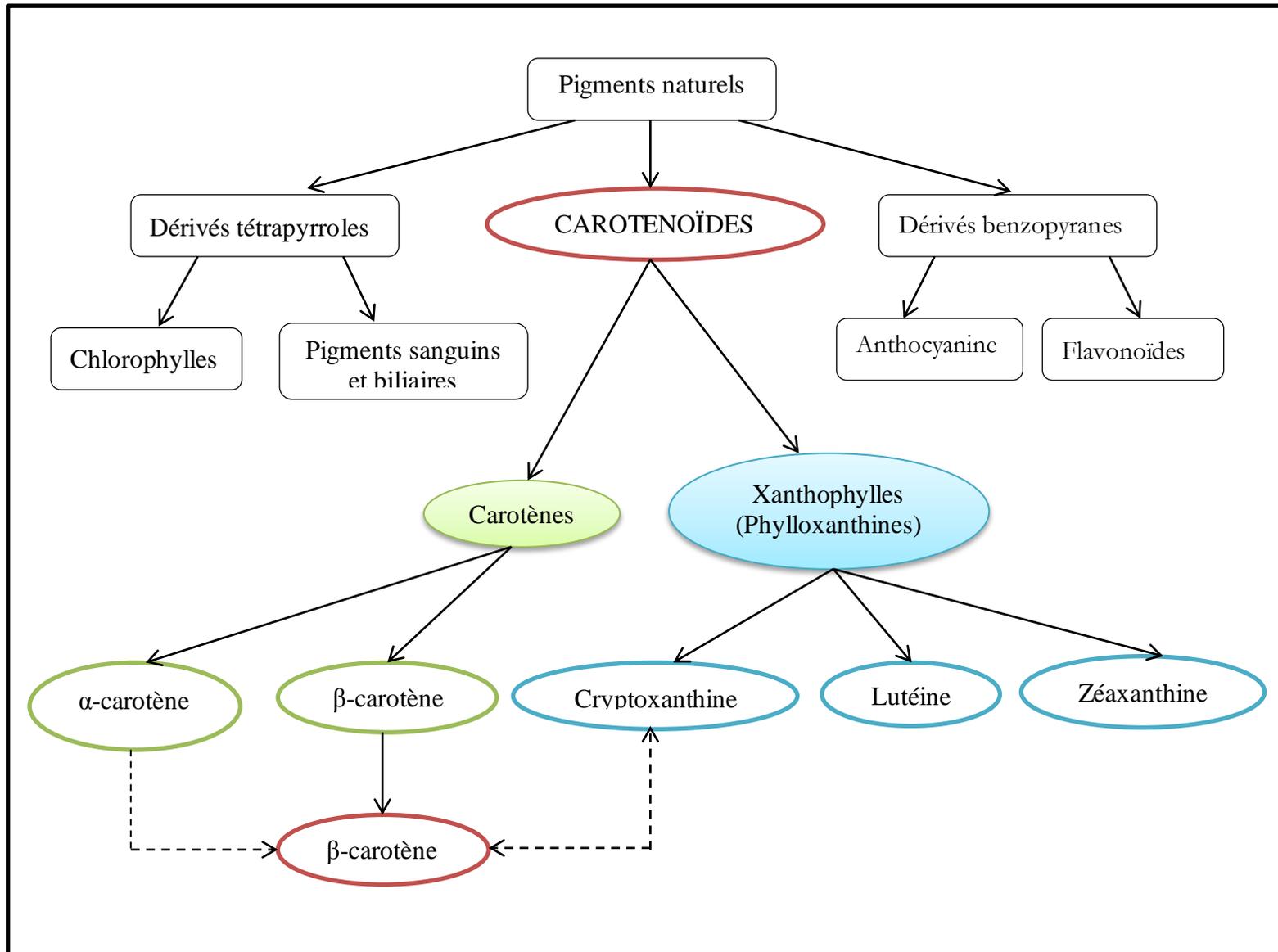
#### 3.2.1.1. Propriétés générales

Les caroténoïdes sont un des groupes principaux pigments d'origine naturelle (figure 7), largement répandus dans la nature et qui absorbent électivement la lumière. Ce sont des pigments montrant une grande diversité en terme de structure, et leur distribution est universelle dans la matière vivante, quel que soit le degré d'évolution et de complexité : on les retrouve des archéobactéries et procaryotes aux angiospermes, et des protozoaires aux mammifères (Cuttriss et *al.*, 2011).

Les xanthophylles, carotènes et lycopènes sont responsables, respectivement des colorations jaune, orange et rouge. Les caroténoïdes végétaux sont transférés aux produits animaux, parfois en grande quantité (jaune d'œuf ; Skřivan et Englmaierová, 2014), ou de manière moins importante, comme pour les produits issus des ruminants chez lesquels ils modifient la couleur du lait, des produits laitiers ou de la graisse corporelle (Kalaç & Samková, 2010). Les consommateurs sont sensibles à la coloration des produits, même si leurs préférences diffèrent selon les pays ou les régions. Une coloration jaune du lait est associée aux pâturages, ce qui, confère une connotation d'alimentation naturelle (Nozière et *al.*, 2006b). Ainsi, les caroténoïdes pourraient être des indicateurs d'élevage plein air.

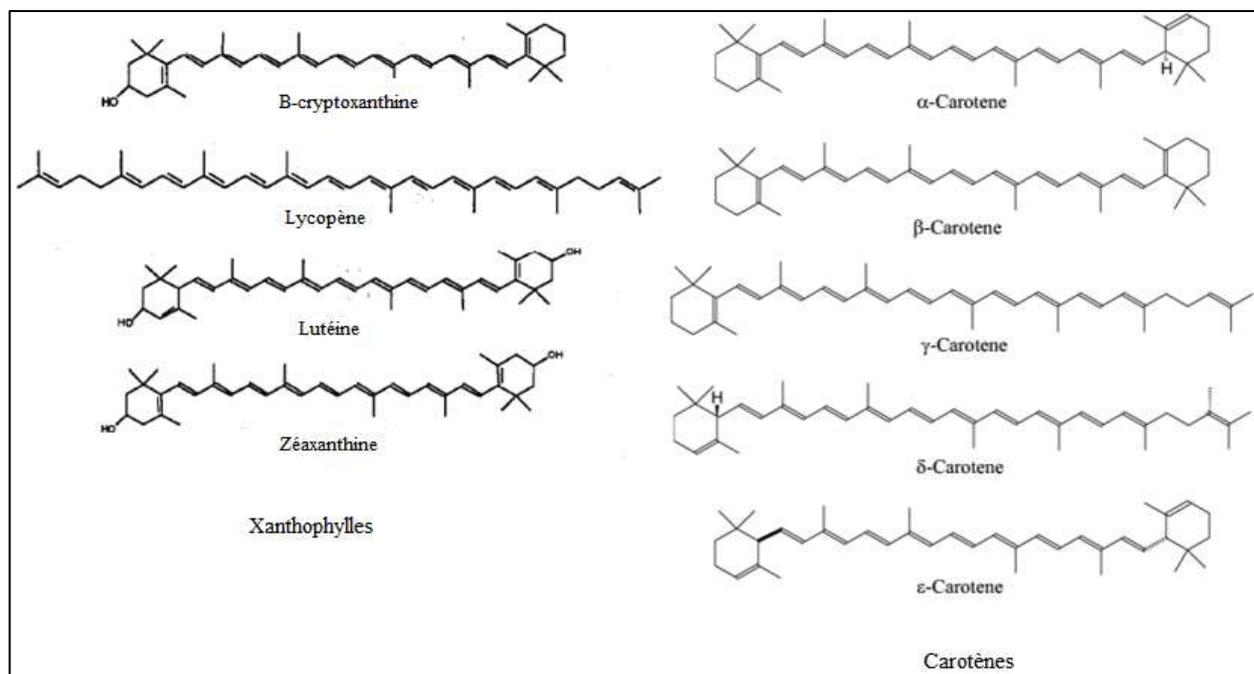
#### 3.2.1.2. Structure générale et propriétés physico-chimiques

Les caroténoïdes rassemblent plus de 750 composés, appartenant à la famille chimique des terpénoïdes, dont le point commun est une longue chaîne polyénique comportant en moyenne 11 doubles liaisons conjuguées (Nisar et *al.*, 2015). Ils regroupent deux classes de composés : les carotènes, hydrocarbures polyéniques à 40 atomes de carbones (C40), et les xanthophylles synthétisés à partir des carotènes et qui possèdent au moins une fonction oxygénée (hydroxyle, époxyde, carbonyle ou carboxyle). La majorité des caroténoïdes appartient à cette dernière classe (Button, 1995). Parmi les caroténoïdes les plus fréquents du règne végétal, on trouve deux formes principales de carotènes ( $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -carotène) et cinq xanthophylles



**Figure 7 :** Classification du  $\beta$ -carotène parmi les grands groupes de pigments d'origine naturelle (Mouthon, 2000)

(lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine et néoxanthine ; McQuinn et *al.*, 2015) (figure 8).



**Figure 8 :** Structure des caroténoïdes (McQuinn et *al.*, 2015)

L'introduction d'une fonction hydroxyle dans le  $\alpha$ -carotène permet la formation de lutéine, alors que le  $\beta$ -carotène est le précurseur de la zéaxanthine, la violaxanthine, et l'anthéroxanthine. Ce mécanisme est à l'origine de leurs propriétés anti-oxydantes (Chen et *al.*, 2015).

Les caroténoïdes peuvent adopter des configurations *E* (*trans*) ou *Z* (*cis*) du fait de la présence des doubles liaisons. A l'état naturel, ils sont généralement présents sous la forme *E*, configuration la plus stable d'un point de vue thermodynamique, mais susceptibles de s'isomériser pour donner des isomères *Z* sous l'effet de la lumière ou de la chaleur.

Les caroténoïdes sont dits chromophores, c'est-à-dire qu'ils absorbent les photons dans le spectre visible entre 320 et 550 nm. La caractérisation du chromophore est liée au nombre de doubles liaisons et à la variation de groupes fonctionnels et de diverses conformations. Ces variations de structure entraînent la modification de l'absorption lumineuse et donc, de la couleur. Elles permettent aussi leur identification par spectrophotométrie.

### 3.2.1.3. Intérêts nutritionnels

Dans l'alimentation humaine, une cinquantaine de caroténoïdes est consommée de façon relativement fréquente, une dizaine d'entre eux de façon importante et les trois principaux (le  $\beta$ -

carotène, la lutéine et le lycopène) constituent 80 % des apports en pigment (McDowell, 2000). Les carottes sont la principale source de  $\beta$ -carotène, comme le sont les tomates pour le lycopène et les épinards pour la lutéine et la zéaxanthine. Les quatre principales fonctions identifiées des caroténoïdes incluent des fonctions provitamine A, antioxydantes, stimulatrices de la communication intercellulaire et du système immunitaire (Burton-Freeman et Reimers, 2011).

Le métabolisme des carotènes conduit à la formation de composés nommés rétinoïdes : rétinol, rétinol, acide rétinoïque (Bonet et *al.*, 2015). Le rétinol et l'acide rétinoïque correspondent aux formes biologiquement actives de la vitamine A : rétinol pour la vision (Bernstein et *al.*, 2016), l'acide rétinoïque dans le processus d'expression et de régulation génomique (Li et *al.*, 2015), alors que le rétinol correspond à la forme de transport (Burri et *al.*, 2016). Les études sur les potentialités antioxydantes des caroténoïdes ont révélé que les caroténoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres et de l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ), le plus actif étant le lycopène suivi de l'astaxanthine, de la cantaxanthine et du  $\beta$ -carotène (Bonet et *al.*, 2015 ; Chen et *al.*, 2015). De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une association entre une augmentation de la consommation de certains caroténoïdes et la diminution du risque de cancer (Choi et *al.*, 2014). Les effets biologiques du lycopène, de la cantaxanthine et de la cryptoxanthine sur la communication intercellulaire pourraient expliquer, en partie, cette association (Burri et *al.*, 2016). Enfin, les travaux de Chew (1993) ont mis en évidence un effet stimulant du  $\beta$ -carotène sur la prolifération des lymphocytes T et B, et sur le nombre et l'activité des cellules "natural killers" (NK). De plus, le  $\beta$ -carotène est impliqué dans le mécanisme d'action non spécifique du système immunitaire (Lucas et *al.*, 2014) et la prévention contre certaines maladies inflammatoires (Lin et *al.*, 2016) et cardiovasculaires (Wang et *al.*, 2014).

Les fonctions des caroténoïdes chez les ruminants sont probablement similaires à celles décrites pour l'homme, même si elles n'ont pas forcément été mises en évidence (Calderon, 2007). Des aspects plus spécifiques aux ruminants, en particulier en ce qui concerne leur action sur la fertilité (Dewhurst et *al.*, 2009), la fonction de reproduction (Michal et *al.*, 1994), et sur la santé de la mamelle (Jucola et *al.*, 1996), doivent cependant être soulignés.

Chez les plantes, les caroténoïdes et leur produits de clivage enzymatique et oxydatif, appelés apocaroténoïdes, sont cruciales pour divers processus biologiques, tels que l'assemblage des photosystèmes et de complexes d'antenne de lumière pour la photosynthèse et la photoprotection, ainsi que pour la régulation de la croissance et le développement (Havaux, 2014). Les apocaroténoïdes sont également proposées pour servir de molécules de signalisation

et ont été impliqués dans les interactions entre les plantes et leur environnement (Cazzonelli & Pogson, 2010) .

#### **3.2.1.4. Caroténoïdes des olives et des margines**

Les caroténoïdes sont des composés liposolubles associés aux fractions lipidiques des organismes ou des matrices. Ainsi, leur présence dans les margines serait liée aux particules végétales en suspension ainsi qu'à l'huile résiduelle après le processus d'extraction. La présence et les concentrations de ces composés dans les margines n'ont jamais été étudiées. Cependant, dans l'huile d'olive, leur taux est très variable, allant de 6,22 à 1,15 mg/kg (Manai-Djebali et *al.*, 2012). Leur concentration dans l'huile d'olive est liée à la variété d'olive (Manai-Djebali et *al.*, 2012), au degré de maturité du fruit et au procédé d'extraction de l'huile (Inarejos-García et *al.*, 2011).

#### **3.2.2. Les tocophérols**

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (4 tocophérols et 4 tocotriénols). Cette vitamine liposoluble est reconnue pour ses propriétés antioxydantes et assure la stabilité des structures cellulaires. Elle est principalement produite par les plantes, les animaux y ont accès par le biais de leur alimentation.

##### **3.2.2.1. Définition et structure chimique**

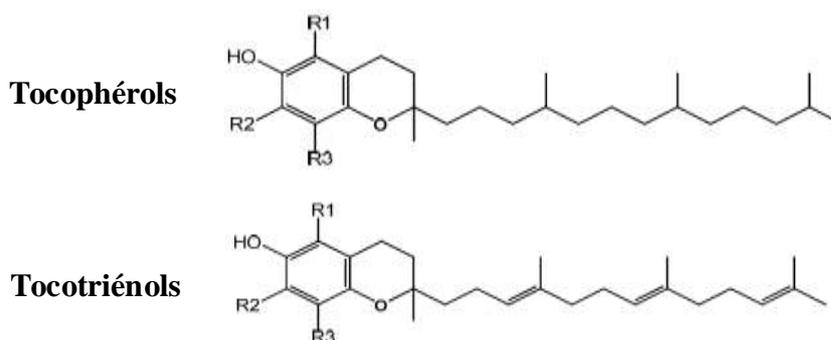
La molécule de tocol constitue la structure de base des tocophérols. Elle est constituée d'un noyau hydroxychromane et d'une chaîne phytyle entièrement saturée. Les différentes formes de tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) se distinguent entre elles par le nombre et la situation des groupements méthyles fixés sur le noyau chromanol (figure 9). Parmi ces composés, le plus fréquemment retrouvé dans la nature est l' $\alpha$ -tocophérol, qui présente également l'activité vitaminique la plus élevée.

Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. Naturellement présents dans la nature, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -tocotriénols possèdent une activité vitaminique alors que les formes  $\gamma$  et  $\delta$  sont inactives (Le Grusse, 1993).

##### **3.2.2.2. Propriétés chimiques et fonctions biologiques**

Dans l'organisme humain (et plus généralement chez les animaux), les principaux systèmes antioxydants endogènes agissent dans les phases aqueuses de la cellule ou hors des

cellules. L' $\alpha$ -tocophérol va s'insérer dans les membranes cellulaires, de nature lipidique, ainsi que dans les lipoprotéines en stabilisant les radicaux peroxy (Serbinova et *al.*, 1991). L' $\alpha$ -tocophérol est en effet connu pour être l'antioxydant lipophile le plus puissant pour limiter le processus d'oxydation radicalaire. Une déficience en tocophérol dans les membranes cellulaires peut augmenter la perméabilité des cellules, entraîner des dysfonctionnements et les rendre plus vulnérables à la dégradation. Il est aussi l'antioxydant le plus important dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) et pourrait donc jouer un rôle clé en inhibant leur oxydation qui est un facteur de risque de développement de l'athérosclérose. Une fois oxydé, l' $\alpha$ -tocophérol peut être régénéré (réduit) par l'acide ascorbique (vitamine C) ou l'ubiquinol (Pincemail et Defraigne, 2003).



R1	R2	R3	Dénomination	
CH3	CH3	CH3	$\alpha$ -tocophérol (5,7,8-triméthyltolcol)	$\alpha$ -tocotriénol (5,7,8-triméthyltocotriénol)
CH3	H	CH3	$\beta$ -tocophérol (5,8-diméthyltolcol)	$\beta$ -tocotriénol (5,8-diméthyltocotriénol)
H	CH3	CH3	$\gamma$ -tocophérol (7,8-triméthyltolcol)	$\gamma$ -tocotriénol (7,8-diméthyltocotriénol)
H	H	CH3	$\delta$ -tocophérol (8-méthyltolcol)	$\delta$ -tocotriénol (8-méthyltocotriénol)

**Figure 9** : Structure des tocophérols et tocotriénols (Chanforan, 2010).

Chez les plantes, les deux principaux rôles de  $\alpha$ -tocophérol sont de protéger les chloroplastes contre les dommages oxydatifs et de protéger le photosystème II de la photo-inhibition, permettant ainsi la fonction de photosynthèse dans les membranes des thylakoïdes (Havaux et *al.*, 2005).

Chez l'homme et les animaux,  $\alpha$ -tocophérol est essentielle pour le fonctionnement optimal des systèmes reproducteur (fertilité), musculaire, circulatoire, nerveux et immunitaire (Dønnem et *al.*, 2015). Chez la vache laitière, l'un des premiers effets de la vitamine E à être découvert était sa capacité à diminuer le temps de rétention pour les membranes fœtales et par conséquent améliorer la performance de reproduction (Harrison et *al.*, 1984). De même, il a été

établi par Smith *et al.* (1997) qu'une supplémentation en vitamine E, lorsque le sélénium alimentaire était adéquat, réduit significativement l'incidence d'infections intra-mammaires et mastites cliniques. La vitamine E permet également d'améliorer la supplémentation de la capacité de destruction des neutrophiles et améliore la fonction des macrophages (Debier et Larondelle, 2005). Politis *et al.* (2001) ont constaté une augmentation de plasminogène lié au récepteur activateur (u-PA) dans les neutrophiles chez des vaches laitières supplémentées en vitamine E, ce qui suggère un effet positif sur le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation.

### 3.2.2.3. Tocophérols des olives et des margines

Comme les caroténoïdes, les tocophérols sont des composés liposolubles associés aux fractions lipidiques des organismes ou des matrices. Leur présence dans les margines serait liée, notamment à l'huile résiduelle après le processus d'extraction. A notre connaissances, la présence et les concentrations de ces composés dans les margines n'ont jamais été abordées dans la littérature.

La teneur totale en tocophérols dans les huiles d'olive est très variable puisqu'elle a été reportée dans une gamme allant de quelques mg à 450 mg/kg d'huile (Ghanbari *et al.*, 2012; Manai-Djebali *et al.*, 2012 ; Limón *et al.*, 2015). Elle est fonction de plusieurs facteurs tels que la variété d'olive (Ballus *et al.*, 2014), le degré de maturité du fruit (Benito *et al.*, 2013), les conditions climatiques (Beltran, 2010) et le procédé d'extraction de l'huile d'olive (Clodoveo, 2012). L' $\alpha$ -tocophérol représente à lui seul jusqu'à 95% de la totalité des tocophérols (Boskou, 1996), mais on trouve également un peu de  $\beta$ - (9,6 mg/kg) et  $\gamma$ - (19 mg/kg) tocophérols (Ballus *et al.*, 2014), alors que le  $\delta$ -tocophérol n'est présent qu'à l'état de traces (Psomiadou *et al.*, 2000).

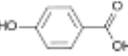
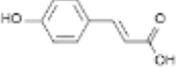
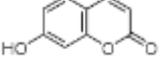
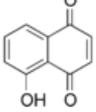
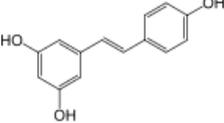
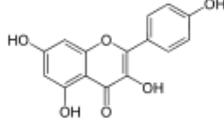
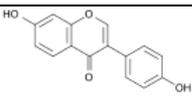
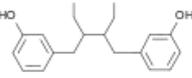
## 3.3. Composés phénoliques

### 3.3.1. Structure chimique et diversité

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction (Hennebelle *et al.*, 2004).

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique (Skerget et *al.*, 2005). Ce nom provient du composé parent le plus simple, le phénol. Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte pas loin de 8000 composés (Hennebelle et *al.*, 2004). Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes (tableau 3) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...) (Robards, 2003).

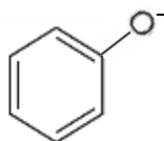
**Tableau 3** : Principales classes de composés phénoliques (Bruneton, 1999).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure chimique
C <sub>6</sub>	Phénols simples	hydroquinone	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques,	acide p-coumarique	
	Coumarines	Ombelliférone	
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglon	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	trans-resvératrol	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Enthocyanes</li> <li>• Flavanones</li> </ul>	Kaempférol	
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Entérodiol	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins	Procyanidol	

### 3.3.2. Propriétés chimiques et mécanismes d'action contre les radicaux libres.

#### 3.3.2.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes (figure 10) stabilisés par résonnance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical (Sartori-Thiel, 2003) ; l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical (Leopoldini et *al.*, 2011). Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre (Korkina et *al.*, 2012).



**Figure 10** : Structure chimique de l'ion phénoxyde

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel (Sartori-Thiel, 2003). Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale (Manach et *al.*, 2004).

#### 3.3.2.2 Mécanismes d'action contre les radicaux libres

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres de groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyls. Ainsi, des différentes familles connues des polyphénols, les flavonoïdes sont-ils ceux qui, en particulier, réunissent toutes ces caractéristiques (Rice-Evans et *al.*, 1996).

### 3.3.3. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques qui sont exploitées dans de nombreux domaines industriels. L'activité antioxydante est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $1O_2$ ,  $HOCl$ ,  $RO^{\bullet}$  et  $ROO^{\bullet}$ ) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN et ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (Quideau et *al.*, 2011).

Les composés phénoliques jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (Xia et *al.*, 2011). Il a été rapporté que les raisins (*Vitis vinifera*) possèdent des propriétés pharmacologiques importantes, et en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'acide gallique, d'acide hydroxycinnamique, de flavanols, de flavonols, et de tanins (Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009). Les composés, appartenant aux acides phénoliques, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamique et caféique qu'on les retrouve présents dans le thym et la téragone, ils sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches bactériennes, fongiques et virales (Cheng et *al.*, 2008).

Les possibilités de guérison qu'offrent les flavonoïdes sont exploitées de longues dates. Hippocrate prescrivait un baume de propolis contre les plaies et les ulcères. Des siècles plus tard, les propriétés antimicrobiennes de la propolis ont été attribuées aux composés de la catégorie des flavonols et flavanones. En effet, avec leur aptitude à inhiber la germination des spores de plantes pathogènes, ils sont d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme (Cushnie et Lamb, 2005). Les flavonols issus de fractions de propolis ont également montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 ou HSV-2, sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur de haut risque pour la transmission du VIH (Khan et *al.*, 2005). La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur

permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (Cowan, 1999).

L'action des flavonoïdes d'un extrait de citron sur la perméabilité membranaire fut le premier effet pharmacologique connu de ces composés, il y a plus de 50 ans (Sartori-Thiel, 2003). Les études sur les flavonoïdes issus de plantes utilisées traditionnellement restent encore très répandues car, bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (Benavente-Conforti *et al.*, 2008). Dans la famille des stilbènes, le resvératrol a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro*. Les recherches se tournent actuellement vers la synthèse de produits à base de resvératrol dans le but de diminuer l'utilisation de médicaments synthétiques (Udenigwe *et al.*, 2008).

#### **3.3.4. Applications industrielles des polyphénols**

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012). La capacité antioxydante des composés phénoliques est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la

**Tableau 4** : Composés phénoliques des margines et leurs concentrations cités dans la littérature

Composés	N° Cas	Valeurs (mg/l)			Références
		Moyennes ± ET	Minimales	Maximales	
1-acetoxypinoresinol (% des phenols totaux)	-	2,31	2,3	2,32	249
3,4-DHPEA-EDA (% des phénols totaux)	-	1,01	-	-	14, 161, 249
3,4-dihydroxyphenylpropionique	71693-95-3	11,7	-	-	117
<b>Acides phénoliques</b>					
Acide 2,3-dihydroxyphenylacétique	-	16,4	-	-	117
Acide 2,6-diméthoxybenzoïque	1466-76-8	0,35	-	-	55
Acide 3,4,5- triméthoxybenzoïque (% des phenols totaux)	118-41-2	2,38 ± 2,81	0,4	4,37	249
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatechuique)	99-50-3	326	-	-	42, 133, 194
Acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique)	331-39-5	115,50 ± 146,18	0,02	423	14, 128, 133, 149, 147, 161, 164, 168, 194, 281, 309, 322-323, 404
Acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC)	102-32-9	191,47 ± 315,31	3,42	903	14, 128, 147, 161, 164, 168, 281, 404
Acide 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolique [3,4-DHPEA-EA]	-	1,04	-	-	249
Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapique)	530-59-6	3,34 ± 0,68	2,96	4,13	55, 249
Acide 3-hydroxybenzoïque	99-06-9	28	-	-	117
Acide 3-hydroxyphenylpropionique	621-54-5	70	-	-	117
Acide 4-hydroxybenzoïque (para)	99-96-7	31,4 ± 34,8	5,6	71	117
Acide 4-hydroxyphenylacétique	156-38-7	194,08 ± 115,18	23,4	274	14, 164, 168, 194, 323
Acide 4-hydroxyphenylpropionique	-	23	-	-	117,
Acide 4-phenylacétique	-	77,5 ± 72,26	26,4	128,6	49
Acide dihydrobenzoïque (ppm)	-	0,59	-	-	63
Acide dihydroxymandelique (% des phenols totaux)	-	3,4	-	-	249
Acide elenolique	34422-12-3	9,24 ± 10,9	-	-	194, 249, 309
Acide ferulique	1135-24-6	175,81 ± 273,03	0,07	790	14, 128, 147, 161, 164, 168, 281, 323, 404
Acide gallique	149-91-7	249,06 ± 259,09	0,031	583	14, 49, 147, 149, 161, 281, 322, 323, 404
Acide hydroxycinnamique	-	7,4	-	-	47
Acide <i>p</i> -coumarique	7400-08-0	253,5±243,99	5,45	785	14, 49, 117, 128, 133, 149, 147, 161, 164, 168, 194, 281, 404

peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (Moure et *al.*, 2001).

Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Sartori-Thiel, 2003).

### 3.3.5. Les composés phénoliques des margines

Les composés phénoliques (ou biophénols) des margines sont très divers et leur structure est très variable (tableau 4). Pendant le processus de fabrication de l'huile d'olive, les biophénols sont transférés à partir de la pâte d'olives au cours du broyage/malaxage à l'huile et aux différents sous-produits, particulièrement aux margines. Composés à tendance hydrophile, leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans la phase aqueuse. En effet, 2% seulement des composés phénoliques originaires des olives sont transférés à l'huile, 53% aux margines et 45% aux grignons d'olives (Rodis et *al.*, 2002). Néanmoins, certains de ces composés sont nouvellement synthétisés grâce à plusieurs voies de biotransformation enzymatique (Obied et *al.*, 2005 ; Klen & Vodopivec, 2012).

Les classes les plus importantes des biophénols des margines sont les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les flavonoïdes et les sécoiridoïdes (Ryan & Robards, 1998 ; Soler-Rivas et *al.*, 2000). Les alcools phénoliques des margines sont le 3,4-dihydroxyphenyl éthanol (hydroxytyrosol) et le *p*-hydroxyphenyl éthanol (tyrosol). Les flavonoïdes des margines les plus rapportés sont le lutéoline 7-O-glucoside, la rutine et l'apigénine 7-O-glucoside, et les anthocyanines, cyanidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-rutinoside. L'oleuropéine et le ligustroside, provenant de la pulpe des olives, sont les principaux secoiridoïdes des margines. Certains dérivés de l'oleuropéine ont été également rapportés, tels le dimethyloleuropeine, l'oleuropéine aglycone et l'acide élénolique (Romani et *al.*, 1999 ; Soler-Rivas et *al.*, 2000). Le verbascoside est le principal dérivé de l'acide hydroxycinnamique présent dans les margines (Romani et *al.*, 1999).

Suite du tableau 4

Composés	N° Cas	Valeurs (mg/l)			Références
		Moyennes $\pm$ ET	Minimales	Maximales	
Acide syringique	530-57-4	31,65 $\pm$ 16,9	19,7	43,6	42, 49, 55, 133, 249
Acide trans-cinnamique	140-10-3	105,3	-	-	128
Acide vanillique	121-34-6	50,47 $\pm$ 54,62	1,68	128,7	14, 49, 128, 133, 161, 164, 168, 281, 232, 404
Vanilline (% des phenols totaux)	121-33-5	2,32	-	-	42, 49, 128, 249
verbascoside (% des phenols totaux)	61276-17-3	1,06 $\pm$ 0,75	0,31	1,81	194, 249, 354, 309, 387
<b>Alcools phénoliques</b>					
3,4-dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol, DOPET)	10597-60-1	885,35 $\pm$ 1227,3	0,21	4006	2, 14, 49, 117, 127, 128, 133, 147, 149, 161, 164, 168, 194, 281, 309, 322, 323, 404
4-Hydroxyphenylethanol (Tyrosol)	501-94-0	373 $\pm$ 573,7	0,5	2491	1, 14, 49, 117, 128, 133, 147, 149, 164, 168, 194, 322, 323
Hydroxytyrosol glucoside (% des phenols totaux)	-	9 $\pm$ 4	4,4	13,1	249
Hydroxytyrosol-4- $\beta$ -glucoside	-	168 $\pm$ 47,35	110	226	147, 149, 164
Hydroxytyrosylelenolate	-	0,614	-	-	55
<b>Flavonoïdes</b>					
Apigénine (flavone)	520-36-5	86	-	-	14, 161, 194, 249, 281, 323, 404
Apigénine-7-glucoside (% des phenols totaux)	578-74-5	2,66 $\pm$ 1,52	1,49	3,64	354, 249
Apigénine-7-rutinoside (% des phenols totaux)	552-57-8	0,85 $\pm$ 0,042	0,82	0,88	354, 249
Luteoline (flavone)	491-70-3	20,3 $\pm$ 67,32	0,01	234	14, 117, 161, 194, 281, 309, 322-323, 404
luteoline-7-glucoside (flavone)	5373-11-5	1,87 $\pm$ 3,31	0,01	10,6	14, 117, 161, 281, 309, 323, 404
luteoline-7-rutinoside (% des phenols totaux)	25694-72-8	2,125 $\pm$ 1,73	0,9	3,35	249
Naringénine (% des phenols totaux) (flavanone)	-	1 $\pm$ 1,09	0,23	1,77	249
Quercétine (% des phenols totaux) (flavonol)	117-39-5	2,06	-	-	63, 249

Suite du tableau 4

Composés	N° Cas	Valeurs (mg/l)			Références
		Moyennes $\pm$ ET	Minimales	Maximales	
rutine (flavonol)	153-18-4	7,6 $\pm$ 15,88	0,1	36	194, 249, 309, 354
<b>Autres phénols simples</b>					
3,4-dihydroxyphenylglycol (DOPEG)	28822-73-3	58	-	-	147
Catechol	120-80-9	235	-	-	
Dérivé de l'oleuropeine (en % des phénols totaux)	-	4,44	-	-	249
Dérivé de l'oleuropeine (en % des phénols totaux)	-	4,05	-	-	249
Dérivé de l'acide cinnamique	-	0,32 $\pm$ 0,39	00	1,18	309
Dérivé de l'acide élénolique	-	1,81 $\pm$ 1,49	0,03	4,77	309
Dérivé du ligstroside	-	0,71	-	-	249
Dérivé du ligstroside	-	4,21 $\pm$ 1,44	3,19	5,23	249
Ligstroside	35897-92-8	86	-	-	149, 249
m-Cresol	108-39-4	1845 $\pm$ 632,11	1020	2560	154
ME 3,4 -DHPEA-EDA (en % des phénols totaux)	-	2,12 $\pm$ 0,76	1,59	2,66	249
nuzhenide (en % des phénols totaux)	39011-92-2	1,78 $\pm$ 0,15	1,67	1,89	249
o-Cresol	95-48-7	907 $\pm$ 504,14	230	1450	154
Oleoside methyl ester	-	10,1	-	-	55
Oleuropeine	32619-42-4	409,25 $\pm$ 137,65	260	575	117
Oleuropeine aglycone	-	60,5 $\pm$ 85,60	0	121	249
p-3,4-DHPEA-EA (en % des phénols totaux)	-	3,41	-	-	249
p-Cresol	106-44-5	1082,5 $\pm$ 441,69	560	1510	154

- Données non disponibles, ET : écart-type

**Tableau 5** : Résumé des bioactivités des principaux biophénols des margines (Zbakh et El-Abbassi, 2012).

Composé phénolique	Bioactivité et sites d'action	
Hydroxytyrosol	Antioxydante	Active la biogenèse des mitochondries Protège le système PBMC contre le stress oxydatif et la destruction du DNA Inhibe l'oxydation des lipides pendant la conservation des aliments
	Cardioprotective et antiatherogénique	Effets multiples Piège et réduit la production de l'anion superoxide dans la culture des promocytes humains
	Chemoprotectrice	Réduit le niveau intracellulaire de l'oxygène réactif dans les cellules endothéliales vasculaires par une sur-régulation de l'expression catalase via la voie AMPK-FOXO3a Induit l'apoptose cytochrome C-dépendante Inhibe la prolifération des cellules cancéreuses
	Cytoprotectrice	Dans les cellules PC12 Dans les cellules cérébrales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>
	Antimicrobienne et antivirale	Contre les pathogènes humains Dans l'agriculture, contre les bactéries phytopathogéniques Contre le virus influenza
	Anti-inflammatoire	Inhibe la production des leukocytes leukotrienes B4
	Syndrome ostéoporose	Prévient la perte de l'os dans le modèle expérimental de l'ostéoporose
	fongicide	Contre <i>Verticillium dahliae</i>
Oleuropéine	antioxydante	Activité anti-radicalaire (test de DPPH)
	Antiathérogénique et cardioprotectrice	Prévient l'atteinte oxydative du myocarde induite par <i>ischemia</i> Possède des effets vasodilatateurs et anti-agrégation plaquettaire
	neuroprotectrice	Améliore la perméabilité de la barrière sang-cerveau et l'œdème cérébral chez le rat
	Antiproliférative	Contre le cancer du sein Inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du muscle lisse
	Hypoglycemique	Chez les lapins diabétiques
	Antihypertensive	Efficace chez les patients avec hypertension stade 1

### 3.3.6. Intérêts biologiques des biophénols des margines

Il y a une évidence croissante que les radicaux libres soient impliqués dans plusieurs maladies humaines, puisqu'ils attaquent les biomolécules telles que les lipides, les protéines, l'ADN, et les biomembranes, et jouent un rôle capital dans la dégradation oxydative des aliments et des produits cosmétiques. Par conséquent, l'extraction des composés phénoliques biologiquement actifs à partir des margines (biophénols) constitue une alternative viable pour valoriser cet effluent problématique (Obied *et al.*, 2009). En effet, la fraction phénolique possède des activités biologiques intéressantes. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* (tableau 5) ont montré que les biophénols des margines exercent des activités à fort potentiel biologique, incluant mais n'ont pas limitées à des actions antioxydantes et piègeurs de radicaux libres. Ils sont potentiellement capables de prévenir les effets de l'inhalation passive de la fumée de cigarette qui responsable d'un stress oxydatif, de réduire la production de thromboxane B2 par le sang entier, et de réduire les symptômes des maladies inflammatoires comme l'arthrose (Visioli *et al.*, 2009). Il a été observé aussi que l'administration des extraits de margines, entre autre l'hydroxytyrosol purifié, à des rats diabétiques a causé une baisse dans le niveau de la glycémie (Hamden *et al.*, 2009).

Il a été montré aussi que l'absorption journalière des polyphénols peut dépasser 1g/jour. Elle est de ce fait supérieure à celle des autres classes de métabolites secondaires et des antioxydants alimentaires. A titre d'exemple, elle est 10 fois supérieure à l'absorption de la vitamine C et 100 fois plus élevée à celle de la vitamine E et les caroténoïdes. Dans le tableau 5 est donnée une synthèse de la littérature des activités biologiques des principaux composés phénoliques des margines. De plus, les études de biodisponibilité ont montré que les biophénols des olives peuvent être absorbés au niveau de l'intestin et entrer dans la circulation sanguine sous forme conjuguée (Manna *et al.*, 2000; Vissers *et al.*, 2002).

### 3.3.7. Caractéristiques microbiologiques

Dans les margines d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures. Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème du point de vue sanitaire (Zbakh et El-Abbassi, 2012 ; Ntougias *et al.*, 2013). Le pouvoir antimicrobien des margines est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns catéchol-mélaninique (Hamdi et Ellouz, 1993). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli, 1991). Ils peuvent

Suite du tableau 5

Composé phénolique	Bioactivité et sites d'action	
Oleuropéine	Antimicrobienne et antivirale	Antibactérien Antimycoplasme Contre les bactéries et les champignons pathogènes Activité anti-HIV des extraits des feuilles d'olive Contre la réplication du virus de l'hépatite B.
	Anti-inflammatoire	Identifiée dans toutes les cultures des cellules sanguines humaines
	Effet protecteur	Contre le régime élevé en graisse induit par la stéatose hépatique chez la souris
	Cytostatique	Contre les cellules McCoy
	Molluscicide	Contre les espèces sud-américaines <i>Biomphalaria glabratus</i>
	Activité endocrinienne	Stimulation de la thyroïde et modulation de l'activité hypolipidémique-hypoglycémique
	Modulation des enzymes	Activation de la pepsine et inhibition de la trypsine, lipase, glycerol-dehydrogénase, glycerol-3-phosphate dehydrogénase, et glycerokinase
Oleuropéine aglycone	Antioxydante	Activité antioxydante plus importante comparativement à l'oleuropéine Protège contre l'oxydation des LDL
	Neuroprotectrice	Inhibe l'agrégation du taux des neuropathies neurodégénérative
	Cytoprotectrice	Prévient l'agrégation amyloïde cytotoxique d'amyline humaine Réduit l'oxydation de l'ADN, utilisé à fortes concentrations
	Anti-inflammatoire	Inhibe la pleurésie <i>carraghénane</i> induite chez la souris
Tyrosol	antioxydante	Contre la peroxydation des lipides dans les cellules Caco-2 intestinales
	Anti-inflammatoire	Chez l'homme
	Cardiprotectrice	Module la production de l'anion superoxide et l'expression MMP-9 dans les cellules THP-1 stimulé PMA
	Neuroprotectrice	effet protecteur d' <i>ischémie</i> cérébrale transitoire chez les rats

inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique (Hattenschwiler et Vitousek 2000).

### 3.4. Impacts environnementaux des margines

Comme les margines sont un sous-produit de la trituration des olives, on peut supposer sans risque qu'elles sont entièrement biodégradables. Cependant, les phénols et les lipides se décomposent à des vitesses de réactions beaucoup plus lentes que d'autres constituants, tels que les sucres ou les acides volatils à chaîne courte (Kapellakis et *al.*, 2008). Cette résistance à la biodégradation, avec un taux de matière organique élevé, un pH acide et une demande chimique (DCO) et biologique (DBO) en oxygène (respectivement, 110 g/l et 170 g/l) (Ouzounidou et *al.*, 2010) sont à l'origine de plusieurs impacts environnementaux. Cette situation est aggravée par le caractère saisonnier de la production de l'huile d'olive et les volumes importants de margines générées approchant les 30 millions de m<sup>3</sup>/an, dont 98% sont concentrés dans les pays du pourtour méditerranéen (Koutrotsios et Zervakis, 2014).

#### 3.4.1. Pollution de l'eau

Souvent rejetés dans des récepteurs naturels sans aucun traitement préalable, les margines nuisent fortement à la qualité des eaux de surfaces. La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution (Kapellakis et *al.*, 2008).

Les margines déversées dans l'eau réduisent sa disponibilité en oxygène. Ce phénomène est accentué par la forte concentration des sucres réducteurs, qui peuvent stimuler la respiration microbienne, ce qui induit un déséquilibre de la totalité de l'écosystème (Kapellakis et *al.*, 2006). A forte teneur en phosphore, les margines peuvent mener à l'eutrophisation (McNamara et *al.*, 2008). Les lipides forment un film sur la surface des eaux, ce qui empêche la pénétration de la lumière du soleil et l'oxygène, inhibant ainsi la croissance des plantes (Kapellakis et *al.*, 2006). Les effets environnementaux négatifs comprennent aussi la décomposition et, par conséquent, l'hypoxie, qui induisent des réductions dans d'autres populations animales (poissons).

L'épandage des effluents d'huileries d'olive, très riches en éléments azotés, sur les sols peut également poser des problèmes environnementaux. En effet, les nitrates peuvent polluer les nappes situées dans ou à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable (Benyahia et Zein, 2003 ; Fki et *al.*, 2005).

**Tableau 6 :** Traitements et domaines d'applications possibles des margines cités dans la littérature

Traitements	Processus	Principe	Principaux produits	Domaines d'applications	Limitation du processus	Références
<b>Traitement</b>						
<b>Biologiques</b>	Anaérobique (digesteurs contact anaérobies, lit de boues à flux ascendant, lit de boues à filtre anaérobie).	Dégradation de la matière organique par les micro-organismes anaérobiques (bactéries, levures et champignons filamenteux)	Production d'énergie et de biogaz (méthane, H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> )	Conversion des biogaz en énergie	- Hautes charges organiques,  - concentration élevée en composés phénoliques.	Mann et <i>al.</i> (2010)
	Aérobique (boues activées)	Utilisation des lipides ou des substances liées aux lipides seuls ou avec les sucres comme sources de matière organique par certains micro-organismes lipolytiques (bactéries, champignons et levures)	Production de biomasse, d'acides organiques et d'enzymes : lipases, laccases, peroxydases Mn-dépendante, et pectinases	- Alimentation humaine (production de champignons comestibles) - Laiterie, industrie pharmaceutique, détergents, - catalyse l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et glycérol - synthèse de biopolymères et de bio-diesel	- Le recours à la dilution des margines multiplie leur impact  - Production de boues.	Xavier da Silva (2014)

### 3.4.2. Pollution de l'air

La décharge des margines dans les bassins d'évaporation à ciel ouvert, sur les terres ou dans les eaux naturelles génère des processus de fermentation et l'émission de plusieurs gaz, notamment le méthane, le dioxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène (Niaounakis et Halvadakis, 2004). Ce dernier conduit une pollution considérable par les odeurs même à grandes distances, en particulier au cours de la période de trituration des olives (Niaounakis et Halvadakis, 2004). La pollution de l'air a un impact négatif sur les activités économiques en zones touristiques et archéologiques.

### 3.4.3. Pollution des sols

L'épandage direct des margines sur les sols provoque un colmatage des sols et une diminution de leur qualité. Ces déchets sont à l'origine de l'augmentation de la salinité des sols (Fiestas et Borja, 1992) et de la diminution du pH, qui pourrait être à l'origine du changement de leurs caractéristiques physico-chimiques. De même, les substances toxiques contenues dans ces effluents se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol (Marisot et Tournier, 1986).

## 3.5. Traitements et valorisations des margines

Plusieurs traitements de dépollution des margines ont été testés et proposés pour faire face à leur impact environnemental. A noter que la plupart de ces applications sont seulement décrites dans la littérature scientifique (Dermeche et *al.*, 2013) mais ne seraient pas ou difficilement applicables sur le terrain. Le tableau 6 présente les principales voies de traitement et de valorisation des margines proposées.

Les solutions suggérées varient du simple entreposage par épandage dans des bassins à ciel ouvert à des procédés de traitement plus ou moins compliqués. L'entreposage par épandage dans des bassins à l'air libre est la solution la moins coûteuse et la plus facile à réaliser (Borja et *al.*, 1996). Elle est essentiellement pratiquée dans les pays de la rive sud de la méditerranée. Cependant, elle présente des inconvénients : l'évaporation est difficile à cause de la couche huileuse qui se forme en surface, en plus de l'infiltration des polluants vers le sous-sol et vers la nappe phréatique dont les concentrations en certains éléments présents dans les margines dépassent les normes de rejet en milieu naturel, ce qui a pour effet de souiller la qualité de l'eau potable (Paraskeva et Diamadopoulos, 2006).

Suite du tableau 6

Traitements	Processus	Principe	Principaux produits	Domaines d'applications	Limitation du processus	Références
<b>Traitement</b>						
Physiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- centrifugation,</li> <li>- Distillation et évaporation</li> <li>- Membranaire (ultra-filtration, micro-filtration, osmose inverse)</li> <li>- Combustion et incinération,</li> <li>- Ozonation</li> <li>- Irradiation-ultrason à basse fréquence</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Membranes de filtration permettant la séparation des substances dissoutes selon la taille des particules et la charge électrique</li> <li>- Utilisé surtout pour margines 2-phases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- solution concentrée (pâte concentrée), vapeur d'eau et substances volatiles.</li> <li>- Elimination de la matière organique et des gouttelettes d'huile</li> <li>- Réduire jusqu'à 50% des composés phénoliques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très efficaces dans la diminution de la charge polluante.</li> <li>- Très utiles dans les pré- et post-traitements.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûts élevés</li> <li>- Ne produisent pas de substances à valeur ajoutée</li> <li>- Coût élevé en énergie,</li> <li>- Echec dans l'élimination des substances dissoutes.</li> <li>- coûts élevés des installations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Akdemir and Ozer (2008)</li> <li>Niaounakis et Halvadakis (2006)</li> <li>Drouiche et <i>al.</i> (2004)</li> <li>Kapellekis et <i>al.</i> (2008)</li> <li>Beltran-Heredia et <i>al.</i> (2000)</li> <li>Atanassova et <i>al.</i> (2005)</li> </ul>

La valorisation agricole des margines par compostage ou par épandage est une pratique ancienne, notamment dans les pays producteurs de l'huile d'olive qui se situent dans les régions arides et semi arides (Moraetis *et al.*, 2011). La richesse en matière organique et en nutriments fait des margines un biofertilisant à bas coût et une source d'eau d'irrigation dans les pays Méditerranéens où les précipitations sont de plus en plus rares (Caputo *et al.*, 2013). Cependant, la pratique incontrôlée à long terme de ces techniques altère l'équilibre nutritionnel (Sierra *et al.*, 2001) et microbiologique des sols (Mahmoud *et al.*, 2010) et multiplie les risques de contamination des nappes phréatiques par lessivage (Kavvadias *et al.*, 2010).

Les techniques de traitement biologique des margines basées sur les processus aérobie et anaérobie font recours à des microorganismes (bactéries, champignons, levures) pour oxyder et dégrader la matière organique polluante en métabolites simples comme le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le méthane (CH<sub>4</sub>) et les composés aliphatiques. Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés (Fountoulakis *et al.*, 2002).

Les traitements physiques des margines consistent à l'épaississement des matières polluantes organiques et minérales (solubles et insolubles) et à leur séparation de la phase liquide. Néanmoins, ces procédés sont à l'origine d'une importante charge polluante solide et sont extrêmement coûteux en énergie rendant difficile leurs utilisations par les petites entreprises productrices (El Hajjouji *et al.*, 2007).

Les traitements chimiques des margines sont utilisés pour réduire l'intensité de leur coloration (Balice *et al.*, 1997). De tels traitements peuvent être utilisés en tant que prétraitement ou traitement de finition après épuration biologique.

Les tentatives de mise en place de techniques de dépollution des margines ont abouti à l'élaboration de procédés complexes et coûteux et surtout à générer d'autres sous-produits difficiles à gérer. Les travaux sur l'utilisation des margines comme source naturelle pour la production de composés phénoliques bioactifs sont en plein essor (Schaffer *et al.*, 2010 ; Lafka *et al.*, 2011). Ces co-produits de l'industrie oléicole paraissent être une source abordable et abondante de substances phénoliques biologiquement actives qui détiennent un potentiel prometteur en tant qu'antioxydants, agents anti-inflammatoires et antimicrobiens. Néanmoins, l'hétérogénéité qualitative et quantitative de ces composés est souvent une difficulté (Dermeche *et al.*, 2013).

Suite du tableau 6

Traitements	Processus	Principe	Principaux produits	Domaines d'applications	Limitation du processus	Références
<b>Traitement</b>						
Chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réaction Fenton</li> <li>- Echange d'ions</li> <li>- Neutralisation</li> <li>-Floculation/ coagulation, précipitation/ clarification</li> <li>- Adsorption</li> <li>- Oxydation électrochimique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxydation chimique et coagulation des composés organiques.</li> <li>- Substitution des ions dans la solution en utilisant des réactifs chimiques</li> <li>- Réduire le pH à 7 par le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ou augmenter le pH par Ca(OH)<sub>2</sub></li> <li>- Usage des produits chimiques ou autres matériaux</li> <li>- Adsorption des composés dissous des margines sur une substance solide.</li> <li>- Les polluants sont adsorbés à la surface de l'anode de l'électrode, puis détruits par réaction de transfert d'électrons.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutralisation et déstabilisation des colloïdes hydrophiles en suspension,</li> <li>- Hydrolyse acide des corps gras (huile, acides gras,...) qui facilite leur séparation.</li> <li>- Les protéines à longues chaînes agissent comme agents flocculants pour les matériaux en suspension</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elimination de l'huile et les matières en suspension (solides)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûts</li> <li>- La plupart des constituants organiques sont difficile à précipiter (sucre, phénol, acides volatiles, ...)</li> <li>- Coût élevé de l'adsorbant (charbon actif commercial) voltage, salinité, concentration initiale des margines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kallel et <i>al.</i> (.2009).</li> <li>Kapellakis et <i>al.</i> (2008)</li> <li>Mitrakas et <i>al.</i> (1996)</li> <li>Riccardi et <i>al.</i> (2000)</li> <li>Niaounakis et <i>al.</i> (2004).</li> <li>Chatzisyneon et <i>al.</i> (2008).</li> </ul>

Suite du tableau 6

Traitements	Processus	Principe	Principaux produits	Domaines d'applications	Limitation du processus	Références
<b>Traitement</b>						
Conventionnels	- Bassins d'évaporation  - Mélange aux eaux municipales			Fertilisants (résidus solides secs)	odeurs nauséabondes, faible biodégradation formation d'une couche lipidique à la surface qui entrave l'évaporation naturelle	Ferraz <i>et al.</i> (2012)  Madr <i>et al.</i> (2007)
<b>Valorisation</b>						
Naturels	Eau d'irrigation  -Fertilisants  -Compost	dégradation aérobie de la matière organique des déchets solides (agricoles, forestiers et urbains) et des marges			Changement des caractéristiques physico-chimiques (pH, salinité, porosité, érosion) et microbiologiques des sols. - Souillure des nappes phréatiques. - Cout élevé	Albuquerque <i>et al.</i> (2004).  Marinho <i>et al.</i> (2009)  Zenjari <i>et al.</i> (2006)
Récupération des antioxydants (biophénols)		Extraction et purification par des produits chimiques	Antioxydants naturels purs	Pharmacie, cosmétique et agro-industrie	hétérogénéité qualitative et quantitative des composés phénoliques	Rahmanian <i>et al.</i> (2014).

Suite du tableau 6

Traitements	Processus	Principe	Principaux produits	Domaines d'applications	Limitation du processus	Références
<b>valorisation</b>						
Autres utilisations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production de fibres utilisées dans l'alimentation</li> <li>- Fabrication des savons (savon de Marseille).</li> <li>- Teinture du textile (laine)</li> <li>- Préparation des boissons fonctionnelles</li> </ul>	Pouvoir adsorbant		Alimentation humaine et animale	caractère diluée des margines Composés phénoliques - Traitement préalable pour éliminer les matières en suspension. - Condition spécifique de conservation (température, pH)	Galanakis et <i>al.</i> (2009).  Dermeche et <i>al.</i> (2013)  Meski et <i>al.</i> (2012).  Zbahrk et El-Abbassi (2012).

### 3.6. Cas particulier de valorisation : utilisation en alimentation animale

Les margines ont été utilisées directement comme aliment pour les animaux de rente. Elles ont été distribuées sous forme d'eau de boisson à des volailles (Fedeli & Camurati, 1981) ce qui semble avoir permis de réduire les coûts de production et la mortalité des animaux.

Plus récemment, distribuées pendant 3 mois à hauteur de 5 % dans l'alimentation de truites en croissance, les margines ont entraîné une réduction de la croissance (probablement par un effet antinutritionnel des polyphénols sur les protéines de la ration), une modification de la formule sanguine et une augmentation des quantités de récepteur aux œstrogènes ce qui pourrait indiquer une activité phyto-œstrogénique de certains de ces composés et avoir des conséquences sur la reproduction et les fonctions sexuelles des animaux à long terme (Sicuro et al., 2010). Cependant, aucune anomalie n'a alors pu être détectée sur la physiologie et l'activité digestive.

Aguilera et al. (1989) stipulent que les margines peuvent être utilisées comme une source d'énergie pour les microorganismes du rumen et par conséquent pour les ruminants étant donnée leur teneur élevée en sucre. C'est ainsi que les margines ont été offertes à 20 brebis adultes (de 18 mois) taries et non gravides. La supplémentation en marge de la ration a été progressive (10, 20, 30 et 40 % de la MS du foin de luzerne ou du foin ; Gasa et al., 1991). Les résultats ont montré que l'ingestion volontaire de la matière sèche n'a pas été affectée par le niveau d'inclusion du sous-produit. La digestibilité de la matière sèche, de la matière organique et des matières azotées a évolué de façon linéaire avec le niveau d'incorporation des margines, quand le régime a été offert au niveau d'entretien. Cependant, quand la ration a été offerte "ad libitum", l'incorporation de 30% de margines a causé une réduction de la dégradation "in sacco" de la matière sèche du foin de luzerne et du pH du jus de rumen mesuré 3 heures après le repas. Ceci tendait à indiquer certaines limites à l'usage des margines dans la ration des ruminants et la nécessité de définir des recommandations d'emploi. Le procédé Dalmolive décrit par Martilotti (1993) semble remédier au problème. Il consiste à mélanger 50 kg de margines avec 20 kg de grignons et 12,6 kg de divers résidus et sous-produits agricoles pour réduire l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Ceci produit 29 kg d'aliment en granulés dont la composition est indiquée dans le tableau 7.

La distribution des margines dans la ration des ruminants paraît donc envisageable, d'autant plus que le passage des aliments dans le rumen entraîne un profond remaniement moléculaire qui concernerait également les polyphénols et pourrait entraîner une forte réduction, voire la perte, de leur toxicité. Cependant, la prise en compte de la variabilité probable de leur composition paraît nécessaire avant d'émettre des recommandations d'usage.

**Tableau 7 :** Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive (Martilotti, 1993).

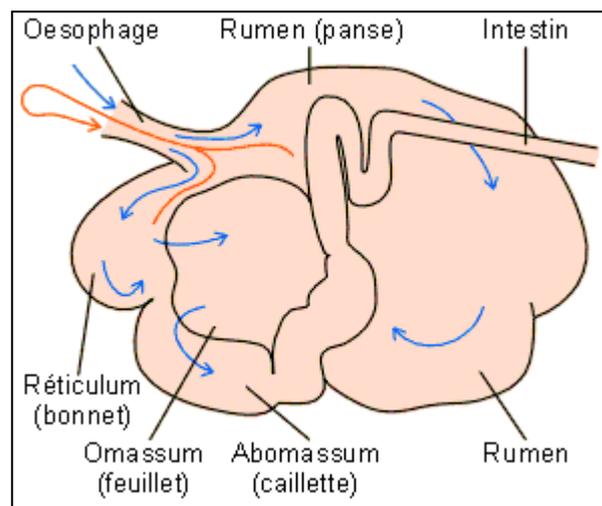
<b>Composant</b>	<b>Valeur (% de la matière sèche totale)</b>
Matière azotée totale	21,6
Matière grasse	4,0
Cellulose brute	13,1
Matière minérale	8,9
Extrait non azoté	52,5
Matière azotée digestible	17,2

## IV. Digestion des aliments chez les ruminants

### 4.1. Anatomie du tube digestif des ruminants

D'un point de vue anatomique, le système digestif des bovins se compose de la bouche, de la langue, des dents, du pharynx digestif, de l'œsophage, des estomacs, des intestins, du rectum et de l'anus.

Les estomacs des ruminants sont volumineux. Ils occupent les 4/5 de la cavité abdominale. Ils comprennent trois compartiments appelés "préestomacs", le réseau (ou *réticulum*), le rumen, et le feuillet (ou *omasum*). Ceux-ci précèdent un 4<sup>ème</sup> compartiment, la caillette (ou *abomasum*), qui correspond à l'estomac proprement dit (figure 11). Cette configuration particulière permet aux ruminants d'effectuer une prédigestion microbienne des aliments, avec une utilisation particulièrement poussée des fibres présentes dans la ration.



**Figure 11** : Estomacs des ruminants

#### 4.1.1. Réseau et rumen

Le réseau et le rumen sont souvent considérés ensemble car leur contenu se mélange fréquemment. Le rumen a une capacité d'environ 150 litres et représente 80% du volume total des estomacs. Sa paroi interne est constituée de papilles qui augmentent la surface de contact avec la masse alimentaire et qui permettent l'absorption de certains nutriments. Le rumen est situé sur le côté gauche de l'animal et s'étend du diaphragme au bassin. Il communique de façon large avec le réseau.

Le réseau est quant à lui un petit réservoir situé entre le rumen et le diaphragme, dont la paroi présente une apparence réticulaire en nids d'abeilles tout à fait caractéristique. Sur la paroi

droite et dorsale du réseau, cette structure fait place à un sillon relativement large et profond, appelé gouttière œsophagienne, qui s'étend du cardia jusqu'à l'orifice de communication entre le réseau et le feuillet, l'orifice réticulo-omasal.

Le réticulo-rumen assure l'essentiel de la prédigestion que subissent les aliments avant d'atteindre la caillette. La masse alimentaire subit en effet à ce niveau d'une part un brassage permanent via la motricité du rumen-réseau, d'autre part les fermentations microbiennes, et enfin, un broyage poussé via la rumination (Popova, 2011).

La rumination consiste en effet en la régurgitation du bol alimentaire vers la bouche et sa mastication. Elle permet donc une réduction de la taille des particules et une bonne imprégnation du bol alimentaire avec la salive, ce qui a pour effet d'augmenter la densité des particules (Orskov et Ryle, 1990). Le réseau peut être considéré comme un véritable carrefour qui régule la circulation des particules alimentaires entre l'œsophage, le rumen et le feuillet. Ainsi, les particules suffisamment petites, de l'ordre de quelques millimètres, passent à travers l'orifice réticulo-omasal pour atteindre le feuillet, tandis que les particules de grande taille sont refoulées vers le réseau et le rumen, ce qui a pour effet de stimuler la rumination et la production de salive. L'orifice réticulo-omasal se trouvant en position basse, seules les particules ayant acquis une densité suffisante pour couler, et non plus flotter dans le rumen, passent à travers celui-ci. La rumination permet donc la vidange du rumen-réseau par la réduction en petites particules des végétaux les plus résistants à la mastication.

#### **4.1.2. Feuillet**

D'une capacité d'environ 10 litres, cet organe, dont les parois sont constituées de fines lamelles qui lui ont donné son nom, constitue une zone de transition entre le rumen-réseau où la digestion est initiée par des fermentations, et la caillette, où la digestion est essentiellement enzymatique (Jouany, 1994 ; Grenet, 1997). Il permet donc l'assimilation de certains nutriments et renvoie les aliments insuffisamment fermentés vers le réticulum. Une fois les aliments suffisamment fermentés, ils passent dans la caillette. Le feuillet est plus développé chez les bovins que chez les petits ruminants.

#### **4.1.3. Caillette**

La caillette est le véritable estomac des ruminants. Le bolus alimentaire n'y séjourne que 2 ou 3 heures. Il est pourvu, comme chez les monogastriques, d'une muqueuse glandulaire qui sécrète le suc gastrique. La sécrétion de suc gastrique, en conjonction avec les contractions de la

musculature de la caillette, permet une digestion enzymatique des particules alimentaires. La caillette est surtout le lieu où débute la digestion des protéines, qu'il s'agisse des protéines apportées directement par la ration et qui ont échappé à la dégradation microbienne, des protéines produites par les microorganismes du rumen ou encore de ces derniers eux-mêmes, qui sont lysés et digérés à leur tour par le suc gastrique (Jarrige, 1978). Le pH acide de la caillette (2 à 2,5) permet la stérilisation du bolus alimentaire : de nombreux microorganismes venant du rumen y sont détruits.

#### **4.1.4. Intestin grêle**

L'intestin grêle fait suite à l'estomac. Il s'agit d'un long tube cylindrique et flexueux, d'une longueur moyenne de 40 m chez le bovin adulte, dans lequel s'effectuent la digestion et l'absorption. Refoulé dans le flanc droit de l'animal par le rumen, l'intestin grêle est composé de trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Le duodénum est pourvu de glandes dites duodénales, qui sécrètent diverses enzymes. Il reçoit en outre les sécrétions du foie (la bile) et du pancréas (le suc pancréatique). L'ensemble de ces sécrétions permettent de poursuivre et de compléter la digestion déjà entamée au niveau de la caillette par le suc gastrique. Les glucides, les protéines et les lipides sont ainsi scindés en petites molécules qui vont être absorbées dans le jéjunum et l'iléum.

#### **4.1.5. Gros intestin**

Le gros intestin fait suite à l'intestin grêle et se termine au niveau de l'anus. Il est formé de trois segments successifs : le caecum, le colon et le rectum. C'est dans le gros intestin que se termine la digestion. Le caecum est un cul-de-sac cylindrique de petite taille (50 à 70 cm de long sur 10 à 12 cm de large), porté par l'intestin et situé à la limite de l'iléon et du colon. Le colon constitue quant à lui la majeure partie du gros intestin. Il se présente comme un tuyau d'une dizaine de mètres environ, qui fait suite à l'iléon et au caecum et qui se termine au niveau du rectum. Il n'y a pas de sécrétion enzymatique au niveau du gros intestin et les mouvements y sont faibles. Par contre, des fermentations similaires à celles du rumen s'y produisent, en moindre proportion toutefois, contribuant à la digestion des fibres jusque-là non digérées. Une importante absorption d'eau a lieu dans le gros intestin, de même qu'une absorption de certains nutriments. Les résidus non digérés passent ensuite dans le rectum où se forment les matières fécales, évacuées par l'anus. Le trajet du bol alimentaire dans le tractus digestif prend de 24 à 48 heures.

## 4.2. Fonctionnement du rumen : l'écosystème ruminal

Le rumen est un écosystème anaérobie strict, peuplé par 4 catégories de microorganismes qui vivent en symbiose avec le ruminant : des bactéries, des protozoaires, des archaebactéries et des champignons. Ces microorganismes dégradent, via des processus d'hydrolyse et de fermentation, la plupart des composants de la ration alimentaire du ruminant, dans le but de couvrir leurs besoins et d'assurer ainsi leur survie. Simultanément, ils synthétisent différentes molécules nécessaires à leur développement, telles que des acides aminés et des protéines.

### 4.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont très nombreuses dans le rumen : de l'ordre de  $10^9$  bactéries/ml de jus de rumen. Plus de 200 espèces bactériennes sont présentes (Mackie et *al.*, 2000). Les bactéries sécrètent dans le milieu ruminal des enzymes qui assurent l'hydrolyse des protéines (protéolyse) et des glucides : cellulose (cellulolyse), hémicelluloses (hémicellulolyse), pectines (pectinolyse) et amidon (amylolyse) (Fonty et Durand, 2007). Certaines bactéries sont également responsables de l'hydrolyse des lipides (lipolyse) et de leur hydrogénation. Ces bactéries occupent trois niches écologiques dans le rumen : elles sont soit libres dans la phase liquide du rumen ou fixées aux fibres alimentaires et à la paroi du rumen (Fonty et Durand, 2007).

### 4.2.2. Les protozoaires

Les protozoaires constituent la moitié de la biomasse du rumen. Ils sont cependant moins nombreux que les bactéries, de l'ordre de  $10^6$  cellules/ml de jus de rumen, mais plus grands (Williams et Coleman, 1997). Ils sont plus sensibles aux conditions qui règnent dans le rumen, surtout le pH, que les bactéries. A la différence de bactéries qui sécrètent dans le milieu ruminal des enzymes hydrolytiques, les protozoaires ingèrent les particules alimentaires ainsi que les bactéries du rumen, et les dégradent. Ils participent spécifiquement au métabolisme des glucides. Ils s'attaquent ainsi à tous les constituants des parois, et sont donc en concurrence avec les bactéries, qu'ils peuvent aussi consommer. En outre, les archaebactéries méthanogènes se trouvent fixées aux protozoaires. De ce fait, l'une des voies de la réduction de la production de méthane consiste à réduire la taille de cette faune ruminale (Karnati et *al.*, 2003).

### 4.2.3. Les archaebactéries

Il s'agit d'archaebactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes du rumen (Stewart et *al.*, 1997). Des études, basées sur la culture ou l'analyse

moléculaire, ont montré que les *Archaea* méthanogènes du rumen les plus communément isolés appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae* (Wright *et al.*, 2008). Il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter*. D'autres *Archaea* méthanogènes appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae* ont été isolées chez des bovins et des ovins. Tandis que des *Archaea* méthanogènes de la famille *Methanosarcinaceae* ont été trouvées chez les caprins et les ovins. Il s'agit de *Methanosarcina barkeri* (Pei *et al.*, 2010).

Les *Archaea* occupent différentes localisations dans le rumen. On les trouve dans la phase liquide du contenu digestif mais beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés, sur les particules alimentaires, ainsi que sur l'épithélium ruminal (Ohene-Adjei *et al.*, 2007).

#### 4.2.4. Les champignons

Chez le ruminant adulte, la densité de champignons mesurée par des méthodes de cultures, est comprise entre  $10^3$  et  $10^4$  champignons/ml du contenu ruminal (McAllister et Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin *et al.*, 2011). Les champignons du rumen sont totalement anaérobies (McAllister et Cheng, 1996).

La quantité de champignons dans le rumen chez l'adulte peut varier fortement en fonction du régime alimentaire et du délai entre les repas. Six genres différents de champignons du rumen ont pu être isolés et identifiés ; ils appartiennent à la famille des *Neocallimastigomycetes* (*Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces* ; Kittelmann *et al.*, 2012).

Les champignons du rumen sont souvent attachés aux fibres composant la phase solide et représentent environ 5 à 10% de la biomasse microbienne totale du rumen (Orpin, 1981). Par ailleurs, ils ont un fort potentiel fibrolytique grâce à une forte production de polyosidases, qui permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses, et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés mais ne dégradent pas la pectine. Les produits terminaux générés par la fermentation des glucides sont du formate, de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{H}_2$  (Bauchop et Mountfort, 1981).

### 4.3. Conditions indispensables au fonctionnement du rumen

La diversité des microorganismes présents fait néanmoins en sorte que les différentes espèces se complètent mutuellement (consortium). Les produits terminaux du métabolisme d'une espèce servant de substrat pour le métabolisme d'une autre espèce, se chevauchent et se substituent les unes aux autres. Etant donné que les composants de la ration sont dégradés par

des espèces microbiennes bien spécifiques, un changement dans la ration doit toujours être fait graduellement. Une transition alimentaire est donc nécessaire. En cas de changement brutal de la ration, des perturbations sévères peuvent parfois survenir. En général, il est considéré qu'un changement de la population microbienne du rumen prend au minimum trois semaines.

Bactéries, protozoaires et champignons sont adaptés à vivre dans un environnement caractérisé par un pH de 6,0 à 7,0 (Brugère, 1983), en l'absence d'oxygène, à une température de 39 à 40°C et en présence de métabolites issus des fermentations (Dehority, 2003). Les principaux produits terminaux des fermentations microbiennes sont le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le méthane (CH<sub>4</sub>), l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et les acides gras volatiles (AGV). Ces fermentations s'accompagnent en outre d'un dégagement important de chaleur.

Pour permettre un bon maintien et développement des microorganismes du rumen favorable à une bonne digestion, il est important que le rumen présente des conditions de vie assez standard. Le pH est l'un des paramètres les plus importants. Les fermentations du rumen constituent la principale source de variation du pH. Leur intensité est liée à la composition des aliments ainsi qu'au rythme de distribution des repas :

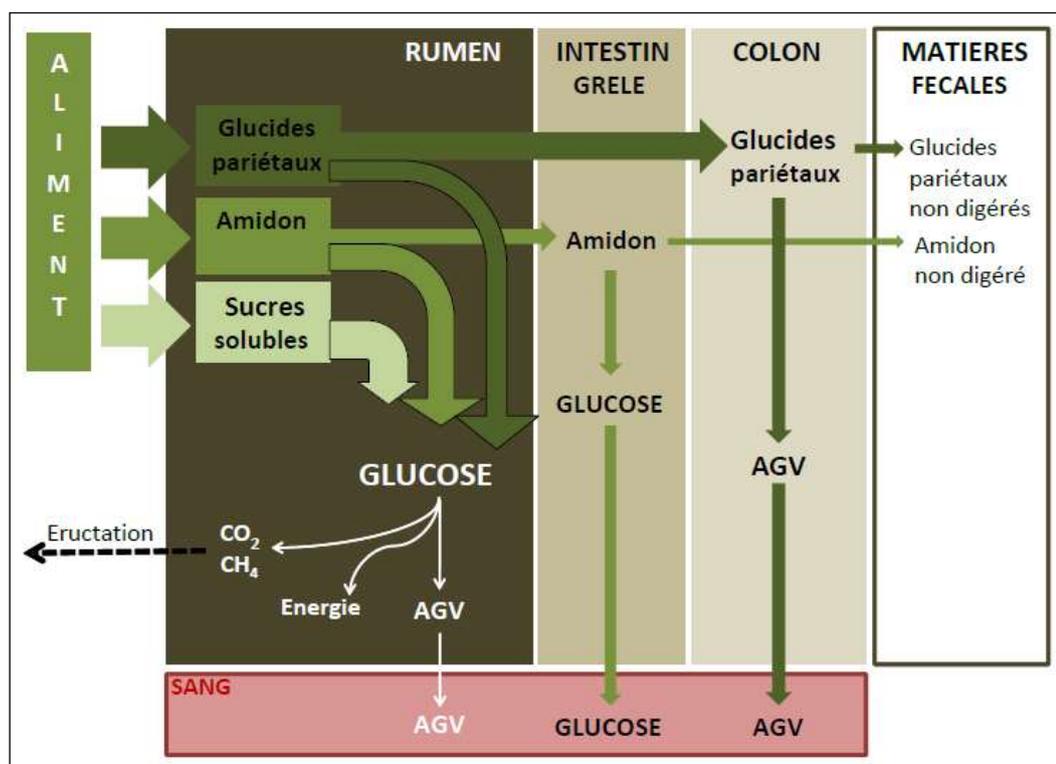
- Après un repas, le pH diminue, car la concentration en AGV augmente fortement.
- Entre les repas, le pH augmente. En effet, d'une part, la concentration en AGV diminue suite à leur absorption progressive, et d'autre part, la rumination amène des aliments imprégnés de salive riche en bicarbonates, qui constituent un tampon efficace.

#### **4.4. Digestion des aliments dans le rumen**

Lors du processus de digestion, les nutriments subissent des transformations aboutissant à leur absorption ou à leur élimination par les matières fécales. Chaque microorganisme se caractérise par la nature du substrat auquel il est capable de s'attaquer, et est donc spécialisé dans des fonctions métaboliques précises, qui peuvent être parfois assez limitées. On trouve ainsi par exemple des bactéries cellulolytiques, capables de dégrader les glucides pariétaux, des bactéries amylolytiques, capables de dégrader l'amidon, et des bactéries lipolytiques, capables de dégrader les lipides. Par conséquent, la nature de la ration influence significativement la nature de la population microbienne : un régime riche en fourrages favorisera le développement des bactéries cellulolytiques, alors qu'un régime riche en céréales favorisera celui des bactéries amylolytiques.

#### 4.4.1. Digestion des glucides

Une fois arrivés dans le rumen, les glucides sont hydrolysés sous l'action des enzymes hydrolytiques microbiennes. Le glucose représente le principal produit terminal de ce processus de dégradation. Ce glucose va ensuite être converti par le jeu des fermentations microbiennes en un métabolite intermédiaire, l'acide pyruvique. Celui-ci subit une dégradation ultérieure, qui va aboutir à la formation d'un mélange d'acides gras volatiles (AGV) : acide acétique (C2 : 0), acide propionique (C3 : 0) et acide butyrique (C4 : 0) (Andersen et *al.*, 1999). L'acide lactique est quant à lui un intermédiaire de cette chaîne de dégradation. Du CO<sub>2</sub>, du CH<sub>4</sub> et de la chaleur sont également produits au cours de ce processus (figure 12).



**Figure 12** : Voies biochimiques de la fermentation et de la production d'AGV.

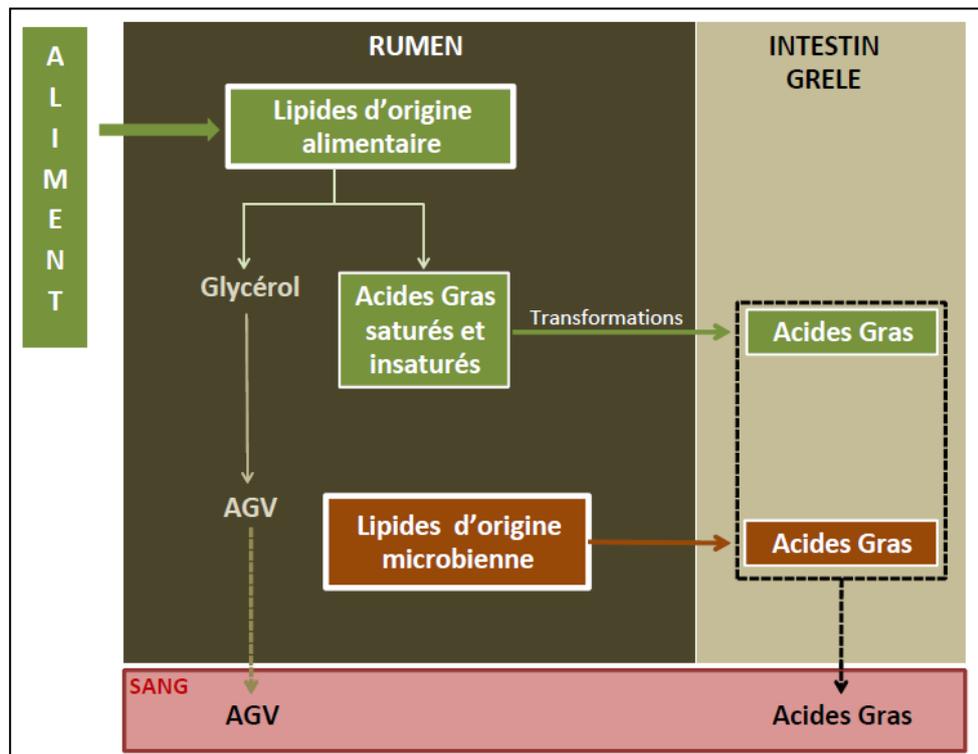
(Cuvelier et *al.*, non daté)

Il est important de rappeler que les différents glucides (cellulose, hémicellulose, amidon,...) sont dégradés par des populations bactériennes spécifiques ; la cellulose et l'hémicellulose sont attaquées par les bactéries cellulolytiques, alors que l'amidon est dégradé par les bactéries amylolytiques. Chaque population bactérienne utilise, pour ce faire, des voies de dégradation qui lui sont propres et qui aboutissent à la formation préférentielle de tel ou tel type d'AGV. Par conséquent, les proportions des différents AGV produits sont principalement fonction de la composition de la ration alimentaire. L'acide acétique est majoritaire (45 à 70 %

des AGV totaux), l'acide propionique représente de 15 à 25 % des AGV totaux, et l'acide butyrique 5 à 15%. Ainsi avec un régime riche en fourrages, les proportions d'acides acétique, propionique et butyrique sont généralement respectivement de 70 : 20 : 10. Tandis qu'avec un régime riche en céréales, la proportion d'acide acétique diminue, et celle d'acide propionique augmente, les proportions des 3 acides gras étant plutôt aux alentours de 40 : 40 : 20. La production d'acide butyrique est quant à elle augmentée lorsqu'il est distribué des aliments riches en sucres solubles (Jouany et Ushida, 1998).

#### 4.4.2 Digestion des lipides

Le rumen est le siège d'une lipolyse intense et rapide : les lipides alimentaires sont hydrolysés par les microorganismes du rumen, ce qui permet la production de glycérol et d'acides gras libres. Le glycérol formé est rapidement fermenté en AGV, alors que les acides gras insaturés sont fortement remaniés par les microorganismes du rumen (figure 13). Les acides gras libres, fixés aux particules alimentaires, quittent le rumen, passent dans la caillette, puis dans l'intestin grêle, où ils sont digérés et absorbés (Vossenberget Joblin, 2003).



**Figure 13** : Schéma de la digestion des lipides chez les ruminants.  
(Cuvelier et *al.*, non daté)

A côté de leur activité de dégradation des lipides alimentaires, les microorganismes du rumen synthétisent des lipides microbiens, caractérisés notamment par la présence d'acides gras ramifiés. Lorsque ces microorganismes quittent le rumen et passent dans la caillette, ils sont hydrolysés par le suc gastrique. Ceci permet la libération des lipides microbiens, les acides gras libres microbiens rejoignant le pool d'acides gras libres pour subir la digestion et l'absorption intestinales (Doreau et Ferlay, 1994) (figure 13).

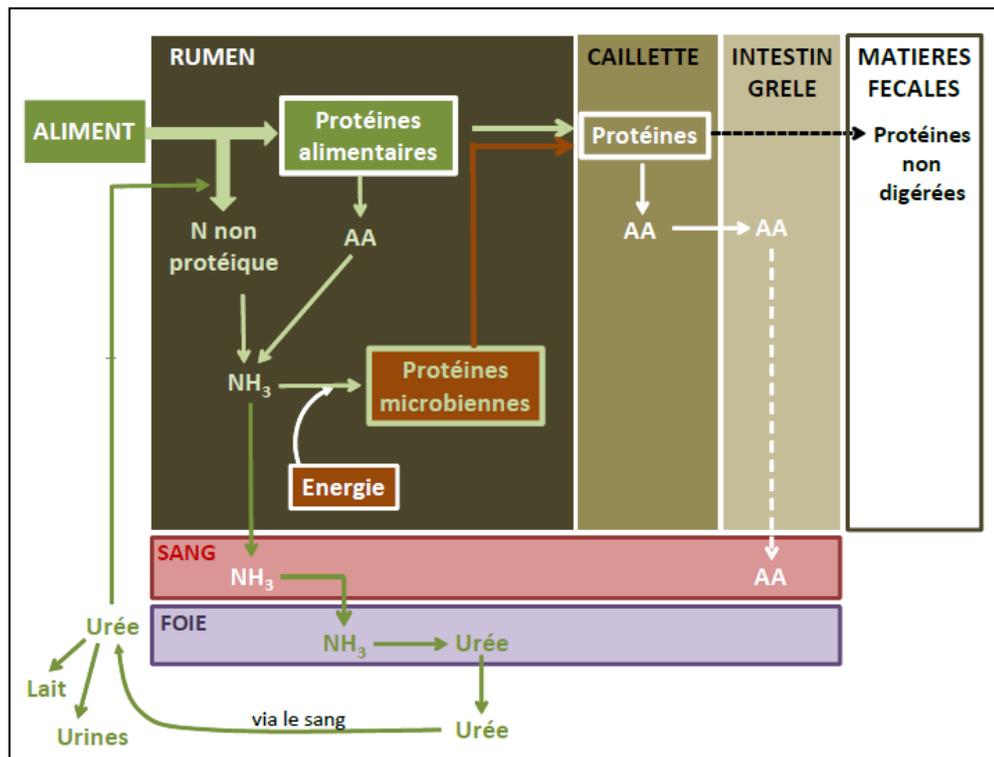
#### 4.4.3 Digestion des matières azotées

Les matières azotées alimentaires (composées des protéines et de l'azote non protéique) subissent dans le rumen une dégradation plus ou moins importante, dont le produit terminal est l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) : les protéines alimentaires sont ainsi transformées en acides aminés puis subissent une fermentation jusqu'au stade  $\text{NH}_3$ , alors que l'azote non protéique est directement transformé en  $\text{NH}_3$ . Cette dégradation génère la production d'une faible quantité d'énergie (Coleman, 1975).

Ces acides aminés sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés en particulier isobutyrate et isovalérate (Jouany, 1994). L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production d'ammoniac, à partir d'urée alimentaire ou endogène.

L'ammoniac est utilisé par les microorganismes du rumen pour synthétiser leurs propres protéines, appelées protéines microbiennes (figure 14). Cette synthèse ne peut cependant avoir lieu qu'en présence d'une quantité suffisante d'énergie disponible pour les microorganismes (effet de synchronisation). Cette énergie est principalement générée par la dégradation des glucides. Dans le cas contraire, les matières azotées excédentaires seront éliminées sous forme de  $\text{NH}_3$  potentiellement toxique. Ce dernier est en effet absorbé par la paroi du rumen et transporté jusqu'au foie où il est transformé en urée. Par ailleurs, l'urée est principalement excrétée par les reins et éliminée par les urines et le lait chez la vache laitière où un excès peut être à l'origine de mammite. Elle peut cependant également retourner au rumen *via* la salive.

Une partie des protéines de la ration résiste à la dégradation ruminale et passe dans la caillette, où elle est alors dégradée par voie enzymatique ("protéines *by-pass*").



**Figure 14** : Schéma de la digestion des matières azotées chez les ruminants. (Cuvelier et *al.*, non daté)

#### 4.4.4. Digestion des caroténoïdes

##### 4.4.4.1. Apports de caroténoïdes dans l'alimentation des ruminants

Bien que les caroténoïdes sont nécessaires pour maintenir une santé et un comportement normaux chez les animaux, ceux-ci sont incapables de synthétiser les caroténoïdes et comptent donc sur leur régime alimentaire pour s'en approvisionner.

Dans les plantes, les caroténoïdes sont synthétisés et séquestrés dans les plastes associés à des protéines. Ils sont concentrés principalement dans les membranes des chromoplastes des fleurs et des fruits, et associés à la chlorophylle dans les chloroplastes des tissus photosynthétiques. Dans les fourrages, les caroténoïdes sont présents principalement dans les feuilles (Dewhurst et *al.*, 2009) dont la teneur peut être 5 à 10 fois plus élevée que dans les tiges (Livingston et *al.*, 1968).

Pendant longtemps, les études sur les caroténoïdes des fourrages ont été focalisées sur leur fonction provitamine A. Par conséquent, les méthodes d'analyses ont été limitées à la quantification de carotène ou de  $\beta$ -carotène, qui toutefois incluait diverses molécules et isomères (Kalac, 2013). Les avancements dans les techniques de séparation de molécules (Cardinault et *al.*, 2006) et l'intérêt particulier de certains caroténoïdes dans la production animale, ont permis

d'augmenter les connaissances sur la diversité et la concentration de caroténoïdes dans les fourrages, ainsi que sur les différents facteurs de variations.

Bien qu'il existe une très grande diversité de caroténoïdes identifiés dans les plantes, pas plus de 10 ont été rapportés dans l'alimentation des ruminants, dont les principaux appartiennent à la famille des xanthophylles. Parmi les 6 xanthophylles identifiées, jusqu'à présent, la lutéine constitue le composé majoritaire et représente en moyenne 56% des caroténoïdes totaux dans les fourrages verts et les ensilages et 64% dans les foin. La zéaxanthine a été fréquemment rapportée et l'epilutéine (probablement un isomère *cis* de la lutéine (Chaveau-Duriot et *al.*, 2005). La présence de néoxanthine, de violaxanthine et d'anthéroxanthine a été plus rarement rapportée et concerne des fourrages plurispécifiques en vert (Graulet et *al.*, 2006) ou séchés en grange (Cardinanult et *al.*, 2006) ; la présence de néoxanthine et de violaxanthine dans la luzerne avait été signalée par Livingston et *al.* (1968). Concernant les carotènes des fourrages, 4 molécules différentes ont été identifiées; le tout-*trans*- $\beta$ -carotène (composé majoritaire), l' $\alpha$ -carotène et les isomères 13-*cis* et 9-*cis*- $\beta$ -carotène. En terme de concentration, il a été rapporté par Nozière et *al.* (2006a), que dans le dactyle (*Dactylis glomerata*), le ray-grass anglais (*Lolium perenne*) et le trèfle rouge (*Trifolium pratense*), les proportions moyennes de la lutéine, la zéaxanthine, l'epilutein et le  $\beta$ -carotène sont, respectivement de 630, 120, 80 et 170 mg/kg de MS. Dans les pâturages des prairies naturelles, Calderon et *al.* (2007) ont trouvé que les concentrations de la lutéine, la violaxanthine, la zéaxanthine, l'epilutein, l'anthéroxanthine, le tout-*trans*- $\beta$ -carotène et le 13*cis*- $\beta$ -carotène étaient, respectivement de 490, 140, 100, 90, 30, 40 et 110 mg/kg de MS. Néanmoins, le contenu en caroténoïdes des fourrages est affecté par plusieurs facteurs dont principalement les familles ou les espèces végétales ; les légumineuses sont plus riches en caroténoïdes que les graminées (Chaveau-Duriot et *al.*, 2005), leur stade de maturité (le contenu en caroténoïdes diminue avec l'âge du fourrage ; Graulet et *al.*, 2012), les facteurs environnementaux (intensité de la lumière, température et humidité), la nature du fourrage ; la concentration en caroténoïdes diminue fortement dans les fourrages conservés et ensilés (entre 20 et 70 mg/kg de MS dans l'ensilage de maïs ; Ferlay et *al.*, 2013) et certaines pratiques culturales (comme la fertilisation et l'utilisation de pesticides ; Park et *al.*, 1983) et méthodes de fabrication (les concentrés contiennent des teneurs faibles en caroténoïdes dues à leur destruction lors du processus de fabrication).

#### 4.4.4.2. Transfert des caroténoïdes de la ration au lait chez les ruminants

La concentration des caroténoïdes dans les produits bovins est déterminée d'une part par leurs caractères qualitatifs et quantitatifs des fourrages ingérés, et d'autre part par leur transfert

de la matrice végétale vers les tissus. En regard des faibles teneurs en caroténoïdes retrouvées dans le lait, l'efficacité du transfert vers la glande mammaire semble fortement limitée. Il est vraisemblable que les différentes étapes du transfert des caroténoïdes de l'alimentation au lait (digestion ruminale, absorption intestinale et métabolisme tissulaire) puissent influencer leur disponibilité pour la mamelle et les autres organes cibles.

#### 4.4.4.2.1. Digestion ruminale

Wing (1969) a mis en évidence une forte digestibilité des caroténoïdes des fourrages dans l'ensemble du tube digestif des bovins (en moyenne 78%) ; cependant, cette digestibilité était variable entre fourrage, en particulier en fonction de l'espèce botanique et de la teneur en matière sèche. Elle était aussi plus élevée pour les fourrages verts que pour les fourrages conservés, pour les foins que pour les ensilages.

Plusieurs travaux, conduit *in vivo* ou *in vitro* sur le devenir des caroténoïdes dans le rumen, ont porté essentiellement sur le  $\beta$ -carotène et ont conduit à 3 types de conclusions distinctes ;

1) **une dégradation partielle** (disparition de 20 à 35% du  $\beta$ -carotène après 7 à 9h d'incubation en fermenteur ; Davidson et Seo, 1963) et **élevée** (de l'ordre de 50% du  $\beta$ -carotène et de xanthophylles ; Cardinault et *al.*, 2004),

2) **une dégradation très faible** (voire nulle) a été enregistrée par Dawson et Hemington (1974) ; Cohen-Fernandez et *al.* (1976). D'après Van Soest (1982), la forte proportion de doubles liaisons de configuration *trans* rendrait les caroténoïdes plus résistants que les acides gras à l'hydrogénation par les bactéries du rumen,

3) **Possibilité d'une synthèse** de  $\beta$ -carotène par les microorganismes rumen. En effet, chez le veau né dans des conditions stériles recevant un lait synthétique dépourvu de carotènes, l'incubation d'une bactérie isolée d'un rumen de vache a induit une excrétion fécale de  $\beta$ -carotène (Pivnyak et Aridhzhanova, 1977).

#### 4.4.4.2.2. Absorption intestinale

Concernant le passage des caroténoïdes au travers de la paroi intestinale, les informations disponibles sont majoritairement basées sur l'étude des monogastriques (Faure et *al.*, 1999). Dans ces espèces, l'importance et la nature des lipides alimentaires influence la solubilisation des caroténoïdes et, par conséquent, leur absorption intestinale. Rappelons que les caroténoïdes sont des molécules liposolubles et qu'elles sont donc transportées avec la phase lipidique.

L'expérimentation de Cardinault et *al.* (2006) menée sur des brebis recevant du trèfle violet sous forme fraîche et munie de cathéters fixés au niveau de la circulation portale permet de déceler uniquement la lutéine et l'épilutéine dans le plasma. L'absence de  $\beta$ -carotène dans le sang du système porte peut être expliquée par une conversion intensive en vitamine A, l'activité de clivage de la 15-15'-mono-oxygénase intestinale étant très efficace chez les ovins. Ces résultats confirment également que, du fait des caractéristiques lipophiles des caroténoïdes, leur absorption se fait presque exclusivement par les vaisseaux lymphatiques.

Dans le tractus digestif, les xanthophylles, qui sont des molécules polarisées, sont exposées en surface externe des émulsions et des micelles, leur transfert entre émulsion et micelles est donc plus facile et plus efficace que pour les carotènes qui, en tant que molécules moins polarisées, sont piégées au centre de ces particules. Le transfert des caroténoïdes de l'émulsion aux micelles pourrait être un facteur limitant de leur absorption intestinale, et tout particulièrement dans les cas d'apports déséquilibrés avec trop de caroténoïdes ou trop peu de graisses. Selon un consensus général datant des années 1970, l'absorption des caroténoïdes par la muqueuse intestinale s'effectuait selon un mécanisme passif (Bulvestre, 2007). Cependant, l'existence de différences selon l'espèce animale étudiée, les molécules ou les segments intestinaux impliqués dans l'absorption des caroténoïdes suggère en réalité un mécanisme actif (During et Harisson, 2004). Un récepteur facilitant leur transport serait impliqué dans le passage des caroténoïdes au travers de la membrane de la face muqueuse des entérocytes (Nozière et *al.*, 2006b). Plusieurs études confirment cette hypothèse en montrant que les capacités d'absorption du  $\beta$ -carotène sont dépendantes de la dose et de la durée, et qu'elles sont également saturables (Mora et *al.*, 2001).

Chez les ruminants, les mécanismes exacts restent inconnus, mais présentent vraisemblablement des spécificités liées aux modifications de la composition des lipides passant dans le duodénum induites par le métabolisme ruminal des graisses alimentaires. Les sécrétions biliaires peuvent également jouer un rôle dans la composition des caroténoïdes présents dans le tractus digestif grâce au recyclage entéro-hépatique. Concernant les taux d'absorption des différents caroténoïdes, les rares résultats publiés dans la littérature sur le ruminant indiquent des taux d'absorption apparente de l'ordre de 56% pour la lutéine, et de 22 à 23% pour le *trans*- et le 13-*cis*- $\beta$ -carotène dans l'intestin grêle du mouton (Cardinault et *al.*, 2006), ou de 66 à 88% pour le  $\beta$ -carotène dans l'intestin total chez le bovin (Mora et *al.*, 2001).

#### 4.4.4.2.3. Métabolisme du $\beta$ -carotène

La disponibilité des caroténoïdes dépend de leur transport dans la lymphe et le plasma, de leur métabolisme tissulaire (particulièrement la conversion en vitamine A et l'utilisation comme pigments et antioxydants), mais également de leur stockage dans les tissus adipeux ou de leur sécrétion biliaire par le foie.

- **Conversion des caroténoïdes en vitamine A**

Au niveau de l'entérocyte, les caroténoïdes pro-vitaminiques A, essentiellement le  $\beta$ -carotène, peuvent être transformés en deux molécules de rétinol par l'enzyme  $\beta$ -carotène 15'15'-mono-oxygénase. Chez l'homme, elle est plus active vis-à-vis de l'isomère *trans* du  $\beta$ -carotène, et elle peut être inhibée par la zéaxanthine (Grolier et al., 1997). Chez les ruminants, l'activité de l'enzyme intestinale semble être meilleure chez les ovins que chez les bovins ou les caprins (Yang et Tume, 1993), ce qui explique le stockage de  $\beta$ -carotène plus élevé et la coloration jaune des carcasses plus marquée chez les bovins (Mora et al., 2001). La conversion des caroténoïdes en rétinol peut également avoir lieu dans d'autres types de cellules épithéliales ou dans les entérocytes (Borel et al., 2005); elle pourrait également avoir lieu au niveau de glande mammaire. En effet, il a été montré par Schweigert et Eisele (1990) qu'après une administration parentérale de  $\beta$ -carotène à des vaches laitières, les concentrations en vitamine A augmentent dans le lait mais pas dans le sang.

- **Transport plasmatique des caroténoïdes**

Suite à l'absorption par les entérocytes, les caroténoïdes qui ne sont pas transformés en rétinol (les xanthophylles plus une fraction des carotènes) sont transportés du pôle luminal au pôle séreux de l'entérocyte, où ils sont excrétés dans la lymphe associés aux triglycérides alimentaires dans les chylomicrons (CM) qui migrent vers le foie. Les caroténoïdes peuvent être stockés dans le foie, comme une large gamme de substances lipophiles, dont la vitamine E, puis être ensuite sécrétés avec les triglycérides hépatiques dans le plasma sanguin sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (During et Harisson, 2004). Chez les bovins, les caroténoïdes plasmatiques sont essentiellement associés aux lipoprotéines de haute densité (HDL), ce qui est cohérent avec la composition lipoprotéinique de leur plasma, alors que chez les ovins et caprins, ils seront majoritairement associés aux fractions LDL et VLDL.

Chez les bovins, le  $\beta$ -carotène, particulièrement le *trans*- $\beta$ -carotène, est la forme circulante principale des caroténoïdes. En plus faible importance, les isoformes 13-*cis*- $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène et la lutéine peuvent également être retrouvés dans leur circulation. Ces

proportions diffèrent entre les espèces, comme par exemple chez les petits ruminants, chez lesquels la lutéine est majoritaire et d'autres caroténoïdes peuvent être retrouvés, dont la zéaxanthine (Yang *et al.*, 1992).

- **Stockage des caroténoïdes dans les différents organes**

Chez les bovins, les caroténoïdes sont présents en quantités particulièrement importantes dans le foie et les tissus adipeux. Ces derniers constituant sans doute la majeure partie des réserves corporelles en caroténoïdes, particulièrement en  $\beta$ -carotène. Le foie et le plasma étant également des pools non négligeables (Mora *et al.*, 2001).

Pour la capacité du tissu adipeux bovin à mobiliser les caroténoïdes, soit en phase de déplétion nutritionnelle (diminution des apports en caroténoïdes) soit en phase de lipomobilisation, il a été montré que chez la vache laitière le pool de  $\beta$ -carotène diminue de 40% après 6 semaines de déplétion, sans mobilisation des lipides (Nozière *et al.*, 2006b). Paterson (1965) a rapporté une relation linéaire entre carotène et acides gras non estérifiés (AGNE) plasmatiques chez la vache laitière avant le vêlage, suggérant une libération du carotène concomitante à la lipomobilisation. Les mécanismes impliqués restent inconnus, mais le flux de sortie des caroténoïdes de l'adipocyte vers le plasma pourrait mettre en jeu les HDL, comme c'est le cas pour le cholestérol (Calderon, 2007).

- **Mécanisme de transfert des caroténoïdes du plasma à la mamelle**

A la différence des acides gras du lait, dont 60% sont fournis par le plasma et 40% peuvent être synthétisés *de Novo* dans la mamelle (Chilliard *et al.*, 2001), les caroténoïdes du lait sont exclusivement fournis par le plasma. Les mécanismes d'apport de caroténoïdes à la glande mammaire incluent :

**1) le captage par l'intermédiaire de l'action lipolysante de la lipoprotéine lipase sur les lipoprotéines riches en triglycérides** : chylomicrons chargés des caroténoïdes absorbés au niveau intestinal, VLDL (et LDL) contenant les caroténoïdes stockés puis sécrétés par le foie dans le plasma. Ce mécanisme a été mis en évidence chez la rate pour l' $\alpha$ -tocophérol (Martinez *et al.*, 2002) dont le captage par la glande mammaire dépend, pour les acides gras, de l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) sur les CM. Ce mécanisme pourrait expliquer le faible taux de transfert des caroténoïdes entre le plasma et le lait, puisque le CM et les LPL ne transportent qu'une faible proportion de ces molécules chez le ruminant (Yang *et al.*, 1992).

2) *l'internalisation complète des petites lipoprotéines (LDL et HDL) via des récepteurs spécifiques* par les cellules épithéliales mammaires, productrices des différentes composantes du lait. Chez la femme, Schweigert et *al.* (2004) ont trouvé des profils de caroténoïdes différents entre le colostrum (plus riche en  $\alpha$ -carotène et lycopène, moins polaires) et le lait mature (plus riche en lutéine et zéaxanthine, plus polaire). D'autre part, ils ont montré que les caroténoïdes polaires sont répartis en proportions équivalentes entre les LDL et les HDL. Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme sélectif dans le transfert des caroténoïdes dans le lait, mettant en jeu différents types de lipoprotéines en fonction de la phase de lactation.

Le taux de transfert des caroténoïdes entre le plasma et le lait est très faible ; avec un débit de l'ordre de 350 l de plasma/kg de lait, le taux de transfert de  $\beta$ -carotène (caroténoïde qui représente 75 à 85% des caroténoïdes totaux dans le lait) est de l'ordre de 0,008% (Nozière et *al.*, 2006a). Ce taux de transfert est beaucoup plus faible que celui de la vitamine A (de 0,10 à 0,43%), mesuré dans les mêmes conditions.

- *Métabolisme de la vitamine A*

Le rétinol issu de la conversion du  $\beta$ -carotène par la 15-15' monooxygénase des entérocytes ou de la supplémentation en esters peut être libéré dans la lymphe et le plasma pour être transporté vers le foie qui constitue le principal site de stockage de la vitamine A. Celle-ci peut circuler sous forme d'esters de rétinol dans les lipoprotéines plasmatiques. Sous forme non estérifiée, elle circule dans le sang liée à une protéine d'origine hépatique, la Rétinol Binding Protein (RBP ; Nonnecke et *al.*, 2004) qui permettent de réguler sa mobilisation par le foie, sa teneur circulante dans le plasma et son transport à la glande mammaire. Bien qu'une majorité des caroténoïdes des CM soit captée par le foie, il a été estimé que 25 à 30% d'entre eux peuvent être utilisés par les tissus extra-hépatiques. D'autres formes de rétinoïdes circulent dans le plasma à des teneurs nettement plus faibles : acide rétinoïque lié à l'albumine, rétinyl- et rétinoyl- $\beta$ -glucuronides (Paik et *al.*, 2004).

La vitamine A sécrétée dans le lait est principalement d'origine plasmatique, mais la capacité de la glande mammaire à cliver le Rétinol  $\beta$ -carotène en vitamine A a également été mise en évidence (Schweigert et Eisele, 1990).

En conclusion, l'apport des caroténoïdes à la mamelle est régulé par : a) leur absorption par les entérocytes, b) leur métabolisme dans les tissus (transformation en vitamine A, utilisation comme pigment ou comme antioxydant) et c) leur stockage/relargage par le foie ou les tissus adipeux.

#### 4.4.5. Digestion des tocophérols

##### 4.4.5.1. Apports de vitamine E dans l'alimentation des ruminants

La vitamine E est synthétisée par les végétaux et sa présence dans le lait résulte de la consommation, par le ruminant, de fourrages verts ou d'aliments concentrés enrichis (oléagineux par exemple) ou supplémentés (concentré de production, complément minéral et vitaminique (CMV)). L'herbe fraîche est de loin, parmi les fourrages la source la plus riche en vitamine E (250 mg/kg de MS ; Ferlay et *al.*, 2013). L' $\alpha$ -tocophérol est plus abondante dans les feuilles que les tiges. La proportion des feuilles, dans les plantes, peut varier selon les espèces, la maturité, les conditions climatiques, la saison et la latitude. Par conséquent, ces différents facteurs vont affecter la concentration d' $\alpha$ -tocophérol dans les fourrages (Kalac et *al.*, 2011).

De nombreuses études stipulent que les concentrations en  $\alpha$ -tocophérol diminuent à mesure que les plantes arrivent à maturité du fait de la perte physiologique croissante des feuilles (Ballet et *al.*, 2000). Par ailleurs, cette concentration est considérée optimale au moment de la floraison pour les légumineuses et l'épiaison pour les graminées (Ballet et *al.*, 2000). Les facteurs environnementaux, tels que la lumière du soleil, la photopériode et la température, affectent également le contenu d' $\alpha$ -tocophérol dans les plantes (Havaux et *al.*, 2005). Pour un stade de croissance donné, les fourrages sont plus riches en  $\alpha$ -tocophérol lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions douces et humides. L'effet bénéfique des conditions pluvieuses réside dans la réduction de la quantité de la lumière du soleil reçue par la plante (Munné-Bosch et Alegre, 2005). Il a également été montré que l'intensité lumineuse élevée à de basses températures est plus stressant pour les plantes que l'intensité lumineuse élevée à des températures élevées (Havaux et *al.*, 2005). La manière dont le fourrage est traité entre sa récolte et offert comme aliment aux animaux peut influencer sur sa teneur en  $\alpha$ -tocophérol. Le découpage, le séchage et le meulage détruisent l' $\alpha$ -tocophérol par oxydation. Cette réaction est accélérée par la lumière ultraviolette et la chaleur (Bauernfeind, 1980).

L'ensilage est supérieure par rapport à la fanaison des fourrages dans la préservation de l' $\alpha$ -tocophérol (Ballet et *al.*, 2000). Il peut y avoir des pertes allant jusqu'à 80-90% d' $\alpha$ -tocophérol dans le foin, mais dans les ensilages bien fermentés les pertes sont souvent moins de 20% (Kalac et *al.*, 2011). Les pertes au cours du processus d'ensilage varient entre les études et les conditions d'ensilage et du choix des espèces végétales (Beeckman et *al.*, 2010). La teneur en vitamine E des principaux aliments des ruminants sont, à titre indicatif données dans le tableau 8.

**Tableau 8** : La teneur en vitamine E des principaux aliments des ruminants (Meschy, 2007).

Aliments	Teneur en vitE ( $\mu\text{g/kg}$ de MS)
<i>Céréales</i>	15-30
<i>Tourteaux</i>	15-20
<i>Pulpe de betteraves déshydratées</i>	12
<i>Luzernz déshydratée</i>	150-200
<b><i>Fourrages verts :</i></b>	
Prairies permanente	20
Graminées	20
Légumineuses	100
<b><i>Ensilages :</i></b>	
Prairies permanente	5
Maïs	5
Graminées	5
Légumineuses	5
<b><i>Foins :</i></b>	
Prairies permanente	10
Graminées	5
Légumineuses	10

Pour la supplémentation en vitamine E, les recommandations récentes sont d'environ 80 UI (unité internationale)/kg de matière sèche ingérée (MSI) en période de tarissement et *post-partum*, et de 20 UI/kg de MSI au cours de l'allaitement (Kalac, 2013). L'apport en vitamine E est généralement considéré comme suffisant lorsque l' $\alpha$ -tocophérol contenue dans le plasma sanguin est supérieure à 3-3,5  $\mu\text{g/ml}$ , ou à un rapport plasma/cholestérol égal à 2. Au-delà de ces valeurs, aucun bénéfice supplémentaire de la vitamine E n'a été observé (Baldi, 2005).

#### 4.4.5.2. Transfert de vitamine E de la ration au lait chez les ruminants

Dans la plupart des cas, même si la concentration en  $\alpha$ -tocophérol dans les fourrages est élevée, les besoins en vitamines E des ruminants ne peuvent être convenablement couverts par leur consommation quotidienne de fourrage (McDowell, 2000). Entre l'ingestion et utilisation métabolique d' $\alpha$ -tocophérol présente dans les fourrages, deux étapes importantes sont impliquées: le passage de la matière à travers le rumen et l'absorption intestinale. Un certain nombre de facteurs peut donc modifier le passage de la vitamine E du fourrage au lait des vaches.

##### 4.4.5.2.1. Digestion ruminale

La dégradation de la vitamine E par les microorganismes du rumen a été rapportée. En effet, Alderson et *al.* (1971) ont constaté une dégradation de la vitamine E variait de 8 à 42 %

avec l'augmentation du niveau d'incorporation de maïs dans la ration. Suite à ces résultats, ils ont suggéré que la vitamine E a été partiellement dégradée par la microflore du rumen et en particulier par les bactéries amylolytiques. Une dégradation modérée de la vitamine E par la microflore du rumen (environ 20%) a été signalée par Robert, (1995). Par ailleurs, des études plus récentes, en utilisant la forme stabilisée de la vitamine E (acétate de dl- $\alpha$ -tocophérol), ont rapporté qu'il y a eu peu ou pas de dégradation de la vitamine E dans le rumen (Chikunya *al.*, 2004). Très récemment, en utilisation des vaches laitières de haute production, Hymøller et Jensen (2010) ont également montré qu'aucune dégradation de l'acétate de dl- $\alpha$ -tocophérol n'a été enregistrée dans le rumen.

#### 4.4.5.2.2. Absorption, transport et distribution de la vitamine E

L'absorption de la vitamine E dépend étroitement des processus régissant la digestion et l'absorption des graisses alimentaires. En effet, la carence clinique en vitamine E chez l'homme est généralement due au syndrome de malabsorption des graisses (Bramley et *al.*, 2000). La vitamine E est absorbée dans l'intestin grêle proximal, où le transport à travers la bordure en brosse est sensé se produire par diffusion passive. Chez le rat, approximativement 40% d'une dose unique d' $\alpha$ -tocophérol a été absorbée, tandis que 65% de la dose a été absorbé lorsqu'une  $\alpha$ -tocophéryle acétate a été administré lentement et de manière continue. Dans les études sur l'homme, les estimations de 24 h d'absorption efficace pour l' $\alpha$ -tocophérol et  $\alpha$ -tocophérol acétate ont varié entre 21 et 86%. Plusieurs groupes ont rapporté que la supplémentation en vitamine E chez l'homme augmente les concentrations plasmatiques pas plus de deux à trois fois indépendamment de la durée, de la quantité ou de la fréquence des doses, suggérant qu'il existe une limite d'absorption de la vitamine E et son transport dans le corps. Traber (2000) a démontré que l'absorption de la vitamine E a augmenté linéairement avec l'augmentation de la dose administrée, alors que les concentrations du tocophérol plasmatique restent constantes. Ces auteurs ont conclu que la vitamine E est absorbée à un taux constant, suggérant que la vitamine E nouvellement absorbée a remplacé en partie le tocophérol déjà présent dans les lipoprotéines circulantes, limitant ainsi les concentrations plasmatiques globales.

Chez les ruminants, la vitesse d'absorption de la vitamine E est relativement lente que chez d'autres espèces, le pic au niveau du plasma est atteint environ 24-48 h après administration orale (Ballet et *al.*, 2000). L'efficacité d'absorption de la vitamine E varie avec son niveau d'apport dans l'alimentation; à 10 UI/kg, il y a environ 98% de l'absorption de la vitamine E, entre 100 et 1000 UI, l'efficacité baisse, respectivement entre 80 et 70% (Leeson et Summers,

2001). Il est également probable que l'absorption par l'intestin est limitée par saturation à des niveaux alimentaires très élevés en vitamine E (Weiss et Wyatt, 2003).

La vitamine E est sécrétée dans les CM à la suite de son absorption dans la muqueuse intestinale. Les CM sont transportés le long de l'intestin via la voie lymphatique et sécrétée dans la circulation, où ils subissent un catabolisme par la LPL, une enzyme fixée à la surface de l'endothélium capillaire, conduisant à la formation des résidus de chylomicrons. Les composants de surface en excès produits par le catabolisme des chylomicrons sont transférés directement aux HDL, qui peuvent échanger leur tocophérol nouvellement acquis avec d'autres lipoprotéines circulantes. En outre, la LPL peut agir comme une protéine de transfert, transférant la vitamine E à un certain nombre de tissus, y compris la peau, les muscles et le tissu adipeux. Les tissus capables de synthétiser la LPL (par exemple, le tissu adipeux) peuvent obtenir plus de tocophérol par ce mécanisme. Cependant, la majeure partie des tocophérols absorbés restent dans les résidus de chylomicrons, qui sont ensuite absorbés par les cellules parenchymateuses du foie.

Le foie joue un rôle central dans la libération de tocophérol dans la circulation et par conséquent son mouvement vers les tissus périphériques. Cela dépend de l'action d'une protéine cytosolique 30 kDa, appelée  *$\alpha$ -tocophérol transfert protein* (TTP). La TTP se lie préférentiellement à l' $\alpha$ -tocophérol plus qu'au  $\delta$ -homologue, car elle peut discriminer entre le nombre et la position des groupements méthyle sur l'anneau chromanol. Ainsi, bien que l' $\alpha$ - et  $\delta$ -tocophérol soient absorbés à un degré similaire et incorporés dans les chylomicrons en quantités égales, la majeure partie du  $\delta$ -tocophérol est excrétée dans la bile alors que l' $\alpha$ -tocophérol est retenue préférentiellement. Il en résulte que l' $\alpha$ -tocophérol soit l'homologue prédominant *in vivo*, avec plus de 80% de la vitamine E présente dans la circulation (Bramley et al., 2000). La TTP peut également discriminer entre les différents stéréo-isomères du tocophérol.

- **Concentrations et taux de transfert de l' $\alpha$ -tocophérol dans le lait de vache.**

La teneur en vitamine E dans le lait de vache est affectée par plusieurs facteurs, tels que les espèces, les races, selon la variabilité individuelle liée au patrimoine génétique, le stade de lactation, la parité de l'animal, en interaction avec son niveau de production et son état sanitaire. La nature de l'alimentation joue également un rôle important (Nozière et al., 2006a). Shingfield et al. (2005) ont enregistré des teneurs en  $\alpha$ -tocophérol de 1,10-1,15 et 0,54 mg/kg de lait de vaches nourries, respectivement d'ensilages d'herbe et de foin. En revanche, Mogensen et al. (2012) n'ont pas trouvé de différence significative. La sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol dans le lait était liée à l'apport alimentaire. En effet, Focant et al. (1997) ont montré qu'une supplémentation alimentaire à un taux élevé en vitamine E (9616 UI/j) a augmenté le contenu en  $\alpha$ -tocopherol

dans le lait et amélioré la résistance des matières grasses laitières du lait à l'oxydation. Néanmoins, Le taux de transfert apparent d' $\alpha$ -tocophérol de l'aliment au lait a été d'environ 2,8-6% (Höjer et *al.*, 2012).

#### **4.4.6. Digestion des composés phénoliques**

##### **4.4.6.1. Les polyphénols des fourrages**

Les fourrages contiennent de grandes quantités de composés aromatiques à la fois dans la paroi cellulaire insoluble (Besle et *al.*, 1994) et dans le contenu cellulaire sous forme d'eau et de polyphénols soluble dans l'éthanol (Fraisie et *al.*, 2007) spécifique à chaque taxon végétal (Harborne,1999). Les teneurs en Flavonoïdes et d'autres composés phénoliques variaient de 0,8 à 8 g/kg MS, la prairie naturelle étant de loin la plus riche. Le trèfle violet fraîchement fauché contenant 9,2 g/kg MS d'isoflavones (Besle et *al.*, 2004). Les Composés caffeoyls et flavonoïdes glycosides ont été principalement trouvés dans le foin de *ray grass*, le foin de prairie et la prairie pâturée. Les composés hydrolysés tels que les acides hydroxycinnamiques et aglycones ont été trouvés dans l'ensilage de maïs et l'ensilage de *ray grass*. Les taux estimés de polyphénols étaient les plus faibles pour l'ensilage de maïs (3,7 g/kg), à peu près similaire pour le foin et l'ensilage de *ray grass* et le foin de dactyle (environ 15g/kg). Les concentration les plus grandes ont été signalées pour le foin de prairie (21,6 g/kg) et la prairie pâturée (35,3 g/kg) (Besle et *al.*, 2010). La présence de flavonoïdes principalement sous la forme de glycosides dans tous les foins plaident en faveur de la pertinence du séchage en grange dans l'obscurité pour préserver les polyphénols. En revanche, il a été démontré avec le trèfle rouge que l'ensilage fermenté et le séchage au four sont deux procédés appropriés pour la conservation des aglycones dans les fourrages (Sakakibara et *al.*, 2004).

##### **4.4.6.2. Métabolisme des composés phénoliques et transfert à la glande mammaire**

La plupart des composés phénoliques (CP) naissent de la dégradation ruminale des polyphenols solubles et des composés aromatiques de la paroi cellulaire. Plusieurs réactions de réduction, de déméthylation, de déshydroxylation, et de décarboxylation avec une vitesse variable ont donné lieu à plusieurs composés aromatiques qui sont capables d'être absorbés (Besle et *al.*, 1995). Les composés sont absorbés à travers le rumen et la muqueuse intestinale et immédiatement conjugués avant de pouvoir être transformé dans le foie, excrété dans l'urine ou le lait (Scheline, 1991). Les principaux acides phénoliques observés dans le rumen des moutons

recevant des fourrages étaient les acides 3-phénylpropionique (APP), cinnamique (AC), et benzoïque (AB) (Chesson et *al.*, 1982). Dans le sang, les principaux composés étaient l'APP et l'AB (Cremin et *al.*, 1995). L'APP est transformé en AB dans le foie par  $\beta$ -oxydation (Scheline, 1991). Le pool de l'AB est ensuite conjugué avec la glycine pour former l'acide hippurique (AH) (Gatley et Sherratt, 1977), ou avec de l'acide glucuronique ou sulfate. L'acide chlorogénique (ACh) est rapidement clivé dans le rumen en acides caféique (AC) et quinique (AQ). L'AC est en partie absorbé ou transformé dans le rumen en cinnamate puis en APP; l'aromatisation de l'AQ n'est pas très efficace (Martin, 1982), mais elle donne lieu à l'AB. Une part de tous ces composés est ensuite absorbée directement. Le pool de l'AB dans le sang est excrété dans le lait (et dans les urines) comme l'AH et quelques formes conjugués de l'AB.

Les composés UV-visibles (CUV) peuvent également contenir des produits de la dégradation des acides aminés. La phénylalanine est une autre source d'APP (Martin, 1973) et peuvent aussi produire l'AC (Hansen et Crawford, 1968). La tyrosine est transformée en APP (Martin, 1973) ou peuvent être convertis en phénol, 4-éthylphénol, p-crésol par *Clostridium tetanomorphum* (Brot et *al.*, 1965). La dégradation microbienne de la tryptophane conduit à des composés indolyl comme le scatole et l'indole (Kemmer et *al.*, 1997).

#### **4.4.6.3. Importance des composés phénoliques dans la santé des ruminants, le rendement et les propriétés organoleptiques du lait**

La consommation d'un niveau adéquat de CP par les bovins laitiers réduit l'incidence du ballonnement au pâturage, impliquant la formation d'une vaste mousse dans les réticulorumen qui entraîne l'application d'une pression sur les poumons, provoquant souvent une insuffisance respiratoire et la mort de l'animal (Harborne, 1998). Les CP, en interagissant avec les protéines, provoquent l'effondrement ou l'inhibition de la formation de mousse. Il a été suggéré que l'incidence du ballonnement peut être réduit, alternativement, en sélectionnant à partir de certaines cultures des cultivars qui contiennent un niveau élevé de CP, par exemple, la luzerne (*Medicago sativa*) (Aerts et *al.*, 1999).

L'effet des CP alimentaires sur la composition et le rendement du lait n'a pas été suffisamment élucidée (Besle et *al.*, 2010), mais il a été rapporté qu'une alimentation du bétail riche en CP augmente la production, la teneur en matière grasse et la teneur en azote non-caséine du lait (Blauwiekel et *al.*, 1997). Il a également été montré que la fourniture d'une source modérée de pro-anthocyanidines dans l'alimentation des moutons, en complétant l'alimentation avec le lotier (*Lotus corniculatus*), a augmenté le rendement de lait, des protéines et du lactose

(les différences sont plus prononcées en fin de lactation; Wang et *al.*, 1996). Il est suggéré que l'augmentation du rendement en protéines du lait peut être liée au fait que, dans le réticulorumen (pH de 6,0 à 7,0), les CP interagissent avec les protéines inhibant ainsi l'utilisation des protéines dans le rumen par des micro-organismes indigènes (il a été estimé que la microflore réticulorumen dégrade jusqu'à 75% des protéines ingérées). Mais une fois que le complexe protéine-CP passe dans la caillette (pH 2,5 à 3,5), il est décomposé et les protéines libérées sont dégradées et utilisées par le ruminant (Wilkins & Jones, 2000). Il a également été démontré que les CP réduisent l'incidence des *helminthiases* infra-cliniques chez les ruminants et la croissance et la migration des *Colubriformis trichostrongylus* ainsi que d'autres nématodes ce qui induit une augmentation dans la production laitière et l'utilisation des protéines (Molan et *al.*, 2000).

La supplémentation des vaches laitières jusqu'à 20 % de déchets de thé décaféiné, riche en polyphénols, a été rapportée avoir peu d'effet sur la production ou la qualité de lait, par conséquent son utilisation comme culture fourragère pas cher a été préconisée (Baruah, 1997).

Les CP sont susceptibles de jouer un rôle important dans les propriétés sensorielles du lait et des produits laitiers. L'addition du phénol au lait de fromage, à raison de 0,1 mg/kg pour le cheddar, ou à 1-10 mg/kg pour le Camembert, le Roquefort ou les fromages bleus, comme agents aromatisants a été brevetée (Dunn & Lindsay, 1985). Les propriétés sensorielles d'un éventail de phénols simples ont été répertoriées par Maga (1978). L'addition de préparations phénoliques à 100 mg/kg (extrait de fumée de bois avec un ratio de phénols et terpènes de 4:1) au lait de fromagerie (environ 60-80% étant retenue dans la caille) donnait un goût fumé souhaitable au fromage. Le rôle de la vanilline dans la saveur de crème glacée et de yaourt est bien établi. La capacité des protéines de lait pour interagir avec la vanilline et d'autres CP simples et à la réduction de leur perception de l'arôme ont été établies (Reiners et *al.*, 2000).

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

## **Partie 1. Etude de la composition chimique des margines et caractérisation de ses facteurs de variation**

### **1. Rappel des objectifs de l'étude**

Compte tenu du manque de données claires concernant la composition chimique, en particulier en composés phénoliques, des margines en fonction des productions, nous avons mis en place un protocole d'étude destiné à évaluer la variabilité de ce paramètre, le procédé d'obtention de l'huile (presse ou centrifugation à 3-phases) et la variété d'olive. Pour cela, nous avons sélectionné quinze unités de production oléicole réparties dans quatre wilayas de l'est algérien (Constantine, Guelma, Skikda et Batna) d'une part, et nous avons élaboré un questionnaire d'enquête à réaliser lors de la visite de chaque site, d'autre part. Celui-ci a permis de caractériser au mieux les conditions de production et collecter ainsi des informations pour l'exploitation des données analytiques obtenues.

### **2. Questionnaire d'enquête**

Avant l'échantillonnage, une étude a été réalisée sur la caractérisation générale des unités de production de l'huile d'olive. Le questionnaire a été testé auprès d'une cinquantaine d'unités dans les mêmes wilayas précitées. Il comprend 20 questions réparties en 3 sections (annexe 1).

#### **✓ Section 1 : Caractéristiques générales des huileries**

Cette section visait à obtenir des informations générales sur les unités de production de l'huile d'olive, concernant notamment : le nom et la localisation de l'entreprise, type de process, nombre d'employés, la période usuelle de la production de l'huile d'olive et le volume des margines produites.

#### **✓ Section2 : Caractérisation du process au moment de l'échantillonnage**

Cette section avait pour but de collecter des informations concernant la matière première, les olives: variétés et maturité, mode et durée de conservation (addition du sel), effeuillage, lavage, traitement (volume et température de l'eau ajoutée pendant la trituration des olives), rendement de la production (huile et margines), conditions de l'environnement (tendances générales du climat durant la saison avant la cueillette des olives) et rejet des margines produites

✓ **Section 3 : Questions d'ordre général**

Cette section a été désignée pour collecter des informations sur la sensibilisation des mouliniers de l'impact environnemental, du caractère polluant des margines et de leur gestion selon la réglementation en vigueur.

### 3. Echantillonnage

Les échantillons de margines ont été collectés à partir de 15 unités de production d'huile d'olives réparties dans les quatre wilayas précitées au tout début de la campagne oléicole 2011-2012 (octobre-décembre 2011). Quatre variétés d'olive ont fait l'objet de cette étude : *Chemlal*, *Azerradj*, *Bouricha* et *Sigoise*. Les huileries ont été organisées en 2 groupes selon le processus d'extraction: le procédé discontinu de presse (traditionnel) ou le système de centrifugation à 3-phases (tableau 9). Il est à noter qu'il n'était pas possible de trouver assez d'échantillons pour les margines de la variété *Bouricha* dans le cas du procédé de presse. Tous les échantillons ont été collectés lors d'une ou plusieurs visites des unités au moment de la production de l'huile d'olive.

**Tableau 9 :** Effectifs des échantillons de margines issues de la trituration des différentes variétés d'olives par pressage ou par centrifugation à 3 phases.

Variétés	Procédé d'extraction		Total
	Presse	3-phases	
<i>Azerradj</i>	4	7	11
<i>Chemlal</i>	5	6	11
<i>Sigoise</i>	5	4	9
<i>Bouricha</i>	1	3	4
Total	15	20	35

A chaque huilerie, les margines fraîches prélevées ont été transportées au laboratoire dans des bouteilles opaques en plastique de 1,5 l, bien remplies et fermées de manière à assurer un milieu exempt d'oxygène, puis subdivisées de manière homogène dans des flacons de 10 ml et congelées à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

Les analyses ont porté essentiellement sur la composition chimique des margines : les matières sèche (MS), minérale (MM), organique (MO), le pH, la composition fine en phénols, en caroténoïdes et en vitamines E.

## 4. Analyses chimiques

### 4.1. Acidité (pH)

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre modèle pH538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Allemagne) muni d'une électrode Mettler Toledo–InLab (R commerciale).

### 4.2. Matière sèche (MS)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par la pesée d'un échantillon de margines avant et après évaporation à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g/100 g de poids frais.

### 4.3. Matières minérale (MM) et organique (MO)

Les margines sèches ont été incinérées à 550°C jusqu'à une masse constante dans un four à moufle. La matière organique correspond à la différence entre le poids sec et les cendres (correspondant à la MM) qui en résultent.

### 4.4. Contenu et composition des caroténoïdes et de la vitamine E des margines

La composition en caroténoïdes et vitamine E a été explorée selon une méthode dérivée de Chauveau-Duriot et *al.* (2010). Les margines sont tout d'abord déprotéinisées par traitement à l'éthanol, puis les caroténoïdes sont extraits avec de l'hexane. Les caroténoïdes sont ensuite séparés suivant leur hydrophobicité, et la phase contenant les composés les plus hydrophobes est saponifiée. Les deux phases sont ensuite regroupées puis lavées. Après évaporation, l'extrait sec est repris dans du solvant en vue de son injection en UPLC.

#### 4.4.1. Procédure d'extraction

A 2 ml de margines mis en tube de 18 ml (tube 1) sont ajoutés 0,5 ml d'éthanol contenant le standard interne (SI). Les tubes sont vortexés 30 secondes, puis les margines sont déprotéinisées en ajoutant 2 ml d'éthanol absolu. Les tubes sont vortexés 1 minute, puis agités 10 minutes sur la plaque d'agitation balancier.

L'extraction proprement dite des caroténoïdes est réalisée par l'ajout de 2 ml d'hexane/acétate d'éthyle (AE) (9/1 ; v/v). Chaque tube est vortexé 1 minute, puis agité sur la plaque d'agitation balancier 10 minutes. Cette étape est suivie par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g (2500 tours/minute avec la centrifugeuse Jouan CR3i). La phase hexanique supérieure est transférée dans un tube de 18 ml (tube 2) à l'aide d'une pipette. L'extraction est répétée deux fois. La phase hexanique supérieure issue de la deuxième extraction est récupérée et poolée avec la première dans le tube 2.

Les carotènes sont séparés des vitamines et des xanthophylles par l'ajout de 2 ml d'un mélange éthanol/eau (90/10) à la phase hexanique. Après agitation au vortex 1 minute et centrifugation 5 minutes à 1000 g, la phase éthanolique (inférieure) contenant les xanthophylles, caroténoïdes plus hydrophiles et les vitamines, est transférée dans un tube en verre de 5 ml (tube 3). Cette étape est répétée encore une fois. Les deux phases éthanoliques sont alors poolées dans le tube 3. L'extrait éthanolique est évaporé à sec sous azote à 28°C et conservé sous flux d'azote jusqu'à la fin de l'extraction.

Parallèlement, la phase hexanique est évaporée elle aussi. Le résidu sec est saponifié par 2 ml de KOH éthanolique 10%, préparé extemporanément et incubé 1h à 60°C dans le bain marie avec agitation des tubes manuellement toutes les 10 minutes environ. La saponification est stoppée en plaçant les tubes dans la glace et en rajoutant 2 ml d'eau et 2 ml d'hexane/AE (9/1 ; v/v). Les tubes sont vortexés 1 minute et centrifugés 5 minutes à 1000 g. La phase hexanique est transférée dans un tube de 18 ml (tube 4). Cette extraction est répétée 2 fois (en tout, cette étape comporte 3 extractions à l'hexane/acétate d'éthyle). A cette phase hexanique sont rajoutés 2 ml d'un mélange eau/éthanol 50/50 (v/v) (dans tube 4). Après agitation au vortex pendant 30 secondes et centrifugation 5 minutes à 1000 g, la phase hexanique (supérieure) est prélevée et mise dans le tube en verre de 5 ml (tube 3) qui contient l'extrait éthanolique sec. Le tout est évaporé sous azote à 28°C.

Quand l'extrait est sec, 30 µl de THF (tetrahydrofurane) sont rajoutés et 270 µl d'un mélange acétonitrile/dichlorométhane/méthanol (75/10/15 ; v/v/v) préparé préalablement. Les tubes sont bien vortexés afin de reprendre la totalité de l'extrait. L'extrait est filtré sur filtre seringue de 0,22 µm en transférant dans un insert de 150 µl placé dans un vial identifié. Les échantillons sont passés sur UPLC, le volume d'injection est 20 µl.

#### 4.4.2. Quantification des caroténoïdes et de la vitamine E des margines par Analyse en UPLC

Les conditions chromatographiques sont décrites dans le tableau 10. Une colonne Acquity UPLC HSS T3, 150×2,1 mm, 1,8- $\mu$ m (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines; France) a été utilisée avec un gradient d'acetonitrile-dichlorométhane-méthanol (solution A) 75-10-15 (v/v/v) et acétate d'ammonium 0,05 M dans l'eau (solution B). Le gradient linéaire utilisé consistait en la séquence suivante : 75:25 (A:B) en conditions initiales, 75:25 (A:B) de 0 à 20 min, 100:0 (A:B) de 20 à 21 min, 98:2 (A:B) de 21 à 30 min, 98:2 (A:B) de 30 à 44 min, et finalement retour aux conditions initiales. Le débit était 0,4 ml/min. La température de la colonne était maintenue à 35 °C dans un four à colonne. Les caroténoïdes et les vitamines E ont été détectés respectivement à 450 et 292 nm, et identifiés en comparant leurs temps de rétention (Rt) et analyses spectrales avec ceux des standards.

**Tableau 10 :** Description des conditions chromatographiques pour l'extraction des caroténoïdes et vitamines E des margines.

Appareil :	UPLC, AcquityWaters		
Colonne	HSS T31,8- $\mu$ m, 150×2,1 mm		
Phases mobiles :	A : acetonitrile–dichlorométhane–méthanol (75/10/15 ; v/v/v) B : acétate d'ammonium 0,05 M dans l'eau		
Débit :	0,4 ml/min		
Température :	35 °C		
Gradient :	t0-t20 min	75 % A	25 % B
	T20-t21 min	100	0
	T 21-T30 min	98	2
	T30-44 min	98	2
Longueur d'ondes :	450 et 292		
Volume d'injection :	20 $\mu$ l		

## 4.5. Quantification des composés phénoliques des margines par analyse en spectrométrie de masse (MS)

### 4.5.1. Extraction des composés phénoliques des margines

Les échantillons de margines, conservés à -20°C ont été décongelés la veille à 4°C. L'extraction des composés phénoliques a été réalisée en triple pour chaque échantillon selon la méthode décrite par De Marco *et al.* (2007) avec quelques modifications. 4 ml de margines, mis en tube à vis de 20 ml, préalablement pesés sont acidifiés à pH = 2 par 200 µl d'HCl 2N, puis délipidés 3 fois avec 1 volume d'hexane. A chaque répétition, une forte agitation des tubes pendant 1 minute au vortex a été suivie par une centrifugation de 15 min à 2500 tr/min à 20°C et la phase supérieure hexanique a été éliminée.

L'extraction des composés phénoliques a été faite à l'AE. 8 ml d'AE sont mélangés à la phase inférieure correspondant à la margine délipidée. Les tubes sont vortexés 1 min individuellement puis 15 min collectivement avec un vibrax, avant d'être centrifugés 15 min à 2500 tr/min à 20°C. L'extraction a été répétée trois fois. L'AE est récupéré dans un tube de 15 ml et mis à évaporer sous azote à 35°C dès la 1<sup>e</sup> récupération. L'AE des 3 extractions est cumulé dans le même tube et évaporé à sec. L'extrait sec est repris par exactement 200 µl de THF puis 800 µl de méthanol (qualité HPLC). 200 µl d'extrait sont enfin dilués avec 800 µl d'acide formique 0,1 % dans l'eau.

### 4.5.2. Quantification des composés phénoliques par HPLC-MS

Le système d'analyse était composé d'une chaîne HPLC Alliance Waters, équipée d'un détecteur ESCI-multi mode ionisation, enabled Quattro-micro<sup>TM</sup> API Waters (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le logiciel MassLynx (Waters) a été utilisé pour commander l'instrument et l'acquisition des données. La séparation a été réalisée avec une colonne Sphinx (125 x 2 x 3 µm; Macherey-Nagel, Hoerd, France) à température ambiante. Les solvants de l'élution étaient (A) 0,1% acide formique dans l'eau, et (B) 0,1% acide formique dans acetonitrile pour un temps total d'analyse de 30 min. Le gradient changeait linéairement comme suit : 93:7 (A:B) en conditions initiales, 93:7 à 30:70 (A:B) entre 0 et 17 min, 0:100 (A:B) de 20 à 23 min, l'étape finale 93:7 (A:B) de 25 à 30 minutes. Le débit était 0,3 ml/min et le volume d'injection 10 µl (tableau 11).

**Tableau 11 :** Conditions d'analyses en HPLC pour la détection des composés phénoliques.

Appareil :	HPLC Alliance Waters		
	DéTECTEUR ESCI-multi-mode ionization enabled Quattro-micro™ API Waters		
Colonne Sphinx	125 x 2 x 3 µm Macherey-Nagel		
Phases mobiles :	A : acide formique 0,1 % dans l'eau		
	B : acide formique 0,1 % dans l'acetonitrile		
Débit :	0,3 ml/min		
Gradient :	t0	93 % A	7 % B
	T 17min	30	70
	T 20min	0	100
	T 23 min	0	100
	T 25 min	93	7
	T 30 min	93	7
Longueur d'ondes :	275 et 320 nm		
Volume d'injection :	10 µl		

En utilisant les données de la littérature, une série de 15 composés phénoliques qui ont été déjà décrits et/ ou quantifiés dans les margines ont été sélectionnés. Celle-ci comprend quelques composés phénoliques couramment rencontrés dans les plantes ou les herbes, comme les acides phénoliques suivants: acides vanillique, caféique, 4-hydroxyphenylacétique, 3,4-dihydroxyphenylacétique, gallique, ferulique, p-coumarique et chlorogénique, et plusieurs phénols plus complexes ont été représentés par les flavones : apigénine, lutéoline et lutéoline-7-glucoside et enfin d'autres composés typiques des olives comme le tyrosol et l'hydroxytyrosol (alcools phénoliques), l'oleuropeine et sa forme aglycone (qui sont des secoiridoïdes). Les meilleures conditions analytiques déterminées pour chaque composé phénolique individuel d'intérêt utilisant les standards purs sont présentés dans le tableau 12. Le mode d'ionisation positif ou négatif (ESI+ ou ESI-) a été sélectionné pour chaque composé en prenant en compte le meilleur signal obtenu. La quantification des composés phénoliques a été réalisée contre une calibration externe en utilisant un mélange de standards purs analysé dans les mêmes conditions.

Les données chromatographiques ont été analysées avec software QuanLynx. La moyenne des concentrations de chaque composé phénolique dans chaque échantillon de margine a été reportée à son contenu de matière sèche et exprimée en µg par g de MS.

**Tableau 12 :** Conditions de spectrométrie de masse (MS) par composé recherché.

Composé	RT (min)	Ion	Ion Précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Potentiel de la source (V)	Energie de collision appliquée (eV)	Transition
Acide vanillique	6,37	[M+H] <sup>+</sup>	169	93	26,0	13,0	169 > 93
Hydroxytyrosol	2,81	[M+H] <sup>+</sup>	137	91	34,0	18,0	137 > 91
Acide caféique	5,73	[M+H] <sup>+</sup>	163	88	38,0	25,0	163 > 88
Lutéoline	11,23	[M+H] <sup>+</sup>	287	153	60,0	28,0	287 > 153
Tyrosol	4,81	[M+H] <sup>+</sup>	121	103	34,0	15,0	121 > 103
Acide 4-OH- phenylacétique	6,15	[M+H] <sup>+</sup>	106	76	46,0	17,0	106 > 76
Acide 3,4-diOH- phenylacétique	4,34	[M+H] <sup>+</sup>	123	76	48,0	19,0	123 > 76
Oleuropéine	9,65	[M+H] <sup>+</sup>	361	137	30,0	18,0	361 > 137
Apigénine	12,55	[M+H] <sup>+</sup>	271	153	58,0	29,0	271 > 153
Oleuropéine aglycone	18,69	[M-H] <sup>-</sup>	377	307	84,0	12,0	377 > 307
Acide <i>p</i> - coumarique	8,16	[M-H] <sup>-</sup>	163	119	28,0	15,0	163 > 119
Acide chlorogénique	5,80	[M-H] <sup>-</sup>	353	191	30,0	19,0	353 > 191
Acide férulique	8,47	[M-H] <sup>-</sup>	193	134	32,0	18,0	193 > 134
Lutéoline-7-O- glucoside	8,44	[M-H] <sup>-</sup>	447	285	118,0	26,0	447 > 285
Acide gallique	2,09	[M-H] <sup>-</sup>	169	125	34,0	14,0	169 > 125

## 5. Analyses statistiques

Les données ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel Minitab® 16.2 (Minitab Inc. Paris, France) avec le procédé de production de l'huile d'olive et la variété comme facteurs. A cause de l'absence de l'échantillon de margine de la variété d'olive Bouricha dans le cas du système de presse, les données ont été éliminées, par conséquent, l'analyse statistique a été réalisée avec 3 variétés seulement (*Chemlal*, *Azerradj*, *Sigoise*). Les principaux effets indépendants (variété et procédé) et leur interaction ont été testés. Les données des margines de la variété *Bouricha* ont été données dans le texte pour un supplément d'information. Le test a posteriori de Tukey-Kramer a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes. Les différences entre les groupes ont été considérées significatives pour des valeurs de probabilité  $p$  inférieures à 0,05.

## **Partie 2. Biodégradation anaérobie des margines et de leurs extraits phénoliques bruts par le microbiote du rumen**

### **1. Rappel des objectifs de l'étude**

Vu la richesse des margines en substances énergétiques (sucres et lipides), cette étude a été entreprise afin d'évaluer, dans un premier lieu la valeur nutritionnelle de ce sous-produit agricole par voies chimique puis biologique (détermination de l'activité métabolique du microbiote ruminal *in vitro*). Etant donné que les margines renferment des teneurs élevées en composés phénoliques, dont les effets sur la croissance bactérienne et l'activité enzymatique microbienne sont bien établis (Bisignano *et al.*, 1999), cette étude s'est intéressée dans un second lieu à explorer d'une part la possibilité d'atténuer ces effets via l'usage des margines en mixtures et d'autre part l'impact de ces composés phénoliques sur l'activité métabolique du microbiote ruminale. En outre, la métabolisation des mélanges par le microbiote ruminale a permis la détermination du pourcentage de margines brutes à incorporer dans la ration pour les essais *in vivo*.

### **2. Echantillonnage**

Dans l'expérimentation conduite pour étudier la biodégradation anaérobie des margines et des mixtures par les microorganismes du rumen, les échantillons de margines sont obtenus à partir d'un mélange d'olives triturées selon le procédé continu en 3-phases pendant la campagne oléicole 2009-2010.

Les margines qui ont servi pour la mise en évidence de l'impact du contenu phénolique sur l'activité métabolique et la composition de la faune du rumen sont celles utilisées dans l'étude de la variabilité de la composition chimique des margines (partie 1), à savoir les margines monovariétales, *Chemlal*, *Azerradj* et *Sigoise*.

### **3. Evaluation de la valeur nutritionnelle des margines**

#### **3.1. Caractérisation chimique des margines brutes**

Les analyses chimiques des margines ont été réalisées selon les normes décrites par l'AOAC, (1990 ; 14, method ID 942.05). Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

### 3.1.1. Détermination de la matière sèche

Elle a été déterminée par dessiccation dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. 10 ml de margines ont été introduit dans un cristalliseur préalablement taré. Ce dernier a été placé dans une étuve à 80°C pendant 48 heures (jusqu'à poids constant). La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon.

### 3.1.2. Détermination de la matière minérale

Les margines préalablement séchées ont été incinérées dans un four à moufle à 550 °C pendant 6 heures. La perte de poids observée au cours de la calcination correspond à la matière organique et le résidu aux cendres (matière minérale).

### 3.1.3. Détermination de la matière azotée totale

L'azote total est dosé par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode comporte deux étapes : la minéralisation et la distillation. L'azote organique de l'échantillon de margine sèche (prise d'essai 1g) est transformé en azote minéral (sulfate d'ammonium), en présence d'acide sulfurique concentré à chaud (20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 420°C pendant 4 heures) et d'un catalyseur (sélénium). Après transformation du sulfate d'ammonium en ammoniac par une base forte (NaOH ; 10N), l'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau et repris dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré. Il est alors titré par une solution d'HCl ; 0,1N. Les étapes de distillation et de titration sont réalisées sur un autoanalyseur (KJELTEC 1030). La teneur en azote de la matière sèche est obtenue par l'équation suivante :

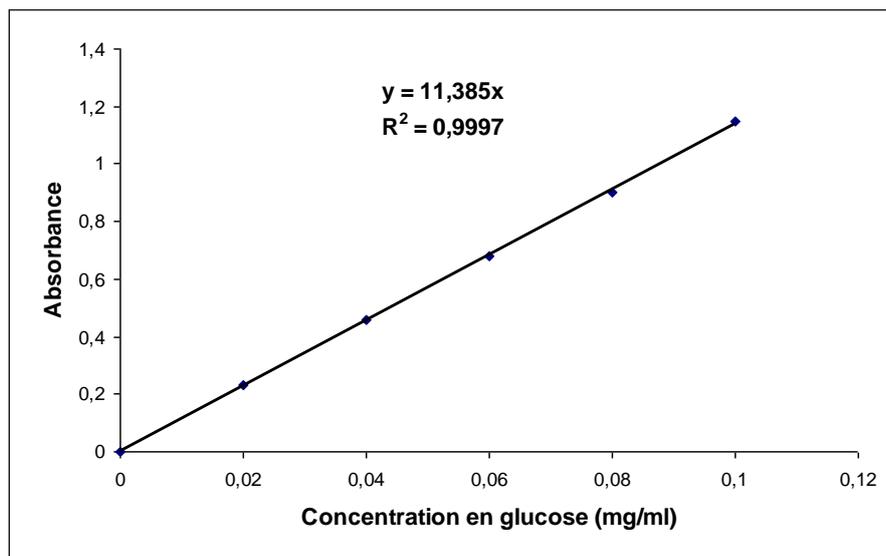
$$N = \frac{\text{vol}(HCl)(ml) * 14 * [HCl]}{\text{prised'essai} * MS(\%)}$$

La teneur en matières azotées totales (MAT) est obtenue en multipliant la teneur en azote N par le coefficient 6,25.

### 3.1.4. Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est réalisé selon la technique de Dubois et *al.* (1956). Le mélange réactionnel est composé de 1 ml de margine, 1 ml d'une solution de phénol (5%, P/V dans l'eau) et 3 ml d'acide sulfurique (97%). Les tubes sont agités vigoureusement au vortex puis incubés pendant 30 min à 30°C. L'absorbance est mesurée à 488 nm. Les concentrations en

sucre totaux sont déduites à partir d'une courbe d'étalonnage de glucose (figure 15). La teneur en sucre totaux est exprimée en pourcentage de MS.



**Figure 15 :** Courbe étalon des sucres totaux

### **3.2. Evaluation de la biodégradation des margines brutes par les microorganismes du rumen via la production des biogaz (voie biologique)**

L'assimilation des margines brutes par le microbiote du rumen a été réalisée *in vitro* par le procédé expérimental décrit par Menke et *al.* (1979) avec quelques modifications. Ce procédé est une simulation de la dégradation des aliments par les microorganismes dans le rumen dont le principe se base sur la mesure de la production de biogaz, méthane (CH<sub>4</sub>) et gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), qui sont les gaz fermentaires essentiellement produits lors de la dégradation microbienne.

#### **3.2.1. Description du système de fermentation en batch (seringue)**

La fermentation est réalisée dans des seringues en polypropylène de 60 ml dont le bout a été connecté à un tube en silicone et fermé par une pince pour éviter la perte des gaz produits pendant la fermentation. Les pistons des seringues sont lubrifiés avec de la graisse de silicone. La biodégradation *in vitro* des margines est suivie par la lecture du volume de biogaz produit, indiqué par le déplacement du piston.

#### **3.2.2. Inoculum**

Le jus de rumen, utilisé comme inoculum, est prélevé de 3 moutons, accoutumés munis d'une canule ruminale. Il est transféré dans des thermos préalablement chauffés à 39 °C et

saturés en CO<sub>2</sub>. Au laboratoire, le contenu ruminal est filtré à travers 4 couches d'un tissu de mousseline. Toute la manipulation est réalisée sous un flux constant de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Composition du milieu de culture

Le milieu de culture est composé d'une solution tampon (NaHCO<sub>3</sub>, 35,0 g/l), d'une solution de macrominéraux (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,7g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,2g ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,6g ; q.s.p. 100 ml), d'une solution d'oligo-éléments (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 3,2g ; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 10,0g ; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,0g ; FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 8,0g ; q.s.p. 100 ml), d'un indicateur du potentiel d'oxydoréduction (résazurine (C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>), 0,1g ; q.s.p. 100 ml) et d'une solution réductrice (NaOH (1N), 4 ml ; Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O, 625 mg; H<sub>2</sub>O, 95 ml). Le mélange de couleur bleue est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose. Ensuite, la solution est barbotée avec un flux continu de CO<sub>2</sub>, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au blanc transparent. A cette étape, le jus de rumen filtré est ajouté dans les proportions 1/2 (v/v). Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant 10 min de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie.

### 3.2.4. Inoculation et incubation

Deux cent (200) mg de margines brutes ont été introduits dans chaque seringue et mis à fermenter avec 30 ml de milieu de culture (10 ml de jus de rumen filtré et 20 ml de la salive artificielle). Pour chaque série d'incubation, trois répétitions ont été réalisées. Dans les mêmes conditions, trois témoins (jus de rumen et salive artificielle) sont incubés. Les seringues inoculées sont incubées dans des bains marie réglés à 39°C et agités d'une manière cyclique de 3 min (30 secondes agitation, et 2 minutes et 30 secondes sans agitation).

### 3.2.5. Paramètres fermentaires mesurés

#### 3.2.5.1. Mesure du pH

Le pH des jus de rumen et des contenus des fermenteurs est déterminé à l'aide d'un pH-mètre (HANNA Instruments HI 8418).

#### 3.2.5.2. Production de biogaz

Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure du volume des biogaz à différents intervalles de temps : 3, 6, 9, 24, 48, 72 et 96 heures. De la production de biogaz après 24h d'incubations et des concentrations des composés nutritifs (protéines totales et les matières

minérales) sont estimés les paramètres suivants : l'énergie métabolisable, la digestibilité de la matière organique et la production des AGV selon les équations de régression proposées par Menke et Steingass (1988) et Getachew *et al.* (2000) :

$$\text{In vitro OMD (g/kg MS)} = 14.88 + 0.889\text{GPT} + 0.45\text{CP} + 0.0651\text{XA}$$

$$\text{In vitro ME (MJ/kg MS)} = 2.20 + 0.136\text{GPT} + 0.057\text{CP} + 0.029\text{CP}^2$$

$$\text{et Acides Gras Volatils AGV (\mu mole/g MS)} = 0.0239\text{GPT} - 0.0601$$

Avec OMD, digestibilité de la matière organique (g/100 g MS); ME, énergie métabolisable (MJ/kg MS); GPT, volume de biogaz enregistré après 24h de fermentation ; CP, contenu en protéines totales (g/100 gr MS); XA, contenu en cendres (g/100 g MS).

#### **4. Suivi de la biodégradation *in vitro* des mixtures de margines brutes et du foin de vesce-avoine**

Dans cette partie de l'étude, visant à déterminer le pourcentage des margines brutes à incorporer dans la ration pour les essais *in vivo*, des mixtures de margines et de foin de vesce-avoine ont été réalisées. Les margines ont été incorporées à différentes concentrations (P/P) : 0%, 40%, 60%, 80% et 100%.

Les différentes mixtures sont mises à fermenter en conditions d'anaérobiose dans des systèmes batch décrits précédemment. En plus de la production de biogaz, la digestibilité apparente de la matière sèche (DMS) et la production d'ammoniac (N-NH<sub>3</sub>) ont été également mesurées.

##### **4.1. Détermination de la concentration en azote ammoniacal**

L'ammoniac (N-NH<sub>3</sub>) est dosé par une technique colorimétrique selon la méthode proposée par Chaney et Marbach (1962), dont le principe est le suivant : l'ion ammonium (NH<sub>3</sub>) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore. La réaction est catalysée par le nitroprussiate de sodium. Il se forme un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue.

#### 4.1.1. Traitement des échantillons de contenu de fermenteurs

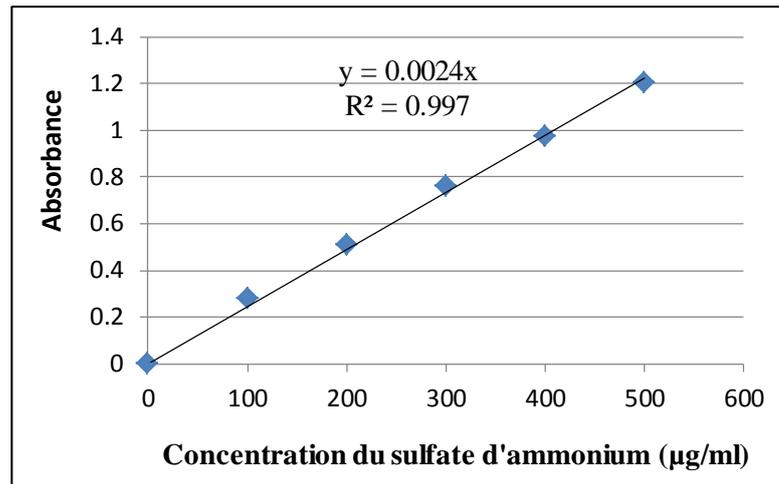
Après 24 heures d'incubation, 2 ml d'une solution d'acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 50 g/l) sont ajoutés à 10 ml du contenu de chaque seringue. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 11000 tours/min pendant 30 min, puis le surnageant est récupéré et conservé à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au dosage chimique.

#### 4.1.2. Dosage

Le milieu réactionnel comprend  $2\mu\text{l}$  de l'échantillon (surnageant) et 5 ml de la solution A (tableau 13). Après homogénéisation, 5 ml de la solution B (tableau 13) sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé et maintenu dans un bain marie à  $37^\circ\text{C}$  pendant 20 min. La densité optique est mesurée à 660 nm. La concentration de l'ammoniaque est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (figure 16). Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

**Tableau 13** : Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque

Solutions (pour 500 ml d'eau distillée)	Eléments	Quantité
<b>Solution A</b>	Phénol	5 g
	Nitroprusside de sodium	25 mg
<b>Solution B</b>	Hydroxyde de sodium	2,5 g
	Solution d'Hypochlorite de sodium (eau de javel à $35^\circ$ )	5 ml



**Figure 16** : Courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal.

#### 4.2. Détermination de la digestibilité apparente

Après 24 h de fermentation, le contenu de chaque seringue est centrifugé à 11000 tours/min pendant 30 min. Le culot est filtré et séché dans l'étuve à 60°C jusqu'au poids constant (pendant 48h), puis pesé. La digestibilité réelle de la matière sèche DMS est calculée par l'équation suivante:

$$DMS \% = [MS_i - (MS_{r_s} - MS_{r_b}) / MS_i] \times 100$$

Où :

DMS: Digestibilité apparente de la matière sèche ;  $MS_i$  : Matière sèche initiale introduite dans chaque seringue ;  $MS_{r_s}$  : Matière sèche résiduelle de substrat incubé ;  $MS_{r_b}$  : Matière sèche résiduelle moyenne du blanc

### 5. Impact des composés phénoliques extraits de margines monovariétales sur l'activité métabolique du microbiote du rumen

Cette partie est conduite selon le même procédé d'incubation dans les systèmes batch décrit dans la section 3.2. Dans ce cas, 200 mg de foin sont introduits dans chaque seringue auxquels 100µl d'extrait phénolique sont ajoutés au moment de l'incubation. Chaque seringue est ensuite inoculée avec 30 ml de milieu de culture. En parallèle, des seringues témoins contenant uniquement 200 mg de foin (sans extrait) et des seringues blancs (jus de rumen + salive artificielle) sont incubées dans les mêmes conditions. Pour chaque extrait, six répétitions sont réalisées. Les paramètres fermentaires retenus sont décrits dans les deux sections

précédentes à savoir : pH, production de biogaz, digestibilité apparente de la MS, production d'ammoniac et quantification des protozoaires.

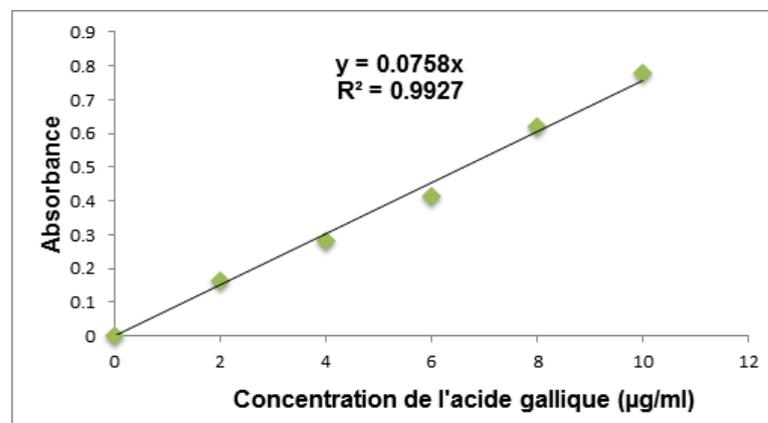
Les extraits phénoliques, introduits dans le milieu fermentaire, sont obtenus par extraction à l'acétate d'éthyle, et sont caractérisés par la détermination de leurs concentrations respectives en phénols totaux, tanins totaux, tanins condensés et flavonoïdes. En outre, leur capacité à précipiter les protéines a été évaluée *in vitro*.

### 5.1. Extraction des composés phénoliques des margines

Les margines brutes ont été acidifiées à pH = 2 par l'ajout d'HCl (2N) puis délipidées à l'hexane. L'extraction proprement dite est faite à l'acétate d'éthyle : 2 ml de margines délipidées sont ajoutées à 1,5 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est agité 15 min au vibraxe puis centrifugé 15 min à 1000g. La phase éthylique est récupérée et le culot a subi deux autres traitements à l'acétate d'éthyle. Le surnageant est mis à évaporer dès la première récupération à 40°C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI 400. L'extrait sec est conservé à 4°C jusqu'au moment du dosage.

### 5.2. Dosage des phénols totaux

Le dosage colorimétrique des phénols totaux a été réalisé par la technique de Folin-Ciocalteu selon le procédé décrit par Makkar et *al.*, (1993). Cinq (5) µl de l'extrait phénolique sont ajoutés à 495µl d'eau distillée, 250µl de solution de Folin-Ciocalteu (1N) et 1,5 ml de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20%). Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 40 min. L'absorbance est mesurée à 725 nm. Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage standard et sont exprimés en équivalent d'acide gallique (figure 17).



**Figure 17 :** Courbe étalon correspondant aux dosages des phénols totaux

### 5.3. Dosage des tannins totaux

Les tannins totaux (TT) sont dosés selon la technique de Makkar et *al.* (1993). Deux (2) ml de l'extrait phénolique sont ajoutés à 100 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et 2 ml d'eau distillée. Les tubes sont agités pendant 15 min puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 min. Le surnageant contient les phénols simples, les tanins sont précipités par le PVPP. La détermination de la concentration en TT correspond à la différence entre les phénols totaux mesurés avant et après le traitement par le PVPP. La concentration en TT est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préparée sur la base d'acide tannique (figure 18).

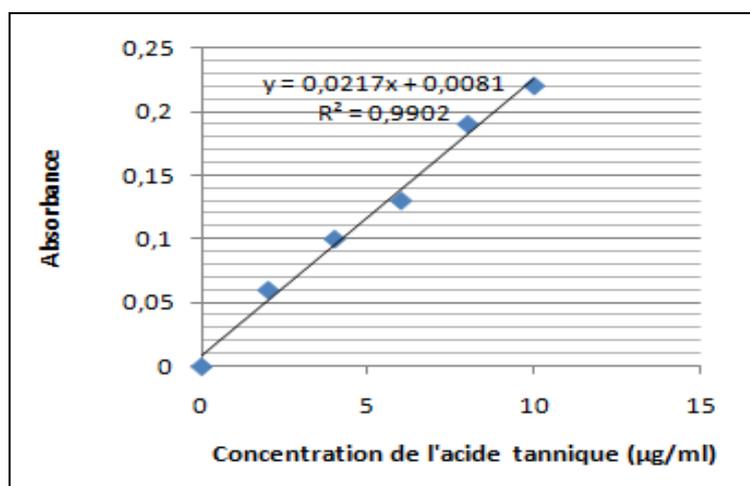
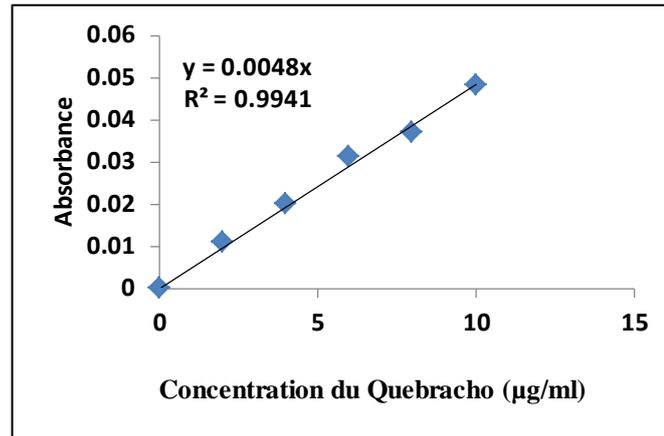


Figure 18 : Courbe étalon correspondant aux dosages des tannins totaux

### 5.4. Dosage des tannins condensés

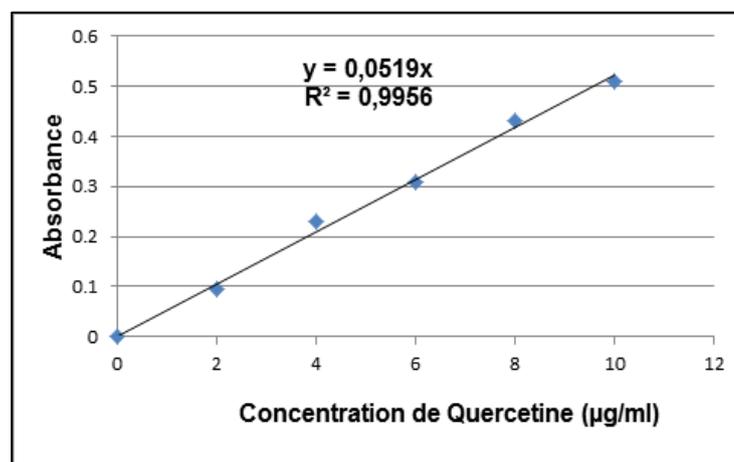
Le dosage des tannins condensés est effectué par la méthode n-butanol-HCl décrite par Porter et *al.* (1986). Le milieu réactionnel est composé de 0,5 ml de l'extrait, 3 ml de la solution n-butanol-HCl (95%) et de 0,1 ml du réactif ferreux (sulfate d'ammonium ferrique 2% dilué dans HCl, 2N). Les échantillons sont agités puis incubés une heure dans un bain marie à 100°C. L'absorbance est mesurée à 550nm après refroidissement des tubes. Les résultats sont exprimés en se référant à une courbe d'étalonnage de quebracho (figure 19).



**Figure 19 :** Courbe étalon correspondant au dosage des tanins condensés

### 5.5. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux sont déterminés par le chlorure d'aluminium (l' $\text{AlCl}_3$ , 2%) selon le procédé décrit par Ayoola et *al.* (2008). Il consiste à mélanger 250  $\mu\text{l}$  d'extrait phénolique dilué dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée, l'ensemble est mélangé avec 750  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$ . Les densités optiques (DO) sont lues à 420 nm et les concentrations sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage de quercétine (figure 20).



**Figure 20 :** Courbe étalon correspondant aux dosages des flavonoïdes totaux

### 5.6. Test de précipitation des protéines (*test de diffusion radiale*)

Elle permet d'estimer le taux de protéines précipitées par les tanins. Elle dépend de la formation de complexes entre les tanins et le sérum-albumine bovine (BSA) intégrée dans l'agarose (Hagerman, 2002).

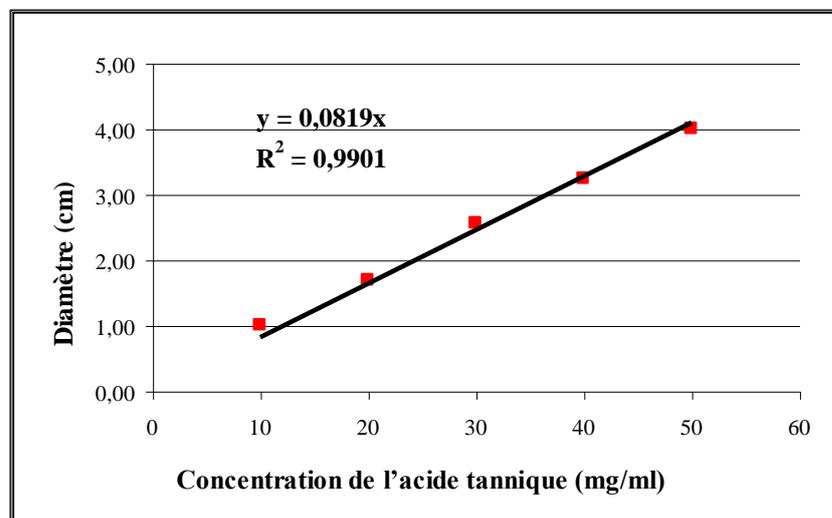
### ❖ Préparation des boîtes de pétri

Tout d'abord, un tampon d'acétate (pH 5,0 et 0,05M) est préparé comme suit : 2,85 ml d'acide acétique glacial sont mélangés avec 800 ml d'eau distillée et 10,6 mg d'acide ascorbique. Le pH de la solution est ajusté à 5 avec une solution de NaOH (4N), puis le volume de la solution est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Pour la préparation des boîtes : 2,5 g d'agarose sont ajoutés à 250 ml d'un tampon d'acétate. Le mélange est placé en ébullition pendant 15 min en agitant pour dissoudre l'agarose dans le tampon, puis transféré dans un bain marie à 45°C pendant 5 minutes. A ce moment, 250 mg de BSA sont ajoutés, 10 ml de la solution préparée sont transférés dans chaque boîte. Les boîtes de pétri sont ensuite couvertes avec du parafilm et conservées à 4 °C.

### ❖ Procédé d'analyse :

Six µl de l'extrait phénolique sont introduits dans des puits de 6 mm de diamètre creusés dans le gel d'agarose. Les boîtes sont recouvertes et incubées à 30 °C pendant 96 h. La réaction de précipitation est révélée par la formation d'un cercle opaque dont le diamètre est proportionnel au taux de tanins présents dans l'extrait, Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide tannique par référence à une courbe étalon (figure 21).



**Figure 21 :** Courbe étalon correspondant au dosage des tanins totaux mesurés par la méthode de diffusion radiale.

## 6. Analyses statistiques

Les données ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATIT-CF version 4, avec comme facteurs le substrat et le temps d'incubation. Les principaux effets indépendants et leur interaction ont été testés. Le test de Newmann-Keuls a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes. Les différences entre les groupes ont été considérées significatives pour des valeurs de probabilité  $p$  inférieures à 0,05.

## **Partie 3. Impact de la distribution de margines en complément de rations à base de fourrages classiquement distribués en Algérie sur la composition en microconstituants du lait chez la Vache**

### **1. Rappel des objectifs de l'étude**

L'objectif de cette étude était d'étudier l'impact de la distribution de margines en complément de rations à base de fourrages classiquement distribués en Algérie, comme le foin de vesce-avoine, chez la vache laitière en production, sur la composition en microconstituants du lait, en particulier les composés absorbant dans l'UV-visible issus des biotransformations ruminales des polyphénols ingérés.

### **2. Stratégie expérimentale**

L'impact de la distribution de margines en complément de la ration chez la vache laitière en production, sur la composition en micronutriments du lait était évaluée en suivant les effets éventuels sur les performances de production (production laitière (PL), taux de matières grasses (TB), taux de matières protéiques (TP) par vache) et sur la composition fine du lait (profil chromatographique des composés absorbants dans l'UV-visible mais aussi caroténoïdes et vitamines A et E). Ces effets ont été déterminés par comparaison à des vaches recevant la même ration fourragère sans le supplément de margines.

#### **2.1. Plan expérimental**

L'expérimentation s'est déroulée à la ferme Kadri Brahim à Constantine, Algérie pendant la période allant de décembre 2011 à février 2012. Elle a porté sur 12 vaches Holstein en début de lactation dont le poids moyen était d'environ  $643 \pm 21$ kg. Les vaches ont été réparties en deux lots homogènes (âge, poids, parité, stade de lactation, production laitière) (tableau 14). Les vaches témoins, en nombre de 6 ont reçu un régime à base de vesce-avoine (foin et ensilage), les vaches du lot expérimental, également en nombre de 6 ont reçu le même régime mais supplémenté par de la margine à une proportion de 50% de la matière brute. Les vaches ont été logées dans un bâtiment en stabulation entravée.

**Tableau 14** : Critères de répartition des vaches en lot témoin et expérimental

N°	Identification	Age (ans)	Nombre de parité	Date de vêlage	Poids (Kg)	Production Laitière (l/j)
1	08020	3	2	02/12/2011	600	18
2	08038	3	2	15/11/2011	649	21
3	31098	3	2	08/11/2011	640	20
4	05038	6	4	29/09/2011	702	20
5	05032	6	3	28/11/2011	587	29
6	05026	6	4	12/07/2011	721	21
					<b>649 ± 22</b>	<b>21,5 ± 1,6</b>
7	07004	4	3	22/11/2011	587	27
8	06042	5	4	13/11/2011	658	22
9	07022	4	3	29/10/2011	600	24
10	05014	6	4	24/08/2011	608	21
11	08010	3	2	22/08/2011	680	19
12	07012	4	3	11/07/2011	690	17
					<b>637 ± 18</b>	<b>21,7 ± 1,4</b>

## 2.2. Aliments

La ration quotidienne des vache a été constituée du foin et de l'ensilage de vesce-avoine, du foin de luzerne et du concentré (50% maïs, 28% son gros, 22% soja) plus le concentré minéral et vitaminique (CMV ; 1%). Les vaches du lot expérimental ont reçu le même régime avec une supplémentation du concentré par les margines.

Les margines d'un mélange de variétés d'olives ont été collectées d'une huilerie traditionnelle le 23 décembre 2011, soit une semaine avant le début de l'expérimentation. Les margines ont été mises dans des conteneurs en polypropylène de 200 l et conservées dans un hangar à température ambiante et à l'abri de la lumière.

## 2.3. Plan de rationnement

Deux repas ont été distribués, le matin à 5h et le soir à 15h. Le repas du matin a été composé du concentré avec le CMV distribué en premier, puis il a été suivi par le foin de luzerne. Quant au repas du soir, le foin de luzerne a été remplacé par le foin de vesce-avoine et l'ensilage de vesce-avoine a été distribué à la fin.

### 2.3.1. Quantités distribuées : chaque vache reçoit :

- Repas du matin :
  - 05 kg de concentré dont 1% de CMV
  - 06 kg de foin de luzerne
- Repas du soir :
  - 05 kg de concentré dont 1% de CMV
  - 15 kg d'ensilage de vesce-avoine
  - 06 kg de foin de vesce-avoine

Deux semaines d'adaptation progressive à la margine pour le lot concerné (annexe 2). Les concentrations de 10%, 20%, 30%, et 40% ont été distribuées progressivement par pallier de 04 jours (16 jours de période pré-expérimentale). Le régime expérimental de 50% a été donné à partir du 17<sup>ème</sup> jour pendant 3 semaines.

Le choix de ces concentrations finales a été déterminé sur la base de résultats obtenus en système batch en présence du microbiote d'ovin.

## 3. Prélèvements

Les échantillons de lait, par vache, ont été prélevés avant le début de la période d'adaptation et à la fin de la période expérimentale, à la traite du matin et à la traite du soir. Les laits ont été conservés à + 4 °C pendant la nuit et le mélange soir + matin a été reconstitué à l'issue de la traite du matin dans les proportions 40/60. Le mélange est ensuite réparti dans les flacons prévus pour analyses et ceux-ci stockés à -20°C.

## 4. Analyses de laboratoire

### 4.1. Paramètres de performance de la production laitière

Les analyses de la composition du lait concernant les TP, TB, lactose, urée et cellules ont été réalisées au laboratoire Galilait (Theix, France) par une approche infra-rouge pour les premiers et un comptage cellulaire pour le dernier.

### 4.2. Extraction et dosage des caroténoïdes et des vitamines des laits

La composition en caroténoïdes et vitamine E a été déterminée selon la méthode de Duriot et *al.* (2010) décrite précédemment dans la section 4.4.1. et 4.4.2. de la partie 1.

### 4.3. Extraction des composés phénoliques du lait avec déconjugaison

Les composés phénoliques du lait ont été extraits selon la méthode de King et *al.* (1998). Après déprotéinisation du lait par traitement à l'acétonitrile, les composés phénoliques sont déconjugés sous l'action de la glucuronidase. Ils sont ensuite purifiés en présence de méthanol (délipidation) et concentrés par évaporation. L'extrait est finalement repris dans du méthanol en vue d'une injection en CLHP. L'extraction des composés phénoliques du lait se déroule en deux temps :

#### Premier jour (J1)

##### ➤ Extraction et purification à l'acétonitrile

L'échantillon de lait est décongelé à température ambiante la veille de l'extraction. Le jour de l'extraction, il est homogénéisé sur un agitateur balancier puis par retournements successifs.

Dans chaque tube de 80 ml sont mis 24 ml d'acétonitrile et un barreau aimanté. Les tubes sont placés dans des béchers de 100 ml posés sur une plaque d'agitation multiposte. 10 ml de lait sont ajoutés goutte à goutte tout en agitant au niveau maximum et pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 minutes à 17°C et à 1000 g (centrifugeuse Jouan CR3i), 13 ml (2x6,5 ml) de surnageant sont introduits. Cette étape est doublée pour chaque échantillon. Les tubes sont mis à évaporer dans l'évaporateur centrifuge réglé à 38°C.

##### ➤ Déconjugaison

Dans chaque tube sont ajoutés 200 µl de tampon formiate 0,4 M, pH 5,0 et 25 µl de glucuronidase. Les tubes sont mis dans un bain-marie thermostaté à 37°C sous agitation mécanique toute une nuit.

#### Deuxième jour de l'extraction (J2):

##### ➤ Purification au méthanol (délipidation et déprotéinisation)

Dans chaque tube sont ajoutés 1,5 ml de méthanol. Ceux-ci sont agités quelques secondes au vortex. Après 1 h dans un bain de glace, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 4 °C et à 1000 g. Les deux surnageants issus du même échantillon de lait sont aussitôt regroupés dans un tube préalablement taré et évaporés sous flux d'azote dans le bloc chauffant réglé à 30 °C jusqu'à 0,4 ml de phase aqueuse (le volume est ajusté si besoin avec de l'eau MilliQ). A l'extrait concentré sont ajoutés 0,4 ml de méthanol. Après 4-5 secondes d'agitation et 10 minutes de centrifugation à 7 °C et à 1000 g, le surnageant est prélevé et transféré dans un insert verre placé

dans un flacon à sertir de 2 ml identifié. Les flacons sont centrifugés 10 minutes à 20 °C et à 1000 g. Les extraits de lait sont passés sur système CLHP. Le volume d'injection était 20 µl.

#### 4.4. Analyse en HPLC

L'analyse du profil en composés absorbant dans l'UV a été réalisée par chromatographie liquide haute performance à l'aide d'une chaîne HPLC 1260 Agilent équipée d'un système de pompes quaternaire et d'un détecteur DAD. La séparation des composés a été réalisée sur 2 colonnes distinctes :

- Nucleodur Sphinx, 150mm x 4,6mm, 5µ (Machrey-Nagel),
- Lichro Cart Super Spher 60 RP8e, 125mm x 2mm, 4µ (Merck), en appliquant le gradient de phases mobiles suivant :
  - A : Phase aqueuse contenant 0,05% d'acide formique
  - B : Acetonitrile 70 % / eau 30 % / acide formique 0,05 %
  - D : Acetonitrile
    - 0 minutes 90 % A – 10 % B
    - 5 minutes 90 % A – 10 % B
    - 25 minutes 100 % B
    - 30 minutes 100 % D
    - 35 minutes 100 % D

Le débit appliqué était de 0,3 ml/min, le volume d'injection fixé à 5 µl et la température de colonne à 35°C. Les longueurs d'onde d'acquisition étaient 275 et 320 nm.

#### 5. Analyses statistiques

Les données ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel Minitab<sup>®</sup> 16.2 (Minitab Inc. Paris, France) avec la supplémentation en marge dans la ration des vaches laitières comme facteurs. Le test a posteriori de Tukey-Kramer a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes. Les différences entre les groupes ont été considérées significatives pour des valeurs de probabilité  $p$  inférieures à 0,05.

# Chapitre 3

## Résultats et discussion

## **Partie 1. Etude de la composition chimique des margines et caractérisation de ses facteurs de variation**

### **1. Profil des huileries et traitement des olives au moment de leur trituration**

Le but du questionnaire était d'identifier et de caractériser les huileries et de définir les conditions de production de l'huile d'olive en vue de recueillir des informations profondes et de les exploiter dans l'interprétation des résultats.

#### **1.1. La cueillette des olives**

La production de l'huile d'olive est une activité saisonnière. Elle commence par la cueillette des olives. D'après les mouliniers interrogés, le ramassage des olives se faisait auparavant à partir de la fin du mois de décembre de chaque année de sorte à obtenir de meilleurs rendements et une huile de qualité. Cependant, la situation a changé, de nos jours les agriculteurs commencent à cueillir les olives un peu plus tôt, en novembre, voire même dès la fin du mois d'octobre. Ceci permet d'échapper à la période des grandes gelées dans les champs d'oliviers, d'éviter les files d'attente au niveau des moulins à l'huile et de prévenir la fermentation des olives qui réduirait la qualité organoleptique de l'huile et par voie de conséquence le prix de revient. Un autre paramètre qui influence la période de la cueillette et détermine le rendement auquel les agriculteurs accordent une grande importance, celui des conditions climatiques pendant la saison précédant la récolte.

La cueillette des olives en Algérie se fait en grande majorité à la main ou à la gaulle. L'usage de la gaulle conduirait au phénomène de "l'alternance", c'est-à-dire une bonne récolte est suivie souvent d'une autre moins bonne. C'est une technique de cueillette dommageable pour l'olivier car les tiges de branches sont les premières atteintes et elles tombent en même temps que les olives. L'année suivante, les branches endommagées et asséchées ne produiront plus et agiront négativement sur la santé de l'olivier tout entier.

Avant de commencer à faire tomber les olives, des filets ou des bâches sont placés par terre afin de faciliter le ramassage. Les olives sont ensuite collectées dans des sacs en jute ou en plastique.

**Tableau 15** : Profil des huileries et de traitement des olives pendant le processus d'extraction de l'huile d'olive.

Caractéristiques générales des huileries				Traitement des olives au moment de l'extraction de l'huile d'olive						
Localités	Nom de l'huile	Procédé	Gestion des margines	Variétés (Nombre d'échantillons)				Volume d'eau ajoutée (l/100 kg d'olives)	T° de l'eau ajoutée (°C)	Rendement (l d'huile/ 100 kg d'olives)
				<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Bouricha</i>			
Skikda (Côte Méditerranéenne)	Rachid	Presse	Déversées dans la canalisation des eaux usées	2	2	1	0	25	50	17.5
	El-Ghdir	Presse		0	0	0	1	-	-	-
	Boughadoum	Presse		1	0	0	0	Sans	-	16
	El-Haj	Presse	Bassins d'évaporation	1	1	0	0	40-50	40	15.5
	Hézila	3-phases		2	1	0	1	50-60	70	16.5
	Benmeliek	3-phases		1	1	0	0	40-50	65	16.5
	Batna (Sud-Est)	Guesmi	Presse	Déversées dans la canalisation des eaux usées	0	0	2	0	Quelques litres	Ambiante
Krimil		Presse	0		1	0	0	40	50-60	14
Neumane		Presse	0		1	0	0	30	50	20
Mélizi		Presse	0		0	2	0	25-30	40-45	24

## 1.2. Conservation des olives au niveau des unités de fabrication de l'huile d'olive

Sitôt arrivées aux moulins à huile, les olives ont été transférées dans des conteneurs aérés (clayettes en plastique) afin d'éviter tout processus de fermentation. Leur conservation a été faite en dehors de tout ajout de sel avant et après leur réception, selon les agriculteurs que nous avons pu rencontrer et les mouliniers interrogés le jour de l'échantillonnage. Cette situation est due probablement à une baisse de la production de l'huile d'olive au cours de cette campagne (réduction de 35% par rapport à la campagne précédente, 2010-2011) due, d'une part au gaulage, technique de cueillette non respectueuse de l'arbre et d'autre part aux conditions climatiques défavorables, principalement à la diminution des précipitations. Néanmoins, la conservation des olives par ajout de sel est une opération couramment utilisée par les agriculteurs, car elle permet une meilleure conservation des olives. La trituration des olives est faite entre 24h et 4 jours suivant leur réception.

Avant la trituration des olives de chaque variété, nous avons procédé à l'examen du contenu des clayettes en plastique, d'une part pour s'assurer de la pureté de la variété, et d'autres parts pour estimer son degré de maturité. Selon une observation visuelle et avec l'aide de certains agriculteurs rencontrés le jour de l'échantillonnage, nous avons pu tirer les constatations suivantes : les olives de la variété *Azerradj* étaient d'un niveau de maturité suffisant. En effet, 9 échantillons sur 11 avaient le niveau de maturité requis. Un résultat similaire a été observé aussi pour la variété *Chemlal*. Quant à la variété *Sigoise*, seulement 3 échantillons sur 9 ont atteint ou dépassé la maturité. La *Sigoise* serait donc une variété tardive due à la grosseur de son fruit, aussi la maturité des olives est variable et dépend de la variété.

## 1.3. Traitement des olives selon le procédé de trituration

La production de l'huile d'olive est un processus fort consommateur d'eau et d'énergie. L'eau commence à être ajoutée au cours du broyage/malaxage des olives. Sa quantité et sa température sont fonction du process utilisé. Pour le système de presse, certains mouliniers affirment ne pas ajouter d'eau pendant toutes les étapes du process, c'est le cas de l'huilerie Boughadoum (Skikda), alors que pour d'autres l'ajout d'eau est fonction du degré de maturité du fruit, plus les olives sont mûres et moins est élevé le volume d'eau ajouté (huilerie Rachid) (Tableau 16). Le volume d'eau ajouté varie, en général, pour le système de presse entre 30 à 40 L/100 kg d'olives (Huileries El Haj, Guesmi, Krimil, Neumane et Mélizi) (tableau 15), quant à sa température, elle variait entre 40-60 °C. Il convient de noter ici que nous avons remarqué que

Suite du Tableau 15

Caractéristiques générales des huileries				Traitement des olives au moment de l'extraction de l'huile d'olive						Rendement (L d'huile/ 100 kg d'olives)
Localité	Nom de l'huile	Procédé	Gestion des margines	Variétés (Nombre d'échantillons)				Volume d'eau ajoutée (L/100 kg d'olives)	T° de l'eau ajoutée (°C)	
				<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Bouricha</i>			
Batna (Sud-Est)	Fatima	3-phases	Bassins d'évaporation	1	1	1	0	30-40	Ambiante	16
	Babana	3-phases	Bassins d'évaporation	1	0	1	0	Sans	-	17
Constantine Centre-Est	Limoune	3-phases	Bassins d'évaporation	0	1	1	0	Sans	-	19
	Benyerbah	3-phases		1	2	0	0	Sans	-	16,5
Guelma Nord-Est	Meddour	3-phases		1	0	1	2	40	60	22,5

- Données non disponibles.

dans certains cas, la température était proche du degré d'ébullition. Pour le système de centrifugation à 3-phases, certains propriétaires déclarent que toute l'opération d'extraction s'est déroulée sans ajout d'eau, or, à notre connaissance le décanteur horizontal ne peut fonctionner sans l'ajout d'eau, en plus c'est un système fermé et l'eau est injectée de manière automatique. Les températures d'eau variaient entre 30 à 70 °C (tableau 15).

Le rendement de la production de l'huile d'olive était variable selon les huileries, mais il était particulièrement fonction de la variété. La *Sigoise* avait enregistré le rendement en huile le plus élevé (valeur moyenne de 21,33 L/100 kg), dû probablement à la taille de son fruit, *Azerradj* le plus faible avec une valeur moyenne de 15,73 L/100 kg d'olives, *Chemlal* était intermédiaire (17,18 L/100 kg d'olives). Concernant la quantité des olives pressées, la majorité des propriétaires s'abstiennent, la cause principale étant les fausses déclarations aux services de fiscaux. Pour les volumes de margines générés, nous avons remarqué que presque la totalité des propriétaires des huileries possèdent des puits, d'où la difficulté de préciser les volumes d'eau ajoutées au cours de la trituration des olives, notamment pour le système traditionnel. Ainsi, les volumes de margines générées sont mal estimées.

#### **1.4. Gestion des margines générées**

D'après l'enquête, la gestion des margines est fonction du procédé. Pour le système traditionnel de presse, les margines sont déversées directement dans les canalisations des eaux usées municipales, sans aucun traitement préalable. Pour les nouvelles installations, c'est-à-dire les huileries fonctionnant avec le système de centrifugation à 3-phases, les propriétaires doivent respecter certaines conditions et répondre au cahier des charges qui interdit le mélange de ces effluents avec les eaux usées municipales ou leur rejet dans les eaux de mer pour les villes côtières. En Algérie, à l'heure actuelle l'élimination des margines se fait via les bassins d'évaporation.

Le rejet des margines dans les bassins d'évaporation produit une sorte de boue très concentrée en matière organique et minérale qui peut être valorisée en agriculture comme fertilisant ou engrais. A notre grande surprise, aucun propriétaire des unités de production de l'huile d'olive que nous avons visité ne détient cette information. Néanmoins, nous avons noté un niveau élevé de conscience de la part des propriétaires quant à la menace environnementale de cet effluent liquide et sa menace pour le bien-être animal et sur l'homme et ceux-ci souhaitent que les pouvoirs politiques optent pour d'autres solutions respectueuses de l'environnement.

**Tableau 16 :** Caractéristiques physicochimiques des échantillons de margines.

	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						Valeur P		
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases			Variété	Procédé	Interaction
	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>			
(n=4)	(n=5)	(n=3)	(n=7)	(n=6)	(n=4)				
pH	5,07 ± 0,08	5,13 ± 0,07	5,13 ± 0,09	5,16 ± 0,06	5,13 ± 0,06	4,91 ± 0,08	ns	ns	ns
	g/100 g des margines brutes								
MS	7,83 ± 1,81	9,35 ± 1,62	10,60 ± 2,09	8,68 ± 1,37	10,35 ± 1,48	7,96 ± 1,81	ns	ns	ns
MO	6,53 ± 1,64	7,23 ± 1,46	7,20 ± 1,89	7,44 ± 1,24	9,34 ± 1,34	6,72 ± 1,64	ns	ns	ns
MM	1,31 <sup>b</sup> ± 0,36	2,12 <sup>ab</sup> ± 0,32	3,40 <sup>a</sup> ± 0,41	1,23 <sup>b</sup> ± 0,27	1,01 <sup>b</sup> ± 0,29	1,24 <sup>b</sup> ± 0,36	0,022	0,001	0,024

MS, matière sèche; MO, matière organique ; MM, matière minérale.

Les valeurs sont des moyennes ± l'erreur standard.

a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ) (test de Tukey-Kramer).

ns = différence non-significative ( $P > 0.05$ ).

## 2. Caractérisation chimique des margines

Les principaux paramètres physico-chimiques des margines collectées sont donnés dans le tableau 17.

### 2.1. Le pH

Les margines sont acides, la valeur moyenne de pH de  $5,09 \pm 0,03$  indépendamment du process ou de la variété. Selon la littérature, l'acidité des margines est une caractéristique commune de cet effluent liquide (Achak *et al.*, 2009 ; Blika *et al.*, 2009 ; Martinez-Garcia *et al.*, 2009 ; Garcia Castello *et al.*, 2010 ; Gonçalves *et al.*, 2010 ; Lakhtar *et al.*, 2010 ; Mechri *et al.*, 2011 ; Di Bene *et al.*, 2012 ; Mahmoud *et al.*, 2012 ; Lykas *et al.*, 2014). Ceci est dû principalement aux acides organiques (Fakharedine *et al.*, 2006 ; Achak *et al.*, 2009 ; Chaari *et al.*, 2015). Les valeurs moyennes du pH des margines issues des deux procédés (de presse et de centrifugation à 3-phases, respectivement  $5,11 \pm 0,08$  et  $5,06 \pm 0,06$ ) et des 3 variétés (Azerradj, Chemlal et Sigoise, respectivement  $5,11 \pm 0,07$  ;  $5,14 \pm 0,06$  ;  $5,02 \pm 0,08$ ) sont statistiquement similaires ( $p < 0,05$ ). Nos résultats concordent avec ceux trouvés par plusieurs auteurs (Ben Sassi *et al.*, 2006 ; Eroglu *et al.*, 2009 et El Abbassi *et al.*, 2012 ).

### 2.2. Les matières sèche (MS) et organique (MO)

En prenant en compte toutes les margines collectées des unités d'extraction de l'huile d'olive fonctionnant avec le système de presse et le système de centrifugation à 3-phases, la teneur moyenne en MS était de  $9,13 \pm 0,70$  g/100g des margines brutes sans montrer de différences entre le procédé ou la variété. Notre résultat est en parfait accord avec celui trouvé dans plusieurs travaux (El-Abbassi *et al.*, 2009 ; Martinez-Garcia *et al.*, 2009 ; Mekki *et al.*, 2009 ; Galanakis *et al.*, 2010 ; El-Abbassi *et al.*, 2011 ; El Abbassi *et al.*, 2012a ; El Abbassi *et al.*, 2012b ; Jeguirim *et al.*, 2012 ; Katsoyannos *et al.*, 2012 ; Magdich *et al.*, 2012 ; Abichou *et al.*, 2013). Pour l'ensemble de ces auteurs, le pourcentage d'humidité des margines variait entre 87 et 95% avec une moyenne de  $88,74\% \pm 2,84$  ( $n=15$ ).

Concernant la MO, la teneur moyenne était de  $7,41 \pm 0,43$  g/100g des margines brutes. Là aussi, les résultats étaient similaires ( $p < 0,05$ ) entre le procédé d'extraction et la variété d'olive. Pour ce paramètre les valeurs rencontrées dans la littérature variaient entre 2 et 12,9 g/100 ( $n=6$ ) des margines brutes (Belaid *et al.*, 2006 ; El Hajjouji *et al.*, 2007 ; Mahmoud *et al.*, 2010 ; Magdich *et al.*, 2012 ; Abichou *et al.*, 2013 ; Lykas *et al.*, 2014). Cette variation peut être due à l'effet de la dilution dû à l'ajout d'eau au moment de l'extraction de l'huile d'olive.

**Tableau 17 :** Composition et contenu en caroténoïdes des margines ( $\mu\text{g/g}$  de MS) selon la variété et le procédé de trituration des olives

	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						Valeur P		
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases			Variété	Procédé	Interaction
	Azerradj (n=4)	Chemlal (n=5)	Sigoise (n=3)	Azerradj (n=7)	Chemlal (n=6)	Sigoise (n=4)			
Zéaxanthine	1,23 ± 0,50 (16,8%)	0,44 ± 0,44 (13,7%)	0,38 ± 0,57 (16,9%)	1,91 ± 0,37 (19,8%)	1,42 ± 0,40 (15,2%)	1,83 ± 0,50 (19,6%)	ns	0,012	ns
Lutéine	3,81 ± 1,16 (52,1%)	1,43 ± 1,04 (44,5%)	1,13 ± 1,34 (50,2%)	4,69 ± 0,88 (48,6%)	5,26 ± 0,95 (56,2%)	4,30 ± 1,16 (45,9%)	ns	0,007	ns
$\beta$ -Cryptoxanthine	0,07 ± 0,25 (1,0%)	0,19 ± 0,22 (5,9%)	0,16 ± 0,28 (7,1%)	0,60 ± 0,19 (6,2%)	0,50 ± 0,20 (5,3%)	0,25 ± 0,25 (2,7%)	ns	ns	ns
13cis - $\beta$ -Carotène	0,42 ± 0,18 (5,7%)	0,18 ± 0,16 (5,6%)	0,00 ± 0,21 ( $<0,1\%$ )	0,34 ± 0,14 (3,5%)	0,53 ± 0,15 (5,7%)	0,61 ± 0,18 (6,5%)	ns	0,051	ns
9cis- $\beta$ -Carotène	0,50 ± 0,13 (6,8%)	0,21 ± 0,12 (6,5%)	0,13 ± 0,15 (5,8%)	0,40 ± 0,10 (4,1%)	0,36 ± 0,11 (3,8%)	0,52 ± 0,13 (5,5%)	ns	ns	ns
tout-trans- $\beta$ -Carotène	1,28 ± 0,32 (17,5%)	0,77 ± 0,29 (24,0%)	0,44 ± 0,37 (19,5%)	1,70 ± 0,24 (17,7%)	1,29 ± 0,26 (13,8%)	1,85 ± 0,32 (19,8%)	ns	0,005	ns
Somme des carotenoides	7,31 ± 1,72 <sup>ab</sup>	3,21 ± 1,54 <sup>b</sup>	2,25 ± 1,99 <sup>b</sup>	9,64 ± 1,30 <sup>a</sup>	9,35 ± 1,41 <sup>ab</sup>	9,36 ± 1,72 <sup>ab</sup>	ns	0,001	ns

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  l'erreur standard. Entre parenthèse sont présentées les proportions de chaque composé en pourcentage de la somme. a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ) (test de Tukey-Kramer). ns = différence non-significative ( $P > 0.05$ ).

### 2.3. La matière minérale (MM)

En dehors du procédé d'extraction et de la variété d'olive, la teneur moyenne en MM des margines collectées à partir des unités d'extraction était de  $1,72 \pm 0,33$  g/100g des margines brutes. Les teneurs en MM trouvées par plusieurs auteurs variaient entre 0,8 et 3,4 g/100g ( $n=11$ ) des margines brutes avec une moyenne de  $1,6 \pm 1,4$ g/100g des margines brutes (Belaid et al., 2006 ; Fakharedine et al., 2006 ; El Hajjouji et al., 2007 ; Achak et al., 2009 ; Mekki et al., 2009 ; Mahmoud et al., 2010 ; El Abbassi et al., 2012b ; Mahmoud et al., 2012 ; Abichou et al., 2013), ce qui nous a permis de constater que la teneur en MM de nos échantillons de margines sont conformes avec celles de la littérature. D'autre part, la teneur en MM des margines brutes était statistiquement différente selon le procédé d'extraction ( $P = 0,001$ ), la variété d'olive ( $P = 0,022$ ) et leur interaction ( $P = 0,024$ ) (tableau 17). En effet, les margines de la variété *Sigoise* issues du système de presse ont montré une teneur en MM supérieure de 3 fois environ par rapport à celle de la variété *Azerradj* issues du procédé de centrifugation à 3-phases (tableau 17). Les margines de la variété *Chemlal* issues de la presse avaient des valeurs intermédiaires. Notre résultat est en parfait accord avec celui d'El Abbassi et al. (2012b) qui ont trouvé que les margines issues du système d'extraction discontinu de presse étaient 3 fois plus concentrées en MM que celles générées par le procédé continu à 3-phases. Cependant, des résultats opposés ont été également signalés précédemment par Ben Sassi et al. (2006). Dans le contexte des pratiques agricoles traditionnelles marocaines, la conservation des olives, avant leur trituration, se fait en totalité par ajout de sel. Or, la conservation des olives utilisées dans notre étude était faite en dehors de tout ajout de sel. Par conséquent, les écarts enregistrés pourraient mieux résulter des différences entre les variétés d'olives (dus directement aux différences intrinsèques entre variétés ou indirectement, au stade de maturité des olives, par exemple) qui se sont exprimées dans le processus de la presse, mais pas avec le système de centrifugation à 3-phases.

### 2.4. Teneur et composition en caroténoïdes et en tocophérols des margines

Notre travail présente la première étude qualitative et quantitative de la composition en caroténoïdes et en tocophérols des margines monovariétales des trois principales variétés d'olives cultivées en Algérie, à savoir *Azerradj*, *Chemlal* et *Sigoise*. Pour tous les échantillons de margines, six composés différents de caroténoïdes et deux tocophérols ont été identifiés et quantifiés. Les principaux résultats sont rassemblés dans les tableaux 17 et 18, respectivement pour les caroténoïdes et tocophérols.

**Tableau 18 :** Composition et contenu en tocophérols des margines ( $\mu\text{g}/\text{g}$  de MS) selon la variété et le procédé de trituration des olives

Variétés d'olive	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						Valeur P		
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases			Variété	Procédé	Interaction
	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>			
(n=4)	(n=5)	(n=3)	(n=7)	(n=6)	(n=4)				
$\alpha$ -tocophérol	28,80 $\pm$ 11,54 (86,8%)	21,08 $\pm$ 10,32 (86,4%)	39,14 $\pm$ 13,33 (87,5%)	24,46 $\pm$ 8,73 (87,7%)	24,66 $\pm$ 9,42 (90,5%)	15,64 $\pm$ 11,54 (84,8%)	ns	ns	ns
$\gamma$ -tocophérol	4,35 $\pm$ 1,34 (13,1%)	3,31 $\pm$ 1,19 (13,6%)	5,58 $\pm$ 1,54 (12,5%)	3,42 $\pm$ 1,01 (12,3%)	2,60 $\pm$ 1,09 (9,5%)	2,80 $\pm$ 1,34 (15,2%)	ns	ns	ns
Somme des tocophérols	33,16 $\pm$ 12,80	24,39 $\pm$ 11,45	44,73 $\pm$ 14,78	27,89 $\pm$ 9,67	27,25 $\pm$ 10,45	18,45 $\pm$ 12,80	ns	ns	ns

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  l'erreur standard. Entre parenthèse sont présentées les proportions de chaque composé en pourcentage de la somme.

a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ) (test de Tukey-Kramer).

ns = différence non-significative ( $P > 0,05$ ).

Pour ces deux groupes de composés, l'analyse a révélé un profil commun entre tous les échantillons quels que soient la variété ou le processus. La composition en caroténoïdes a révélé la présence de 3 xanthophylles (lutéine, zéaxanthine et  $\beta$ -cryptoxanthine) et 3 carotènes (9-*cis*, 13-*cis* et tout-*trans*- $\beta$ -carotènes). En pourcentage, elle était environ de : 50 % de lutéine, 32 % de  $\beta$ -carotène dont 2 tiers de tout-*trans*- $\beta$ -carotène et environ 11 % de zéaxanthine. Ce résultat était compatible avec les rapports indiquant que la lutéine a été le principal caroténoïde de l'huile d'olive de différentes variétés espagnoles (Gandul-Rojas et Minguez-Mosquera, 1996), suivie par le tout-*trans*- $\beta$ -carotène. Cependant, la zéaxanthine n'a pas été identifiée par ces auteurs. Ce composé et la lutéine sont généralement très difficiles à séparer par chromatographie classique or la méthode de séparation utilisée dans cette étude a fait intervenir une technologie plus performante permettant de distinguer sans équivoque la lutéine de la zéaxanthine d'une part, les 3 isomères du  $\beta$ -carotène d'autre part. Dans la présente étude, aucun autre caroténoïde n'a été observé dans les extraits d'échantillons, ce qui reflète probablement une différence majeure entre la composition en caroténoïdes des margines et de l'huile d'olive parce que les composés lipophiles suivent préférentiellement les matrices huileuses plutôt que les matrices aqueuses. En conséquence, les xanthophylles mineurs précédemment trouvés dans l'huile d'olive (anthéaxanthine, violaxanthine, néoxanthine ...) ne sont pas observables dans le présent travail alors que la méthode est en mesure de les extraire et de les quantifier (Chauveau-Duriot et *al.*, 2010).

La somme des caroténoïdes était différente selon le processus puisque les teneurs étaient de 2,2 fois plus élevées avec le système 3-phases qu'avec la presse ( $9,44 \pm 1,48$  vs  $4,25 \pm 1,75$  mg/g de MS,  $P=0.001$ ), ce qui est principalement dû à la zéaxanthine, la lutéine et les isomères 13-*cis*- et tout-*trans*- $\beta$ -carotène (tableau 17). La concentration totale des caroténoïdes était significativement 4 fois plus élevée dans les margines de la variété *Azerradj* obtenues par le procédé de centrifugation à 3-phases que dans les margines des variétés *Sigoise* ou *Chemlal* issues du procédé de presse. Ce résultat permet de compléter ceux observés précédemment dans l'huile d'olive. En effet, Giuffrida et *al.* (2007) ont rapporté que des teneurs élevées en pigments (qui incluent les caroténoïdes) ont été trouvées dans les huiles produites par le procédé continu de 3-phases, par rapport aux huiles produites par la presse traditionnelle. García et *al.* (2005) stipulent que les huiles d'olive vierges produites dans des technologies d'extraction moderne utilisant des broyeurs à couteaux, à marteaux ou à disques (cas des systèmes continus de centrifugation, 2- ou 3-phases) ont une teneur nettement plus élevée en caroténoïdes que celles produites par les procédés traditionnels discontinus (cas de la presse ou de la super-presses,

**Tableau 19:** Composés phénoliques des margines ( $\mu\text{g/g}$  de MS) quantifiés par analyse en HPLC/MS selon la variété d'olive et le procédé d'extraction.

	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						Valeur <i>P</i>		
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases			Variété	Procédé	Interaction
	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>			
( <i>n</i> =4)	( <i>n</i> =5)	( <i>n</i> =3)	( <i>n</i> =7)	( <i>n</i> =6)	( <i>n</i> =4)				
Acide vanillique	45,0 ± 16,9	35,2 ± 15,1	66,6 ± 19,5	31,9 ± 12,8	15,1 ± 13,8	64,4 ± 16,9	0,069	ns	ns
Hydroxytyrosol	1,0 ± 2,5	5,3 ± 2,2	2,5 ± 2,9	0,1 ± 1,9	0,4 ± 2,0	0,0 ± 2,5	ns	ns	ns
Acide caféique	33,3 ± 24,7 <sup>b</sup>	35,0 ± 22,1 <sup>b</sup>	187,0 ± 28,5 <sup>a</sup>	26,2 ± 18,6 <sup>b</sup>	35,2 ± 20,1 <sup>b</sup>	95,4 ± 24,7 <sup>ab</sup>	<0,001	0,098	ns
Luteoline	105,1 ± 32,2	95,9 ± 28,8	72,2 ± 37,2	112,8 ± 24,3	104,5 ± 26,3	88,9 ± 32,2	ns	ns	ns
Tyrosol	282,4 ± 107,5	212,8 ± 96,1	231,8 ± 124,1	103,3 ± 81,3	104,9 ± 87,8	239,9 ± 107,5	ns	ns	ns
Acide 4-Hydroxyphenylacétique	2,7 ± 2,5 <sup>ab</sup>	5,5 ± 2,2 <sup>ab</sup>	9,3 ± 2,9 <sup>ab</sup>	1,4 ± 1,9 <sup>b</sup>	3,0 ± 2,0 <sup>ab</sup>	11,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	0,007	ns	ns
Acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique	28,4 ± 14,5 <sup>ab</sup>	28,4 ± 13,0 <sup>ab</sup>	49,7 ± 16,8 <sup>ab</sup>	13,9 ± 11,0 <sup>b</sup>	31,1 ± 11,9 <sup>ab</sup>	81,7 ± 14,5 <sup>a</sup>	0,014	ns	ns
Oleuropeine	12,4 ± 740,1	23,1 ± 662,0	56,3 ± 854,6	6,4 ± 559,5	256,4 ± 604,3	2723,2 ± 740,1	ns	0,105	ns

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  l'erreur standard.

a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ) (test de Tukey-Kramer).

ns = différence non-significative ( $P > 0.05$ ).

utilisant des meules de granite), probablement en raison de la meilleure rupture des différents tissus qui constituent le fruit de l'olivier et de la température élevée de la pâte d'olive, au moment du malaxage, qui pourrait induire l'inactivation des enzymes responsables de la dégradation du pigment au cours du process.

Dans tous les échantillons de margines analysés, deux tocophérols ont été détectés et quantifiés :  $\alpha$ - et  $\gamma$ -tocophérol. Leurs concentrations moyennes étaient de  $25,63 \pm 4,46$  et  $3,68 \pm 0,52$   $\mu\text{g/g}$  de MS, respectivement pour l' $\alpha$ - et  $\gamma$ -tocophérols (tableau 18). L'isomère  $\alpha$  étant en quantités plus élevées, représente environ 90 % de la vitamine E totale. Ce pourcentage est conforme aux données de la littérature sur l'huile d'olive vierge (Manai-Djebali et *al.*, 2012 ; Ballus et *al.*, 2014 et Limon et *al.*, 2015). Pour ces deux formes de vitamine E, aucune différence n'a été observée dans leurs concentrations respectives ou leur somme selon le procédé de production de l'huile d'olive ou de la variété. Ceci était surprenant car Deiana et *al.*, (2002) ont indiqué que la teneur en tocophérol dans l'huile d'olive était fortement dépendante de la variété, et on aurait pu s'attendre à ce que cela soit également vrai pour les margines. Toutefois, il pourrait être supposé que si l'étape de malaxage a été bien effectuée avant la séparation de l'huile (à travers la presse ou la centrifugation à 3-phases), les gouttelettes lipidiques ont bien fusionné favorisant l'extraction des tocophérols avec la fraction huileuse et laissant seulement une fraction mineure (non liée quantitativement à des quantités initialement présentes dans le fruit) dans les margines (Jiménez et *al.*, 2014).

## 2.5. Teneur et composition en biophénols des margines

Parmi les composés phénoliques des margines choisis pour analyse (tableau 19), l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'oleuropeine aglycone n'ont pas été quantifiés puisque leurs concentrations respectives dans les échantillons étaient inférieures à la limite de quantification ou de détection de nos conditions de dosage. Sur la base des valeurs moyennes de la concentration des douze composés phénoliques quantifiés dans tous les échantillons de margines, le tyrosol était le composé phénolique majeur ( $195,87 \pm 41,52$   $\mu\text{g/g}$  de MS), à l'exception de l'oleuropéine qui a atteint des valeurs largement supérieures parfois (tableau 19). Dans l'ordre de grandeur décroissant, les concentrations de la lutéoline ( $96,57 \pm 12,43$   $\mu\text{g/g}$  de MS), l'acide caféique ( $68,70 \pm 9,53$   $\mu\text{g/g}$  de MS), la lutéoline-7-O-glucoside ( $51,38 \pm 8,56$   $\mu\text{g/g}$  de MS), l'acide vanillique ( $43,05 \pm 6,52$   $\mu\text{g/g}$  de MS), et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ( $38,87 \pm 5,62$   $\mu\text{g/g}$  de MS) ont été suivis par l'acide 4-hydroxyphénylacétique ( $5,62 \pm 0,96$   $\mu\text{g/g}$  de MS),

Suite du tableau 19

Variétés d'olive	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						Valeur P		
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases			Variété	Procédé	Interaction
	Azerradj (n=4)	Chemlal (n=5)	Sigoise (n=3)	Azerradj (n=7)	Chemlal (n=6)	Sigoise (n=4)			
Apigénine	3,3 ± 1,4	3,8 ± 1,3	2,8 ± 1,6	5,71 ± 1,1	3,3 ± 1,2	1,8 ± 1,4	ns	ns	ns
Acide chlorogénique	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	ns	0,041	0,106
Luteolin-7-O-glucoside	32,0 ± 22,1	34,2 ± 19,8	66,2 ± 25,6	49,1 ± 16,7	33,7 ± 18,1	93,2 ± 22,1	0,109	ns	ns
Acide gallique	4,7 ± 1,2	3,5 ± 1,1	3,0 ± 1,4	3,7 ± 0,9	3,3 ± 1,0	6,3 ± 1,2	ns	ns	ns

Les valeurs sont des moyennes ± l'erreur standard.

a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ) (test de Tukey-Kramer).

ns = différence non-significative ( $P > 0.05$ ).

l'acide gallique ( $4,06 \pm 0,47 \mu\text{g/g}$  de MS), l'apigénine ( $3,45 \pm 0,55 \mu\text{g/g}$  de MS), l'hydroxytyrosol ( $1,55 \pm 0,96 \mu\text{g/g}$  de MS) et enfin l'acide chlorogénique ( $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$  de MS). Les échantillons de margines ont montré des teneurs en composés phénoliques différentes en fonction de la variété et/ou du procédé (tableau 19). En effet, compte tenu des comparaisons entre les margines des différentes variétés d'olive, les concentrations de l'acide caféique, de l'acide 4-hydroxyphénylacétique et de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique étaient significativement différentes et une tendance a été observée pour l'acide vanillique et la lutéoline-7-O-glucoside. Pour ces cinq composés, la tendance générale est que les valeurs les plus élevées sont observées pour la variété *Sigoise*, par comparaison à *Azerradj* ou *Chemlal*, atteignant la signification pour l'acide caféique (4,3 fois plus élevée ;  $P < 0,05$ ), l'acide 4-hydroxyphénylacétique (3,4 fois ;  $P < 0,05$ ) et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (2,6 fois ;  $P < 0,05$ ).

En ce qui concerne l'effet du processus, les différences sont rares sauf en ce qui concerne la concentration de l'acide chlorogénique qui a été augmentée (4 fois) avec le procédé de centrifugation à 3-phases en particulier pour la variété *Sigoise*, alors qu'elle a diminué pour *Azerradj* (valeur de  $P$  proche de la tendance ; tableau 19). Par ailleurs, cet effet sur l'acide chlorogénique est largement marginal en raison de son niveau de concentration très faible ( $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$  de MS). En revanche, la concentration moyenne de l'oleuropeine qui a été seulement de  $30,6 \mu\text{g/g}$  de MS avec le processus de la presse a atteint  $995,3 \mu\text{g/g}$  de MS pour le procédé de centrifugation à 3-phases, mais en raison de la forte variabilité, la différence a atteint seulement la tendance de signification. A l'inverse, le système de presse donnerait des concentrations plus élevées d'acide caféique, avec une moyenne de  $85,1 \pm 14,6 \mu\text{g/g}$  de MS que le système de centrifugation à 3-phases ( $52,3 \pm 12,3 \mu\text{g/g}$  de MS).

Enfin, pour hydroxytyrosol, la lutéoline, tyrosol, l'apigénine et l'acide gallique, aucune différence significative liée au procédé d'extraction ou à la variété d'olive ne pourrait être signalée.

Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénoliques présents dans les margines issues de la trituration des trois variétés d'olive sont montrés dans le tableau 20. Le mode d'extraction de l'huile d'olive n'influence pas les concentrations en phénols totaux (PT), en flavonoïdes totaux (FT) et en tanins condensés (TC) des margines issues des trois variétés étudiés ( $P=0,206$ ). Par ailleurs, l'effet variété est prononcé pour ces mêmes paramètres. En effet, la variété *Sigoise* présente le contenu en PT le plus élevé ( $26,3 \text{ g/l}$ ) suivie d'*Azerradj* et *Chemlal* (respectivement,  $23,97$  et  $20,09 \text{ g/l}$ ). Les mêmes tendances ont été enregistrées pour les tanins

**Tableau 20 :** Contenu en composés phénoliques des margines (g/l) issues des variétés *Azerradj*, *Chemlal* et *Sigoise* pressées par mode traditionnel ou 3-phases.

Variétés d'olive	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						SEM	Valeurs P
	Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases				
	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>		
Phénols totaux	24,65	19,83	28,50	23,29	20,35	24,1	3,53	0,206
Flavonoïdes totaux	0,016	0,017	0,022	0,018	0,015	0,016	0,0026	0,13
Tanins condensés	5,79	2,91	5,31	4,67	4,95	5,28	0,997	<1‰
CPP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-

CPP, capacité à précipiter les protéines, SEM, erreur standard des moyennes, nd : non déterminé, P : probabilité.

condensés. La concentration la plus élevée était enregistrée pour la variété *Sigoise* (5,29 g/l) et la plus faible pour la variété *Chemlal* (2,93 g/l). Ces résultats confirment ceux de la composition en phénols et en cendre où nous avons trouvé que la variété *Sigoise* était supérieure par rapport à *Azerradj* et *Chemlal*. Pour les flavonoïdes totaux, les trois variétés ont des concentrations statistiquement similaires ( $p < 0,05$ ).

Pour le test de quantification des tanins totaux via leur capacité de précipitation du sérum albumine bovine (BSA), ces derniers s'avèrent non décelables. Ces résultats corroborent parfaitement avec les résultats ultérieurement obtenus dans d'autres travaux (Singh *et al.*, 2005 ; Vitti *et al.*, 2005 ; Arhab, 2007). L'avantage des méthodes de précipitation des protéines est la mesure de l'activité biologique des tanins présents dans les aliments, alors que les méthodes colorimétriques basées sur les propriétés chimiques, indiquent seulement la nature chimique des tanins (Singh *et al.*, 2005). Ainsi, les taux nuls de la capacité à précipitation des protéines (CPP) pourraient s'expliquer soit par les faibles taux de tanins condensés que renferment les margines des trois variétés, soit par l'incompatibilité structurale des tanins présents dans ces margines et la sérum albumine bovine. En outre, les références bibliographiques traitant de l'activité biologique des composés phénoliques des margines sont très rares, voire mêmes inexistantes (dans les conditions d'anaérobiose). De ce fait, l'étude de leur impact sur la dégradation ruminale reste à établir et pourrait être d'un intérêt majeur.

Les études dans la littérature concernant la quantification des composés phénoliques des olives peuvent être facilement rencontrés lorsqu'il s'agit de leur contenu dans l'huile, mais sont moins fréquentes lorsque l'on considère les margines. Il est bien admis que les margines "liquides" contiennent 53% des composés phénoliques initialement présents dans les olives (2% seulement dans l'huile et environ 45% dans les grignons secs ; Rodis *et al.*, 2002) ; cependant, les composés phénoliques identifiés dans les margines ainsi que leurs concentrations varient d'une étude à l'autre (Obied *et al.*, 2005). Le biais majeur vient du fait que les données des concentrations de ces composés sont le plus souvent exprimées par rapport au volume, alors que l'eau est parfois ajouté au cours du processus de production de l'huile d'olive (de 0 à 60 litres par 100 kg d'olives selon l'étude menée auprès des propriétaires des huileries de la présente étude). Ainsi, nous avons rapporté nos résultats à la teneur en matière sèche des margines. Quoiqu'il en soit, cela n'influe pas sur l'analyse qualitative de leur profil en composés phénoliques et il est généralement admis que le plus abondant serait l'hydroxytyrosol, le tyrosol, et l'oleuropéine (Obied *et al.*, 2005).

La quantification des composés phénoliques dans la présente étude a confirmé que le tyrosol serait le composé majeur dans les échantillons de margines, tandis que des concentrations très faibles d'hydroxytyrosol ont été observées, l'oleuropeine aglycone étant indétectable et les concentrations d'oleuropéine fortement variables (plus de 200 fois dans les conditions testées). Il est rapporté que le contenu et la composition en composés phénoliques des margines dépendent de la maturité et du cultivar du fruit, des conditions climatiques, du temps de stockage, du process et de la durée du malaxage (Obied et *al.*, 2005 et Jiménez et *al.*, 2014). Visioli et *al.* (1999) ont identifié l'oleuropeine comme composé phénolique majeur, alors qu'elle a été détectée en très faible concentration par Fakharedine et *al.* (2006) ; Lafka et *al.* (2011) et non détectée par Lesage-Meessen et *al.* (2001). Dans la présente étude, les prélèvements de margines ont toujours été effectués à la chaîne (au moment même de l'extraction de l'huile d'olive) et le degré de maturité des olives a été évalué par l'enquête pour aider à l'interprétation des données. Cela a permis de suggérer que nos quelques observations peuvent être partiellement attribuées au degré de maturité des olives. En effet, dans la présente étude, la teneur en l'oleuropéine était largement supérieure (valeur moyenne supérieure à 1700 µg/g de MS) dans les margines collectées à partir d'olives à faible niveau de maturation alors que sa concentration diminue lorsque le stade de maturité a augmenté. En fait, l'oleuropéine serait dégradée au cours de la maturation des fruits en raison de l'augmentation de l'activité de certaines enzymes hydrolytiques pendant la maturation des olives tel que rapporté par Dağdelen et *al.* (2013). Dans les margines, l'hydroxytyrosol a été rapporté être le composé phénolique majeur, atteignant environ 70% de la teneur totale en composés phénoliques (El-Abbassi et *al.*, 2012b). Certains auteurs ont également constaté que l'hydroxytyrosol était le principal composé phénolique des grignons d'olive, atteignant des concentrations entre 1624 à 2872 mg/kg (Rubio-Senent et *al.*, 2012). Le niveau de cet acide phénolique augmentait à la suite de la dégradation de l'oleuropéine pendant le processus de maturation des fruits en raison de l'augmentation de l'activité de certaines enzymes hydrolytiques (Amiot et *al.*, 1989 ; Esti et *al.*, 1998) et de la dégradation de l'hydroxytyrosol glucoside lors du broyage/malaxage (Klen & Vodopivec, 2012). Notre étude a démontré que les concentrations de l'hydroxytyrosol ou l'oleuropéine dans les margines sont très variables et suggère qu'ils pourraient être parmi les composés majeurs ou mineurs des margines en fonction de plusieurs facteurs (processus, degré de maturité du fruit...).

Le système d'extraction a légèrement modifié la composition phénolique des margines, puisque seule la concentration en acide chlorogénique a été significativement augmentée par le procédé de centrifugation à 3-phases (plus particulièrement pour les variétés *Sigoise* et *Chemlal*).

Toutefois, le processus continu à 3-phases tend à augmenter la concentration de l'oleuropeine alors que le contraire est vrai pour l'acide caféique. Ces résultats concordent avec ceux signalés par des rapports antérieurs de Lesage-Meessen *et al.* (2001) et Klen et Vodopivec (2012), mais pas avec ceux d'El-Abbassi *et al.* (2012b) qui ont démontré que les profils phénoliques des margines obtenues par le système continu à 3-phases sont différents de ceux issus du processus de la presse traditionnelle. Il est précisé que l'addition d'eau avant la séparation de l'huile influe sur les coefficients de partition des composés phénoliques. Rodis *et al.* (2002) ont démontré que la plupart des biophénols d'olive ont un faible coefficient de partition (huile/eau) allant de  $6.10^{-4}$  (dans le cas de l'oleuropéine) à 1,5. Par conséquent, au moment de la séparation des phases la plupart d'entre eux finissent dans la phase aqueuse ou margines. Obied *et al.* (2005) ont rapporté que la température au moment du process et la qualité de l'eau affectent la répartition des composés phénolique entre l'eau et l'huile de manière significative. Plus la température de l'eau est élevée, plus la partition des biophénols l'est dans l'huile, alors que plus l'eau est ajoutée, plus les biophénols sont récupérés dans les margines. La solubilité de l'oleuropéine dans les margines est beaucoup plus élevée que dans la phase huileuse (Rodis *et al.*, 2002), ce qui peut expliquer sa forte concentration dans les margines obtenues par centrifugation (procédé 3-phases). En revanche, Caponio et Catalano (2002) ont montré que, même la température des olives avant et pendant le broyage influence fortement la solubilisation des phénols et par conséquent leur concentration dans les margines. Di Giovacchino *et al.* (2002) avaient déjà prouvé que les broyeurs métalliques des systèmes continus de centrifugation (3- ou 2-phases) assurent une meilleure rupture de la chair d'olive comparativement aux meules de la presse, améliorant ainsi la libération des phénols de la pâte d'olive à l'huile et par voie de conséquence aux margines. Dans notre étude, les propriétaires des unités d'extraction de l'huile d'olive fonctionnant par le procédé de centrifugation à 3-phases ajoutent de gros volumes d'eau chaude pour améliorer et optimiser l'extraction de l'huile et minimiser la consommation d'énergie (de 40 l d'eau/100 kg d'olives à 66 °C vs 27 l d'eau/100 kg d'olives à 47 °C pour le procédé traditionnel de la presse), mais ces différences semblent insuffisantes pour induire d'effet notable sur le contenu en phénols.

Des différences quantitatives entre les variétés d'olives ont été notées pour plusieurs biophénols. Des quantités élevées d'acide caféique, d'acide 4-hydroxy-phénylacétique et d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (ainsi qu'une tendance pour l'acide vanillique et la lutéoline-7-O-glucoside) sont observées pour la variété *Sigoise*, le schéma est le même pour les 2 autres variétés testées (*Azerradj* et *Chemlal*). Cela semble indiquer que la composition phénolique

pourrait présenter une contribution utile de la caractérisation biochimique des variétés de margines. Ce résultat corrobore les travaux antécédents de Mulinacci et *al.* (2001) sur les margines et ceux de Romani et *al.* (1999) sur l'huile.

## Partie 2. Biodégradation anaérobie des margines et de leurs extraits phénoliques bruts par le microbiote du rumen

### 1. Biodégradation *in vitro* des margines en système batch

#### 1.1. Caractérisation chimique des margines vs foin de vesce-avoine

La composition chimique et le contenu phénolique des margines et du foin de vesce-avoine (témoin) qui ont servi pour l'étude de la biodégradation en système batch sont présentés dans le tableau 21. Seuls les paramètres qui n'ont pas été évoqués dans la partie 1 vont être discutés ici.

**Tableau 21 :** Composition chimique des margines issues du système continu à 3-phases et du foin de vesce-avoine (g/100 g de MS).

Paramètres	Substrats		ESM	Valeur P
	Margines	Foin de vesce-avoine		
MS	6,72	61,62	1,86	<3 ‰
MM	2,46	4,79	0,20	<1 ‰
MAT	2,70	6,79	0,20	<1 ‰
ST	32,57	20,21	1,76	<1 ‰
PT	5,6	2,75	0,02	<5 ‰
TT	4,5	2,05	0,01	<1 ‰
TC	0,59	1,84	0,02	<3 ‰

MS, matière sèche ; MM, matière minérale ; MAT, matière azotée totale ; ST, sucres totaux ; phénols totaux ; TT, tanins totaux ; TC, tanins condensés ; E.S.M., erreur standard des moyennes.

Les margines sont caractérisées par une teneur en matière azotée totale faible. Celle-ci est de 2,70g/100g de MS (Tableau 22). Ce résultat est conforme à celui mentionné dans la littérature (Ben Othman et *al.*, 2009 et Moussaoui et *al.*, 2010).

Comparativement au substrat témoin (foin de vesce-avoine), les margines se distinguent par leur contenu élevé en sucres totaux (32,57%). Cette teneur est largement supérieure à celle enregistrée dans plusieurs travaux (Christodoulou et *al.*, 2007 ; Hachicha et *al.*, 2008 et Blika et *al.*, 2009). Ces auteurs mentionnent des concentrations comprises entre 1 et 8%. La teneur élevée

**Tableau 22 :** Biodégradation *in vitro* des margines estimée par la production de biogaz et les paramètres fermentaires déterminés après 24h d'incubation (pH, N-NH<sub>3</sub>, AGV<sub>t</sub>, DMS et ME)

Substrats	Production de biogaz après (ml/200 mg MS)							Paramètres fermentaires mesurés				
	3h	6h	9h	24h	48h	72h	96h	pH	N-NH <sub>4</sub> (µg/ml)	AGV <sub>t</sub> (µMolg/ de MS)	DMO g/kg de MS	ME (MJ/kg de MS)
Margines	12,67	15,83	20,85	32,14	50,66	50,66	50,66	6,62 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	0,708	44,80	6,93
Foin de vesce-avoine	15,50	21,50	25,67	40,53	58,33	61,50	61,50	6,71 <sup>a</sup>	4,94 <sup>a</sup>	1,271	68,01	11,50
SEM	0,35	4,71	6	0,90	0,90	0,90	0,90	0,01	0,18			
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01			

N-NH<sub>3</sub> : ammoniac, AGV<sub>t</sub> : acides gras volatiles totaux, DMO : digestibilité de la matière sèche organique, ME : énergie métabolisable, *P* : probabilité.

en sucres totaux de nos margines pourrait être due au fait qu'elles étaient collectées directement de la chaîne de trituration. En effet, d'après Hamdi (1992), le stockage des margines dans les bassins d'évaporation entraîne la bioconversion des sucres en acides organiques. Les principaux sucres identifiés, d'après la littérature, incluent l'arabinose, le fructose, le xylose, le mannose, le glucose, le saccharose, le mannitol, le sucrose et les pentoses (Niaounakis & Halvadakis, 2006 ; Dhouieb et al., 2006 ; McNamara et al., 2008 ; Eroglu et al., 2009 ; Mechri et al., 2010 et Abichou et al., 2013). Ces oses sont très solubles et peuvent constituer un excellent supplément énergétique dans les rations des ruminants (Molina-Alcaïde & Yanez-Ruiz, 2008). Nos résultats montrent aussi que les margines se caractérisent par un contenu élevé en phénols totaux, estimé en équivalents d'acide gallique à 5,6g/100g de MS (tableau 21). Bien que des résultats semblables sont rapportés par Ben Sassi et al. (2006) pour des margines marocaines obtenues d'un système à 3-phases, ce taux est, cependant, différent de ceux notés par Zenjari et al. (2006) et Blika et al. (2009). Ces variations dans la teneur en phénols totaux des margines peuvent être dues à plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques développées dans la partie 1. Pour les ruminants, les phénols peuvent contribuer à l'inhibition des *Archaeobactéries* et, par conséquent, limiter les pertes d'énergie sous forme de méthane. De même, la concentration des margines en TT est 2 fois supérieure à celle du foin de vesce-avoine ( $P < < 1 \%$ ) (tableau 21). La teneur en TC des margines (0,59 g/100g de MS) suggère qu'elles sont riches en tanins hydrolysables. Ces derniers sont efficacement dégradés par le microbiote du rumen et contribuent à la production des acides gras volatiles (source majeure d'énergie pour les ruminants).

### **1.2. Production de biogaz *in vitro* en présence du microbiote d'ovin et paramètres fermentaires mesurés (pH, N-NH<sub>3</sub>, AGV<sub>t</sub>, DMS et ME)**

La production de biogaz résultant de la dégradation anaérobie des margines en présence du microbiote ruminal d'ovins, et des paramètres fermentaires (pH et ammoniac) mesurés après 24 h d'incubation et ceux estimés (acides gras volatiles totaux, digestibilité de la matière organique et l'énergie métabolisable) sont illustrés dans le tableau 22. Il en ressort que la production de biogaz est significativement différente entre les substrats aux différents temps d'incubation ( $P < 0,01$ ). Après 96 h, le volume de biogaz cumulé le plus élevé est noté par le substrat témoin (61,50 ml/200 mg MS) et le plus faible par les margines (50,66 ml/200 mg MS).

Quand une analyse de la cinétique de la production de biogaz a été effectuée, elle a révélé que 63 et 66% de biogaz ont été produits pendant les premières 24 heures de la fermentation. Ces différences sont probablement dues à la composition chimique des deux substrats (tableau 22).

Les margines sont riches en sucres totaux, en phénols et en tanins comparativement au témoin. Ainsi, il semblerait que les sucres sont rapidement fermentés, ce qui a engendré une production importante de gaz dans les premières heures d'incubation. Par ailleurs, cette production de gaz a été ralentie suite à la solubilisation des composés phénoliques. Ces composés sont considérés comme des facteurs antinutritionnels car ils affectent à la fois la palatabilité et l'ingestion des aliments (Shofield *et al.*, 2001; Makkar, 2005 ; Salem *et al.*, 2006 ). Selon de nombreux travaux, il est établi que les composés phénoliques réduisent significativement la production de biogaz (Makkar *et al.*, 1995 et Hervas *et al.*, 2000). Cette réduction peut être engendrée via une diminution de l'activité fermentaire du microbiote, soit directement par l'inhibition de la croissance bactérienne ou de leurs enzymes sécrétés dans le milieu fermentaire, et/ou indirectement par fixation aux substrats en limitant leur accessibilité à la dégradation enzymatique (Akin *et al.*, 1988 et Makkar *et al.*, 1995 ). Les résultats des analyses chromatographiques des margines monovariétales (section 2.5. partie 1) ont mis en évidence la richesse des margines en phénols simples (tyrosol et oleuropéine) qui agissent aussi bien sur les bactéries du rumen que sur les enzymes impliquées dans le processus de la digestion anaérobie, particulièrement, la  $\beta$ -glucosidase et la carboxyméthylcellulase (Zuhainis *et al.*, 2008).

La valeur de pH enregistrée dans les fermenteurs en fin d'incubation est plus faible en présence de margines (6,62) qu'avec le substrat de référence (6,71 ;  $P < 0,01$ ) (tableau 22). La légère acidification du milieu de fermentation est essentiellement due à l'accumulation des AGV. Pour les deux substrats, les valeurs de pH enregistrées sont au-dessus du seuil critique d'inhibition de la croissance et de l'activité de la cellulolytique du microbiote ruminal (Hoover, 1986 ;  $\text{pH} \geq 6$ ). Ce résultat est corroboré par les concentrations en  $\text{AGV}_t$  estimées qui montrent que la production la plus élevée est observée pour le substrat de référence (1,271  $\mu\text{moles/g MS}$ ) et la plus faible pour les margines (0,708  $\mu\text{moles/g MS}$ ). En effet, les AGV sont des produits fermentaires qui représentent la principale source d'énergie pour les ruminants et dont l'accumulation dans le milieu ruminal contribue à son acidification. Selon Arhab *et al.* (2009), la stabilité du pH dans la zone de neutralité en système batch ( $\text{pH}$  régnant dans le rumen, 6,8-6,9) est expliquée par la libération excessive des ions carbonates à partir de la solution tampon pour neutraliser l'acidité résultant de la production des acides gras volatiles et/ou une production élevée d'ammoniac. Effectivement, cette dernière est inférieure aux concentrations préconisées

**Tableau 23 :** Biodégradation *in vitro* des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine estimée par la production de biogaz et les paramètres fermentaires déterminés après 24h d'incubation (pH, N-NH<sub>3</sub> et DMS).

Margines : foin de vesce-avoine	Production de biogaz (ml/200 mg de MS)							Paramètres fermentaires mesurés		
	3h	6h	9h	24h	48h	72h	96h	pH	N-NH <sub>4</sub> (µg/ml)	DMS (g/100g de MS)
0 : 100	15,50 <sup>a</sup>	21,50 <sup>a</sup>	25,67 <sup>a</sup>	40,53 <sup>a</sup>	58,33 <sup>a</sup>	61,50 <sup>a</sup>	61,50 <sup>a</sup>	6,71	4,94 <sup>a</sup>	83,28 <sup>a</sup>
40 : 60	9,33 <sup>bc</sup>	11,67 <sup>bc</sup>	14,33 <sup>abc</sup>	31,33 <sup>a</sup>	48,00 <sup>a</sup>	52,00 <sup>ab</sup>	52,00 <sup>ab</sup>	6,70	4,23 <sup>cd</sup>	81,02 <sup>a</sup>
60 : 40	10,67 <sup>b</sup>	15,83 <sup>ab</sup>	18,67 <sup>ab</sup>	27,33 <sup>ab</sup>	36,00 <sup>b</sup>	47,83 <sup>ab</sup>	48,83 <sup>ab</sup>	6,76	5,02 <sup>bc</sup>	73,30 <sup>b</sup>
80 : 20	9,33 <sup>bc</sup>	11,00 <sup>bcd</sup>	12,67 <sup>bc</sup>	23,33 <sup>b</sup>	32,67 <sup>b</sup>	38,50 <sup>d</sup>	39,17 <sup>d</sup>	6,69	5,64 <sup>b</sup>	65,26 <sup>c</sup>
100 : 0	12,67 <sup>b</sup>	15,83 <sup>ab</sup>	23,26 <sup>ab</sup>	31,37 <sup>a</sup>	44,16 <sup>b</sup>	45,58 <sup>cd</sup>	45,58 <sup>cd</sup>	6,62	3,71 <sup>d</sup>	59,68 <sup>d</sup>
<b>SEM</b>	2,02	2,48	2,77	3,92	4,00	3,31	3,40	0,06	0,37	3,10
<b>P</b>	0,0011	0,0018	0,0019	0,0106	0,0064	<1 ‰	<1 ‰	0,54	0,046	<1 ‰

N-NH<sub>3</sub> : ammoniac, DMS, digestibilité de la matière sèche. *ESM*, erreur standard des moyennes, *P* probabilité.

a, b : les lettres différentes dans une rangée sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ) (test de Newman-Keuls).

pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro* (Nagadi et al., 2000 ; 80 mg/l). Dans notre essai, les concentrations d'ammoniac enregistrées dans les fermenteurs après 24 heures en présence de margines ou de foin de vesce-avoine sont respectivement de 3,71 et 4,94 mg/100 ml (tableau 23). Selon Blümmel et al. (1999) et Jouany (1994), la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d'ammoniac et de biomasse bactérienne. Ainsi, le bilan azoté relatif révèle que la dégradation de la matière azotée aboutit essentiellement à la production de biomasse microbienne. La valeur la plus élevée de la digestibilité de la matière organique, estimée à partir des concentrations des éléments nutritifs et de la production de gaz de chaque substrat, est observée pour le substrat témoin (68,01%) et la plus faible pour les margines (44,80%). L'énergie métabolisable prédite est également différente entre les margines et le substrat de référence. La valeur de l'énergie métabolisable calculée pour le foin (11,5 MJ/kg MS) est similaire à celle rapportée pour le foin d'alfalfa de qualité moyenne (NRC, 1989). Cependant, le contenu énergétique des margines (6,93 MJ/kg MS) est acceptable pour un sous-produit et il est hautement supérieur à celui noté par Christodoulou et al. (2007).

## **2. Biodégradation *in vitro* des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine**

### **2.1. Suivi de la fermentation des mélanges de margines et de foin de vesce-avoine par la production des biogaz**

Le tableau 24, qui illustre les résultats de la production de gaz des substrats singuliers (margines, foin de vesce-avoine) et de leurs mélanges, montre que les margines sont faiblement fermentées par le microbiote ruminal d'ovins par rapport au foin de vesce-avoine ( $P = 0,0011$ ). La production de biogaz est significativement différente entre les deux substrats pour les différents temps d'incubation ( $P < 0,05$ ). Au terme des 96 h d'incubation, les volumes de gaz enregistrés sont respectivement de 45,58 et 61,50 ml/200 mg MS pour les margines et le foin de vesce-avoine. Cette différence est certainement liée, comme il a été déjà mentionné dans le tableau 22 à la composition chimique différente des deux substrats (margines et foin de vesce-avoine). En effet, la faible production de gaz résultant de la biodégradation *in vitro* des margines est probablement due à leur richesse en glucides solubles et facilement fermentescibles qui sont rapidement assimilés par les microorganismes durant les premières heures de fermentation, et à

leur contenu élevé en composés phénoliques dont la solubilisation engendre à la fois l'inhibition de la croissance des microorganismes impliquée dans la production de gaz (*Archaeobactéries*) (Kamra et al., 2008 ; McNulty et al., 2009 ; Patrin et saxena, 2010). En revanche, la situation observée pour le substrat témoin résulte de la nature hybride du foin de vesce avoine qui est formé de l'association de deux plantes appartenant à deux familles botaniques différentes, la vesce (*Vicia sativa*), une légumineuse fourragère très riche en glucides mais aussi en protéines, et l'avoine (*Avena sativa*), une graminée riche en fibres. L'addition des margines dans les mixtures induit une réduction de la production de gaz pour les différentes doses et aux différents temps d'incubation ( $P < 0,05$ ). Cette réduction est dépendante de la concentration. Ainsi et après 24h d'incubation, cette chute était de l'ordre de 22,7, 32,57 et 42,43%, respectivement pour les concentrations 40, 60 et 80% de margines ajoutées. Cette forte diminution dans la production de biogaz est probablement due, d'une part à l'effet des composés phénoliques présents dans les margines, et d'autre part à la substitution de la fraction cellulosique (potentiellement dégradable dans le temps) du foin par la fraction soluble, facilement fermentescible des margines. En fait, plusieurs auteurs rapportent que le contenu protéique contribue faiblement à la production de gaz mais fortement à la production de biomasse microbienne (Khazaal et al., 1995 ; Long et al., 1999 ; Aregheore, 2000). Ainsi, la réduction dans la production de gaz observée suite à l'addition des margines pourrait être également attribuée à l'appauvrissement du milieu de culture en ce facteur de croissance. Ces constatations sont confirmées par le calcul des effets associatifs (tableau 25). L'addition des margines au foin de vesce-avoine induit un effet antagoniste sur la production de gaz.

**Tableau 24 :** Effets associatifs obtenus à partir de la biodégradation anaérobie des associations margines-foin de vesce-avoine.

Temps d'incubation (h)	Pourcentage de margines inclus dans les associations		
	40%	60%	80%
3h	-33,73%	-24,21%	-33,73%
6h	-37,46%	-15,16%	-32,10%
9h	-41,89%	-24,29%	-48,62
24h	-12,85	-23,97%	-35,10%
48h	-6,32%	-29,74%	-36,24%
72	-10,34	-10,66%	-28,10%

**Tableau 25 :** Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés *Azerradj*, *Chemlal* et *Sigoise* sur la production de gaz ruminal cumulée *in vitro*.

	<i>Témoin</i>	Procédé d'extraction de l'huile d'olive						SEM	<i>P</i>
		Système de presse			Système de centrifugation à 3-phases				
		<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Azerradj</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Sigoise</i>		
3h	7,66	7,66	9	8,33	6,33	12	9	2,51	0,40
6h	12,66	11,33	14,66	14,33	9,66	20	14	2,11	0,2
9h	18,33	15,66	18,33	19,33	13,33	26,33	17,33	1,13	0,13
24h	36,33	38,66	43,66	42,66	33,66	48,33	36,66	2,31	0,24
48h	46,33	61	69	69	54,33	75	72,33	1,78	0,02

SEM : erreur standard des moyennes, *P* : probabilité.

Ainsi, il semblerait que l'association margine-foin de vesce-avoine induit la prolifération de la biomasse microbienne. Ceci est probablement dû au contenu élevé des margines en composés phénoliques qui inhibe principalement la croissance des archaebactéries, marquée par une réduction dans la production de méthane, ce qui engendre la prolifération des bactéries fermentaires pour le maintien de l'équilibre de l'écosystème ruminal.

## **2.2. Paramètres fermentaires mesurés**

Les résultats des paramètres fermentaires mesurés (pH, N-NH<sub>4</sub> et DMS) (tableau 24) montrent que l'introduction des margines dans les mélanges ne modifie pas les valeurs de pH après 24h d'incubation (P=0,54). En revanche, les margines engendrent globalement une augmentation dans la production d'ammoniac. Cet accroissement est de 0,7 et 1,32 unités, respectivement pour les concentrations de 60 et 80%. En outre, la même tendance est observée pour la digestibilité de la matière sèche. Ainsi, cette augmentation est de 9,54 et 1,72 unités, respectivement pour les doses de 40 et 60%. De ce fait, il paraît que l'addition des margines induit une réorientation des voies métaboliques fermentaires du foin de vesce-avoine vers la prolifération de la biomasse macrobienne, indispensable à la dégradation de sa fraction cellulosique, plutôt qu'à la production de biogaz.

## **3. Impact du contenu phénolique des margines sur la biodégradation anaérobie du foin de vesce-avoine**

### **3.1. Impact du contenu phénolique des margines monovariétales sur l'activité métabolique du microbiote ruminal**

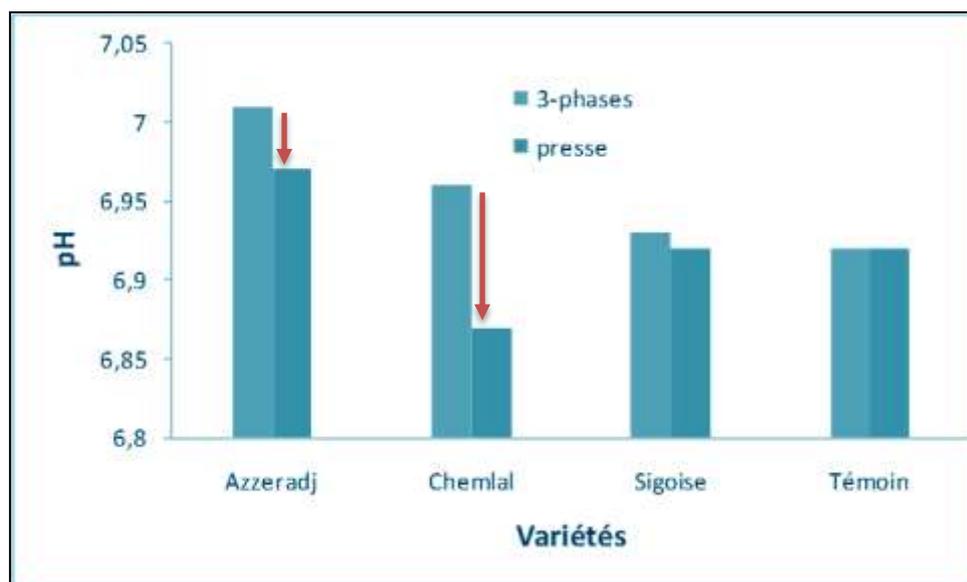
#### **3.1.1. Production de biogaz**

L'addition du contenu phénolique extrait des margines des trois variétés au milieu fermentaire stimule la production de gaz aux différents temps d'incubation (3h-24h) comparativement au témoin (tableau 25). Après 24h d'incubation, cette augmentation bien qu'elle ne soit pas significativement différente du témoin (sans le contenu phénolique des margines), est de 20,17, 17,42 et 6,41%, respectivement pour les variétés *Chemlal*, *Sigoise* et *Azerradj* issues du procédé de centrifugation à 3-phases. Une tendance différente est observée pour le système traditionnel où l'accroissement dans la production de gaz est uniquement noté

pour la variété *Chemlal* (33,03%,  $P < 5\%$ ). Ces résultats pourraient être expliqués par la capacité du microbiote ruminale à dégrader les composés phénoliques. En effet, l'étude menée par Leulmi (2011), ayant travaillé dans les mêmes conditions, montre que le contenu phénolique des margines est dégradée pendant les premières heures d'incubation où des taux de biodégradation de 63,33% et 56,94% ont été notés, respectivement pour les phénols totaux et les phénols simples. D'après McSweeney et al. (2001), certains microorganismes du rumen, notamment les *Streptococcus* possèdent des tannases capables de dégrader les tanins hydrolysables. Ces enzymes interviennent dans l'hydrolyse des liaisons esters des tanins hydrolysables en produisant l'acide gallique et du glucose. A la fin de la fermentation (à partir de 24h d'incubation), l'addition des extraits phénoliques entraîne une diminution non significative dans la production de biogaz pour les variétés *Azerradj* et *Sigoise*. Ce ralentissement pourrait être attribué à l'épuisement des composés phénoliques biodégradables dans le milieu de culture et /ou à leur bioconversion en composés phénoliques stables et non biodégradables. En effet, de nombreux auteurs signalent que la dégradation des polyphénols engendre la production de monomères simples qui peuvent être polymérisés et forment des composés résistants à la biodégradation (Hamdi et Ellouz, 1993 ; Capasso, 1997). En revanche, l'augmentation dans la production de biogaz constatée pour la variété *Chemlal* peut être expliquée par l'effet méthanogénique que peuvent exercer les composés phénoliques (Min et al., 2003).

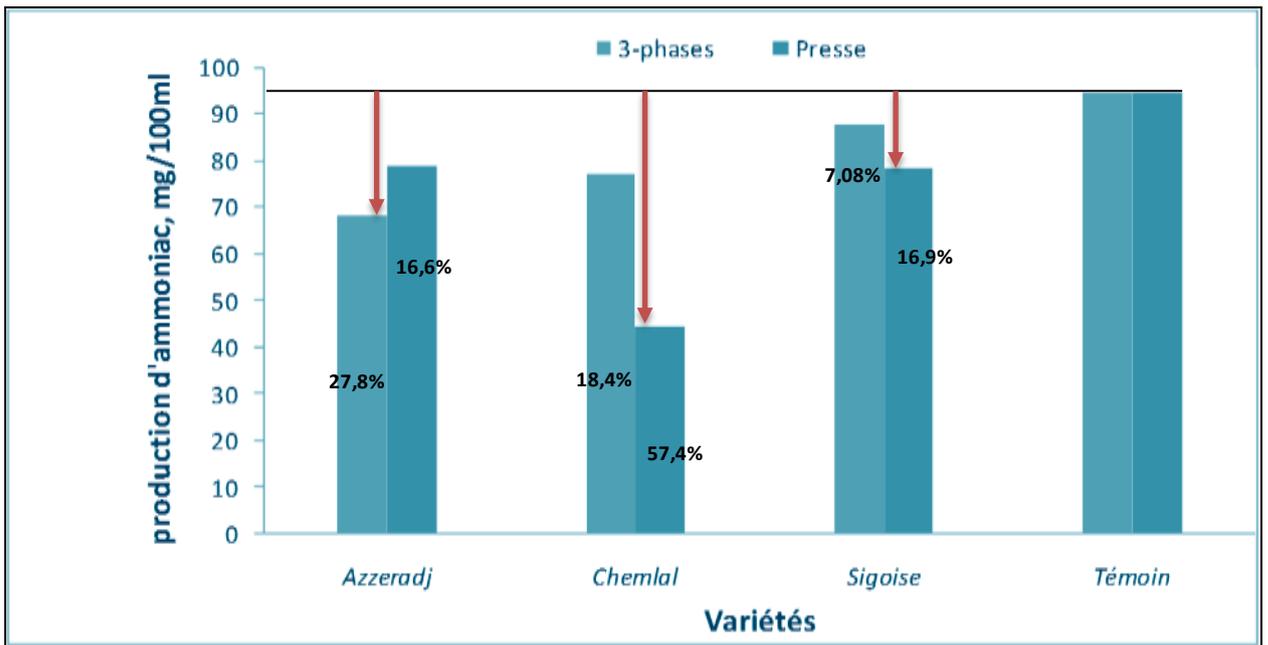
### 3.1.2. Paramètres fermentaires mesurés

Les mesures de pH effectuées après 24h sont présentées dans la figure 22. Cette dernière indique que l'influence du contenu phénolique est statistiquement non significative sur les valeurs de pH ( $P > 0,05$ ). Une augmentation légère et non significative est observée pour les variétés *Azerradj* et *Chemlal* pressées par le mode de centrifugation à 3-phases (respectivement, 7,01 et 6,96). Tandis qu'une tendance inversée est notée pour les mêmes variétés pressées selon le mode de presse. Ces valeurs restent dans l'intervalle toléré pour une activité microbienne efficace. De plus, elles témoignent de l'efficacité du système tampon utilisé dans la salive artificielle.



**Figure 22 :** Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés *Azerradj*, *Chemlal* et *Sigoise* sur le pH du milieu fermentaire enregistré après 24h d'incubation.

La production de l'azote ammoniacal ( $N-NH_3$ ) du foin de vesce-avoine additionné à des extraits phénoliques est mentionnée dans la figure 23. Elle montre que l'addition du contenu phénolique au milieu fermentaire engendre une diminution non significative dans la concentration de l'azote ammoniacal après 24h d'incubation ( $P > 0,05$ ). Pour le procédé de centrifugation à 3-phases, la réduction la plus élevée est enregistrée pour la variété *Azerradj* (27,8%) et la plus faible pour la variété *Sigoise* (7,08%). Concernant, pour le mode traditionnel de presse, une réduction importante est notée pour *Chemlal* (57,4%) et plus faible pour *Azerradj* (16,6%). Cette diminution dans la production d'ammoniaque peut être la conséquence d'un effet des composés phénoliques sur les archaebactéries et, indirectement, sur les protozoaires qui sont la niche écologique de leur fixation. Ces derniers jouent un rôle primordial dans la protéolyse où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est trois fois supérieure à celle des bactéries (Eugene, 2002). Comme elle peut être la conséquence de l'inhibition spécifique de la désamination assurée principalement par les bactéries, spécifiquement des bactéries hyper-productrices d'ammoniaque (Jouany, 1994 ; Medini et *al.*, 2009). En outre, cette diminution pourrait être expliquée également soit par une assimilation intense de ce macronutriment par les bactéries (Arhab, 2007) et/ou sa transformation en protéines microbiennes (Jouany et Reperant, 2007).



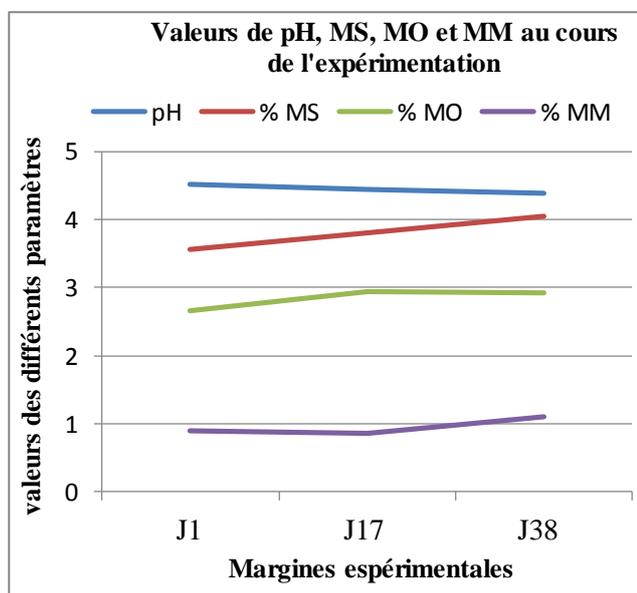
**Figure 23 :** Impact du contenu phénolique extrait des margines des variétés *Azerradj*, *Chemlal* et *Sigoise* sur la production en azote ammoniacal du milieu fermentaire après 24h d'incubation.

## **Partie 3. Impact de la distribution de margines en complément de rations à base de fourrages classiquement distribués en Algérie sur la composition en micro-constituants du lait chez la Vache**

### **1. Caractéristiques chimiques et en micro-constituants vitaminiques des margines incorporées dans la ration alimentaires des vaches en production et leur évolution au cours de l'expérimentation**

#### **1.1. Paramètre chimiques**

Les margines incorporées comme supplément de la ration des vaches en production ont été issues d'une huilerie fonctionnant avec le système discontinu de presse située à Sidi Mezghiche, commune El Harrouche, wilaya de Skisda (Côte-Est Algérienne). Les caractéristiques physico-chimiques et leur évolution au cours des 5 semaines d'expérimentation sont illustrées dans la figure 24.



**Figure 24 :** Valeurs de quelques paramètres chimiques des margines et leur évolution au cours de la période expérimentale.

MS, matière sèche (g/100g des margines brutes) ; MO, matière organique (g/100g de MS) ; MM, matière minérale (g/100g de MS).

J1 : 1<sup>er</sup> jour de l'expérimentation ; J16 : fin de la période d'adaptation ; J38 fin de l'expérimentation.

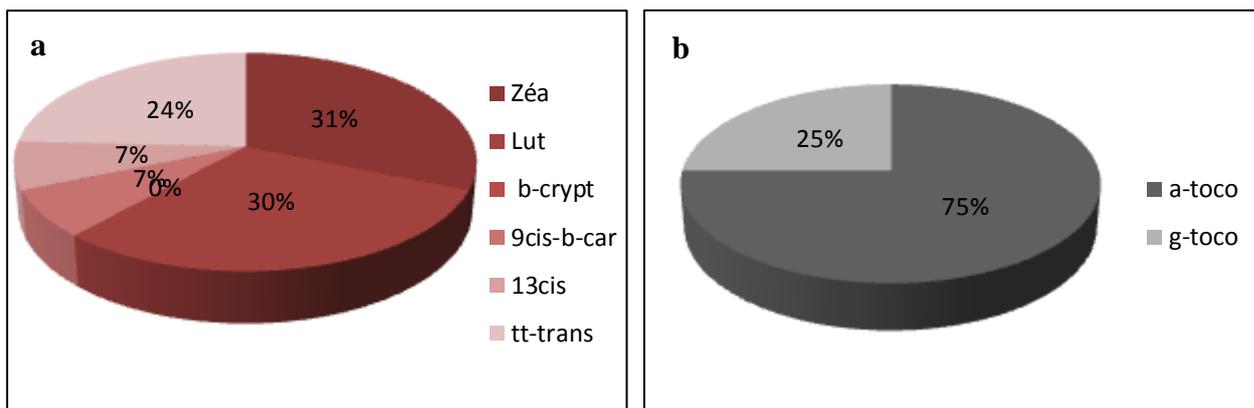
Le pH des margines était acide, sa valeur au J1 était de 4,51. Au J17 et J38, les valeurs du pH sont passées, respectivement à 4,43 et 4,38. Cette légère baisse peut être expliquée par la transformation de certains phénols simples, composés phénoliques majoritaires des margines en acides ou alcools phénoliques, ce qui avait pour effet de baisser des valeurs du pH. Très peu d'études ont été réalisées sur l'effet du stockage sur la teneur en composés phénoliques des marines. El Abbassi et *al.* (2012b) ont enregistré une augmentation croissante et significative des phénols totaux au cours des 4 premiers mois de stockage des margines à température ambiante et à l'abri de la lumière, accompagnée par une augmentation de leur pouvoir antioxydant. La concentration commence à chuter à partir du 5<sup>ème</sup> mois. Feki et *al.* (2006) ont enregistré une accumulation significative de l'hydroxytyrosol après 5 mois de stockage. La concentration correspondante a augmenté de 257 à 302 %. Cependant, les concentrations des autres composés phénoliques étaient nettement diminuées. Plusieurs réactions peuvent avoir lieu au moment du stockage des margines qui peuvent influencer leur composition chimique. Ainsi, certaines molécules peuvent être transformées, d'autres néoformées ou disparues (El Abbassi et *al.*, 2012b).

En l'absence des données de la littérature de l'effet du stockage des margines sur leur composition chimique, nous avons enregistré une augmentation des teneurs en matière sèche, organique et minérale due probablement à la prolifération des microorganismes (levures et champignons notamment) et/ ou à la diminution du volume des margines par évaporation au moment du prélèvement.

## 1.2. Les micro-constituants vitaminiques

### 1.2.1. Teneurs et composition en micronutriments des margines

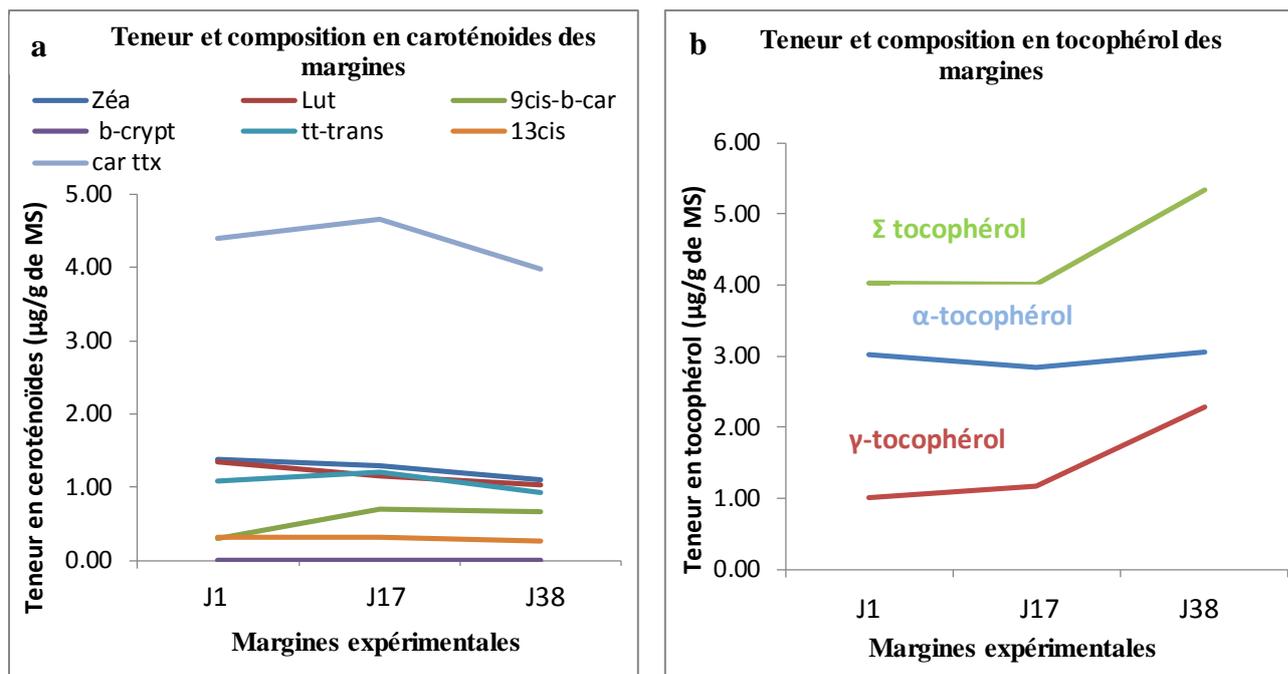
La composition centésimale moyenne en caroténoïdes des margines est présentée en figure 25a. Cinq composés seulement étaient quantifiables. Parmi eux, se trouvent 3 isomères du  $\beta$ -carotène (formes *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis*), et 2 xanthophylles (zéaxanthine, lutéine et  $\beta$ -cryptoxanthine). La  $\beta$ -cryptoxanthine étant présente, au mieux, à l'état de trace. Les  $\beta$ -carotènes représentaient en moyenne 40% des caroténoïdes totaux, l'isomère *tout-trans*, principal précurseur de la vitamine A, étant la forme principale. Parmi les xanthophylles, la lutéine et la zéaxanthine, se trouvant en proportions sensiblement égales, étaient très nettement dominantes puisqu'elles constituaient 60% des caroténoïdes totaux. Le composé majoritaire de la vitamine E étant l' $\alpha$ -tocophérol (figure 25b).



**Figure 25** : Composition et teneur en caroténoïdes et tocophérol des margines.  
a ; caroténoïdes, b ; tocophérol

### 1.2.2. Evolution de la teneur et de la composition en micronutriments des margines au cours de la période d'expérimentation

Le profil des caroténoïdes et de la vitamine E n'a pas été influencé au moment du stockage des margines. Néanmoins, nous avons noté l'absence parmi les xanthophylles, de la  $\beta$ -cryptoxanthine et une baisse légère de la teneur en zéaxanthine et en lutéine. Pour les trois isomères du  $\beta$ -carotène, les concentrations tendent à être stables pour certains, c'est le cas du 13cis- $\beta$ -carotène, ou augmentées au J17 puis baissent au J38, comme c'est le cas du tout-*trans* et du 9-cis  $\beta$ -carotène (figure 26a), mais globalement, nous avons noté une baisse de la teneur en caroténoïdes totaux en fin d'expérimentation, dont la teneur a passé de 4,41 à 3,98  $\mu\text{g/g}$  de MS. Pour la vitamine E et contrairement aux caroténoïdes, les teneurs ont augmenté pour les deux isomères  $\alpha$ - et  $\gamma$ - tocophérol au cours des 5 semaines de la période expérimentale (figure 26b).



**Figure 26 :** Composition et teneur en micro-constituants vitaminiques des margines pendant la période expérimentale. a, caroténoïdes ; b, vitamine E.

J1 : 1<sup>er</sup> jour de l'expérimentation ; J16 : fin de la période d'adaptation ; J38 fin de l'expérimentation.

## 2. Effet de la supplémentation en margines sur les performances de production des vaches laitières.

Pendant les 38 jours d'expérimentation, aucun refus ni réduction de l'ingestion de la part des vaches du lot expérimental n'ont été observés. Les margines incorporées avec le concentré ont été très bien acceptées par les vaches dès le premier jour de l'expérimentation. Nous avons même noté une performance "particulière" et une sensation de bien-être des vaches du lot expérimental. En effet, suite à une diarrhée passagère de plus d'une semaine qui a touché la majorité des vaches de l'étable, les 6 vaches du lot expérimental ont en été épargnées. Les résultats du tableau 26 montrent clairement que les performances de production des vaches en lactation n'étaient pas touchées négativement par l'incorporation des margines dans leur ration de base. Les volumes de lait produits, les taux butyreux (TB), protéiques (TP), cellulaires et l'urée étaient comparables ( $p < 0.05$ ) pour les deux lots (témoin et expérimental).

**Tableau 26** : Production laitière, taux butyreux et protéiques, urée et taux cellulaires des laits en fin de période expérimentale.

	<b>Lot Margine</b>	<b>Lot Témoin</b>	<b>SE</b>	<b>P</b>
PL (kg/j)	19,66	21,48	1,66	ns
TP (g/l)	31,8	32,2	1,2	ns
TB (g/l)	26,5	25,3	4,9	ns
Cellules (/ml)	287500	239500	40232	ns
Urée (g/l)	0,31	0,32	0,02	ns

PL : production laitière, TP : taux protéiques, TB : taux butyreux. SE : erreur standard, P : probabilité.

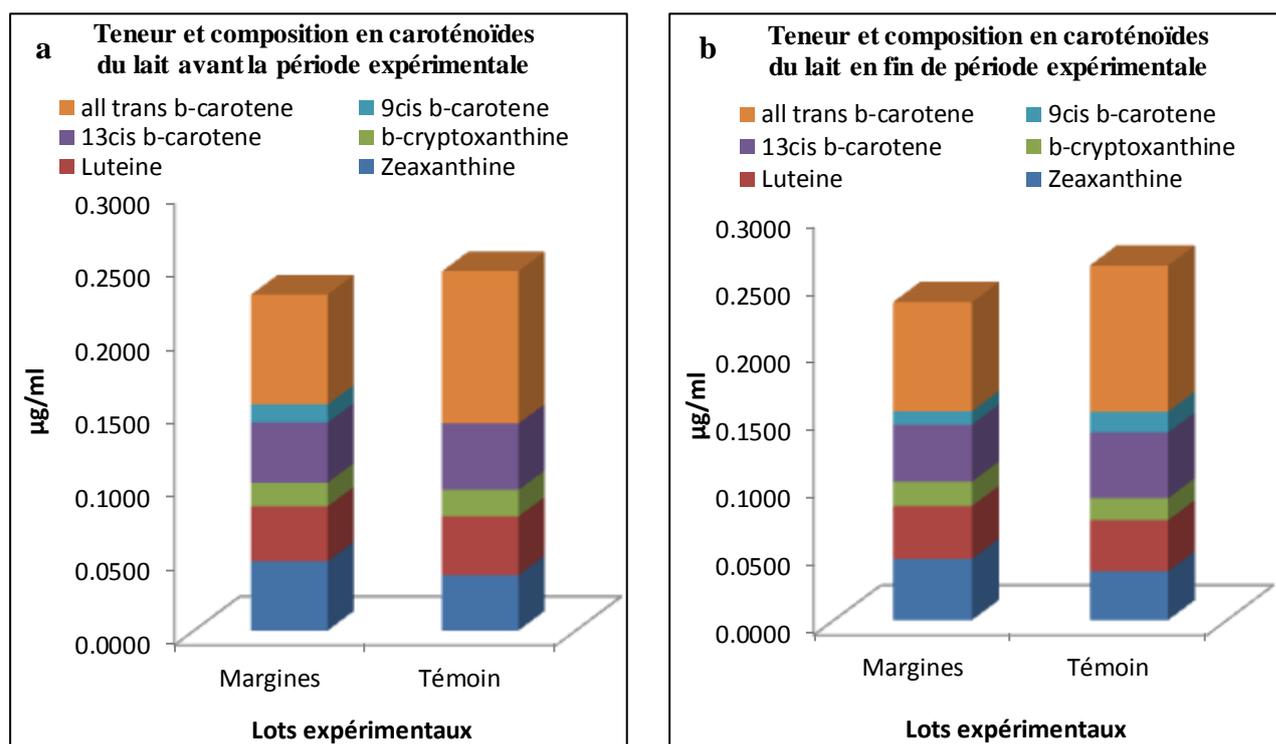
Il est à noter, par ailleurs, que les TB enregistrés dans notre étude (26,5 et 25,3 g/l de lait, respectivement pour le lot margine et le lot témoin) étaient faibles par rapport aux normes européennes (35-45 g/l) (Piccard et *al.*, 2006) et aux valeurs enregistrées par Matallah et *al.* (2015) chez 125 vache Holstein de la wilaya d'El-Tarf. Chez ces dernières, les TB étaient de  $33,2 \pm 0,8$  g/l de lait. Bouselmi et *al.* (2010) rapportent une moyenne de TB de 34,5 g/l des laits de la Tunisie. Les TP étaient d'environ 32 g/l (moyenne entre les deux lots). Ces taux sont semblables avec ceux enregistrés par plusieurs auteurs (Agabriel et *al.*, 1990 ; Bouselmi et *al.*, 2010 ; Matallah et *al.*, 2015).

En effet, plusieurs facteurs interagissent et déterminent la composition du lait. Ces facteurs sont liés à l'animal (facteur génétique, stade physiologique, état sanitaire,...) et au milieu (alimentation, saison et traite). Il a été rapporté par plusieurs auteurs qu'une alimentation hivernale riche en concentré a pour effet de diminuer les TB (Hoden et *al.*, 1985 ; Journet et Chilliard, 1985; Sutton, 1989 ; Coulon et Rémond, 1991). Cette chute n'est significative qu'avec des proportions très élevées d'aliments concentrés (entre 40 et 60% de la matière sèche de la ration (Coulon et *al.* 1989). Simultanément, les TP sont généralement améliorées, en raison le plus souvent de l'augmentation du niveau énergétique de la ration. Par ailleurs, une alimentation riche en protéine brutes (17% ou plus) peut entraîner des laits contenant des quantités importantes d'urée. Le mode de présentation physique des aliments joue aussi un rôle. Il a été montré qu'il y a une corrélation positive entre l'indice de fibrosité d'une ration (temps de mastication et de rumination) et les TB. Si la ration manque de structure la vache la mâchera peu, ce qui diminuera le temps de rumination et la production de la salive, substance riche en tampon. Pour l'effet de la race, il a été démontré que le lait des Montbéliardes est plus riche que celui des Prim'Holstein (Coulon et Binet, 1987 ; Coulon et Lilas, 1988 et Froc et *al.*, 1988).

Le nombre de cellules était de 287500 et 239500, respectivement pour le lot margine et le lot témoin, sans montrer de différence significative pour  $p < 0,05$ . Nos valeurs sont proches des normes européennes ( $< 300.000$  cell/l) et témoignent de l'état général de santé de nos vaches et de leurs mamelles. Les mammites ont plusieurs conséquences sur les performances de production des animaux (Bartlett et al 1991, Lescourret et Coulon, 1994), la qualité du lait (Munro et al., 1984 et Barbano et al., 1991) et le revenu de l'éleveur (Beck et al., 1992). La numération cellulaire semble en particulier varier au cours de la lactation (Sheldrake et al., 1983 ; Schutz et al., 1990 et Auldish et al., 1995), et augmenter avec l'âge (Kennedy et al., 1982 et Schultz et al., 1990), même chez des vaches indemnes de mammites (Serieys, 1985 ; Harmon, 1994). Elle augmente aussi parfois en situation de stress (Wegner et al., 1976) ou d'effort physique.

### **3. Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en caroténoïdes, vitamine A et E du lait.**

Six caroténoïdes seulement ont été identifiés et quantifiés dans la matière grasse du lait. Les composés étaient présents dans les margines, cependant leurs proportions respectives variaient d'une matrice à l'autre. Alors que les xanthophylles étaient majoritaires dans les margines (60% des caroténoïdes totaux), la situation a été inversée pour le lait. En effet, dans le lait, le  $\beta$ -carotène (dont on retrouve les formes tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*) était majoritaire (environ 60 % des caroténoïdes totaux ; figure 27). Le tout-*trans* constituait à lui seul environ 40% des caroténoïdes totaux, 18 et 3%, respectivement pour les isomères 13-*cis* et 9-*cis*  $\beta$ -carotène. Les seuls xanthophylles présents étant la zéaxanthine, la lutéine et la  $\beta$ -cryptoxanthine, avec respectivement 18, 16 et 7% des caroténoïdes totaux. Ces résultats concordent avec ceux de Graulet et al., (2012), dont les pourcentages des six et seuls caroténoïdes isolés et quantifiés des laits de vaches alimentées au pâturage étaient très proches des nôtres.

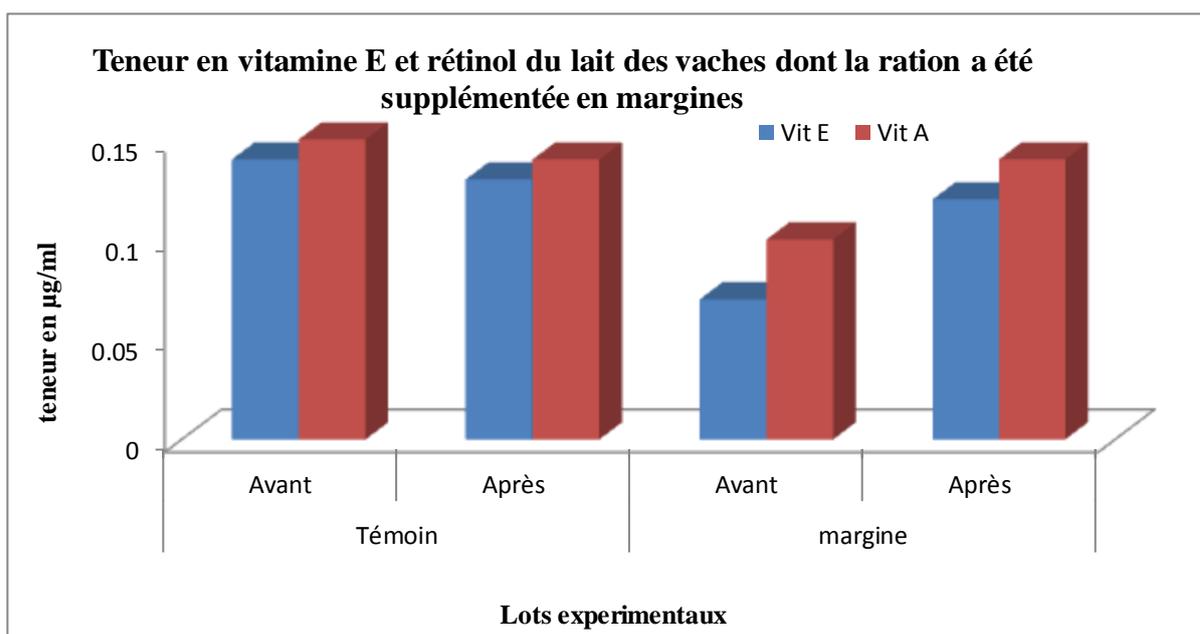


**Figure 27:** Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en caroténoïdes du lait. a, avant la supplémentation ; b, après la supplémentation

Les concentrations des vitamines A et E du lait des vaches du lot témoin étaient sensiblement semblables durant la période de l'essai, alors que pour les vaches du lot margines, les teneurs en ces deux vitamines ont été légèrement améliorées suite à l'apport en margines dans la ration de base des vaches. Par ailleurs ces différences restent statistiquement non significatives pour  $p < 0,05$  (figure 28).

Notre dispositif n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives dans la composition des micro-constituants vitaminiques (caroténoïdes, vitamine A et E) du lait, suite à l'incorporation des margines dans la ration des vaches en production. Ainsi, aucune différence n'a été observée entre les laits des vaches supplémentées ou non en margines. Ce résultat peut être expliqué par la faible valeur nutritionnelle des margines en générale et les margines utilisées dans la présente étude par rapport au fourrages, car les concentrations en vitamines liposolubles A, E et en  $\beta$ -carotène dans le lait sont principalement liées aux quantités consommées par les vaches. En effet, dans des conditions expérimentales, une relation a été observée entre les apports de  $\beta$ -carotène et de vitamine E alimentaires, leurs concentrations dans le plasma et leur sécrétion dans la matière grasse du lait (MGL) (Calderón et al., 2007). Ces auteurs ont observé

une relation linéaire entre l'apport alimentaire et les concentrations plasmatiques de  $\beta$ -carotène et de vitamine E. Cependant, au niveau du lait, la linéarité de la relation n'a été observée que pour la vitamine E, les concentrations du lait en  $\beta$ -carotène atteignant un plateau autour de 5  $\mu\text{g/g}$  MG suggérant une saturation dans le transfert du plasma au lait. Ces résultats expérimentaux sont en accord avec la littérature résumée par Nozière *et al.* (2006b) montrant une relation linéaire entre le  $\beta$ -carotène alimentaire lorsque le régime apporte entre 0 et 60 mg/kg MS et sa concentration dans le lait (entre 1,5 et 5,5  $\mu\text{g/g}$  MG).



**Figure 28** : Effet de la supplémentation en margines sur la teneur en vitamines A et E du lait.

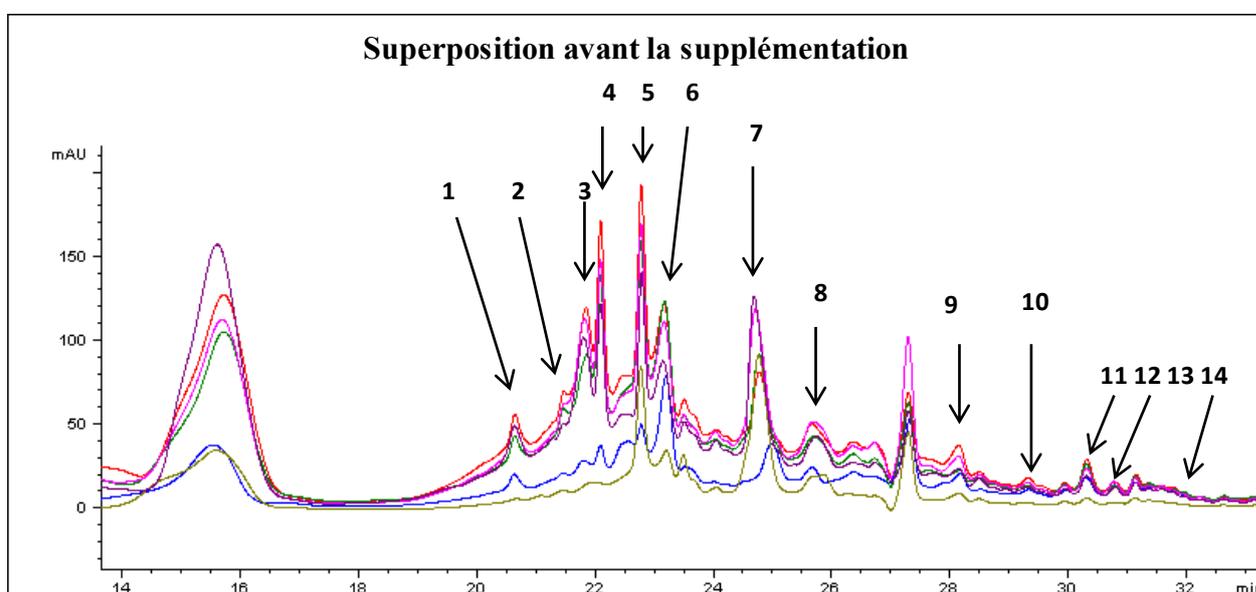
#### 4. Effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la composition en composés phénoliques du lait.

##### 4.1. Composés phénoliques du lait

Un total de 53 pics différents présentant un spectre de composés phénoliques a été séparé dans les différents échantillons de lait. Certains d'entre eux représentent des composés co-élus. Du nombre total de pics, 14 étaient séparés et identifiés pour les deux régimes. Rappelons que notre objectif de départ était de chercher des composés phénoliques spécifiques des olives, en l'occurrence le tyrosol et l'hydroxytyrosol, à fort pouvoir antioxydant, suite à un apport en margines dans la ration des vaches à 50% (P/V) du foin de vesce-avoine. Les principaux

omposés phénoliques retenus dans notre étude sont présentés en figure 29. On distingue, en grande majorité des phénols simples ou acides phénoliques (ac. 4-OHbenzoïque, ac. benzoïque), quelques flavones (lutéoline et apigénine) et flavanes (epigalocatéchine).

Nos résultats se rapprochent de ceux de Besle et *al.* (2004 ; 2010) qui ont isolé 15 composés aromatiques dans le lait de vaches avec 5 composés importants. Certains composés sont essentiellement des phénols simples (phénol, crésol, éthylphénol, propylphénol), des diphénols (dérivés du catéchol) et des composés en C6-C2 (acide phénylacétique ou acétovanillone). Ces composés proviendraient essentiellement de phénomènes de détoxication ou de la dégradation des phénols pariétaux. D'autres composés paraissent spécifiques d'un fourrage ou d'un régime (régimes contenant du *ray-grass*). Ces composés spécifiques sont toutefois en faible quantité, souvent à l'état de traces.

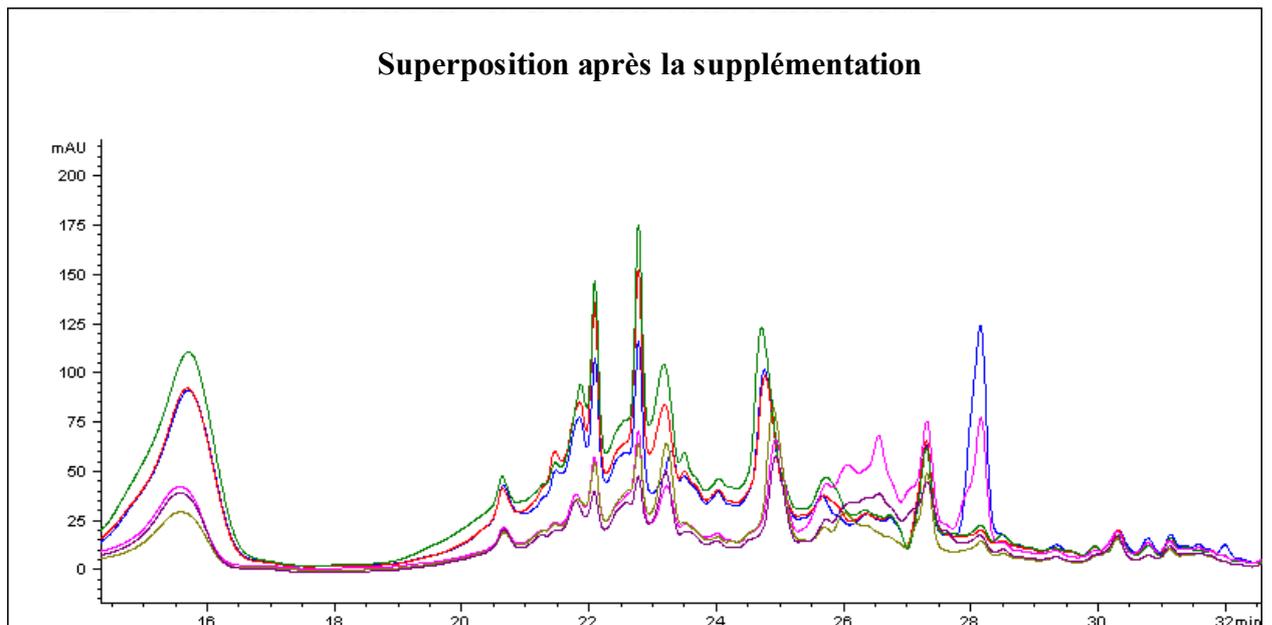


**Figure 29 :** Composés phénoliques identifiés dans le lait de vache avant la supplémentation

en margines. 1. Ac. 2,6-diOH-quinoline ; 2. Ac. 2,4-diOHbenzoïque ; 3. Ac. 4-OHbenzoïque ; 4. Riboflavine ; 5. Riboflavine 5'P ; 6. Ac. hippurique ; 7. Ac. 2-hydroxyquinoline ; 8. Ac. 2,3,6-timethoxybenzoïque ; 9. Ac. benzoïque ; 10. Epigalocatechine ; 11. Ac. quinolinique ; 12. Ac. cinnamique ; 13. Apigénine ; 14. Lutéoline.

Les profils chromatographiques des composés phénoliques des laits de vaches pour les deux régimes, supplémenté ou non en margines (figures 29 et 30) mettent en évidence des réponses et des comportements différentes des vaches de chaque lot quant à l'accumulation et la concentration des composés phénoliques des laits individuels. Un certain nombre de facteurs liés à l'animal affecte les concentrations en composés phénoliques. La variabilité des animaux

pouvait être due à une efficacité de transfert déterminée génétiquement des composés choisis dans le tractus digestif pour le lait (au niveau de l'absorption intestinale, la transformation cellulaire ou la bioactivation, l'absorption de plasma ou la sécrétion de la glande mammaire ; Graulet, 2014). Cette variabilité pourrait aussi être expliquée par des facteurs liés à la performance des animaux tels que les différents niveaux d'utilisation métabolique des vitamines ou encore par un effet de dilution/concentration dans le lait.



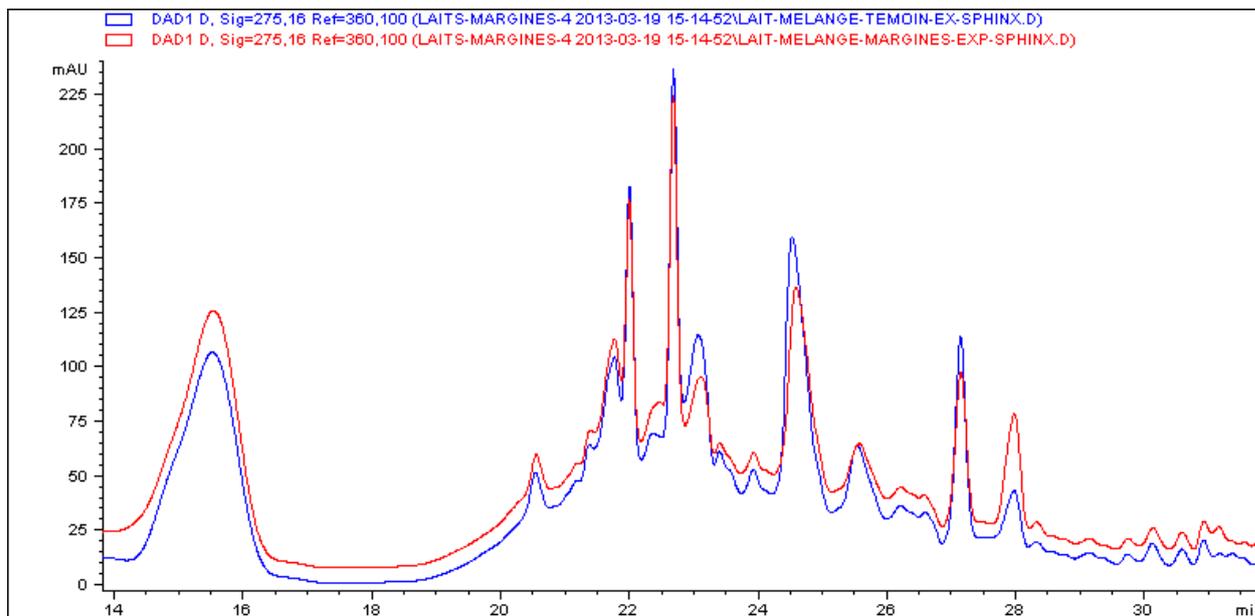
**Figure 30 :** Chromatogramme des composés phénoliques du lait de vache après la supplémentation en margine.

#### **4.2. Composés phénoliques du lait de vaches supplémentées en margine**

La concentration en composés phénoliques des margines est très variable, mais elle est en moyenne de 5 à 7 g/l. A 50% (P/V) de foin de vesce-avoine, notre apport journalier était de 42 g de composés phénoliques/vache/jour. La teneur en tyrosol et hydroxytyrosol, respectivement est de 0,3 et 0,5 g/l. Avec les fermentations ruminales et les taux faibles de transferts des composés phénoliques à la glande mammaire, il est très peu probable que les composés phénoliques des margines participent au pool des composés phénoliques du lait.

La variabilité de la teneur et de la composition en composés phénoliques des laits individuels entre les vaches des deux lots expérimentaux (témoins et margines) ne nous a pas permis d'examiner en clair l'effet de la supplémentation en margines sur la teneur et la

composition en composés phénoliques du lait. Nous avons donc mélangé les laits du lot témoin d'une part et les laits du lot margines d'autre part. Les résultats sont illustrés en figure 31. Les profils des deux chromatogrammes sont presque identiques, ce qui nous permet de déduire que la supplémentation en margine, dans notre étude, n'avait pas d'effet sur la teneur et la composition en composés phénoliques du lait.



**Figure 31 :** Superposition des chromatogrammes des laits de mélange, en rouge mélange des laits de vaches du lot margine ; en bleu mélange des laits de vaches témoins.

# Conclusion générale et perspectives

## Conclusion générale et perspectives

---

L'objectif de cette étude était de tenter de trouver une voie de valorisation, utile et non coûteuse, des margines d'huile d'olive. La menace environnementale de cet effluent liquide constitue un enjeu majeur pour les pays producteurs du bassin méditerranéen, entre autre l'Algérie. Dans ce contexte, leur usage dans l'alimentation des ruminants s'avère très prometteur, même si aucune amélioration de la production laitière n'a été apportée d'un point de vue qualitatif et quantitatif, les vaches en production ont très bien accepté la supplémentation en margine, dans leur ration alimentaire de base, jusqu'à 50 % de matière sèche (MS). Ainsi, la stratégie proposée a consisté à distribuer les margines aux vaches laitières en production. Cette valorisation à grande échelle a nécessité une étape préalable de caractérisation de la variabilité de composition chimique et de micro-constituants des margines et l'étude de leur métabolisation par le microbiote du rumen dans les conditions *in vitro*.

Les résultats de la caractérisation chimique des margines ont montré que, contrairement au pH, la matière sèche et la matière organique, les teneurs en matières minérales étaient significativement différentes selon le procédé d'extraction ( $P = 0,001$ ), la variété d'olive ( $P = 0,022$ ) et leur interaction ( $P = 0,024$ ). En effet, les margines de la variété *Sigoise* issues du système de presse ont montré une teneur en matière minérale supérieure de 3 fois environ par rapport à celles de la variété *Azerradj* issues du procédé de centrifugation à 3-phases. Ces variations enregistrées pourraient résulter des différences entre les variétés d'olives puisque la conservation des olives utilisées dans notre étude était faite en dehors de tout ajout de sel.

Notre travail présente la première étude qualitative et quantitative de la composition en caroténoïdes et en tocophérols des margines monovariétales. Pour ces deux groupes de composés, l'analyse a révélé un profil commun entre tous les échantillons quels que soient la variété ou le processus. La composition en caroténoïdes a révélé la présence de 3 xanthophylles (lutéine, zéaxanthine et  $\beta$ -cryptoxanthine) et 3 carotènes (*9-cis*, *13-cis* et tout-tans- $\beta$ -carotènes). Les composés majoritaires étaient la lutéine (50 %), le  $\beta$ -carotène (32 %, dont 2 tiers de tout-tans- $\beta$ -carotène) et la zéaxanthine (11 % environ). La somme des caroténoïdes était significativement différente selon le processus et la variété. En effet, les teneurs étaient de 2,22 fois plus élevées avec 3-phases qu'avec la presse et 4 fois plus élevées chez les margines de la variété *Azerradj* issues par le procédé continu que les margines des variétés *Sigoise* ou *Chemlal* issues de la presse. Ceci peut être dû probablement à une meilleure rupture des différents tissus qui constituent le fruit de l'olivier et de la température élevée de la pâte d'olive au moment du malaxage qui pourrait induire l'inactivation des enzymes responsables de la dégradation des pigments au cours du processus. Les deux tocophérols qui ont été détectés et quantifiés sont :  $\alpha$ -

et  $\gamma$ -tocophérol. Les concentrations de ces deux composés étaient comparables pour les deux paramètres de variation en question, le procédé et la variété.

Parmi les 15 composés phénoliques identifiés dans le présent travail, ont été quantifiés 12. Le composé phénolique majoritaire était le tyrosol et dans quelques cas l'oleuropéine. Les teneurs en composés phénoliques étaient différentes en fonction de la variété et/ou du procédé. En effet, les concentrations (par rapport à la matière sèche des margines) des acides caféique, 4-hydroxyphénylacétique et 3,4-dihydroxyphénylacétique étaient significativement différentes et une tendance a été observée pour l'acide vanillique et la lutéoline -7-O-glucoside. Pour ces cinq composés, les plus élevées sont observées pour la variété *Sigoise*. En ce qui concerne l'effet du process, les différences sont rares à partir du moment où elles concernent principalement la concentration de l'acide chlorogénique qui a été augmenté (4 fois) avec le procédé continu en particulier pour la variété *Sigoise*, alors qu'elle a diminué pour *Azerradj*. En revanche, la concentration de l'oleuropeine qui a été seulement de 30,6  $\mu\text{g/g}$  de MS avec le processus de la presse a atteint 995,3  $\mu\text{g/g}$  de MS pour le procédé de centrifugation à 3-phases, mais en raison de la forte variabilité, la différence a atteint seulement la tendance de signification. A l'inverse, le système de presse donnerait des concentrations plus élevées d'acide caféique que le système de centrifugation à 3-phases.

Les résultats présentés semblent indiquer, malgré le nombre limité de cultivars examinés, que la composition en micro-constituants (composés phénolique, caroténoïdes et vitamine E) peut représenter une contribution utile à la caractérisation chimique des margines monovariétales. En outre, les margines de certains cultivars d'olives pourraient être une source prometteuse de composés bioactifs, tels que le tyrosol et l'oleuropeine à fort pouvoir antioxydant. Néanmoins, les différences dans la composition des différents composés chimiques et vitaminique des margines liées au présent travail et aux données de la littérature suggèrent que d'autres études, à plus grande échelle, seraient nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension des principaux facteurs de variation de la composition chimique des margines.

La biodégradation anaérobie *in vitro* des margines révèle leur utilisation importante par le microbiote du rumen. Comparativement au foin de vesce-avoine, les margines produisent une faible quantité de gaz, en plus, leur fermentation *in vitro* génère un faible volume de méthane. Ceci leur permet d'améliorer l'efficacité de la flore microbienne ruminale dans la production de la biomasse et l'inhibition de la production du méthane, source majeure de perte d'énergie pour l'animal. Ce résultat nous permet de recommander leur utilisation comme additif alimentaire dans la ration des ruminants.

## Conclusion générale et perspectives

---

L'essai, *in vivo*, de distribution des margines dans la ration des vaches laitières nous a permis de définir les conditions de présentation des margines aux animaux (forme, adaptation, niveau d'apport) et leur acceptabilité pour cet ingrédient. Nos résultats ont montré que le niveau de production quantitatif (production laitière) et la composition fine du lait (vitamine A, E et composés phénoliques) ne semble pas être impactées significativement. L'absence d'écarts significatifs entre lots d'animaux est due au fait que les margines qui ont été distribuées aux vaches n'étaient pas particulièrement riches en micro-constituants, comparativement aux fourrages.

En perspectives, il serait intéressant d'explorer les voies de recherches suivantes :

- En ce qui concerne la teneur en matière minérale des margines et leur richesse en sucre totaux, nous suggérons leur utilisation comme supplément minéral ou énergétique avec d'autres matrices fourragères en blocs multi-nutritionnels.

- Valorisation, après extraction et purification, les composés phénoliques des margines dans la récupération d'énergie perdue par méthanisation, et prévoir un procédé biotechnologique pour le conditionnement de ces substances bioactives afin de les introduire en alimentation animale.

- Etudier les voies de bioconversion, par le microbiote ruminal des composés phénoliques majoritaires des margines (tyrosol, hydroxytyrosol et oleuropéine), à fort potentiel antiradicalaire, ant-inflammatoire,... pour élucider leur devenir dans les produits terminaux (viande et lait).

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

1. Abichou M., Gargouri K., Rhouma A. & Khatteli H. (2013). Long term effect of Olive Mill Waste Water spreading on microbial population and the natural floristic composition of a sandy soil. *Agricultural Science, Engineering and Technology Research*, 1(2), 16 -25.
2. Achak M., Hafidi A., Ouazzani N., Sayadi S., Mandi L. (2009a). Low cost biosorbent "banana peel" for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 117–125
3. Achak M., Mandi L. & Ouazzani N. (2009b). Removal of organic pollutants and nutrients from olive mill wastewater by a sand filter. *Journal of Environmental Management*, 90, 2771-2779.
4. Adhoum N. & Monser L. (2004). Decolourization and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation. *Chem. Eng. Proc.*, 43, 1281-1287.
5. Aerts R.J., Barry T.N. & McNabb W.C. (1999). Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75, 1–12.
6. Agabriel G., Coulon J-B., Marty G. & Cheneau N. (1990). Facteurs de variations du taux protéique du lait de vache: étude des exploitations du Puy-de-Dôme. *Production Animale*, 3(3), 137-150.
7. Aguilera M.P., Beltran G., Ortega D., Fernandez A., Jimenez A. & Uceda M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry* 89, 387-391.
8. Ait Baddi G., Hafidi M., Cegarra J., Alburquerque J.A., Gonzalez J., Gilard V. & Revel J.C. (2004). Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and <sup>13</sup>C-NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. *Bioresource Technology*. 93: 285-290.
9. Akdemir E.O., Ozer A. (2008). Application of a statistical technique for olive oil mill wastewater treatment using ultrafiltration process. *Sep Purif Technol*, 62(1), 222-227.
10. Akin D.E., Rigsby L.L., Theodorou M.K. & Hartley R.D. (1988). Population changes of fibrolytic rumen bacteria in the presence of phenolic acids and plant extracts. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 19, 261–275.
11. Al-Azzawie H.F., Saiel M. & Alhamdani S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 78, 1371-1377.
12. Alburquerque J.A., Gonzalez J., Garcia D., Cegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91, 195–200
13. Alderson N.E., Mitchell G.E., Little C.O., Warner R.E. and Tucker R.E. (1971). Preintestinal disappearance of vitamin E in ruminants. *J. Nutr.* 101: 655-659.
14. Allouche N., Ines Fki I. & Sayadi S. (2004). Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 267-273.

## Références bibliographiques

---

15. Alloum D. (1987). L'oléiculture Algérienne. *Options méditerranéennes – N° 24*, 45-48.
16. Amiot M.J., Fleuriet A. & Macheix J.J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69.
17. Andersen J.B., Sehested J. & Invartsen K.L. (1999). Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 49,149-155.
18. Aouidi F., Gannoun H., Othman N.B., Ayed L. & Hamdi M. (2009). Improvement of fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus paracasei* by cheese whey's addition, *Process Biochem*, 44(5), 597-601.
19. Aregheore E.M. (2000). The *in vitro* estimation of energy value and organic matter digestibility of some tropical crop residues and browses used in intensive ruminant livestock production in the dry season. *Scientia Agric. Bohem.* 31(1):65-75.
20. Arhab R. (2007). Etude de la fermentescibilité in vitro et de la digestibilité in vivo de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat. *Université Mentouri de Constantine*, 151p.
21. Arhab R., Macheboeuf D., Aggoun M., Bousseboua H., Viala D. & Besle J-M. (2009). Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and digestibility of tannin containing feedstuffs from North African arid zone. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 475-486.
22. Asfi M., Ouzounidou G., Panajiotidis S., Therios I. & Moustakas M. (2012). Toxicity effects of olive-millwastewater on growth, photosynthesis and pollen morphology of spinach plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 69–75.
23. Assas N., Ayed L., Bouallagui H., Sayadi S., Hamdi M. (2009). Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int Biodeterior Biodegrad*, 63, 407–13.
24. Atanassova D., Kefalas P., Petrakis Ch., Mantzavinos D., Kalogerakis N. & Psillakis E. (2005). Sonochemical reduction of the antioxidant activity of olive mill wastewater. *Env Int*, 31(2), 281–287.
25. Auldism M.J., Coats S., Rogers G.L. & McDowell G.H. (1995). Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Austr. J. Exp. Agr.*, 35, 427-436.
26. Aviani I., Laor Y., Medina Sh., Krassnovsky A. & Raviv M. (2010). Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. *Bioresource Technology* 101, 6699-6706.
27. Ayoola G.A., Coker H.A.B., Adesegun S.A., Adepoju-Bello A.A., Obaweya K., Ezennia E.C. & Atangbayila T.O. (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3), 1019-1024

## Références bibliographiques

---

28. Baldi A. (2005). Vitamin E in dairy cows. *Livestock Prod Sci*, 98, 117-122.
29. Ballet N., Robert J.C. & Williams P.E.V. (2000). Vitamins in forages. In: Givens, D.J., Owens, E.J., Omed, H.M. (Eds.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CABI publishing, New York, pp. 399-431.
30. Ballus C.A., Meinhart A.D., de Souza Campos Jr., de Oliveira da Silva, L.F., de Oliveira, A.F. & Godoy, H.T. (2014). A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Research International*, 62, 74-83
31. Barbano D.M., Rasmussen R.R. & Lynch J.M. (1991). Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, 74, 369-388.
32. Bartlett P.C., Van Wijk J., Wilson D.J., Green C.D., Miller G.Y., Majewski G.A. & Heider L.E. (1991). Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. *J. Dairy Sci.*, 74, 1561-1572.
33. Baruah K.K. (1997). Effect of supplementation of decaffeinated tea waste on the yield and composition of milk in lactating crossbred cows. *Indian Veterinary Journal*, 74, 480-482.
34. Bauchop T. & Mountfort D.O., (1981). Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. *Appl. Env. Microbiol.* 42, 1103-1110.
35. Bauernfeind J.C. (1980) Tocopherols in foods. In: Machlin, L.J. (ed.) *Vitamin E: A Comprehensive Treatise*. M. Dekker, New York and Basel, pp. 99-167.
36. Beck H.S., Wise W.S. & Dodd F.H. (1992). Cost-benefit analysis of bovine mastitis in the cows milk. *UK. J. Dairy Res.*, 59, 449-457.
37. Belaid C., Kallel M., Khadhraou M., Lalleve G., Elleuch B. & Fauvarque J-F. (2006). Electrochemical treatment of olive mill wastewaters: Removal of phenolic compounds and decolourization. *Journal of Applied Electrochemistry*, 36, 1175-1182
38. Belaqziz M., Lakhel E.K., Mbouobda H.D. & El Hadrami I. (2008). Land spreading of olive mill wastewater : effect on maize (*Zea mays*) crop. *Journal of Agronomy*, 7(4), 297-305.
39. Beltran G., Aguilera, M.P., Del Rio, C., Sanchez, S. & Martinez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry* 89, 207-215.
40. Beltran G., Jimenez A., del Rio C., Sanchez S. & Martinez L., Uceda M. & Aguilera M.P. (2010). Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 633-639.
41. Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Garcia-Araya J., Dominguez- Vargas J. R. & Tierno J. C. (2001). Degradation of olive mill wastewater by the combination of Fenton's reagent and ozonation with an aerobic biological treatment. *Wat SciTech*, 44(5), 103-108.

42. Ben Othman N., Roblain D., Chammen N., Thonart P. & Hamdi M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chetoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662–669.
43. Ben Sassi A., Boularbah A., Jaouad 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.
44. Benavente-Garcia O. & Castillo J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205.
45. Benito M., Lasa J.M., Gracia P., Oria R., Abenoza M. & Varona L. (2013). Olive oil and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)- A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291-3340.
46. Benrachou N. (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, Algérie*. 112p.
47. Benyahia N. & Zein K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II, pp 2-7.
48. Bernstein P.S., Li B., Vachali P.P., Gorusupudi A., Shyam R., Henriksen B.S. and Nolan J.M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoids-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 50, 34-66.
49. Bertin L., Ferri F., Scoma A., Marchetti L., Fava F. (2011). Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction, *Chemical Engineering Journal*, 171, 1287-1293.
50. Bertin L., Lampis S., Todaro D., Scoma A., Vallini G., Marchetti L., Majone M. & Fava F. (2010). Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water Research* 44, 4537-4549.
51. Besle J.M., Cornu A. & Jouany J. P. (1994a). Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *J. Sci. Food Agric.* 64, 171–190.
52. Besle J.M., Jouany J.P. & Cornu A. (1995). Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:33–52.
53. Besle J.M., Lamaison J.L., Pradel P., Fraisse D., Viala D. & Martin B. (2004). Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc. Rech. Ruminants*, 2004, 11.
54. Besle J.M., Viala D., Martin B., Pradel P., Meunier B., Berdagué J.L., Fraisse D., Lamaison J.L. & Coulon J.B. (2010). Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J. Dairy Sci.* 93, 2846-2856.

## Références bibliographiques

---

55. Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R. & Margherita P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *J. Sep. Sci.*, 26, 409–416.
56. 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 Pharmacy and Pharmacology*, 51, 971–974.
57. Blauwiel R., Xu S., Harrison J. H., Loney K. A., Riley R.E. & Calhoun M.C. (1997). Effect of whole cottonseed, gossypol and ruminally protected lysine supplementation on milkyield and composition. *Journal of Dairy Science*, 80, 1358–1365.
58. Blika P.S., Stamatelatos K., Kornaros M., Lyberatos G. (2009). Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global NEST J*, 11(3), 364–72.
59. Blümmel M., Aiple K.P., Steingass H. & Becker K. (1999). A note on the stoichiometrical and voluntary intake of hay fed to sheep: Comparison between using fibre components, in animals, 7(3), 207-225.
60. Bodini S.F., Cicalini A.R. & Santori F. (2011). Rhizosphere dynamics during phytoremediation of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 102, 4383–4389.
61. Bonet M.L., Canas J.A., Ribot J., Palou A. (2015). Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 112-125.
62. Borel P., Drai J., Faure H., Fayol V., Galabert C., Laromiguiere M. & Le Moel G. (2005). Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann. Biol. Clin.* 63(2), 165-177.
63. Borja R., Alba J. & Banks Ch. (1996). Anaerobic digestion of wash waters derived from purification of virgin olive oil using a hybrid reactor combining a filter and a sludge blanket. *Proc. Biochem.*, 31(3), 219-224.
64. Boskou D. (1996) *In: Boskou D (ed.) History and characteristics of the olive tree. Olive oil: chemistry and technology. AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 1–11*
65. Boukhoubza F., Jail A., Korchi F., Loukili Idrissi L., Hannache H., Duarte J.C., Hassani L. & Nejmeddine A. (2009). Application of lime and calcium hypochlorite in the dephenolisation and discolouration of olive mill wastewater. *Journal of Environmental Management* 91, 124–132.
66. Bousselmi K., Djemali M., Bedhif S. & Ethamrouni A. (2010). Facteurs de variation des taux de matière grasse et protéique du lait de vache de race Holstein en Tunisie. *Rencontres, Recherche, Ruminants*.
67. Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A. & Wagner K-H. Vitamin E. (2000). *J Sci Food Agric* 80, 913-938.

## Références bibliographiques

---

68. Brot, N., Z. Smit, and H. Weissbach. 1965. Conversion of l-tyrosine to phenol by *Clostridium tetanomorphum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 112:1–6.
69. Brozzoli V., Crognale S., Sampedro I., Federici F., D'Annibale A. & Petruccioli M. (2009). (Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*, 100, 3395–3402.
70. Brugère H. (1983). Biochimie du rumen-Aspects physiologiques. *Bull.GTV.* 3, 5-22.
71. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation-Lavoisier, 3e édition, Paris, 421- 499
72. Bulvestre M-D. (2007). Influence du  $\beta$ -carotène sur les performances de reproduction chez la vache laitière. Thèse de doctorat vétérinaire. *École Nationale Veterinaire D'alfort, Faculté de Médecine De Créteil*, 124p.
73. Burri B.J., La Frano M.R. & Zhu C. 2016. Absorption, metabolism, and functions of  $\beta$ -cryptoxanthin. *Nutrition Reviews*, 74, 69-82.
74. Calderon F. (2007). Evolution des concentrations du plasma et du lait chez la vache laitière: Effets de l'alimentation et du stade de lactation. Thèse de doctorat, *Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (Rennes, FRA)*. Pp. 145.
75. Calderon F., Chauveau-Duriot B., Pradel P., Martin B., Graulet B., Doreau M. & Noziere P. (2007). Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk following a shift from hay diet to diets containing increasing levels of carotenoids and vitamin E. *J. Dairy Sci.* 90, 5651-5664.
76. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. & Ferret A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 90, 2580-2595
77. Capasso R. (1997). The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Tropical Phytochemistry, Resesrtsh Trends*, 1, 145-156.
78. Caponio F. & Catalano P. (2001). Hammer crushers versus disk crushers: the influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil. *European Food Research Technology*, 213, 219-224.
79. Caputo M.C., De Girolamo A.M. & Volpe A. (2013). Soil Amendment with Olive Mill Wastes: Impact on Ground Water. *Journal of Environmental Management*, 131, 216-221.
80. Cardinali A., Cicco N., Linsalata V., Minervini F., Pati S. & Pieralice M. (2010). Compounds in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46, 976-988.
81. Cardinault N., Doreau M., Nozière P. (2004). Devenir des caroténoïdes dans le rumen, *Renc. Rech. Ruminants* 11, 82.
82. Cardinault N., Doreau M., Poncet C. & Nozière P. (2006). Digestion and absorption of carotenoids in sheep given fresh red clover. *Anim. Sci.* 82:49–55.

## Références bibliographiques

---

83. Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G. & Lo Cascio B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50 (8), 959-66.
84. Cazzonelli C.I. & Pogson B.J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 266-274.
85. Cerrone F., Barghini P., Pesciaroli C. & Fenice M. (2011). Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 84, 254–259
86. Chaâri L., Elloumi N., Mseddi S., Gargouri K., Ben Rouina B., Mechichi T. & Kallel, M. (2015). Changes in Soil Macronutrients after a Long-Term Application of Olive Mill Wastewater. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 4, 1-13.
87. Chaney A.L. & Marbach E.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, 8, 130-132.
88. Chanforan C. (2010). Stabilité de micro-constituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de doctorat, université d'Avignon et des pays de Vaucluse académie d'Aix-Marseille. Pp388.
89. Chatzisyneon E., Dimou A., Mantzavinos D. & Katsaounis A. (2009). Electrochemical oxidation of model compounds and olive mill wastewater over DSA electrodes: 1. *The case of Ti/IrO<sub>2</sub> anode*, *J Hazard Mater*, 15, 167, 1-3
90. Chatzisyneon E., Foteinis S., Mantzavinos D. & Tsoutsos T. (2013). Life cycle assessment of advanced oxidation processes for olive mill wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, 54, 229-234.
91. Chauveau-Duriot B., Doreau M. Nozière P. & Graulet B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397,777-790.
92. Chauveau-Duriot B., Thomas D., Portelli J. and Doreau M. (2005). Carotenoids content in forages: Variation during conservation. *Renc. Rech. Rumin*, 12:117.
93. Chen H., Angiuli M., Ferrari C., Tombari E., Salvetti G. & Bramanti E. (2011). Tocopherol speciation as first screening for the assessment of extra virgin olive oil quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography/fluorescence detector. *Food Chemistry*, 125, 1423–1429
94. Cheng S.S., Liu J.Y., Chang E.H. & S.T. Chang (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99(11), 5145-5149.

## Références bibliographiques

---

95. Chesson A., C.S. Stewart & R. J. Wallace. (1982). Influence of plant phenolic acids in growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 597–603.
96. Chew B.P. (1993). Role of carotenoids in the immune response. *J Dairy Sci.* 76(9), 2804-11.
97. Chikunya S., Demirel G., Enser M., Wood J.D., Wilkinson R.G. & Sinclair L.A. (2004). Biohydrogenation of dietary n-3 PUFA and stability of ingested vitamin E in the rumen, and their effects on microbial activity in sheep. *Br. J. Nutr.* 91, 539-550.
98. Chillirad Y., Ferlay A. & Doreau M. (2001). Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras *trans*, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *Production animale*, 14, 323-335.
99. Choi S.W., Benzie I.F., Collins A.R., Hannigan B.M. & Strain J.J. (2004). Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defense and oxidative stress. *Mutat Res*, 551, 109–17.
100. Chouchene A. (2010). Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique. Thèse de doctorat. *Ecole Nationale d'ingénieurs de Monastir et de l'Université de Haute-Alsace*, 220 p.
101. Chouchene A., Jeguirim M., Favre-Reguillon A., Trouvé G., Le Buzit G., Khiari B. & Fethi Zagrouba. (2012). Energetic valorisation of olive mill wastewater impregnated on low cost absorbent: *Sawdust versus olive solid waste*. *Energy* 39, 74-81.
102. Christodoulou V., Bampidis V.A., Robinson P.H., Israilides C.J., Giouzelyiannis A. & Vlyssides A. (2007). Nutritional and net energy value of fermented olive wastes in rations of lactating ewes. *Czech J. Anim. Sci.*, 52(12), 456–462.
103. Clodoveo M.L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and Future. *Trends in Food Science & Technology* 25, 13-23.
104. Cohen Fernandez S., Budowski P., Ascarelli I., Neumark H & Bondi A. (1976). Pre-intestinal stability of beta-carotène in ruminants. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 46(4), 439-445.
105. Coleman G.S. (1975). The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In : Mc Donald W., Warner A.C.I. (Eds.). Digestion and metabolism in the ruminant. *The university of New England publ, Armidale, USA*, pp. 149-164.
106. Corona G., Tzounis X., Assunta Dessì M., Deiana M., Debnam E.S., Visioli F., Spencer J-P. (2006). The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic Res.*, 40(6), 647-58.
107. Cossu R., Blakey N. & Cannas P. (1993). Influence of co-disposal of municipal solid waste and olive vegetation water on the anaerobic digestion of a sanitary landfill. *Water Science Technology*, 27, 261-271.
108. Coulon J-B. & Binet M. (1987). Facteurs de variations du taux protéique du lait de vache en exploitation. Etude dans l'aire de ramassage de la coopérative fromagère de Laguiole (Aveyron). *Bull. Tech. CRZV Theix, INRA*, 68, 11-18.

## Références bibliographiques

---

109. Coulon J-B. & Lilas J.P. (1988). Composition chimique et contamination butyrique du lait : facteurs de variation dans le département de la Haute-Loire. *INRA Prod. Anim.*, 1, 201-207.
110. Coulon J-B. & Remond B. (1991). Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply in the dairy cow. *Livestock Production Science*. 29:31-47.
111. Coulon J-B., Faverdin P, Laurent F. & Cotto G. (1989). Influence de la nature de l'aliment concentré sur les performances des vaches laitières. *Institut National De La Recherche Agronomique-France (INRA) Productions Animales* 2:47-53.
112. Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
113. Cremin J.D., Mcleod K.R., Harmon D.L., Goetsch A.L., Bourquin L.D. & Fahey G.C. (1995). Portal and hepatic fluxes in sheep and concentrations in cattle ruminal fluid of 3-(4-hydroxyphenyl) propionic, benzoic, 3-phenylpropionic, and *trans*-cinnamic acids. *J. Anim. Sci.*, 73, 1766-1775.
114. Cushnie T.P.T. & Lamb A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
115. Cuttriss A.J., Cazzonelli C.I., Wurtzel E.T. & Pogson B.J. (2011). Carotenoids. *Advances in Botanical Research*, 58, 1-36.
116. Cuvelier C., Hornick J-L., Beckers Y., Froidmont E., Knapp E., Istasse L., Dufrasne I. (non daté). L'alimentation de la vache laitière. Physiologie et Besoins. *Livret de l'agriculture. Université de Liège et Centre Wallon de Recherches Agronomiques*. 67p.  
[http://www.fourragesmieux.be/Documents\\_telechargeables/Cuvelier\\_C\\_Hornick\\_J\\_L\\_Beckers\\_Y\\_Froidmont\\_E\\_Knapp\\_E\\_Istasse\\_L\\_&\\_Dufrasne\\_I\\_Livret\\_alimentation\\_des\\_VL\\_1\\_Besoins\\_et\\_physio.pdf](http://www.fourragesmieux.be/Documents_telechargeables/Cuvelier_C_Hornick_J_L_Beckers_Y_Froidmont_E_Knapp_E_Istasse_L_&_Dufrasne_I_Livret_alimentation_des_VL_1_Besoins_et_physio.pdf)
117. D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V. & Sermanni G.G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 77 265–273.
118. Daâssi D., Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Belbahri L., Woodward S., Zouari-Mechichi H., Mechichi T., Nasri M. & Segura-Carretero A. (2014). Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by *Coriopsis gallica*. *Chemosphere*, 113, 62–70.
119. Dağdelen A., Tümen G., Özcan M.M. & Dündar E. (2013). Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalık, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages. *Food Chemistry*, 136, 41-45.
120. Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
121. Danellakis D., Ntaikou I., Kornaros M. & Dailianis S. (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.*, 101, 358–66.

## Références bibliographiques

---

122. Davies L.C., Vilhena A.M., Novais J.M. & Dias S.M. (2004). Olive mill wastewater characteristics: modelling and statistical analysis. *Grasas y Aceites*, 55(3), 233-241.
123. Davison K.L. & Seo J. (1963). Influence of nitrate upon carotene destruction during *in vitro* fermentation with rumen liquor. *Journal of Dairy Science*, 46, 862-864.
124. Dawson R.M. & Hemington N. (1974). Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *Br. J. Nutr.* 32(2), 327-340
125. De Marco E., Savarese M., Paduano A. & Sacchi R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104, 858-867.
126. Debier C. & Larondelle Y. (2005). Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition*, 93, 153-174.
127. Debo A., Yangui T., Dhoub A., Ksantini M. & Sayadi S. (2011). Efficacy of a hydroxytyrosol-rich preparation from olive mill wastewater for control of olive psyllid, *Euphyllura olivina*, infestations. *Crop Protection* 30, 1529-1534.
128. Deeb A.A., Fayyad M.K. & Alawi M.A. (2012). Separation of Polyphenols from Jordanian olive oil millwastewater. *Chromatography Research International, Volume 2012, Article ID 812127, 8 p*
129. Dehority B.A & Tirabasso P.A. (2001). Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. *J.Anim.Sci.*79, 2908-2912.
130. Deiana M., Rosa A., Cao C.F., Pirisi F.M., Bandino G. & Dessi M.A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of atocopherol concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4342-4346.
131. Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F. & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532-1552.
132. Dewhurst R.J., Delaby L., Moloney A., Boland T. & Lewis E. (2009). Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48, 167-187.
133. Dhoub A., Aloui F., Hamad N. & Sayadi S. (2006). Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration. *Process Biochemistry*, 41, 159-167.
134. Di Bene C., Pellegrino E., Debolini M., Silvestri N. & Bonari E. (2013). Short- and Long-Term Effects of Olive Mill Wastewater Land Spreading on Soil Chemical and Biological Properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 56, 21-33.
135. Di Giovacchino L., Sestili S. & Di Vincenzo D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 587-601.

## Références bibliographiques

---

136. Dias Albino A., Bezerra M. & Nazare P.A. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill waste water. *Bioresource Technology*, 92, 7-13.
137. Dickinson J.M., Smith G.R., Randel R.D. & Pemberton I.J. (1988). In vitro metabolism of formononetin and biochanin. *In Bovine Rumen Fluid. J. Anim. Sci.*, 66, 1969-1973.
138. Doelman, C.J. *Antioxidant Therapy and Preventive Medicine*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1989; Volume 9.
139. Dominguez-Garcia M.C., Laib M., De La Rosa R. & Belaj A. (2012). Characterisation and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 87 (2) 95–100.
140. Dønnem I., Randby Å.T., Hektoen L., Avdem F., Meling S., Våge Å.Ø., Ådnøy T., Steinheim T. & Waagee S. (2015). Effect of vitamin E supplementation to ewes in late pregnancy on the rate of stillborn lambs. *Small Ruminant Research*, 125, 154-162.
141. Doreau M. & Ferlay A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45, 379–396.
142. Drouiche M., Le Mignot V., Lounici H., Belhocine D., Grib H., Pauss A. & Mameri N. (2004). A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining OF and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> techniques. *Desalination* 169(1), 81-88.
143. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Animal Chemistry*, 28: 350-356.
144. Dunn H.C. & Lindsay R.C. (1985). Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean type flavors of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 2859–2874.
145. During A. & Harrison E.H. (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids : insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys*. 430(1), 77-88.
146. El-Abbassi A., Hafidi A., García-Payo M.C. & Khayet M. (2009). Concentration of olive mill wastewater by membrane distillation for polyphenols recovery. *Desalination*, 245, 670-674.
147. El-Abbassi A., Hafidi A., Khayet M. & García-Payo M.C. (2012a). Integrated direct contact membrane distillation for olive mill wastewater treatment. *Desalination*, 323, 31-38.
148. El-Abbassi A., Khayet M. & Hafidi A. (2011). Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 45, 4522-4530.
149. El-Abbassi A., Kiai H. & Hafidi A. (2012b). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132, (1), 406-412.
150. El-Hajjouji H., Fakharedine N., Ait Baddi G., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C. & Hafidi, M., 2007. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet–visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 98, 3513-3520.

151. Elnabris K. J-A. (2014). Acute Toxicity of Olive Mill Wastewaters from the Gaza Strip to Four Marine Invertebrates. *IUG Journal of Natural and Engineering Studies*, 22 (1), 111-127
152. Erguder T.H., Guven E. & Demirer G.N. (2000). Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process. Biochem.*, 36, 243-248.
153. Eroglu E, Gunduz U, Yucel M, Turker L & Eroglu I. (2004). Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *Int J Hydrogen Energy*, 29(2), 163–71.
154. Eroglu E., Eroglu I., Gunduz U. & Yucel M. (2009). Treatment of olive mill wastewater by different physicochemical methods and the utilization of their liquid effluents for biological hydrogen production. *Biomass Bioenerg*, 334, 701–5.
155. Eroglu E., Gunduz U., Yucel M., Turker L. & Eroglu I. (2006). Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two stage processes. *Int J Hydrogen Energy*, 31(11), 1527–35.
156. Esmail A., Abed H., Firdaous M., Chahboun N., Mennane Z., Berny E-H, Ouhssine M. (2014). Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc (Ouzazane, Fès Boulman et Béni Mellal). *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (1), 121-126.
157. Esti M., Cinquanta L., & La Notte N. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 32-35.
158. Eugene M. (2002). Effets de la défaunation de ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude des variations de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. *Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique, Paris-Grignon, France*, 122p.
159. Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A. & Borja R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 37-41.
160. Fakharedine N., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Revel J.C. & Hafidi M. (2006). Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 41, 398-404.
161. Faraloni C., Ena A., Pintucci C. & Torzillo G. (2011). *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in pretreated olive mill wastewater. *Int J Hydrogen Energy*, 36, 5920–31.
162. Faure H., Fayol V. Galabert C. Grolier P. Le Moel G. Steghens J.P., Van Kappel A. & Nabet F. (1999). Les caroténoïdes : I. Métabolisme et physiologie. *Ann. Biol. Clin.* 57, 169-183.
163. Fedeli E. & Camurati F. (1981). In : Séminaire International sur la Valorisation des Sous-produits de l'olivier. *PNUDFAO. Monastir, Tunisie, Décembre 1981*, 111-113.
164. Feki M., Allouche N., Bouaziz M., Gargoubi A. & Sayadi S. (2006). Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 1021–1027.

## Références bibliographiques

---

165. Ferlay A., Graulet B. & Chilliard Y. (2013). Maîtrise par l'alimentation des teneurs en acides gras et en composés vitaminiques du lait de vache. *INRA Prod. Anim.*, 26(2), 177-192
166. Fezzani B. & Ben Cheikh R. (2010). Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresource Technol.*, 101, 1628-34.
167. Fiestas J.A. & Borja R. (1992). Use and treatment of olive mill waste-water: current situation and prospects in Spain. *Grasas Aceites* 43, 101-106.
168. Fki I., Allouche N. & Sayadi S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenol acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93, 197-204.
169. Focant M., Mignolet E., Marique M., Clabots F., Breyne T., Dalemans D., Larondelle Y., 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.*, 81, 1095-1101.
170. Fonty G. & Durand F. 2007. Les écosystèmes digestifs. (Eds), *Technique & Documentation, Paris*, 79-94.
171. Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G. & Lyberatos G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.
172. Froc J., Gilibert J., Daliphar T. & Durand P. (1988). Composition et qualité technologique des laits de vaches Normandes et Pie-noires. 1. Effet de la race. *INRA Prod. Anim.*, 1, 171-178.
173. Galanakis C.M., Tornberg E. & Gekas V. (2010). A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT- Food Sci Technol.*, 43, 1009-17.
174. Galanakis C.M., Tornberg E. & Gekas V. (2009). Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT- Food Sci Technol*, 1-8.
175. Gandul-Rojas B. & Minguez-Mosquera M.I. (1996). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 31-39.
176. García, J.M., Yousfi, K., Oliva J., García-Díaz, M.T. & Pérez-Camino, M.C. (2005). Hot water dipping of olives (*Olea europaea*) for virgin oil debittering. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 8248-8252.
177. 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, 3883-92.
178. Gasa J., Lopes Martins J.A. & Castrillo C. (1991). Utilisation des margines comme supplément des rourrages pour la brebis. *Options Méditerranéennes, -Série Séminaires-*, 16, 167-169.

179. Gatley S.J. & Sherratt H.S.A. (1977). Synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat-liver mitochondria-Submitochondrial localization and kinetics. *Biochem. J.*, 166, 39-47.
180. Gerasopoulos K., Stagos D., Kokkas S., Petrotos K., Kantas D., Goulas P., Kouretas D. (2015). Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology* 82, 42-49
181. Gernjak W., Maldonado M.I., Malato S., Caceres J., Krutzler T., Glaser A. & Bauer R. (2004). Pilot-plant treatment of olive mill wastewater (OMW) by solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis and solar photo-Fenton. *Solar Energy* 77(5), 567-572.
182. Getachew G., Makkar H.P.S. & Becker K. (2000). Tannins in tropical browse: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agri. and Food chemistry*. 148, 3581-3588.
183. 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(3), 3291-340
184. Giuffrida D., Salvo F., Salvo A., La Pera L. & Dugo G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101, 833-837.
185. Gonçalves C., Pereira C & Belo I. (2010). Comparison of batch and fed-batch lipase production from olivemill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. *J Biotechnol.*, 150S:S1-576. In *Special Abstracts*.
186. Gonçalves M.R., Marques I.P., Correia J.P. (2012). Electrochemical mineralization of anaerobically digested olive mill wastewater. *Pharmacological Research*, 61, 364-370
187. Graulet B., Chauveau-Duriot B., Noziere P., Doreau M. (2006). Teneur et composition en caroténoïdes des contenus digestifs et du plasma chez la vache au pâturage. *13e Rencontres Recherches Ruminants*, 13, 193.
188. Graulet B., Martin B., Agabriel C., & Girard C.L. (2014). Vitamins in milk. In Y.W. Park & G.F.W. Haenlein (eds.). Milk and dairy products in human nutrition: *Production, composition and health* p200-219.
189. Graulet B., Piquet M., Duriot B., Pradel P., Hulin S., Cornu A., Portelli J., Martin B., Farruggia A. (2012). Variations des teneurs en micronutriments de l'herbe de prairies de moyenne montagne et transfert au lait. *Fourrages*, 209, 59-68.
190. Grenet E. (1997). Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Productions Animales* 10 : 241-249.
191. Grolier P., Duszka C., Borel P., Alexander-Gouabau M.C. & Asais-Braesco V. (1997). In vitro and in vivo inhibition of beta-carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. *Arch Biochem Biophys.*, 348(2), 233-238.

192. Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Steve Woodward B. & Mechichi T. (2009). Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere*, 75, 1382-1386.
193. Hagerman A.E. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plants extracts. *Journal of Chemistry and Ecology*, 13: 437-449.
194. Hamden K., Alloucheb N., Damak M. & Elfeki M. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 180, 421-432.
195. Hamdi M. & Ellouz P. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environ. Technol.*, 14, 183-188.
196. Hamdi M. & Garcia J.L. (1991) Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill wastewaters. *Biores. Technol*, 38, 23-29.
197. Hamdi M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 37(2), 155-163.
198. Harborne, J.B. (1998). The Handbook of Natural Flavonoids. Wiley & Sons, New York, NY. Haslam E. Practical polyphenols: From structure to molecular recognition and physiological action. *Cambridge: University Press*.
199. Harmon R.J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 77, 2103-2112.
200. Harrison J.H., Hancock D.D. & Conrad H.R. (1984). Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 67, 123-132.
201. Haslam E. (1998). Practical polyphenols: From structure to molecular recognition and physiological action. *Cambridge: University Press*.
202. Hattenschwiler S. & Vitousek P.M., (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*. 15, 238-243.
203. Havaux M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J*. 79, 597-606.
204. Havaux M., Eymery F., Porfirova S., Rey P. & Dormann P. (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17(12), 3451-3469.
205. Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2003). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
206. Hervas G., Frutos P., Serrano E., Mantecon A.R. & Giraldez F.J. (2000). Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci., Camb.*, 135,305-310.

## Références bibliographiques

---

207. Hoden A., Coulon J.B. & Dulphy J-P. (1985). Influence de l'alimentation sur la composition du lait. Effets des régimes alimentaires sur les taux butyreux et protéiques. *Bulletin Technique. CRZV Theix, INRA*, 62, 69-79.
208. Höjer A., Adler S., Martinsson K., Jensen S.K., Steinshamn H., Thuen E., Gustavsson A-M. (2012). Effect of legume-grass silages and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on fatty acid composition and  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and retinol concentrations in organically produced bovine milk. *Livestock Sci.*, 148, 268–281.
209. Hoover W.H. (1986). Chemical factors involved in ruminal fibre digestion. *Journal of Dairy Science*, 69, 2755-2766.
210. Hymøller L. & Jensen S.K. (2010). Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin E in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci.*, 93(12), 5748-57.
211. Inarejos-García A.M., Fregapane G. & Salvador M.D. (2011). Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur Food Res Technol.*, 232, 441–451.
212. ITAF, non daté (date de consultation : janvier 2015).  
<http://www.algerie360.com/algerie/lexension-de-loleiculture-exige-une-organisation-interprofessionnelle/>
213. Jarrige R. (1978). Digestion. In: Alimentation des ruminants. *INRA Publications (Eds.), Versailles, France, pp : 23-45.*
214. Jayanegara A., Goel G., Makkar H.P.S. & Becker K. (2015). Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 60–68.
215. Jeguirim M., Chouchène A., Réguillon A.F., Trouvé G. & Le Buzit G. (2012). A new valorisation strategy of olive mill wastewater: Impregnation on sawdust and combustion. *Resources, Conservation and Recycling*, 59, 4-8.
216. Jiménez B., Sánchez-Ortiz A. & Rivas A. (2014). Influence of the malaxation time and olive ripening stage on oil quality and phenolic compounds of virgin olive oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (11), 2521-2527.
217. Jouany J.P. & Ushida K. (1998). The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 12, 113-128.
218. Jouany J.P. (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions Animales* 7(3) : 207-225.
219. Jouany J-P. & Reperant J-M. (2009). Proposition pour une démarche d'évaluation de substances ou de produits "nouveaux" destinés à l'alimentation animale. Cas particulier des substances et produits à base de plantes. *Agence Française de sécurité sanitaire des aliments.*
220. Journet M. & Chilliard Y. (1985). Influence de l'alimentation sur la composition du lait. *Bulletin Technique. C.R.Z. V.*, 60, 13-2.

## Références bibliographiques

---

221. Jukola E., Hakkarainen J., Saloniemi H. & Sankari S. (1996). Blood selenium, vitamin A and beta-carotene concentrations and under health, fertility treatments and fertility. *J Dairy Sci.*, 76(5), 838-845.
222. Kalaç P. & Samková E. (2010). The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12), 521-537.
223. Kalaç P. & Samková E. (2013). Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *Journal of Agrobiology*, 29(1), 1-13.
224. Kalač P. (2011). The effects of feeding fresh forage and silage on some nutritional attributes of beef: an overview. *J Agrobiol* 28(1), 1-13.
225. Kallel M., Belaid C., Boussahel R., Ksibi M., Montiel A., Elleuch B. (2009), Olive mill wastewater degradation by Fenton oxidation with zero-valent iron and hydrogen peroxide. *J Hazard Mater*, 163 (2-3), 550-554
226. Kalmis E. & Sargin S. (2004). Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53, 43-47.
227. Kamra D.N., Patra A.K., Chatterjee P.N., Kumar R., Agarwal N. & Chaudhary L.C. (2008). Effect of plant extract on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Aust. J. Exp. Agric.*, 48, 175-178.
228. Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P. & Crowther J.C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7, 1-26.
229. Karnati S.K., Yu Z., Sylvester J.T., Dehority B.A., Morrison M. & Firkins J.L. (2003). Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J Anim Sci.*, 81(3):812-5.
230. Katsoyannos E., Gortzi O., Chatzilazarou A., Athanasiadis V., Tsaknis J. & Lalas S. (2012). Evaluation of the suitability of low hazard surfactants for the separation of phenols and carotenoids from red-flesh orange juice and olive mill wastewater using cloud point extraction. *J. Sep. Sci.*, 35, 2665-2670
231. Kavvadias V., Doulaa M.K., Komnitsas K. & Liakopoulou N. (2010). Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182, 144-155
232. Kemmer H., Dehnhard M. & Claus R. (1997). Screening of indoles in cheese. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 205, 433-436.
233. Kennedy B.W., Sethar M.S., Tong A.K.W.W., Moxley J.E. & Downey B.R. (1982). Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 65, 275-280.
234. Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D. & Gambari R. (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, 67(2), 107-119.

235. Khazaal K.A., Dentinho M.T., Ribeiro J.M. & Orskov E.R. (1995). Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hay fed to sheep: Comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Animal Science*, 61, 527-538.
236. Khoufi S., Feki F. & Sami Sayadi Khoufi S. (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 142(1-2), 58-67.
237. King R.A., Mano M.M. & Head R.J. (1998). Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *Journal of Dairy Research* 65 479-489.
238. Kittelmann S., Naylor G.E., Koolaard J.P. & Janssen P.H. (2012). A Proposed Taxonomy of A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS One*. 7(5), e36866.
239. 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.
240. Korkina L., De Luca C. & Pastore S. (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259, 77-86.
241. Koutrotsios G. & Zervakis G.I. (2014). Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *Bio Med Research International*, Article ID 482937, 14 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/482937>
242. Laconi S., Molle G., Cabiddu A. & Pompei R. (2007). Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. *Biodegradation*, 18, 559-566.
243. Lafka T.I., Lazou A.E., Sinanoglou V.J. & Lazos E.S. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 125, 92-98.
244. Lakhtar H., Ismaili-Alaoui M.A., Perraud-Gaime I., Philippoussis A. & Roussos S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *Int Biodeterior Biodegrad*, 64, 167-72.
245. Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D. & Guerzoni M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater, *Bioresource Technol*, 96 (3), 317-322.
246. Le Grusse J. & Watier B. (1993). Les vitamines. *Ed. Masson, Paris*, 134 p.
247. Leeson S. & Summers J.D. (2001). *Scott's Nutrition of the Chicken*: Publisher: *University Books, Canada*; 4th edition, pp, 331-428.
248. Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.

## Références bibliographiques

---

249. Leouifoudi I., Ziad A., Amechrouq A., Oukerrou M.A., Ait Mouse H. & Mbarki M. (2014). Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Sci. Technol (Campinas)*, 34(2), 249-257.
250. Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.C., Lorquin J., Delattre M., Simon J.L., Asther M. & Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75, 501-507.
251. Lescourret F. & Coulon J-B. (1994). Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 77, 2289-2301.
252. Leulmi N. (2011). La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovine. *Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine*, 75p.
253. Li B., Zhao H., Liu J., Liu W., Fan S., Wu G., Zhao R. (2015). Application of ultra-high performance supercritical fluid chromatography for the determination of carotenoids in dietary supplements. *Journal of Chromatography A*, 1425, 287-292.
254. Limón P., Malheiro R., Casal S., Acién-Fernández F.G., Fernández-Sevilla J.M., Rodrigues N., Cruz, C., Bermejo R. & Pereira J.P. (2015). Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. *Food Chemistry*, 175, 203-211.
255. Lin J., Zhao H-S., Xiang L-R., Xia J., Wang L-L., Li X-N., Li J-L., Zhang Y. (2016). Lycopene protects against atrazine-induced hepatic ionic homeostasis disturbance by modulating ion-transporting ATPases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 249-256.
256. Liphshitz N., Gophna R., Hartman M., Biger G. (1991). The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the old world: a reassessment. *J. Arch. Sci.* 18, 441-453.
257. Livingston A.L., Knowles R.E., Nelson J.W. & Kohler G.O. (1968). Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfalfa processing. *J. Agric. Food Chem.*, 16 (1), 84-87.
258. Long R.J., Apori S.O., Castro F.b. & Orskov E.R. (1999). Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 101-113.
259. Loukas M., Krimbas C.M. (1983). History of olive cultivars based on their genetic distances. *J. Hort Sci.* 58, 121.
260. Lucas A., Morales J. & Velando A. (2014). Differential effects of specific carotenoids on oxidative damage and immune response of gull chicks. *Journal of Experimental Biology*, 217, 1253-1262.
261. Lwin K.O., Hayakawa B-T. & Matsui H. (2011). Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Curr.Microbiol.* 62, 1147– 1151.

262. Lykas C., Vagelas I. & Gougoulas N. (2014). Effect of olive mill wastewater on growth and bulb production of tulip plants infected by bulb diseases. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1), 233-243.
263. Mackie R., Aminov R., White B. & McSweeney C. (2000). Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems, *In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction*. CABI, pp. 61–77.
264. Maga J.A. (1978). Simple phenol and phenolic compounds in food flavour. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10, 323–372.
265. Magdich S., Jarboui R., Ben Rouina B., Boukhris M. & Ammar E. (2012). A Yearly Spraying of Olive Mill Wastewater on Agriculture Soil over Six Successive Years: Impact of Different Application Rates on Olive Production, Phenolic Compounds, Phytotoxicity and Microbial Counts. *Science of the Total Environment*, 430, 209-216.
266. Mahmoud M., Janssen M., Haboub N., Nassour A. & Lennartz B. (2010). The Impact of Olive Mill Wastewater Application on Flow and Transport Properties in Soils. *Soil and Tillage Research*, 107, 36-41.
267. Mahmoud M., Janssen M., Peth S., Horn R. & Lennartz B. (2012). Long-Term Impact of Irrigation with Olive Mill Wastewater on Aggregate Properties in the Top Soil. *Soil and Tillage Research*, 124, 24-31.
268. Makkar H.P.S. (2005). *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 291-302.
269. Makkar H.P.S., Blummel M. & Becker K. (1995). Formation of complexes between poly vinylpyrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.*, 73(6), 897-913.
270. Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N.K. & Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of Food and Agriculture*, 61(2), 161–165.
271. Manach C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.
272. Manai-Djebali H., Krichene D., Ouni Y., Gallardo L., Sánchez J., Osorio E., Daoud D., Guido F. & Zarrouk M. (2012). Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 109-119.
273. Mann J., Markham J.L., Peiris P., Nair N., Spooner-Hart R.N. & Holford P. (2010). Screening and selection of fungi for bioremediation of olive mill wastewater. *World J Microbiol Biotechnol*, 26, 567-571.
274. Manna C., Migliardi V., Golino P., Scognamiglio A., Galletti P., Chiariello M. & Zappia, V. (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 461–466.

## Références bibliographiques

---

275. Marisot A., Tournier J.P. (1986). Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agronomie*, 6, 235-241.
276. Markou G., Chatzipavlidis I. & Georgakakis D. (2012). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite. *Bioresource Technology*, 112, 234-241.
277. Martilotti F. (1993). Use of olive by-products in animal feeding in Italy. Division de la production et de la santé animale. *FAO. Rome*. 56-62.
278. Martin A.K. (1973). Urinary aromatic acid excretion by fed and fasted sheep in relation to protein metabolism in rumen. *Br. J. Nutr.*, 30, 251-267.
279. Martin, A.K. (1982). The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants. 1. The metabolism of quinic, cyclohexanecarboxylic and non-phenolic aromatic acids to benzoic acid. *Br. J. Nutr.*, 47, 139-154.
280. Martinez S., Barbas C. & Herrera E. (2002). Uptake of alphatocopherol by the mammary gland but not by white adipose tissue is dependent on lipoprotein lipase activity around parturition and during lactation in the rat. *Metabolism* 51:1444-1451.
281. Martinez-Garcia G., Johnson A.C., Bachmann R.T., Williams C.J., Burgoyne A. & Edyvean R.G.J., (2007). Two-stage biological treatment of olive mill wastewater with whey as co-substrate, *Int Biodeter Biodegr*, 59(4), 273-282.
282. Martinez-Garcia G., Johnson A.C., Bachmann R.T., Williams C.J., Burgoyne A. & Edyvean G.J. R. (2009). Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermented with *Candida tropicalis*. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 1398-1405
283. Matallah S., Bouchelaghem S. & Matallah F. (2015). Variations de la composition chimique du lait de vache Holstein dans le nord-est de l'Algérie. *Livestock Research for Rural Development* 27 (1). <http://www.lrrd.org/lrrd27/1/mata27016.html>
284. Mc Allister T.A., Okine E.K., Mathison G.W. & Cheng K.J. (1996). Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76,231-243.
285. McDowell, L.R. (2000). Vitamins in animal and human nutrition. Ames: *Iowa State University Press*.
286. McNamara C.J., Anastasiou C.C., O'Flaherty V. & Mitchell R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61, 127-134.
287. McNulty J., Nair J.J., Bollareddy E., Keskar K., Thorat A., Crankshaw D., Holloway A. C., Khan, G., Wright, G. D. and Ejim, L. 2009. Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. *Phytochemistry*. 70: 2040-2046.

288. McSweeney C.S., Palmer B., Bunch R. & Krause D.O. (2001). Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J Appl Microbiol.* 90(1):78-88.
289. Mechri B., Chehab H., Attia F., Mariem F. B., Brahab M. & Hammamia M. (2010). Olive mill wastewater effects on the microbial communities as studied in the field of olive trees by analysis of fatty acid signatures. *European Journal of Soil Biology*; 46, 312-318.
290. Mechri B., Cheheb H., Boussadia O., Attia F., Ben Mariem F., Braham M. & Hammami M. (2011). Effects of agronomic application of olive mill wastewater in a field of olive trees on carbohydrate profiles, chlorophyll a fluorescence and mineral nutrient content. *Environ Exp Bot.*, 71, 184-91.
291. Mekki A., Dhouib A. & Sayadi, S. (2007). Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 84, 134-140.
292. Mekki A., Dhouib A., Sayadi S. (2009). Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Prog Nat Sci.*, 19, 1515-21.
293. Mendil M. & Sebai A. (2006). *L'Olivier en Algérie. Institut Technique de L'Arboriculture Fruitière et de la Vigne, Argel, Algeria.* 48-86.
294. Mendil M. (2009). L'oléiculture : Expériences algériennes. *Filaha Innove*, 1111, 4762, p 06.
295. Menke K.H. & Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 28, 7-55.
296. Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Friz D. & Schneider W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal Agriculture Science. Casab*, 92: 217-222.
297. Meski N., Haddara-Hammamia S., Mhenni M.F. (2012). Olive mill wastewater: a potential source of natural dyes for textile dyeing. *Ind Crop Prod.*, 40, 103-9.
298. Michal J.J., Heirman L.R., Wong T.S., Chew B.P., Frigg M. and Volker L. (1994). Modulatory effects of dietary beta-carotene on blood and mammary leucocyte function in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77 (5), 1408-1421.
299. Min B.R., Attwood G.T., McNabb W.C., Molan A.L. & Barry T.N. (2005). The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 121, 45-58.
300. Mitrakas M., Papageorgiou G., Docoslis A., Sakellaropoulos G. (1996). Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill wastewaters. *European Water Pollution Control*, 6 (6), 10-16.
301. Mogensen L., Kristensen T., Søgaard K., Jensen S.K. & Sehested J. (2012).  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in roughages and milk in organic dairy herds. *Livestock Science* 145, 44-54

302. Molan A.L., Waghorn G.C. & McNabb W.C. (1999). Condensed tannins and gastrointestinal infections in sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 61, 57–61.
303. Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R. (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147, 247-267.
304. Mora O., Romano J.L., Gonzalez E., Ruiz F.J., Gomez R. & Shimada A. (2001). Presence of fed beta-carotene in digesta, excreta, blood, and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.*, 81, 133–139.
305. Moraetis D., Stamati F.E., Nikolaidis N.P. & Kalogerakis N. (2011). Olive mill wastewater irrigation of maize: Impacts on soil and groundwater. *Agricultural Water Management*, 98, 1125-1132
306. Moure A., Cruz J.M., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. & Carlos Parajo J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
307. Moussaoui R., Siziani D., Youyou A., Sharrock P. & Fiallo M.L. (2010). Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil. *J. Food Agric. Environ.*, 8(3-4), 86-89.
308. Mouthon G. (2000). Biochimie A : Les caroténoïdes. Polycopié. *Ecole Nationale Vétérinaire*.
309. Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C. & Vincieri F.F. (2001). Polyphenolic Content in Olive Oil Waste Waters and Related Olive Samples. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 49 (8), 3509-3514.
310. Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(1), 31-57.
311. Munro G.L., Grieve P.A. & Kitchen B.J. (1984). Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Aust. J. Dairy Tech.*, 39, 7-16.
312. Nagadi S., Herrero M. & Jessop N.S. (2000). The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. *Animal Feed Science and Technology*, 87: 241-251.
313. Nassar N.N., Arar L.A., Marei N.N. Abu Ghanim M.M., Dwekat M.S. & Sawalha & S.H. (2014). Treatment of olive mill based wastewater by means of magnetic nanoparticles: Decolourization, dephenolization and COD removal. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 1-2, 14-23
314. Nassiri-Asl M. & Hosseinzadeh H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 23(9), 1197-1204.

## Références bibliographiques

---

315. Niaounakis M, Halvadakis CP (2004) Olive mill waste management. Literature Review and Patent Survey. *Typothito-George Dardanos. Athens, Greece, pp xiv, 430*
316. Niaounakis M, Halvadakis CP. (2006). Olive processing waste management literature review and patent survey. *Waste management series, 5, 23-64.*
317. Nisar N., Shan Lu L.L., Khin N.C., Pogson B.J. 2015. Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant, 8 (1), 68-82.*
318. Nonnecke B., Roberts M.P., Godkin J.D., Horst R.L., Hammell D.C. & Franklin S.T. (2001). In fluence of supplemental, dietary vitamin A on retinal-binding protein concentration in the plasma of preruminant calves. *J Dairy Sci., 84, 641-8*
319. Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M. (2006a). Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol., 131, 418-450.*
320. Nozière P., Grolier P., Durand D., Ferlay A., Pradel P., Martin B. (2006b). Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. *J. Dairy Sci., 89, 2634-2648.*
321. Ntougias S., Bourtzis K. & Tsiamis G. (2013). The microbiology of olive mill wastes, *BioMed Research International, vol. 2013, Article ID 784591, 16p.*
322. Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D. & Robards K. (2005a). Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *J. Agric. Food Chem., 53, 9911-9920*
323. 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. *J. Agric. Food Chem., 53, 823-837.*
324. Obied H.K., Prenzler P.D., Konczak I., Rehman A.U., Robards K. (2009). Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative *in vitro* bioassays. *Chem. Res. Toxicol., 22, 227-234.*
325. Ogimoto K. & Imai S. (1981). Atlas of Rumen Microbiology. *Japan Scientific Society Press. Tokyo. Japan.*
326. Ohene-Adjei S., Teather R.M., Ivan M. & Forster R.J. (2007). Post inoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol. 73,4609-4618.*
327. Orpin C.G. & Joblin K.N. (1997). The Rumen Microbial Ecosystem In: Hobson P.N. and Stewart C.S. (eds), Chapman & Hall, *London. pp. 140-195.*
328. Orskov E.R. & Ryle M. (1990). Energy nutrition of rumen microorganisms. In: Energy nutrition in ruminants. *Elsevier Science (Eds.), New York, USA, pp: 10-28.*
329. Ouzounidou G., Zervakis G.I. & Gaitis F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology, 4, 21-38*

330. Oz N.A. & Uzun A.C. (2015). Ultrasound pretreatment for enhanced biogas production from olive mill Wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 565–572.
331. Paik J., Vogel S., Quadra L., Piantedosi R., Gottesman M. lai K., Hamberger L, Morais Vieira M. & Blaner W. (2004). Vitamin A: overlapping delivery pathway to tissues from the circulation. *J Nutr.*, 276S-280S
332. Paraskeva P. & Diamadopoulos E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1475-1485.
333. Park S., Choi Y., Um S.J., Yoon S.K. & Park T. (2011). Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *Journal of Hepatology*, 54, 984–993.
334. Patra A.K. & Saxena J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198-1222.
335. Patterson D.S. (1965). Plasma carotenoids and fat mobilization in stall-fed cattle. *Nature* 206, 1069.
336. Pei C-X., Mao S-Y., Cheng Y-F. & Zhu W-Y. (2010). Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal*, 4(1), 20-9.
337. Piccard P., Chenais F. & Brunschwig P. (2006). Maitrise de la matière grasse du lait par l'alimentation des vaches laitières. Compte-rendu 030631012. *Département d'élevage et qualité*. 36p.
338. Pincemail J. & Defraigne J.O. (2003). Le Co-Enzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. 8(2), 55-60.
339. Pivnyak I. & Arfdzhanova M.K. (1977). Adaptation of a carotene-synthesizing culture of the digestive tract of new-born male calves. *Trudy-Vsesoyuznyi-Ordena-Trudovogo-Krasnogo-Znameni-Nauchno-issledovatel'-skii-institut-Zhivotnovodstva*, 37, 157-159.
340. Politis I., Hidioglou N., Batra T.R., Gilmore J.A., Gorewit R.C. & Scherf H. (1995). Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 179-184.
341. Politis I., Hidioglou N., Cheli F. & Baldi A. (2001). Effects of vitamin E on urokinase plasminogen activator receptor expression by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 62(12), 1934–1938.
342. Popova M. (2011). Structure et activité de la communauté des *Archaea* méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. *Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II*. 264p.
343. Psomiadou E., Tsimidou M. & Boskou D. (2000).  $\alpha$ -tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(5), 1770-1775.

## Références bibliographiques

---

344. Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. & Pouységu L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition* 50(3): 586-621.
345. Rahmanian N., Mahdi Jafari M.S. & Galanakis C.M. (2014). Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *J Am Oil Chem Soc.*, 91:1–18
346. Ranalli A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 39, 26-40.
347. Rayan D., Robards K. & Lavee S. (1999). Determination of phenolic compounds in olives by reverse-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 832, 87–96.
348. Reiners J., Nicklaus S., & Guichard E. (2000). Interaction between blactoglobulin and flavor compounds of different chemical classes Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. *Lait*, 80, 347–360.
349. Riccardi C., Di Basilio M., Savarese F., Torrisi L. & Villarini M. Agronomic –Related Physic-Chemical Changes in Olive Oil Mill Effluent. *J Environ Sci Health*, 35(3), 349-356.
350. Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
351. Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, 657–691
352. Robert J.C. (1995). Effects of the rumen environment on vitamin E provided in the diet. Vitamins in Forages 429 In: *Synopsis of Work in Progress at the Centre for Evaluation and Research in Nutrition in 1994–1995*. Rhône Poulenc Animal Nutrition.
353. Rodis P.S., Karathanos V.T. & Mantzavinou A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50, 596-601.
354. Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F.F. & Cimato A. (1999). Phenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47, 964-967.
355. Rubio-Senent, F., Rodriguez-Gutierrez, G., Lama-Munoz, A., & Fernandez-Bolanos, J. (2012). New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1175-1186.
356. Sabbah I., Marsook T. & Basheer S. (2004). The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Proc. Biochem.* 39(12), 1947-1951.

## Références bibliographiques

---

357. Sakakibara H., Viala D., Ollier A., Combeau A. & Besle J-M. (2004). Isoflavones in several clover species and in milk from goats fed clovers. *Biofactors*, 22(1-4), 237-239.
358. Salem A.Z.M., Salem M.Z.M, El-Adawy M.M. & Robinson P.H. (2006). Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: Secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 251-267.
359. Sartori-Thiel A. (2003). Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat: 177pp*.
360. Schaffer S., Muller W.E. & Eckert G.P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research*, 62, 322–327.
361. Scheline R.R. (1991). Metabolism of oxygen heterocyclic compounds, flavonoids. Pages 267 290 in CRC Handbook of Mammalian Metabolism of Plant Compounds. R.R. Scheline, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
362. Schutz M.M., Hansen L.B., Steuernagel G.R. & Kuck A.L. (1990). Variation of milk, fat, protein and somatic cells for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73, 484-493.
363. Schweigert, F.J. & Eisele W. (1990). Parenteral beta-carotene administration to cow: Effect on plasma levels, lipoprotein distribution and secretion in the milk. *Z. Ernährungswiss*, 29, 184–191.
364. Scoma A., Bertin L., Zanaroli G., Fraraccio S., Fava F. (2011). A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. *Bioresour Technol*, 102, 10273-10279
365. Selma M.V., Espín J.C. & Tomás-Barberán F.A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (15), pp 6485–6501.
366. Serbinova E., Kagan V. E., Han D. & Packer L. (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alphanatocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine*. 10(5), 263-275.
367. Serieys F. (1985). Concentration cellulaire du lait individuel de vache : influence de l'état d'infection mammaire, du numéro de lactation, du stade de lactation et de la production laitière. *Ann. Rech. Vt.*, 16, 255-261.
368. Sheldrake R.F., Hoare R.J.T. & McGregor G.D. (1983). Lactation stage, parity and infection affecting somatic cells, electrical conductivity and serum albumin in milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 542-547.
369. Shingfield K.J., Salo-Väänänen P., Pahkala E., Toivonen V., Jaakkola S., Piironen V., Huhtanen P. (2005). Effect of forage conservation, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cow's milk. *J Dairy Res*, 72, 349–361.
370. Shofield P., Mbugua D.M. & Pell A.N. (2001). Analysis of condensed tannin: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21-40.

## Références bibliographiques

---

371. Sicuro B., Badino P., Daprà F. Gai F., Galloni M., Odore R. & Palmegiano G.B. (2010). Elisabetta Macchi Physiological effects of natural olive oil antioxidants utilization in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) feeding. *Aquacult Int* 18, 415-431.
372. Sierra J., Martí E., Montserrat R., Cruanas R. & Garau M.A. (2001). Characterization and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Sci. Total Environ.* 279, 207-214.
373. Singh B., Saho A., Sharma R. & Bhat T.K. (2005). Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 351-364.
374. Skřivan M. & Englmaierová M. (2014). The deposition of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in hen eggs produced under a combination of sequential feeding and grazing. *Animal Feed Science and Technology*, 190, 79-86.
375. Smith K.L., Horgan J.S. & Weiss W.P. (1997). Dietary vitamin E and selenium mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science*, 75, 1659-1665.
376. Soler-Rivas C., Arpin N., Olivier J.M. & Wichers H.J. (2000). Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycological Research*, 104(3), 351-356.
377. Stewart C.S., Flint H.J. & Bryant M.P. (1997). The rumen bacteria, In: The Rumen Microbial Ecosystem Eds. Hobson P.N. and Stewart C.S. Blackie Academic & Professional An Imprint of Chapman & Hall London Weinheim. New York, Tokyo, Melbourne, *Madras*. Pp. 10-73.
378. Stigliani A.L., Giorio G. & D'Ambrosio C. (2011). Characterization of P450 Carotenoid  $\beta$  and  $\epsilon$ -Hydroxylases of tomato and transcriptional regulation of xanthophyll biosynthesis in root, leaf, petal and fruit *plant*. *Cell Physiology*, 52, 851-865.
379. Sutton J.D. (1989). Altering milk composition by feeding. *Journal Dairy Science*, 72, 2801-2814.
380. Traber M.G. (2000). The bioavailability bugaboo. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(5), 1029-1030.
381. Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. & Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84, 251-257.
382. Udenigwe C.C., Ramprasath V.R., Aluko R.E. & Jones P.J.H. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews* 66(8): 445-454.
383. Un U.T., Itay U.A., Koparal A.S., Ogutveren U.B. (2008). Complete treatment of olive mill wastewaters by electrooxidation. *Chemical Engineering Journal*, 139, 445-452.
384. Van soest P.J. (1982). Lipids. In: Nutritional Ecology of the ruminant, 260-275.

## Références bibliographiques

---

385. Veillet S. (2010). Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. These de Doctorat en Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 153 pp.
386. Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F.F. & Galli C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3397–3401.
387. Visioli F., Vincieri F.F. & Galli C. (1995). Waste waters” from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51, 32–34.
388. Visioli F., Wolfram R., Richard D., Abdullah, M.I.C.B., Crea R. (2009). Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1793–1796.
389. Vissers M.N., Zock P.L., Roodenburg A.J., Leenen R. & Katan M.B. (2002). Apparent absorption of olive oil phenols in humans. *J. Nutr.*, 132, 409–417.
390. Vitti D.M., Abdaalla S.S., Bueno A.L. Silva Filho I.C.S., Costa J.C. & Bueno C.M.S. (2005). Do all tannins have similar nutritional effects. A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 345-361.
391. Vossen, P., (2013). Growing olives for oil. R. Aparicio and J. Harwood (eds.). Handbook of Olive Oil: *Analysis and Properties* pp.19-56.
392. Vossenberg J. & Joblin K.N. (2003). Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* 37(5), 424–428.
393. Wang Y., Douglas G.B., Waghorn G.C., Barry T.N. & Foote A.G. (1996). Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *Journal of Agricultural Science*, 126, 353–362.
394. Wang, Y., Chung S.J., McCullough M.L., Song W.O., Fernandez M.L., Koo S.I. and Chun O.K. 2014. Dietary Carotenoids Are Associated with cardiovascular disease risk biomarkers mediated by serum carotenoid concentrations. *Journal of Nutrition*, 144:1067-1074.
395. Wegner T.N., Schuh J.D., Nelson F.E. & Stott G.H. (1976). Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cell counts in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 59, 949-956.
396. Weiss W.P., Smith K.L., Hogan J.S. & Steiner T.E. (1995). Effect of forage to concentrate ratio on disappearance of vitamins A and E during *in vitro* ruminal fermentation. *J Dairy Sci.*, 78(8), 1837-1842.
397. Wiesman Z. (2009). Desert olive oil cultivation : Advanced Bio Technology, Elsevier Science : New York, NY, USA.
398. Wilkins R.J. & Jones R. (2000). Alternative home-grown protein sources for ruminants in the United Kingdom. *Animal Feed and Science Technology*, 85, 23–32.
399. Williams A.G. & Coleman G.S. (1997). The rumen protozoa. In : Hobson P.N., Stewart C.S. The rumen microbial ecosystem. *Second edition, Chapman et Hall, London*, 73-139.

## Références bibliographiques

---

400. Wing J.M. (1969). Effect of source and season on apparent digestibility of carotene in forage by cattle. *J Dairy Sci.*, 52(4), 479-483.
401. Wright A.D.G. Ma X. Obispo N.E. (2008). Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microb. Ecol.* 56,390–394.
402. Xavier da Silva O.M. (2014). Olive Mill Wastewaters treatment: evaluation of microalgae applicability. Thèse de Doctorat, *Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 59p.
403. Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J. & Li H.B. (2011). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646.
404. Yaakoubi A., Chahlaoui A., Elyachioui M. & Chaouch A. (2010). Traitement des margines à pH neutre et en conditions d'aérobies par la microflore du sol avant épandage. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 149 43-56.
405. Yahiaoui O., Lounici H., Abdi N., Drouiche N., Ghaffour N., Pauss A. & Mameri N. (2011). Treatment of olive mill wastewater by the combination of ultrafiltration and bipolar electrochemical reactor processes. *Chemical Engineering and Processing*, 50, 37–41.
406. Yang A. & Tume R.K. (1993). A comparison beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. *Biochem Mol Bio Int.*, 30(2), 209-217.
407. Yang A., Larsen T.W., Tume R.K. (1992). Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoids transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agr. Res.*, 43, 1809–1817.
408. Yangui T., Sayadi S., Rhouma A. & Dhouib A. (2010). Potential use of hydroxytyrosol-rich extract from olive millwastewater as a biological fungicide against *Botrytis cinerea* in tomato. *J Pest Sci* 83:437–445.
409. Yu Feng McNabb W.C., Barry T.N. & Waghorn G.C. (1995). Effect of condensed tannin in cottonseed hulls upon the *in vitro* degradation of cottonseed kernel proteins by rumen microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 223–234.
410. Zbakh H., El Abbassi A. (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: a review. *J Funct Foods*, 4, 53-65
411. Zenjari B., Hafidi M., El Hadrami I., Bailly J.R. & Nejmeddine A. (1999). Traitement aérobie des effluents d'huileries par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*, 43(5/6), 277-286.
412. Zhao G., Yin Z. & Dong J. (2009). Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 265–268.
413. Zhu L., Liu Z., Feng, Z. Hao J., Shen W., Li X., Sun L., Sharman E., Wang Y., Wertz K., Weber P., Shi X., & Liu J. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by

## Références bibliographiques

---

- simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 1089–1098.
414. Zirehpour A., Jahanshahi M. & Rahimpour A. (2012). Unique membrane process integration for olive oil mill wastewater purification. *Separation and Purification Technology*, 96, 124–131.
415. Zorpas A.A. & Costa C.N. (2010). Combination of Fenton oxidation and composting for the treatment of the olive solid residue and the olive mill wastewater from the olive oil industry in Cyprus. *Bioresource Technology*, 101, 7984–7987
416. Zouari N (1998) Decolorization of olive oil mill effluent by physical and chemical treatment prior to anaerobic digestion. *J Chem Tech Biotech* 73(3):297–303.
417. Zrelli H., Matsuoka M., Kitazaki S., Zarrouk M. & Miyazaki H. (2011). Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK–FOXO3a pathway. *European Journal of pharmacology*, 660, 275–282.
418. Zuhainis Saad W., Abdullah N., Alimon A.R. & Ho Y.W. (2008). Effects of phenolic monomers on the enzymes activities and volatile fatty acids production of *Neocallimastix frontalis* B9. *Anaerobe*, 14: 118-122.

# Annexes



- Degré de maturité des olives :  
Pas mûres, mûres, très mûres
- Origines :                    local ?                    distance de l'huilerie en km ?
- Date de récolte
- durée et conditions de stockage des olives avant traitement en général (sels ?, T° ?  
lumière ? eau ?)
- durée et conditions de stockage des olives ayant donné les margines prélevées (sels ?,  
T° ? lumière ? eau ?)

### 3. Situation géographique de l'unité

### 4. Conditions pédoclimatiques de la saison :

- Sécheresse
- Pluies abondantes

**Annexe 2 : Quantités des mixtures distribuées des différents régimes lors de l'expérimentation.**

Supplémentation en margines (%)	Constitution du mélange (kg)		Quantité d'aliment (kg)/vache/j		Quantité d'aliment (kg)/2 vaches/j		Quantité d'aliment (kg)/2 vaches/pallier	
	Foin de Vesce	Margines -avoine	à raison de 06 kg/j.		à raison de 06 kg/j/vache.		à raison de 06 kg/j/vache.	
			Foin de vesce	Margines	Foin de vesce	Margines	Foin de vesce	Margines
			-avoine		-avoine		-avoine	
10 %	90	10	6	0,667	12	1,334	48	5,336
20 %	80	20	6	1,500	12	3,000	48	12,000
30 %	70	30	6	2,570	12	5,140	48	20,560
40 %	60	40	6	4,000	12	8,000	48	32,000
50 %	50	50	6	6,000	12	12,00	48	48,000

## Valorisation

Ce travail a été valorisé par :

### - Deux publications internationales

1. AGGOUN M., ARHAB R., CORNU A., PORTELLI J., BARKAT M. et GRAULET B. 2016. *Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process*. Food Chemistry 209, 72–80.

2. AGGOUN M., ARHAB R., LEULMI N. et BARKAT M. 2014. *In vitro fermentation of olive oil mill wastewaters using sheep rumen liquor as inoculum: Olive mill wastewaters an alternative for ruminant's nutrition*. J. BioSci. Biotech. 2014, 3(3): 203-210.

### - Une présentation affichée dans un congrès international (Paris, France).

AGGOUN M., DURIOT B., ARHAB A., CORNU A., BARKAT M., GRAULET B. 2013. *Composition des margines issues de la production d'huile d'olive en vue d'une valorisation par la vache laitière*. Renc. Rech. Ruminants, 2013, 20

**Nom :** AGGOUN-ARHAB

**Prénom :** Moufida

**Intitulé :** Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière.

---

### **Résumé**

La production de l'huile d'olive génère des quantités considérables de margines, un polluant puissant déversé dans la nature sans aucun traitement préalable mais qui pourrait être considéré comme une source potentielle de produits naturels de haute valeur additive, en raison de leur teneur en composés phénoliques et d'autres antioxydants naturels. Le but de ce travail était de tenter de valoriser ce co-produit par les ruminants. Ainsi, la stratégie proposée était de distribuer les margines aux vaches laitières en production. Cette valorisation à grande échelle a nécessité deux étapes préalables: i) explorer la variabilité de composition chimique des margines issues de 2 procédés d'extraction de l'huile d'olive (centrifugation en 3-phases vs système de presse) et de 3 variétés d'olives (*Azerradj*, *Chemlal*, *Sigoise*) ; ii) estimer leur dégradation *in vitro* par le microbiote du rumen en système batch.

A l'exception du pH, de la teneur en matière sèche ou matière organique, il y avait une différence significative de la teneur en cendre selon le procédé d'extraction et la variété d'olive. La teneur en caroténoïdes était de 2,2 fois plus élevée avec 3-phases qu'avec le système de presse alors que le contenu en tocophérol était comparable pour les deux paramètres retenus. Parmi les composés phénoliques quantifiés, le tyrosol était le plus abondant alors que la concentration en oleuropéine était très variable. Les différences dans les concentrations de composés phénoliques ont été plus prononcées entre les variétés d'olive qu'entre process.

La biodégradation anaérobie *in vitro* des margines révèle leur utilisation importante par le microbiote du rumen. Comparativement au foin de vesce-avoine, les margines produisent une faible quantité de gaz, en plus, leur fermentation *in vitro* génère un faible volume de méthane. Ceci leur permet d'améliorer l'efficacité de la flore microbienne ruminale dans la production de la biomasse et l'inhibition de la production du méthane, source majeure de perte d'énergie pour l'animal. Ce résultat nous permet de recommander leur utilisation comme additif alimentaire dans la ration des ruminants.

La distribution des margines dans la ration des vaches laitières nous a permis de définir les conditions de présentation des margines aux ruminants (forme, adaptation, niveau d'apport) et leur acceptabilité pour cet ingrédient. Nos résultats ont montré que le niveau de production quantitatif (production laitière) et la composition fine du lait (vitamine A, E et composés phénoliques) ne semble pas être impactés significativement. L'absence d'écarts significatifs entre lots d'animaux est dû au fait que les margines qui ont été distribuées aux vaches n'étaient pas particulièrement riches en micro-constituants, comparativement aux fourrages.

**Mots clés :** Composés phénoliques, caroténoïdes, tocophérols, margines, variétés d'olive, procédés d'extraction, composition chimique, vache laitière, fermentation ruminale.