

EVALUATION OF THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF MARGINES FROM OLIVES EXTRACTION IN THE KHENCHELA REGION

K. Kadi^{*1,2}, R. Mrah², S. Hamli², S. Lekmine³, D. Dib², D. Addad², S Boukeria⁴,
Z. Gueboudji², I. Hafsaoui²

¹Laboratory of Biotechnologie, Water, Enviroment and Health, University of Abbes Laghrour, Khenchela, Algeria

²Faculty of NSL, University of Abbes Laghrour, Khenchela, Algeria

³Faculty of NSL and ES, University of Larbi Tebessi, Tebessa, Algérie

⁴Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Center of Abdel Hafid Boussouf, Mila, Algeria

Received: 25 October 2019 / Accepted: 02 April 2020 / Published online: 01 May 2020

ABSTRACT

The objective of this study is the evaluation of the anticoagulant activity of polyphenols obtained from olive extracts (*Olea europaea* L.) Of the margines of two varieties cultivated at Khenchela (East of Algeria) , the first one is souidi from Chacher and the second one is chemlal from Baghai. The physicochemical characteristics of the two varieties studied showed a difference in water content, total solid content (dry matter), total solid in suspension, potential hydrogen, and especially its content in polyphenols and flavonoids. The quantitative analysis of the two extracts has revealed a great richness of the margines of the souidi variety of polyphenols and flavonoids content compared to the margines of the chemlal variety. The dosage of polyphenols is 0.8 mg EAG / mlE) for Souidi and (0.5 mgEAG / mlE) for Chemlal. The *in vitro* evaluation of the anticoagulant activity of the margines of two varieties souidi and chemlal revealed that the margines of the souidi variety has a good anticoagulant activity vis-à-vis the endogenous pathway Time of Céphaline Kaolin (TCK).

Key words: margines, chemlal and souidi, physicochemical characteristics, dosage, olives, anticoagulant activity.

Author Correspondence, e-mail: kadikenza79@gmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v12i2.8>



1. INTRODUCTION

Dans les industries oléicoles, l'opération d'extraction nécessite de grandes quantités d'eau, par conséquent cette industrie engendre d'importantes quantités d'effluents liquides (les margines). Ces effluents liquides issues sont fortement chargées en phénols et en matières organiques qui les rendent toxiques pour l'environnement [1].

Le rejé direct des margines sur les sols provoque un colmatage des sols, et une diminution de leur qualité. Ces déchets sont à l'origine du changement des caractéristiques physico-chimiques des sols (l'augmentation de la salinité, et de la diminution du pH). De même, les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol, d'autres des résidus de pesticides notamment, sont nocives aux plantes [2]. Plusieurs recherches ont été faites afin d'extraire ces composés d'intérêts médicales et pharmaceutique comme les polyphénols, pour tester leurs activités biologiques et les valoriser [2,3].

Pour cela cette étude a pour objectif d'évaluer l'activité anticoagulante des polyphénols extraites de deux types de margines de la Wilaya de Khenchela.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Margines1: issues d'une unité moderne de trituration équipée en presse à froid (24C°) au niveau de la commune de Baghai, situé au nord de la wilaya de khenchela. Elles sont obtenues à partir des olives marron de la variété Chemlal (*Olea europaea* L. var. Chemlal). Elles sont de couleur marron.

Margines2: issues d'une unité traditionnelle de trituration équipée en presse dans la commune de Chachar situé au sud de la wilaya de khenchela. Ces margines sont obtenues à partir des olives de la variété soudi (*Olea europaea* L. var. Soudi). Elles sont de couleur vert foncé.

Les margines sont stockées dans le congélateur à -18°C au niveau des laboratoires pédagogiques de l'université de khenchela, pour éviter l'auto-oxydation et la polymérisation ultérieure des composés phénoliques et les tannins, qui donnent lieu à des margines sombres, qui ne sont pas facilement biodégradables [4].

2.2. Echantillons du sang et préparation des pools plasmatiques déplaquettés

Six échantillons de sang ont été recueillis à partir des personnes saines (non pas de maladies

chroniques) pour l'évaluation de l'activité anticoagulante au niveau de l'hôpital Ben Bela de Khnchela.

Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anti coagulante de citrate de sodium à 3.2 % et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange est conservé à une basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation.

2.3. Caractéristiques physicochimiques des margines

2.3.1. Le potentiel Hydrogène (pH)

Le pH est mesuré sur des margines fraîches, par un pH-mètre de type BANTE instruments.

2.3.2. La conductivité électrique (CE)

Elle est mesurée sur des margines fraîches, par un Conductimètre de type BANTE instruments.

2.3.3. Teneur en matière minérale (MM)

L'échantillon sec de margine est calciné dans un four à moufle à 550°C, pendant 3 h. Après refroidissement dans un dessiccateur, les produits de l'incinération sont pesés et constituent la matière minérale [5].

$$C = (M2 - M0) / V \times 1000$$

Avec :

C : teneurs en cendres (g/l), M0 : masse de la capsule vide (g), M2 : masse de la capsule avec la matière sèche calcinée (g), V : volume de la prise d'essai (ml)

2.3.4. La matière organique (MO)

La teneur de la matière organique est obtenue par déduction entre le poids sec des margines et leurs poids après calcination (matière minérale) [5].

2.3.5. Teneur en eau (EE)

L'humidité des échantillons des margines est déterminée par un séchage à l'étuve. Environ 10 g de margine (chemlal et souidi) sont pesées, puis séchées à 103°C pendant 24 heures [6], ensuite refroidies pendant 30min dans un dessiccateur, puis repesées une deuxième fois. La perte en eau est calculée par la différence de poids des échantillons humides et secs.

2.3.6. Teneur en solide total (matière sèche)

Le taux de la matière sèche est déterminé par la différence de poids entre la margine (100 %) et la teneur en eau (% H₂O) [7].

$$ST\% = 100\% - \%H_2O$$

2.3.7. Solide total en suspension (STS%)

Les solides totaux suspendus (STS %) sont obtenus par centrifugation des margines fraîches à 4000 g durant 15 min, le résidu solide est séché une nuit à 105°C [7].

$$\text{STS\%} = 100\% - \text{ST\%}$$

2.3.8. Teneur en lipides

20 ml de margine sont mélangés avec 30 ml de n-hexane (3×30 ml), le mélange est mixé rigoureusement dans une ampoule à décanter de 100 ml [8], puis centrifugé pendant 5 min à 3000 tr/min [9]. Les trois phases d'hexane sont combinées et le solvant est évaporé à 79°C dans un évaporateur rotatif (Heidolph, Laborota 4000), séchés à 100 °C dans une étuve puis refroidis dans un dessiccateur pendant 30 min. Le séchage est répété jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en lipide est mesurée par gravimétrie.

2.4. Extraction et dosage des polyphénols des margines

Le traitement des margines et l'extraction liquide-liquide des polyphénols ont été faits selon la méthode décrite par Sayadi et al. [10] avec quelques modifications.

2.4.1. Traitement des margines

Avant de procéder à l'extraction, il est souhaitable de faire une acidification, puis une délipidation des margines à l'aide d'un solvant extracteur [11].

2.4.2. Extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle [12] :

Les margines préalablement délipidées sont mixées avec 20 ml d'acétate d'éthyle, le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15 min) puis centrifugé à 3200 t/min pendant 10 min dans des conditions réfrigérées (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 3K30/Z, Laboratory centrifuges, Allemagne). Les phases sont séparées et l'extraction est répétée quatre fois successivement. Les 5 phases d'acétate d'éthyle contenant les composés phénoliques sont collectées et combinées. L'eau dissoute est ensuite enlevée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) filtrées. Puis le solvant est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu sec est conservé dans 6 ml du DMSO à -18°C. Cette solution est utilisée pour le dosage et la détermination de l'activité anticoagulante des composés phénoliques.

2.4.3. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin Ciocalteu, qui se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée [13]. Le dosage a été effectué selon la méthode de Gutfinger (1981) modifiée par (Lafka et al. 2007) [14].

La lecture de la densité optique à 725 nm permet de déterminer la concentration des polyphénols, en se référant à une courbe étalon établie à partir d'une série de solutions standards de l'acide gallique traitées au réactif Folin-Ciocalteu (0.002-0.016mg/l) figure 1.

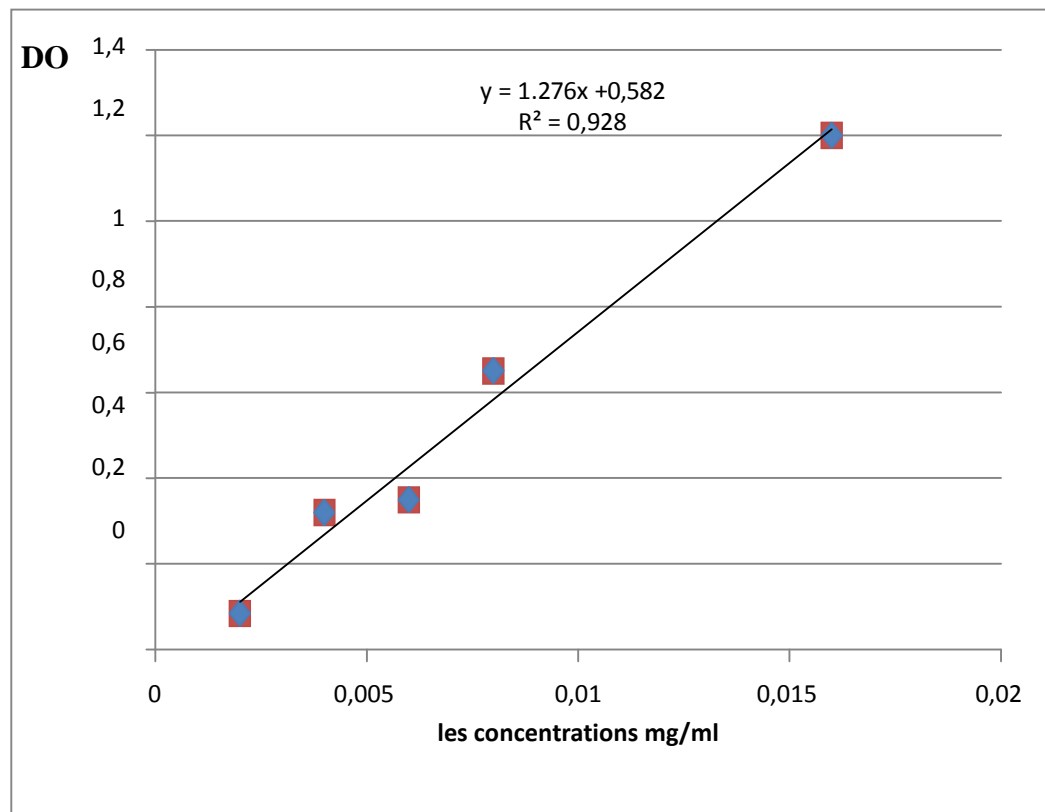


Fig.1. courbe d'étalonnage de l'acide gallique

2.4.4. Dosage des flavonoïdes des margines étudiées par la méthode du trichlorure d'aluminium

Les flavonoïdes d'extrait poly phénolique des margines chemlal et souidi ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium [15]; 1ml des extraits a été ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2%), dans le méthanol. Après 10 minutes d'incubation, l'absorption a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine à différentes concentration (10-45 mg/l) (figure 2). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligrammes équivalent à la quercétine par millilitre d'extrait (mg EQ/ mlE).

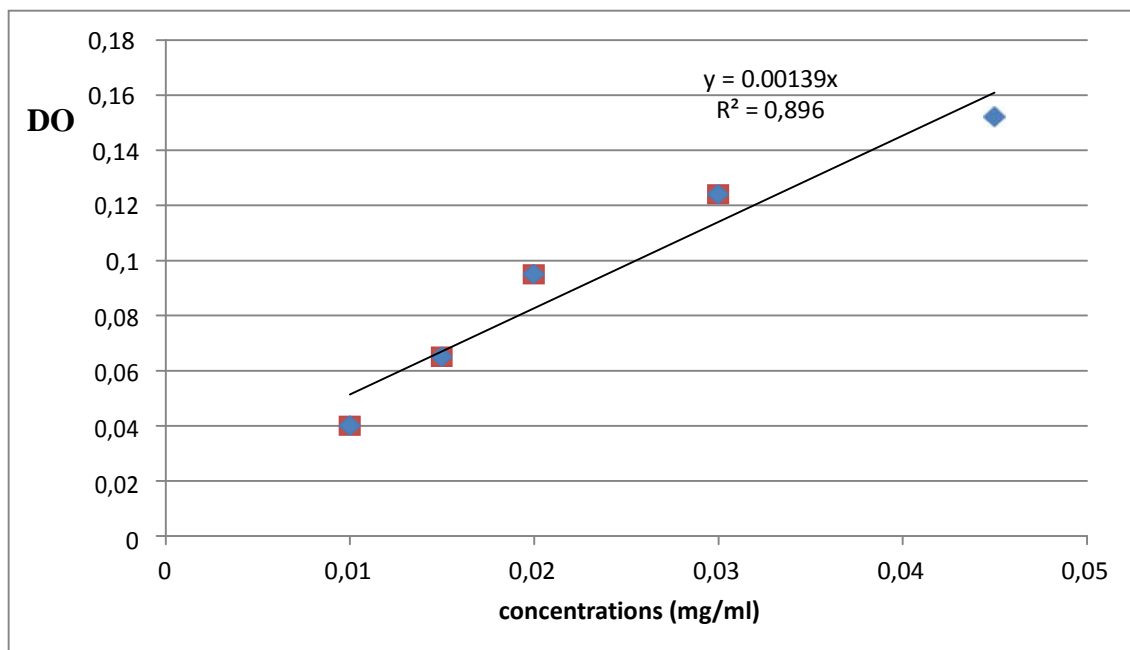


Fig.2. courbe d'étalonnage de la quercitrine

2.5. Evaluation de l'activité anticoagulante *in vitro*

L'activité anti coagulante des polyphénols des margines de deux variétés (Souidi et Chemlal) a été évaluée *in vitro* en adaptant la méthode Rizzo et al. (2008) [16] vis-à-vis la voie exogène et la voie endogène, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests globales et chronométriques, le temps de Quick (TQ) ou il est nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK). Le temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante de l'extrait testé [17].

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans le DMSO a été utilisé comme contrôle positif.

2.5.1. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène des margines étudiées

Un pool de plasmas déplaquetté constitué d'un mélange de plasma de 10 volontaires sains non traités à moyen d'âge (25 ans) dont les TCK les TQ sont normaux. L'activité des extraits phénoliques est établie sur un volume de 100 μ l dont le plasma est de 90 μ l est mélangé avec 10 μ l d'extraits. Après 15 min d'incubation à 37°C, 100 μ l céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100 μ l de chlorure de calcium (0,025 M) préchauffé. En parallèle, un contrôle positif de Lovenox et un test contrôle

négatif (substitution des échantillons par une solution de NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions. Un allongement du TCK en présence des polyphénols par rapport au contrôle indique un effet anticoagulant au niveau de cette voie.

2.5.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène des margines étudiées

Cette activité consiste à mesurer le temps de coagulation du plasma citraté en présence d'un excès de thromboplastine calcique [18]. En utilisant un plasma pauvre en plaquettes en présence de thromboplastine calcique (mélange de facteur tissulaire et des phospholipides), selon le protocole décrit par Wang et al. (2010) [19]

100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec les extraits phénoliques (90 et 10 µl par ordre). Après 15 min. d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionnée au mélange et le temps de coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre.

2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des données relatives aux divers paramètres physicochimiques mesurés et dosages a été réalisée par le logiciel SAS (9.3.1). L'ensemble des mesures a fait l'objet d'une analyse de la variance à un seul facteur pour vérifier au seuil de risque 5%.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Caractéristiques physicochimiques des margines étudiées

L'analyse de variance des paramètres physicochimiques mesurés des margines issues des variétés Souidi de Chechar et Chemlal de Baghai de la région de Khenchela (tableau 1) a montré qu'il n'y a pas une différence significative entre les deux types de margines en ce qui concerne le pH ($p = 0.2401$), la matière sèche (MS) ($p = 0.0705$), l'humidité (H) ($p = 0.2879$), Solide total en suspension (STS) ($p = 0.7512$), la teneur en matière minérale (MM) ($p = 0.7477$) et la matière organique (MO) ($p = 0.744$). Par contre l'ANOVA montre qu'il y a des différences très hautement significatives entre ces deux types en ce qui concerne la conductivité électrique (CE) ($p < 0.0001$) et aussi des différences significatives en ce qui concerne la salinité ($p = 0.0139$) et la matière organique (MO) ($p = 0.0307$).

Tableau 1. Carré moyen de l'analyse de variance de l'effet type des margines sur les paramètres morpho-physiologiques des margines issues des variétés Souidi de Chechar et Chemlal de Baghai

Source de variation	ddl	pH	CE	Salinité	MS	H	MO	MM	STS
effet des margines	1	0.0096 ^{ns}	2.6136 ^{***}	2.535 [*]	6.00 ^{ns}	6.00 ^{ns}	5.415 [*]	0.060 ^{ns}	0.0006 ^{ns}
Erreur	4	0.00505	0.0058	0.145	1.00	4.00	0.505	0.505	0.0052

ns:non significatif *** : très hautement significatif. * : significatif

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des margines issues des variétés Souidi de Chechar et Chemlal de Baghai

Paramètres	Margines I (Chemlal de Baghai)	Margines II (Souidi de Chechar)
Couleur	Marron	Verte
pH	(5.10 ± 0.01)	(5.02 ± 0.01)
CE (mS/cm)	(3.44 ± 0.02)b	(4.76 ± 0.01)a
Salinité	(1,5 ± 0.08) b	(2,8 ± 0.01)a
MS (g)	(7 ± 0.6)	(5 ± 0.5)
H (%)	(95 ± 0.7)	(93 ± 0.9)
STS	(0,90 ± 0.01)	(0,88 ± 0.01)
MO(%)	(14 ± 0.6)a	(12.1 ± 0.4)b
MM%	(1.8 ± 0.03)	(2 ± 0.02)

MS : matière sèche, CE : conductivité électrique, MO : matière organique, H : humidité, STS : solide total en suspension, MM : matière minérale, a, b : les groupes homogènes

D'après les résultats présentés dans le tableau 2, les margines étudiées montrent qu'elles sont acides (pH entre 5.10 et 5.02) en raison de la présence des acides organiques (acides phénolique, acides gras), ces valeurs sont comparables avec ceux de la littérature (pH = 4,2 - 5,9) [4], elles sont salines (1,5 ± 0.08 et 2,8 ± 0.01 pour chemlal et souidi respectivement), cette salinité est due principalement à la présence des ions potassium, chlorures, calcium et magnésium [20]. Ces margines aussi sont riches en eau (95 ± 0.7 et 93 ± 0.9%), en matière organique (14 ± 0.6 et 12.1 ± 0.4%) et minérale (1.8 ± 0.03 et 2 ± 0.02 %) pour chemlal et

souidi respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles enregistrées dans plusieurs travaux [1,2,12]. Elles sont résultées principalement des différents débris solides de la trituration (grignons, membranes des pulpes d'olives). Les taux d'humidité élevés des margines (entre 93% et 95%) peuvent s'expliquer par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part et d'autre part par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive. Les variations des teneurs observées peuvent être dues à la différence du degré de maturité des olives avant trituration (récolte précoce des olives), à la variété cultivée et à la zone géographique [21].

3.2. Dosage des composés phénoliques

3.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats de l'ANOVA ont présenté qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types des margines testés ($p = 0.0808$) (tableau 3).

Tableau 3. Analyse de la variance de l'effet des types de margines issues des variétés Souidi de Chechar et Chemlal de Baghai sur la teneur en poly phénols

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Type de margines	1	0.135	0.135	5.40	0.0808
Erreur	4	0.100	0.0250		
Total corrigé	5	0.235			

Le taux de polyphénols a été déterminé par de nombreux chercheurs, elle est de l'ordre de 4g/l dans les extraits des polyphénols non protéique des plantes [22].

Ces valeurs sont plus élevées par rapport à celles enregistrées dans notre étude ($0,8 \pm 0.02$) mg EAG/mlE pour Souidi et ($0,5 \pm 0.01$) mgEAG/mlE pour Chemlal et qui sont rapprochées aux valeurs trouvées [22-24].

Au vu de ces données, le profil polyphénolique des olives peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, le degré de maturation (l'olive vert possède plus de polyphénols que l'olive noire) [25] et le solvant d'extraction [26].

3.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage en flavonoïde exprimé en mg équivalent à la quercétine par ml d'extrait des

margines de Souidi et Chemlal a permis d'enregistrer des teneurs de (0.065 ± 0.001) et de (0.056 ± 0.005) mg EQ/mlE respectivement dont les résultats de l'ANOVA ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types des margines testés en ce qui concerne la teneur en flavonoïdes ($p = 0.0808$) (tableau 4).

Tableau 4. Analyse de la variance de l'effet des types de margines issues des variétés Souidi de Chechar et Chemlal de Baghai sur la teneur en flavonoïdes

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Type de margines	1	0.0001215	0.0001215	6.08	0.0693
Erreur	4	0.00008	0.00002		
Total corrigé	5	0.0002015			

Les études dans la littérature concernant la quantification des composés phénoliques des olives peut être facilement rencontrée lorsqu'il s'agit de leur contenu dans l'huile, mais elle est moins déclarée dans les margines. Il est bien admis que les margines "liquides" contiennent 53% des composés phénoliques qui sont initialement présentées dans les olives (2% seulement dans l'huile et environ 45% dans les grignons secs) [27].

3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante des extraits des poly phénols des margines

3.3.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (le facteur VII) et la voie commune (les facteurs X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de la voie exogène [28]. Les résultats de la voie exogène sont présentés dans la figure 3.

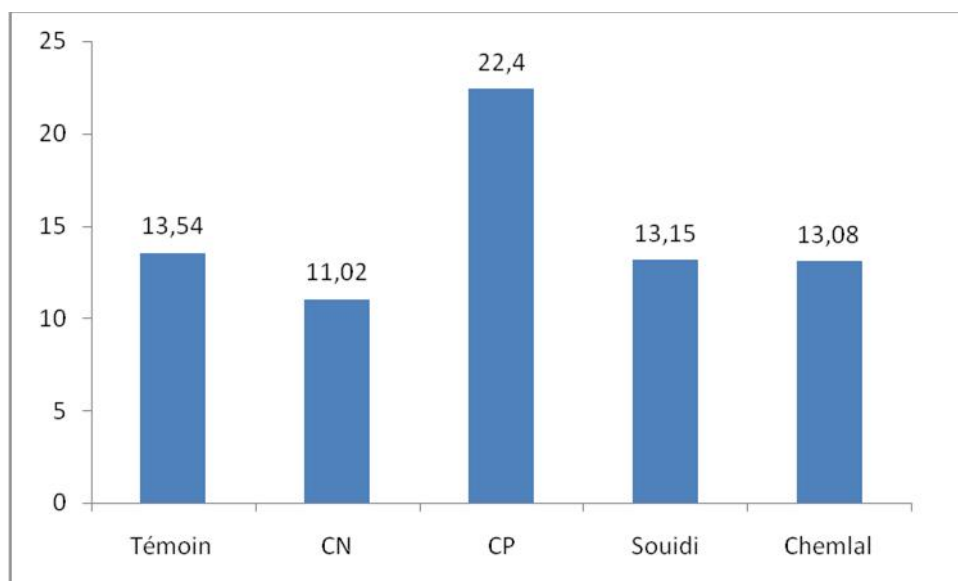


Fig.3. l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène des margines testées
(CN : contrôle négatif, CP : contrôle ossitif)

D'après la figure 3, on note que les polyphénols des margines testées donnent des TQ égaux à 13,15s pour Souidi et 13,08s pour Chemlal, et qui sont un peu supérieurs à celui du contrôle négatif (11,02s) et proches du témoin (13,54s). Donc, les extraits testés n'ont pas une grande activité anticoagulante remarquable vis-à-vis de la voie exogène. Les résultats de Pawlaczyk *et al* (2011) [28] qui ont montré que l'activité anticoagulante est due aux parties aglycones des polyphénols.

3.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène est réalisée à l'aide du test de temps de céphaline kaolin (TCK). Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vitro*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquent l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine [29]. Les résultats sont représentés dans la figure 4.

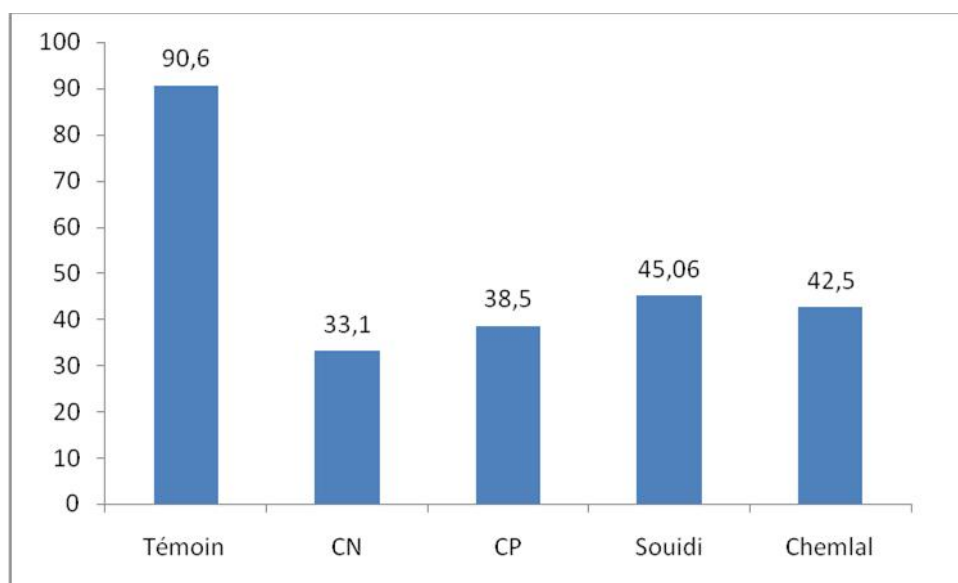


Fig.4. l'activité anticoagulante des margines testées vis-à-vis de la voie endogène.

(CN : contrôle négatif, CP : contrôle ossitif)

A partir de la figure 4, des valeurs à l'ordre de 45,06 s et 42,5 s pour le TCK des extraits des margines de souidi et chemlal respectivement ont été enregistrées par rapport à celui de CN à 33,1 s et de CP à 38,5 s. Donc, les extraits testés ont une bonne activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

Discussion

L'évaluation de l'effet anticoagulant des l'extraits poly phénoliques des margines des variétés souidi et chemlal de la région de kenchela à l'aide des deux tests (TQ, TCK) ont montré que l'extrait des margines de souidi a une activité anticoagulante importante vis-à-vis la voie endogène et plus moins par la voie exogène par apport aux CP et aux CN.

Plusieurs travaux effectués sur les plantes médicinales ont montrés que les conditions climatiques, l'origine géographique et le mode d'extraction peuvent affecter la quantité et la composition en métabolites secondaires et par conséquent les activités biologiques [30,31].

4. CONCLUSION

Les margines d'olives de la wilaya de kenchela possèdent d'innombrables propriétés physicochimiques et biologiques parmi lesquelles l'activité anticoagulante étudiée dans ce travail en donnant des résultats préliminaires très intéressants qui nécessite des études

complémentaires approfondies. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées:

- ✓ Evaluation *in vivo* des activités anticoagulante et antiplaquettaire des extraits phénoliques des margines d'olive.
- ✓ Application des tests spécifiques pour l'estimation de l'activité anticoagulante par ciblage des facteurs clés de la coagulation : FII (thrombine) et FX(prothrombine).
- ✓ Purification des polyphénols et détermination de leurs activités anticoagulante séparément et combinés pour faire ressortir l'effet synergique entre ces molécules.

5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Fiorentino A, Gentili A, Isidori M, Monaco P, Nardelli A, Parrella A, Temussi F. Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51: 1005–1009.
- [2] Fezzni B, Ben Cheikharticle R. Extention of the biodegradation odel N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. 162:1563-1570.
- [3] El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chimistry* .2012. 132: 406-412.
- [4] Hamdi M. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry Biotechnoogyl*, 1992. 37 : 155.
- [5] Pauwels J, Van Ranst E, Verloo M, Mvondo A. Manuel d'Analyses de sols et de plantes. Equipements, Gestion de stocks, de verrerie et produits chimiques. *Publications agricoles-28*, AGCD, Bruxelles, Belgique. 1992. 265 p.
- [6] Rodier J. Legube B. Merlet N. L'analyse de l'eau 9éme Ed., *DUNOD. Paris*. 2009. 1525p.
- [7] Lesage-Meessen L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot J-C, Lorquin J, Delattre M. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemestry*, 2001. 75,501-507.
- [8] Gortzi O, Lalas S, Chinou I. J, saknis T. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity

of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol*, 2008. 226. pp: 583-590

[9] De Marco E, Savarese M, Paduano A, & Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 2007. 104(2), 858-867.

[10] Sayadi S, Allouche N, Jaoua M, Aloui F. Detrimental effects of high molecular mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*. 2000. p35.

[11] Greco G. J. R, Toscano G, Cioffi M, Gianfreda L, Sannino F. Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water. Research*, 1999. p:43.

[12] Della Greca M, Previtera L, Temessi F, Carrelli A. Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis diagnostic pratique (2^{ème} éd)*, Expansion Scientifique Francaise (Paris), 2004. p :45.

[13] Catalano L, Franco I, De Nobili M, Leita L. Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparaison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*, 1999. p :46.

[14] Lafka T.I, Sinanoglou V, Lazos E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 2007. p : 46.

[15] Bahorun T. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from nawthern fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzncimforsch drug Rescarch*. 1996. P : 49,50,55

[16] Rizzo F, Papisoulitis K, Crawford E, Dodkin S, Cue S. Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. *Research in Veterinary Science*, 2008. 85: 166-170.

[17] Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri F. F, Galli C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. p:45.

[18] Croizat P, Favre-Gilly J, Thouverez J.P. Hémostase et coagulation (techniques usuelles). *Ed. Tourelle, Saint-Mandé*, 1968. pp: 97-118.

-
- [19] Wang J, Zhanga Q, Zhang Z, Songa H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010. 46: 6-12.
- [20] Benyahia N., Zein K. Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solution. Lausanne, Suisse. (2003).
- [21] García-Gómez A, Roig A, Bernal M. P. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 2003. p :56.
- [22] Fki I, Bouaziz M, Sahnoun S, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of Flammarion. *Médecine-Sciences*. 2005. p :6-59.
- [23] Zaidi F, Hassissene N, Allouache H, Kichou M, Ourdani S, Rezki K, Bellal M. M, Grongnet J.F., Youyou A. Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Médecine Vétérinaire*. Vol.160, N°2, 2009. Pp :67-73.
- [24] Mouzaoui K, Yazzag L, Moulti-mati F. Composés phenoliques des grignons d'olive provenant d'huileries traditionnelle et moderne: essai de purification de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol. *Sciences et technologie C*. N°40. 2014. pp : 9-15.
- [25] Ryan D, Robards K, Lavee S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 1999. 34 : 265–274.
- [26] Mylonaki S, Kiassos E, Makris D.P, & Kefalas P. Optimization of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chemistry*, Vol.392,N°5, 2008. pp.977-985.
- [27] Obied H, Prenzler P, Robards K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Elsevier B.V. 03-058*. olive-mill waste-waters. *Process Biochemistry*, 2008. 41 : 398–404.
- [28] Pawlaczyk I, Czerchawski L, Kuliczkowski W, Karolko B, Pilecki W, Witkiewicz W, Gancarz R. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thrombosis Research*, 2011. 127: 328-340.
- [29] Renné T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for

thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2006. 36: 148-151.

[30] Hsieh, C.L, Lin, Y.C, Yen, G.C, Chen, H.Y. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against -dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. *Food Chemistry*, 2007. 103: 528-535.

[31] AitBaddi C, Cegarra J, Merlina G, Revel J.C, & Hafidi M. Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of anolive-mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardious Materials*, Vol.165, N°1, 2009,pp.1119-112

How to cite this article:

Kadi K, Mrah R, Hamli S, Lekmine S, Dib D, Addad D, Boukeria S, Gueboudji Z, Hafsaoui I. Evaluation of the anticoagulant activity of margins from olives extraction in the khenchela region. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2020, 12(2), 634-649.