

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :
M^{elle} LAINCER Firdousse

Thème

**Etude de l'activité antioxydante et
antibactérienne des extraits phénoliques de
variétés d'huiles d'olive algériennes**

Devant le jury :

Président : M^r. BENALLAOUA S.

(Pr. Université de Bejaia)

Promoteur : M^r. TAMENDJARI A.

(M.C. Université de Bejaia)

Invitée : M^{me}. LEHOUCHE R.

(M.A. Université de Bejaia)

Examineurs : M^{me}. BEDJOU F.

(M.C. Université de Bejaia)

M^r. IGUEROUADA M.

(Pr. Université de Bejaia)

Année 2010

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

J'exprime mes vifs remerciements au Docteur TAMANDJARI .A, qui a bien voulu superviser ce travail mais surtout pour la liberté qu'il m'a accordé tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Je ne saurai le remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail. Je lui dois beaucoup pour la confiance qu'il m'a témoigné et pour les encouragements et les conseils qu'il m'a prodigué.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Mme R. LEHOUCHE, mon co-encadreur, pour toute l'aide qu'elle m'a apporté mais aussi pour sa disponibilité et son écoute. Il m'est agréable de lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

J'exprime mes sincères gratitudes, à Mr. le Professeur S. BENALLAOUA pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail. J'adresse mes remerciements à l'égard de Mme. le Docteur F. BEDJOU et Mr. le Professeur M. IGUER-OUADA qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Mrs. Les enseignants Mr. BEKDOUCHE et Mr. SAHNOUNE, qui nous ont fait profiter de leurs conseils en statistiques.

J'aimerais remercier aussi Mr. SEBAI, le directeur de l'I.T.A.F.V. de Takerietz, pour son accueil et d'avoir accepté de nous fournir les échantillons. Ainsi que Melle. S. KECIRI pour son aide précieuse et sa disponibilité. Et que tout le personnel de l'I.T.A.F.V. trouve ici mes remerciements les plus sincères.

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de CEVITAL. Particulièrement Mme. D. TERKI et Mr. BAHIRENE.

J'associe mes remerciements aux membres du laboratoire de Biochimie, Mme. S. TAMENDJARI., Melle A. AIDLI., Melle L. DEFLAOUI, ainsi qu'aux techniciens et ingénieurs des laboratoires de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mr. F. AMROUCHE, Mme. N. KHERBACHI, Mme. N. ADJAOU, Melle A. OUATAH.

Je souligne ma reconnaissance aux enseignants Mr Belhadi J., M^{lle} Bendali F., M^{lle} Ayouni K., pour leur aide, leurs précieux conseils, leur gentillesse et leur disponibilité.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui m'ont encouragé et soutenu à tout moment.

Liste des abréviations

A.G.I : Acides Gras Insaturés.

3,4-DHPEA : Hydroxytyrosol.

3,4-DHPEA-EDA : Décarboxyméthyl
oleuropéine aglycone.

A.G.S : Acides Gras Saturés

ABTS : Acide 2,2'-azobis (3
enthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ANOVA: Analysis Of Variance.

ARN :Acide ribonucléique.

ATP: Adénosine triphosphate.

B. subtilis: *Bacillus subtilis*.

CE : Commission Européenne.

CEE : Communauté Economique
Européenne.

CLIP : Collection *Listeria* Institut Pasteur.

CMB : Concentration minimale
bactericide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

COI : Conseil Oléicole International.

COL : Colorimétriques.

DPPH : 2,2-DiPhényl-1 PicrylHydrazyl.

DO : Densité optique.

E.A.C : Equivalent en Acide caféique.

E.A.G : Equivalent en Acide Gallique.

E.coli : *Escherichia coli*.

IC50 : Concentration efficace pour inhiber
50 % du radical DPPH.

HPLC : High-Performance Liquid
Chromatography (chromatographie liquide
à hauteperformance).

I.T.A.F.V : Institut Technique de
l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.

K.pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*.

L. innocua: *Listeria innocua*.

LMA : Laboratoire de Microbiologie
Appliquée.

OH° : Radical hydroxyl.

OOL : dioléolinoléine.

OOO : trioléine.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

PAL : L-phénylalanine ammonia lyase.

PCA: plate count agar.

p-HPEA : Tyrosol.

p-HPEA-EA : Ligstroside aglycone.

p-HPEA-EDA : Décarboxyméthyl
ligstroside aglycon.

POL : palmitooléolinoléine.

POO : dioléopalmitine.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

UFC/gss : unités formant colonies.

UV : UltraViolet.

Liste des figures

Figure 1 :	Coupe longitudinale de l'olive.....	3
Figure 2 :	Mécanisme antioxydant de l'hydroxytyrosol par donation d'hydrogène.	20
Figure 3 :	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété <i>Bouricha</i>	42
Figure 4 :	Acidité des différents échantillons d'huiles.....	44
Figure 5 :	Indice de peroxyde des différents échantillons d'huiles.....	46
Figure 6 :	Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm des différents échantillons d'huiles.....	47
Figure 7 :	Coefficient d'extinction spécifique à 232 nm des différents échantillons d'huiles.....	48
Figure 8 :	Teneurs en polyphénols totaux des différents échantillons d'huiles.....	52
Figure 9 :	Teneurs en <i>ortho</i> -diphénols des différents échantillons d'huiles.....	54
Figure 10 :	Teneur en tyrosol et hydroxytyrosol des différents échantillons d'huiles...	58
Figure 11 :	Teneur en flavonoïdes des différents échantillons d'huiles.....	60
Figure 12 :	Pouvoir réducteur des extraits des différents échantillons d'huiles.....	61
Figure 13 :	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des différents échantillons d'huiles.....	63
Figure 14 :	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS des extraits des différents échantillons d'huiles.....	64
Figure 15 :	Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits des différents échantillons d'huiles.....	66
Figure 16 :	Activité des extraits sur <i>S. aureus</i>	68
Figure 17 :	Activité des extraits vis-à-vis <i>B. subtilis</i>	71
Figure 18 :	Activité de extrait <i>Bouricha</i> A) vis-à-vis <i>E. coli</i> , B) vis-à-vis <i>L. innocua</i> , C) vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> à différents concentrations.....	72
Figure 19 :	L'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété <i>Bouricha</i>	78

Annexe 2

Figure 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques.

Figure 2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des *Ortho*-diphénols.

Figure 3 : Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur.

Annexe 5

Figure 4 : Chromatogramme type des esters méthyliques des acides gras d'une huile d'olive.

Liste des tableaux

Tableau I :	Les différentes catégories d'huile d'olive et leurs critères de qualité.....	7
Tableau II :	Composition de l'huile d'olive en acides gras.....	9
Tableau III :	Structures chimiques des acides phénoliques présents dans l'huile d'olive.....	13
Tableau IV :	Structures chimiques des secoiridoïdes présents dans l'huile d'olive.....	14
Tableau V :	Structures chimiques des alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive.....	15
Tableau VI :	Structures chimiques des flavonoïdes présents dans l'huile d'olive.....	16
Tableau VII :	Structures chimiques des lignanes présents dans l'huile d'olive.....	17
Tableau VIII :	Structures chimiques des hydroxy-isochromanes présent dans l'huile d'olive.....	17
Tableau IX :	Caractéristiques des variétés d'olives.....	29
Tableau X :	Valeurs de l'indice de maturité des olives.....	43
Tableau XI :	Valeurs moyennes des acides gras totaux des huiles des variétés (en % des acides gras totaux).....	50
Tableau XII :	Teneurs des composés phénoliques individuelles, polyphénols totaux déterminées par HPLC et par méthode colorimétrique et polyphénols oxydés des huiles des variétés.....	56
Tableau XIII :	Détermination des IC ₅₀ des différents extraits des échantillons d'huiles...	65
Tableau XIV :	Activité antibactérienne des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive.....	69-70
Tableau XV :	Activité antibactérienne de quelques composés phénolique purs.....	74
Tableau XVI :	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide (CMB) des extraits méthanoliques des différentes variétés d'huile d'olive.....	76

Annexe 1

Tableau I :	Composition en polyphénols individuels de quelques variétés d'huile d'olive vierge d'origines différente (mg/kg).
--------------------	---

Annexe 3

Tableau II : Gamme de concentrations réalisées pour la détermination de la CMI et CMB.

Tableau III : Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log UFC/ml) en culture pure et en présence d'extrait méthanolique de la variété *Bouricha*.

Annexe 4

Tableau IV(a,b,c) : Coefficients de corrélation.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Olive et huile d'olive

I.1	L'olive.....	3
I.2	L'huile d'olive.....	4
I.2.1	Technologie d'élaboration de l'huile d'olive.....	4
1.2.1.1	Récolte des olives.....	4
1.2.1.2	Stockage des olives.....	4
1.2.1.3	Effeuilage et lavage.....	5
1.2.1.4	Broyage.....	5
1.2.1.5	Malaxage.....	5
1.2.1.6	Extraction de l'huile.....	6
1.2.2	Classification et composition de l'huile d'olive.....	7
1.2.2.1	Catégories d'huiles d'olives.....	7
1.2.2.2	Composition de l'huile d'olive.....	8
1.2.2.2.1	La fraction saponifiable.....	8
1.2.2.2.2	La fraction insaponifiable.....	9

II. Composés phénoliques de l'huile d'olive

II.1	Classification et structure chimique.....	12
II.1.1	Les acides phénoliques.....	12
II.1.2	Les secoiridoïdes.....	13
II.1.3	Les alcools phénoliques.....	15
II.1.4	Les flavonoïdes.....	16
II.1.5	Les lignanes.....	16

II.1.6	Les hydroxy-isochromanes.....	17
II.2	Polyphénols et stabilité de l'huile d'olive.....	18
II.3	Propriétés biologiques des polyphénols.....	18
II.3.1	Propriétés antioxydante.....	18
II.3.1.1	Effet scavenger.....	19
II.3.1.2	Chélation des ions métalliques.....	20
II.3.1.3	Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres	21
II.3.2	Propriétés antibactériennes.....	21
II.3.2.1	Action sur la membrane cytoplasmique.....	22
II.3.2.2	Action sur les enzymes.....	22
II.4	Facteurs influençant les polyphénols de l'huile d'olive	23
II.4.1	Effet de la variété.....	23
II.4.2	Effet des conditions climatiques et pratiques culturelles	23
II.4.3	Effet de l'état sanitaire des olives.....	24
II.4.4	Effet du stockage des olives.....	24
II.4.5	Effet de la maturation des olives.....	24
II.4.6	Effet des facteurs technologiques.....	25
II.4.7	Effet du stockage de l'huile.....	27

Partie expérimentale

I. Matériel et méthode

I.1	Matériel végétal.....	28
I.1.1	Récolte et date des prélèvements.....	28
I.1.2	Indice de maturité.....	28
I.1.3	Extraction de l'huile.....	30
I.2	Détermination des indices de qualité de l'huile d'olive.....	30
I.2.1	Acidité.....	30
I.2.2	Indice de peroxyde.....	31
I.2.3	Absorbance spécifique dans l'Ultraviolet.....	32
I.3	Composition en acides gras des huiles.....	32
I.4	Extraction des composés phénoliques.....	33

I.5	Dosages des polyphénols.....	34
I.5.1	Dosage des polyphénols totaux.....	34
I.5.2	Dosage des <i>ortho</i> -diphénols.....	34
I.6	Détermination des phénols des huiles d'olive par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	34
I.7	Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques.....	35
I.7.1	Pouvoir réducteur.....	35
I.7.2	Activité scavenger du radical DPPH	35
I.7.3	Activité scavenger du radical ABTS	36
I.7.4	Détermination de l'activité scavenging du peroxyde d'hydrogène.....	37
I.8	Détermination de l'activité antibactérienne	38
I.8.1	Standardisation des inocula bactériens	38
I.8.2	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques.....	39
I.8.2.1	Diffusion sur milieu gélosé	39
I.8.2.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactericides (CMB) sur milieu solide	40
I.8.2.3	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence de l'extrait de la variété <i>Bouricha</i>	41
I.9	Etude statistique.....	41

II : Résultats et discussion

II.1	Indice de maturité	43
II.2	Indices de qualité de l'huile d'olive	44
II.2.1	Acidité	44
II.2.2	Indice de peroxyde	45
II.2.3	Absorbance dans l'ultraviolet	46
II.3	Composition en acides gras des huiles	49
II.4	Dosages colorimétriques des composés phénoliques	51
II.4.1	Dosage des polyphénols totaux.....	51
II.4.2	Dosage des <i>ortho</i> -diphénols.....	53
II.5	Détermination des phénols des huiles d'olives par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	54
II.6	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanolique.....	61
II.6.1	Pouvoir réducteur.....	61

II.6.2	Activité scavenger du radical DPPH.....	62
II.6.3	Activité scavenger du radical ABTS	64
II.6.4	Activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène.....	66
II.7	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	67
II.7.1	Evaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur milieu gélosé.....	67
II.7.1.1	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques.....	68
II.7.1.2	Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs.....	74
II.7.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	75
II.7.3	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence de l'extrait de la variété <i>Bouricha</i>	77
<hr/>		
Conclusion.....		80
<hr/>		
Références bibliographiques.....		83
<hr/>		

Glossaire

Annexes

Introduction

Introduction

L'olivier, arbre typiquement méditerranéen, se caractérise par un fruit, l'olive, à partir duquel on extrait de l'huile, celle-ci est considérée comme étant un composant essentiel du régime méditerranéen. Depuis les temps les plus anciens, l'huile d'olive est privilégiée pour ses effets bénéfiques sur la santé (Ghedira, 2008).

La production mondiale de l'huile d'olive a atteint 2665000 tonnes pour la campagne 2008/09 sur une surface oleicole d'environ 10.492.000 hectares (COI 2009). Plus de 98% de cette production se trouve localisée dans le Bassin Méditerranéen. L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à la culture de l'olivier. La production algérienne en huile d'olive est d'environ 39800 tonnes (moyenne des cinq dernières campagnes), ce qui représente 1,4% de la production mondiale. Avec 4 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 50 578 ha, Bejaia est la première région oleicole d'Algérie. La production d'huile d'olive pour la campagne 2008/2009 est estimée à 191354hl.

L'huile d'olive est riche en acides gras monoinsaturés, principalement, l'acide oléique (Visioli *et al.*, 2002). Extraite directement à partir du fruit par des procédés mécaniques (Perrin, 1992), elle conserve un grand nombre de ses substances, antioxydants et vitamines, qui lui confèrent une valeur nutritionnelle importante (Jacotot, 1996 et Ollivier *et al.*, 2004). Plusieurs études épidémiologiques et cliniques confirment le rôle incontestable de la consommation régulière de l'huile d'olive dans la réduction du risque des cancers et des maladies chroniques, notamment les affections cardiovasculaires (Cicerale *et al.*, 2009).

Le consommateur se montre de plus en plus exigeant en terme de qualité, sécurité alimentaire et aspect nutritionnel, il tend à rejeter tous les additifs alimentaires y compris les antioxydants synthétiques qui sont suspectés d'effets toxiques, sensibilisants, allergènes et cancérigènes. Néanmoins, il a une préférence pour tout ce qui est naturel. L'huile d'olive largement appréciée auprès des consommateurs renferme des quantités notables en polyphénols (Perrin, 1992), l'intérêt pour ces molécules a pris un essor considérable au cours de ces dernières années (Manach *et al.*, 2004). Elles interviennent dans la lutte contre le stress oxydant impliqué dans l'induction de diverses pathologies (Huang et Sumpio, 2008)

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. De nombreux cas de bactéries multirésistantes sont rapportés en Algérie (Bouzenoune *et al.*, 2009),

pour cela le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ce phénomène. La consommation de l'huile d'olive pourrait aussi bien être un alicament, un moyen de prévention et de réduction du risque d'exposition aux maladies. Dans ce contexte nous avons entrepris ce présent travail dans le but de caractériser l'huile d'olive issue de onze variétés algériennes et d'évaluer l'activité biologique de leurs extraits phénoliques, à savoir l'activité antibactérienne et antioxydante.

La première partie de ce travail est consacrée à une synthèse bibliographique, décrivant la composition chimique et les principales classes de composés phénoliques présente dans l'huile d'olive ainsi qu'un aperçu des différents facteurs qui peuvent influencer leurs teneurs.

La partie expérimentale est consacrée à la détermination des indices de qualité de l'huile d'olive, la composition en acides gras, le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et *ortho*-diphénols), l'identification des composés phénoliques individuels par HPLC ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques des différentes variétés d'huile d'olives.

*Synthèse
bibliographique*

I. L'olive et l'huile d'olive

I.1. L'olive

L'olive est le fruit de l'olivier, c'est une drupe globuleuse à ellipsoïde (0,5 à 4 cm×0,5 à 2,5 cm) pesant de 2 à 12g (Van der Vossen et Mkamilo, 2007).

Récoltée au stade de maturité optimal, une olive renferme en plus de l'eau (50%) diverses substances : huile (22%), sucres (19,1%), cellulose (5,8%), protéines (1,6%), sels minéraux (1,5%) (Zarrouk *et al.*, 1996; Boskou, 2006a).

L'olive peut être conçue comme étant un système polyphasé (figure 1), chacun d'eux doté d'une structure spécifique (Cortesi *et al.*, 2000). En partant de la partie la plus extérieure du fruit, on retrouve :

a) L'épicarpe :

Représente la fine couche externe de l'olive, il constitue 1 à 3 % du poids du fruit. La peau est de couleur verte au début de la maturation due à l'accumulation de la chlorophylle et varie vers le rose violacé, violet et noir à pleine maturité. Ces variations de couleur sont liées à la composition en pigments dans le fruit (Bianchi, 2003; Van der Vossen et Mkamilo, 2007).

b) Le mésocarpe :

Représente 70 à 80 % du poids du fruit, il renferme la plus grande partie d'huile (96 à 98 %) qui se trouve sous forme libre dans des vacuoles et sous forme liée à l'intérieur du cytoplasme (Bianchi, 2003; Boskou, 2006a).

c) L'endocarpe :

Caractéristique de la variété, il représente 18 à 22 % du poids du fruit et contient généralement une graine de forme ellipsoïde de 9 à 11mm avec un embryon (Bianchi, 2003; Van der Vossen et Mkamilo, 2007).

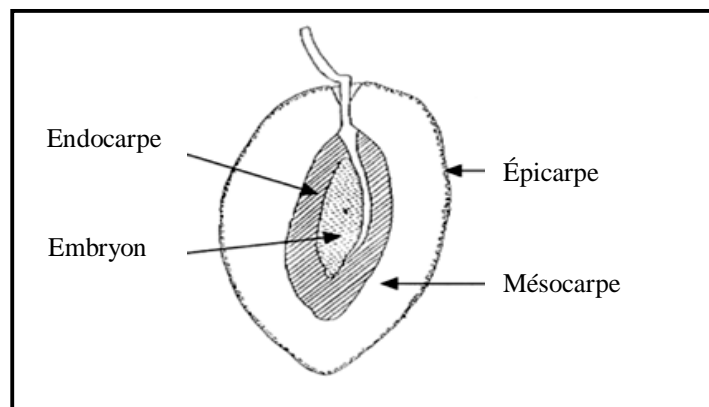


Figure 1 : Coupe longitudinale de l'olive (Bianchi, 2003).

1.2 L'huile d'olive

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

1.2.1 Technologie d'élaboration de l'huile d'olive

L'élaboration de l'huile d'olive vierge comprend une série de processus mécaniques et / ou physiques ayant pour objectif fondamental de séparer le jus huileux de l'ensemble des produits présents dans la masse d'olive triturée (Alba Mendoza, 1999).

1.2.1.1 La récolte des olives

La qualité de l'huile d'olive peut être affectée par les modalités de récolte (Di Giovacchino, 1999). L'idéal serait d'effectuer la récolte des olives à une époque telle à permettre de tirer le rendement maximal à l'extraction et à assurer les meilleures caractéristiques qualitatives de l'huile produite (Sanchez Casa *et al.*, 1999; Petrakis, 2006).

Les opérations de récolte devraient être achevées avant que la chute naturelle des fruits ne s'intensifie (Çavusoglu et Oktar, 1994), les olives une fois tombées de l'arbre sont exposées à des processus chimiques et biochimiques qui peuvent contribuer à la détérioration de l'huile, il est donc nécessaire de récolter les olives sur l'arbre, à la main ou à l'aide de moyens mécaniques (Michelakis, 1992; Metzidakis *et al.*, 1995; Di Giovacchino *et al.*, 2002).

1.2.1.2 Stockage des olives

La cueillette terminée, les olives devraient être transportées immédiatement au moulin afin de préserver leur qualité, dans des conditions assurant les moindres dégâts et altérations des fruits. Les olives abimées ou blessées peuvent subir une oxydation en présence de l'air ce qui réduit la qualité de l'huile produite (Çavusoglu et Oktar, 1994; Di Giovacchino, 1999; Chimi, 2001).

Le transport est réalisé dans des cagettes en plastique ou en bois, il est préférable de recourir à un type d'emballage rigide assurant l'aération des fruits ce qui évite le déclenchement du processus de fermentation provoqué par le réchauffement des fruits (Çavusoglu et Oktar, 1994).

1.2.1.3 Effeuilage et lavage

L'opération d'effeuillage est réalisée par l'application d'un courant d'air aux fruits au fur et à mesure de leur passage (Di Giovacchino, 1991; Uceda *et al.*, 2006). La présence des feuilles lors de la trituration des olives entraîne une amertume et une couleur verdâtre de l'huile, qui est due à la présence de pigments chlorophylliens (Di Giovacchino, 1991; Chimi, 2001).

Le lavage a pour but d'éviter le passage des corps étrangers (poussière, terre, pierre et autres matières solides) aux étapes suivantes du processus d'extraction. Ces corps étrangers peuvent être l'origine de graves altérations de la saveur et de l'odeur de l'huile produite comme ils peuvent nuire aux organes mécaniques de l'équipements d'extraction (Michelakis, 1992; Uzzan, 1994, Di Giovacchino *et al.*, 2002).

1.2.1.4 Broyage

L'huile d'olive est contenue dans de minuscules poches situées dans les cellules des olives. Ces poches sont appelées vacuoles, le broyage a pour but la rupture des cellules de la pulpe afin de provoquer la sortie de l'huile des vacuoles (Di Giovacchino, 1991, Uceda *et al.*, 2006). Cette opération est généralement effectuée avec un broyeur à meules (en granite ou pierre) ou un broyeur métallique (à marteaux fixes ou mobiles à dents ou à disques, à rouleaux...).

1.2.1.5 Malaxage

La pâte obtenue après le broyage des olives est soumise à une opération de malaxage qui consiste en brassage lent et continu induisant ainsi à donner une pâte de bonne régularité et homogénéité (Uzzan, 1994; Di Giovacchino *et al.*, 2002). Le brassage a pour but d'accroître le pourcentage d'huile libre tout en favorisant la réunion des gouttelettes de l'huile en des gouttes plus grosses qui ont tendance à se séparer de la phase solide (Di Giovacchino, 1991, Uceda *et al.*, 2006).

Les principaux facteurs à tenir en compte pour cette opération sont le temps (durée de malaxage) et la température de la pâte (Di Giovacchino, 1991). Selon Ranalli *et al.* (2003), une prolongation du temps de malaxage n'a pas d'effet sur les indices de qualité de l'huile d'olive vierge, par contre, une diminution significative a été observée concernant la teneur en polyphénols totaux. L'accroissement de la température durant l'opération de malaxage au delà de 25 °C conduit à la diminution de la teneur en fraction secoiridoïdes (Angerosa *et al.*, 2001)

et de la perte du contenu de la presque totalité des substances volatiles (Di Giovacchino, 1991; Di Giovacchino *et al.*, 2002)

1.2.1.6 Extraction de l'huile

1.2.1.6.1 Séparation des phases solide et liquide

L'huile d'olive est extraite avec différents systèmes à l'aide d'appareillages spécifiques, actionnés par des forces de nature physique, lesquelles, convenablement exercées sur la pâte d'olive, permettent la séparation des différentes phases (huileuse, solide et margine) (Di Giovacchino, 1991 ; Alba Mendoza, 1999 ; Di Giovacchino *et al.*, 2002).

- **Système d'extraction par pression :**

La séparation de la phase liquide de la phase solide est réalisée dans des installations à pression (Di Giovacchino, 1991). Ce système est basé sur le fait que sous l'action de la pression, la pâte d'olive dégage le moût huileux (phase liquide) qui se sépare de la phase solide (Alba Mendoza, 1999, Chimi, 2006). Actuellement, l'extraction à pression est habituellement effectuée en super-presses hydrauliques avec une augmentation progressive de la pression jusqu'à la valeur maximale de 400 atm dans 45-60 min (Petraakis, 2006).

Selon certains auteurs (Chimi, 2006 ; Wiesman, 2009), l'utilisation de cette méthode traditionnelle dévalorise la production du fruit d'olivier. En effet, l'exposition de la pâte d'olive durant les opérations de broyage et de pressage, à l'air libre durant environ une heure et plus peuvent conduire à des huiles caractérisées par des défauts organoleptiques, un degré d'oxydation et une acidité élevée, ce qui peut conduire à classer ce produit dans la catégorie «des huiles impropres à la consommation ».

- **Système d'extraction par centrifugation**

L'introduction de ces installations a permis de réduire le coût de transformation et la durée de stockage des olives (Chimi, 2006). L'extraction de l'huile des olives dans les installations de centrifugation intervient par effet de la force centrifuge, cette méthode exploite la différence existante entre les poids spécifiques des liquides et du matériel solide (Metzidakis *et al.*, 1995; Di Giovacchino *et al.*, 2002)

a/ Système d'extraction par centrifugation à trois phases

L'utilisation de ce système nous permet d'obtenir trois produits (huile, grignons et margines) (Chimi, 2006, Uceda *et al.*, 2006). La séparation de la phase solide de la phase liquide nécessite l'ajout d'une eau

tiède, cette addition diminue le taux des polyphénols dans l'huile et par conséquent une résistance plus faible à l'oxydation (Salvador *et al.*, 2003).

b/ Système d'extraction par centrifugation à deux phases :

L'utilisation de ce système engendre deux produits (l'huile, eau de végétation plus grignons) (Chimi, 2006, Uceda *et al.*, 2006). Ce système ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation de la phase l'huileuse, une humidification avec l'eau de végétation est suffisante ce qui garantit une huile avec une teneur élevée en antioxydants naturels (α -tocopherols, β -carotène, polyphénols) par rapport au système d'extraction par centrifugation à trois phases (Gimeno *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2003; Chimi, 2006)

1.2.1.6.2 Séparation des phases liquide-liquide :

La séparation se fait en fonction de la densité des deux phases (huile et margine), cette opération est réalisée soit par décantation naturelle ou par centrifugation (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Uceda *et al.*, 2006).

1.2.2 Classification et composition de l'huile d'olive

1.2.2.1 Catégories d'huile d'olive

L'huile d'olive vierge comprend diverses appellations : vierge extra, vierge fine, vierge courante, vierge lampante. Ces diverses catégories qui correspondent à une certaine qualité sont définies en fonction de l'acidité de l'huile, de son indice de peroxyde ainsi que d'autres critères chimiques et qualités organoleptiques (Perrin, 1992).

Les différentes catégories d'huile d'olive ainsi que les limites des critères de qualité établies par le COI (2003) sont représentées dans le tableau I.

Tableau I : Les différentes catégories d'huile d'olive et leurs critères de qualité (COI, 2003).

Catégorie	Acidité (%)	Indice de peroxyde (mEq O ₂ /Kg)	Extinction spécifique dans l'UV			Caractéristiques organoleptiques	
			270nm	ΔK	232nm	Médiane du défaut	Médiane du fruité
1-Huile d'olive vierge extra	$\leq 0,8$	≤ 20	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$	$\leq 2,5$	Me = 0	Me > 0
2-Huile d'olive vierge fine	$\leq 2,0$	≤ 20	$\leq 0,25$	$\leq 0,01$	$\leq 2,6$	$0 < Me \leq 2,5$	Me > 0
3-Huile d'olive vierge courante	$\leq 3,3$	≤ 20	$\leq 0,30$	$\leq 0,01$	–	$2,5 < Me \leq 6$	–
4-Huile olive vierge lampante	$> 3,3$	Non limité	–	–	–	Me > 6	–

1.2.2.2 Composition de l'huile d'olive

L'huile d'olive est constituée d'une fraction saponifiable constituée d'acides gras et de leurs dérivés, et la fraction insaponifiable qui comprend les stérols, les alcools aliphatiques, les pigments, les hydrocarbures, les composés aromatiques, les tocophérols et les composés phénoliques (Berra, 1998). La composition chimique de l'huile d'olive dépend largement de la variété du fruit, des conditions agronomiques, du degré de maturité, des procédés d'extraction et des conditions de stockage (Dugo *et al.*, 2004).

1.2.2.2.1 Fraction saponifiable

La fraction saponifiable représente environ 99 % de la composition de l'huile d'olive. Elle se compose essentiellement de :

a) Les glycérides

Les triglycérides sont les majoritaires de l'huile d'olive (95,4 %), les diglycérides ne représentent qu'environ 1-2,8 % (Zarrouk *et al.*, 1996; Boskou *et al.*, 2006a). Les principaux triglycérides de l'huile d'olive sont : la trioléine « OOO » (40 à 60 %), la dioléopalmitine « POO » (10 à 20 %), la dioléolinoléine « OOL » (10 à 20 %), la palmitooléolinoléine « POL » (5 à 7 %) et la dioléostéarine « SOO » (3 à 7 %) (Ryan *et al.*, 1998; Boskou *et al.*, 2006a)

b) Les acides gras

La composition en acide gras de l'huile d'olive est dominée par l'acide oléique (C18 :1), l'acide linoléique (C18 :2), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C 18 :0) (Ryan *et al.*, 1998). L'acide oléique, présent en grande quantité, distingue l'huile d'olive des autres huiles alimentaires (Visioli et Galli, 1998 ; Ait Yacine *et al.*, 2002). Les principaux acides gras de l'huile d'olive sont représentés dans le tableau II.

La variation de la composition en acide gras des huiles d'olive ne semble pas être seulement affectée par les facteurs pédoclimatiques (Stefanoudaki *et al.*, 1999; D'Imperio *et al.*, 2007) mais aussi par plusieurs autres facteurs dont l'époque de la récolte et la variété (Inglese, 1994; Boskou *et al.*, 2006a).

Tableau II : Composition de l'huile d'olive en acides gras (COI, 2003).

Acides gras	Symboles	Limite de variabilité (%)
Acide myristique	C14 : 0	≤ 0,05
Acide palmitique	C16 : 0	7,5 – 20,0
Acide palmitoléique	C16 : 1	0,3 – 3,5
Acide heptadécanoïque	C17 : 0	≤ 0,3
Acide heptadécénoïque	C17 : 1	≤ 0,3
Acide stéarique	C18 : 0	0,5 – 5,0
Acide oléique	C18 : 1	55,0 – 83,0
Acide linoléique	C18 : 2	3,5 – 21,0
Acide linoléique	C18 : 3	≤ 1,0
Acide arachidique	C20 : 0	≤ 0,6
Acide gadoléique	C20 : 1	≤ 0,4
Acide béhénique	C22 : 0	≤ 0,2
Acide lignocérique	C24 : 0	≤ 0,2

1.2.2.2.2 Fraction insaponifiable

Dénommés constituants mineurs de l'huile d'olive, ils représentent environ 2% de l'huile d'olive où ils sont introduits plus de 230 composés différents (Visioli et Galli, 1998; Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006).

a) Les stérols

Les stérols représentent 20% de la fraction insaponifiable de l'huile d'olive (Montealegre *et al.*, 2010). Les principaux stérols de l'huile d'olive : β -sitostérol (75 à 90%), Δ -5-avenasterol et campesterol, d'autres stérols sont présents à l'état de traces, à savoir : le cholestérol, le Δ -7-stigmastérol, le Δ -7-avenastérol et le campestanol (Boskou *et al.*, 2006a). Les teneurs en stérols varient en fonction de l'origine géographique (Ben Temime *et al.*, 2008), de la variété (Rivera del Alamo *et al.*, 2004) et de la maturité des olives (Koutsaftakis *et al.*, 2000).

b) Les composés aromatiques

Responsables de l'arôme délicat de l'huile d'olive, ils sont constitués d'un mélange de composés volatils : aldéhydes, alcools, esters, hydrocarbures, cétones (Boskou *et al.*, 2006b; Kalua *et al.*, 2007).

Ils sont principalement générés par la voie de lipoxygénase par oxydation des acides gras polyinsaturés (les acides linoléique et linoléique), induisant ainsi à la formation des

principaux aldéhydes C₆, alcools et esters dans l'huile d'olive (Sánchez et Harwood, 2002). D'autres composés aromatiques peuvent être générés par le métabolisme des acides gras et acides aminés engendrant ainsi les acides, alcools, esters et cétones (Angerosa, 2002 ; Kalua *et al.*, 2007).

La teneur en composés volatils varie d'un cultivar à un autre, et dépend étroitement de l'activité des enzymes de la voie de la lipoxygénase (Dhifi *et al.*, 2005; Runcio *et al.*, 2008). D'autres facteurs peuvent influencer leurs teneurs, à savoir : le degré de maturité des olives, le stockage des olives, le temps et la température du malaxage, les conditions climatiques et l'état sanitaire des olives (Morales *et al.*, 2005; Boskou *et al.*, 2006a., Haddada *et al.*, 2007; Baccouri *et al.*, 2008a).

c) Les composés phénoliques

Au cours de ces vingt dernières années, les principaux composés phénoliques présents dans l'huile d'olive sont identifiés et quantifiés. Ils sont constitués d'un mélange : d'acides phénoliques, alcools phénoliques, dérivées secoiridoïdes, lignanes, flavonoïdes et Hydroxyisochromanes (Boskou, 2009). Pendant le processus d'extraction de l'huile d'olive, principalement pendant le broyage et le malaxage, il y a hydrolyse des glycosides et des esters d'acides phénoliques présents dans la pulpe des olives, qui sont par la suite incorporés dans l'huile d'olive (Vazquez-Roncero, 1978 ; Dhifi *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques sont responsables de la stabilité de l'huile à l'oxydation et lui confèrent ses nombreuses vertus diététiques étant donné qu'ils constituent de puissants antioxydants (Owen *et al.*, 2000c, Visioli *et al.*, 2002). En outre, ils jouent un rôle important dans la qualité organoleptique de l'huile d'olive parce qu'ils contribuent à l'élaboration de sa saveur délicate et unique et surtout à son goût amer typique (Visioli et Galli, 1998; Dhifi *et al.*, 2006; Esti *et al.*, 2009).

d) Les pigments

L'huile d'olive contient divers pigments : les chlorophylles, les phéophytines et les caroténoïdes, ils sont transférés du fruit d'olive à l'huile durant le système d'extraction (Cerretani *et al.*, 2008). Les pigments présents dans une huile d'olive sont responsables de la couleur verdâtre à jaune de cette dernière. La couleur est un attribut de base pour la détermination des caractéristiques de l'huile d'olive, elle est associée pour la plupart des consommateurs à la notation de qualité (Ryan *et al.*, 1998; Mateos et García-Mesa, 2006)

- **Les chlorophylles**

Constitués de chlorophylle *a* et *b* qui se transforment durant l'extraction en phéophytines *a* et *b*. En effet, la libération d'acides induit à cette transformation suite à la perte du Mg^{2+} . Ces pigments sont essentiellement responsables de la couleur caractéristique de l'huile d'olive (Ryan *et al.*, 1998; Gandul-Rojas *et al.*, 2000).

Les pigments chlorophylliens dans les huiles végétales sont doués d'un pouvoir photosensibilisateur se traduisant par la production de l'oxygène singulet. Cette espèce d'oxygène excité, étant plus réactive envers les lipides insaturés que l'oxygène à l'état fondamental dissout dans l'huile, aboutit à la formation d'hydroperoxydes (Judde, 2004; Ben Tekaya et Hassouna, 2005).

- **Les caroténoïdes**

Les principaux caroténoïdes dans l'huile d'olive sont la lutéine, le β -carotène et les xanthophylles suivantes : néoxanthine, violaxanthine, lutéoxanthine, anthéroxanthine, mutatoxanthine et beta-cryptoxanthine (Ryan *et al.*, 1998; Mateos et García-Mesa, 2006; Montealegre *et al.*, 2010). Leur teneur dans l'huile d'olive dépend de la variété, du degré de maturité, des conditions environnementales, du procédé d'extraction et des conditions de stockage (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2002; Criado *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2007).

Les caroténoïdes exercent une activité antioxydante, en effet, elles sont efficaces dans la désactivation de l'oxygène singulet généré par les pigments chlorophylliens (Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre *et al.*, 2007).

e) Les tocophérols

On distingue quatre formes de tocophérols, (α , β , γ et δ) qui diffèrent seulement par le nombre et la position de groupes méthyles sur le noyau aromatique (Azzi et Stocker, 2000). L' α -tocophérol représente 95% de l'ensemble des tocophérols présent dans l'huile d'olive (Ryan *et al.*, 1998).

Les tocophérols se trouvent sous forme libre dans l'huile d'olive, ils exercent une activité antioxydante par rupture de la chaîne radicalaire lors des étapes de propagation de l'oxydation lipidique, comme ils peuvent prévenir l'action de l'oxygène singulet, initiateur de la peroxydation des lipides (Psomiadou et Tsimidou, 2002; Ben Tekaya et Hassouna, 2005; Ben Tekaya et Hassouna, 2007).

II. Composés phénoliques de l'huile d'olive

L'huile d'olive est quasiment la seule huile contenant des quantités notables de substances phénoliques naturelles, ces composés confèrent à l'huile son goût si particulier, à la fois amère et fruité (Perrin, 1992), en plus ils contribuent pour une grande part à la bonne stabilité des huiles d'olive vierges (Visioli *et al.*, 2004; Boskou, 2006b, Samaniego Sanchez *et al.*, 2007). L'intérêt porté sur ces composés ne cesse de croître ces dernières années vu leurs propriétés biologiques (Manach *et al.*, 2004; Boskou *et al.*, 2006b). Outre leur propriété antioxydante, ils possèdent d'intéressantes propriétés antibactériennes et thérapeutiques (Ollivier *et al.*, 2004 ; Shahidi et Naczki, 2004).

II.1 Classification et structure chimique

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances à noyau benzénique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles. Leur classification est basée sur le nombre et la nature des substituants (Tsimidou, 1998 ; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a).

II.1.1 Les acides phénoliques

Premier groupe de composés phénoliques décrit dans l'huile d'olive (Nergiz et Onal, 1991; Servili *et al.*, 2004 ; Ramirez-Tortosa *et al.*, 2006), où ils sont présents en faible quantité (annexe 1) (Gomez-Alonso *et al.*, 2002; De la Torre-Carbot *et al.*, 2005).

- Les acides phénoliques sont subdivisés en deux sous groupes (tableau III)

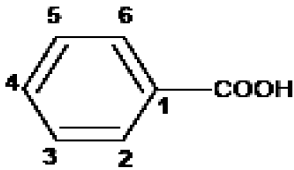
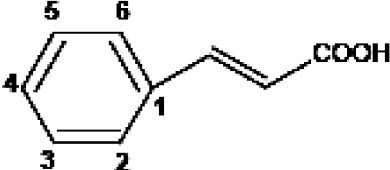
Dérivés hydrobenzoïques dont la structure de base (C_6-C_1), ils incluent l'acide benzoïque, *p*-acide hydroxybenzoïque, l'acide protocatechuique, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide gentistique et l'acide syringique (Servili et Montedoro, 2002; Ramirez-Tortosa *et al.*, 2006)

Dérivés hydroxycinnamiques dont la structure de base (C_6-C_3), ils incluent l'acide *p*-coumarique, acide *o*-coumarique, acide caféique, acide ferulique et acide sinapique (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2006; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a).

D'autres acides phénoliques et dérivés comme DOPAC (acide 3,4-dihydrophenylacétique) et 4-(Acetoxy-ethyl)-1,2-dihydroxybenzène ont été décrits par Carrasco Pancorbo *et al.* (2005a,b).

D'après Carrasco Pancorbo *et al.* (2004), certains acides phénoliques: l'acide cinnamique, acide sinapique, acide caféique, DOPAC peuvent être considérés comme marqueurs géographiques des variétés de l'huile d'olive.

Tableau III : Structures chimiques des acides phénoliques présents dans l'huile d'olive (Bendini *et al.*, 2007).

Composés	Substituant	Structure
Acide phénolique		
<i>Dérivés hydrobenzoïque</i>		
Acide benzoïque,	3-OH	
<i>p</i> -acide hydroxybenzoïque,	4-OH	
Acide protocatéchique,	3,4-OH	
Acide gallique,	3,4,5-OH	
Acide vanillique,	3-OCH ₃ , 4-OH	
Acide gentistique	2,5-OH	
Acide syringique	3,5-OCH ₃ , 4-OH	
<i>Dérivées hydroxycinnamique</i>		
Acide <i>p</i> -coumarique,	4-OH	
Acide <i>o</i> -coumarique,	2-OH	
Acide caféique,	3,4-OH	
Acide ferulique	3-OCH ₃ , 4-OH	
Acide sinapique	3,5-OCH ₃ , 4-OH	

II.1.2 Les secoiridoïdes

Appartiennent au groupe des coumarines (Bendini *et al.*, 2007), ils sont caractérisés par la présence d'acide élénolique et ses dérivés dans leur structure, ces composés sont le résultat d'hydrolyse des secoiridoïdes glucosides présents dans le fruit d'olive principalement l'oleuropéine, demethyloleuropéine et ligstroside (Servili *et al.*, 2004 ; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a). La réaction d'hydrolyse est catalysée par la β -glucosidase (Angerosa *et al.*, 1996; Rayan *et al.*, 2002). Romero-Segura *et al.* (2009) ont confirmé l'aptitude de cette enzyme à hydrolyser les secoiridoïdes glucosides présents dans le fruit d'olive avec une activité

maximale avec le substrat oleuropéine suivie du ligstroside (65,4%) et du deméthyleuropeine (21%).

Les secoiridoïdes représentent la fraction majoritaire des polyphénols de l'huile d'olive (annexe 1), généralement ils sont représentés par : la forme dialdéhydique de l'acide élénolique liée à l'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) ou liée au tyrosol (*p*-HPEA-EDA) et les isomères d'oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA) (tableau IV) (Gomez-Alonso *et al.*, 2002; De la Torre-Carbot *et al.*, 2005; Servili *et al.*, 2009).

Les formes dialdéhydiques de l'oleuropéine aglycone et du ligstroside aglycone sont des secoiridoïdes présents en faible quantités dans l'huile d'olive (Montedoro *et al.*, 1993; Servili *et al.*, 2002; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2006).

Tableau IV : Structures chimiques des secoiridoïdes présents dans l'huile d'olive

(Hrcirik et Fritsche, 2004; Bendini *et al.*, 2007) .

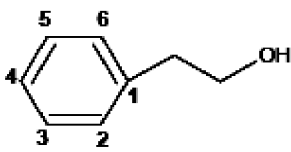
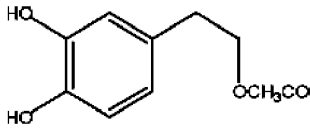
Composés	Substituant	Structure
Secoiridoïdes		
Décarboxyméthyl oleuropéine aglycone ou (3,4-DHPEA-EDA)	R ₁ -OH	
Décarboxyméthyl ligstroside aglycon ou (<i>p</i> -HPEA-EDA)	R ₁ -H	
Oleuropéine aglycone ou (3,4 DHPEA-EA)	R ₁ -OH	
Ligstroside aglycone ou (<i>p</i> -HPEA-EA)	R ₁ -H	
Forme dialdéhydique de l'oleuropéine aglycone	R ₁ -OH	
Forme dialdéhydique ligstroside aglycone	R ₁ -H	

II.1.3 Les alcools phénoliques

L'hydroxytyrosol « (3,4-dihydroxyphenyl)éthanol ou (3,4-DHPEA) » et le tyrosol « (*p*-hydroxyphenyl)éthanol ou (*p*-HPEA) » (tableau V) sont les principaux alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive (annexe 1)(Owen *et al.*, 2000c; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a). Leurs teneurs sont généralement faibles dans l'huile fraîche c'est à dire l'huile nouvellement extraite (Servili et Montedoro, 2002). D'après Servili *et al.* (2004), cette teneur augmente graduellement au cours du stockage, cette augmentation est due à la libération des molécules d'hydroxytyrosol et du tyrosol des secoiridoïdes comme 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA et 3,4-DHPEA-EA.

D'autres travaux menés sur l'identification des composés phénoliques de l'huile d'olive ont révélé la présence d'autres alcools phénoliques, caractérisés par la présence d'hydroxytyrosol dans leur structure. En effet, une étude menée par Brenes *et al.* (1999) montre la présence d'une molécule 4-(acétoxyéthyl)-1,2-dihydroxybenzène ou l'hydroxytyrosol acétate (voir tableau) caractérisé par un groupement acétyle lié à au groupement méthylène de l'hydroxytyrosol, la présence de cet alcool phénolique est confirmée par Gomez-Alonso *et al.* (2002) et Hrcirik et Fritsche (2004).

Tableau V : Structures chimiques des alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive
(Bendini *et al.*, 2007 ; Cicerale *et al.*, 2009).

Composés	Substituant	Structure
Alcools phénoliques		
Tyrosol ou <i>p</i> -HPEA ou [(<i>p</i> hydroxyphenyl)ethanol]	4-OH	
Hydroxytyrosol , 3,4-DHPEA ou [(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol]	3,4-OH	
4-(acétoxyéthyl)-1,2-dihydroxybenzène ou 2-(3-4 dihydroxy phényle) ou hydroxytyrosol acétate		

II.1.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent un groupe de polyphénols dont la structure est disposée sous la configuration C6-C3-C6 (Balasundram *et al.*, 2006). Ils sont composés de deux noyaux aromatiques liés par un hétérocycle oxygéné, une substitution dans cet hétérocycle a pour résultat les principales classes de flavonoïdes : flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, isoflavones, flavanonol et les anthocyanidines (Hollman et Katan, 1999).

La lutéoline et l'apigénine sont les flavones dominants dans l'huile d'olive (tableau VI). Ce sont des dérivées de 7-glucoside lutéoline et apigénine glucoside, ces deux composés phénoliques sont présents dans l'olive (Brenes *et al.*, 1999; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a; Bendini *et al.*, 2007). Carrasco-Pancorbo *et al.* (2004) ont identifié la taxifoline qui est un flavanonol présent dans l'huile d'olive espagnole.

Tableau VI : Structures chimiques des flavonoïdes présents dans l'huile d'olive (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a).

Composés	Substituant	Structure
Flavonoïdes		
<i>Flavones</i>		
Apigénine	R ₁ -OH, R ₂ -H	
Lutéoline	R ₁ -OH, R ₂ -OH	
<i>Flavanonol</i>		
Taxifoline		

II.1.5 Les lignanes

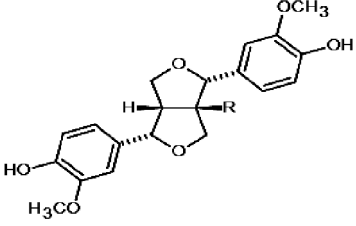
Le terme lignane a été introduit pour décrire un groupe de dimères de phénylpropanoïdes dans lesquels les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) de chaque chaîne propyle (Willför *et al.*, 2006).

Brenes *et al.* (2000) et Owen *et al.* (2000b) ont identifié (+)-1-acétoxypinoresinol, (+)-pinoresinol (tableau VII), composés majeurs des lignanes présents dans l'huile d'olive. Selon

Brenes *et al.* (2000), l'hydrolyse des composés similaires aux lignanes liés aux glucosides secoiridoides sont à l'origine de ces deux composés phénoliques.

Tableau VII : Structures chimiques des lignanes présents dans l'huile d'olive

(Bendini *et al.*, 2007).

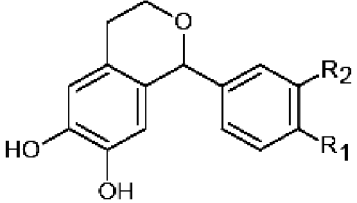
Composés	Substituant	Structure
Lignanes		
(+)-Pinoresinol	R-H	
(+)-1-acetoxypinoresinol	R-OCOCH ₃	

II.1.6 Les hydroxy-isochromanes

Selon Bendini *et al.* (2007), les hydroxy-isochromanes présents dans l'huile d'olive sont générés par l'interaction de l'hydroxytyrosol et les composés carbonylés résultants du processus d'extraction de l'huile. En effet, l'interaction de hydroxytyrosol avec la vanilline ou benzaldehyde produit le 1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane et le 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane respectivement (tableau VIII) (Bianco *et al.*, 2001).

Tableau VIII : Structures chimiques des hydroxy-isochromanes présent dans l'huile d'olive

(Bianco *et al.*, 2001).

Composés	Substituant	Structure
Hydroxy-isochromanes		
1-Phenyl-6,7-dihydroxyisochromane	R ₁ ,R ₂ -H	
1-(3'-Methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxyisochromane	R ₁ -OH,R ₂ -OCH ₃	

II.2 Polyphénols et stabilité de l'huile d'olive :

L'autoxydation est une réaction entre les lipides et une molécule d'oxygène. Ce phénomène est responsable de la dégradation de l'huile d'olive (Ryan *et al.*, 1998). La première manifestation de la dégradation oxydative est souvent la perte de l'arôme, développement du rancissement, le changement de la couleur et la diminution de la valeur nutritionnelle des aliments (Ryan *et al.*, 1998 ; Cillard et Cillard, 2006).

Les inhibiteurs naturels de l'oxydation que sont les polyphénols contribuent à accroître la stabilité de l'huile d'olive. L'huile d'olive contient des taux élevés de composants phénoliques naturels qui exercent un effet protecteur car ils peuvent interrompre la chaîne radicalaire de l'oxydation lipidique (Vazquez Roncero, 1978 ; Unal, 1994). Un rapport linéaire a été noté entre la teneur en polyphénols et la stabilité de l'huile d'olive vierge à l'oxydation (Perrin, 1992).

Les antioxydants les plus puissants sont représentés par les *ortho*-diphénols, dont les principaux sont : l'hydroxytyrosol, l'acide caféique et l'oléuropéine. L'hydroxytyrosol, ayant le meilleur pouvoir antioxydant (Del Carlo *et al.*, 2004), se dégrade plus rapidement. En effet, Chimi *et al.* (1991), indiquent que les composés phénoliques se dégradent avec le temps comme conséquence à leur activité antioxydante et que leur vitesse de dégradation est positivement corrélée à leur efficacité antioxydante.

II.3 Propriétés biologiques des composés phénoliques

II.3.1 Propriétés antioxydantes

Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue. Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des défenses antioxydantes; on parle alors de stress oxydant qui constitue l'origine de diverses pathologies (Favier, 2003 ; Barouki, 2006).

Une attention considérable est attribuée au potentiel antioxydant des composés phénoliques grâce à leur rôle préventif dans diverses pathologies associées au stress oxydant (cardiovasculaires, certains cancers et maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson)) (Tripoli *et al.*, 2005). Les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive, principalement l'hydroxytyrosol, possède une propriété antiathérogène en agissant comme inhibiteurs de l'oxydation des LDL, il s'est révélé aussi capable de prévenir le développement des maladies carcinogène dans l'organisme en bloquant les radicaux libres ce qui empêche

l'endommagement de l'ADN. D'autres études ont rapportés que ce composé stimulent la production d'oxyde nitreux, médiateurs de l'activité relaxante, ayant aussi une action antithrombotique (Visioli *et al.*, 1998; Covas, 2007; Huang et Sumpio, 2008).

D'autres composés phénoliques, tel que *p*-HPEA-EDA s'est révélé impliqué dans l'inhibition de la cyclooxygénase enzyme qui catalysent les étapes de la voie inflammatoire de l'acide arachidonique. Selon Beauchamp *et al.* (2005), *p*-HPEA-EDA ou bien l'oleocanthale est une molécule anti-inflammatoire qui possède des activités similaires à l'ibuprofène. La consommation de ce composés peut prévenir le risque de développement des cancers (Bendini *et al.*, 2007 ; Cicerale *et al.*, 2009).

Les composés phénoliques sont impliqués dans ces activités via plusieurs mécanismes en agissant à différents niveaux des réactions radicalaires. Soit par la chélation des métaux, soit par l'effet scavenger, ou par inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres (Boskou, 2009 ; Petti et Scully, 2009).

II.3.1.1 Effet scavenger

L'effet scavenger des composés phénoliques consiste à piéger et à neutraliser les radicaux peroxydes (LOO^\bullet), hydroxyles (OH^\bullet) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). De ce fait, ils interfèrent et bloquent la propagation de la chaîne radicalaire (Owen *et al.*, 2000c ; Soler Rivas *et al.*, 2000; Velasco et Dobarganes, 2002 ; Bendini *et al.*, 2007).

L'interaction des polyphénols avec de nombreux radicaux à été étudiée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de cette activité antioxydante. Selon Visioli et Galli (1998), Ollivier *et al.* (2004), Servili *et al.* (2009), la propriété antioxydante des *ortho*-diphénols est reliée à leur capacité à donner un atome d'hydrogène formant ainsi un radical stable par formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène libre du groupement hydroxy et l'hydroxyle du radical phénoxy pour conduire à la formation d'une quinone (figure 2).

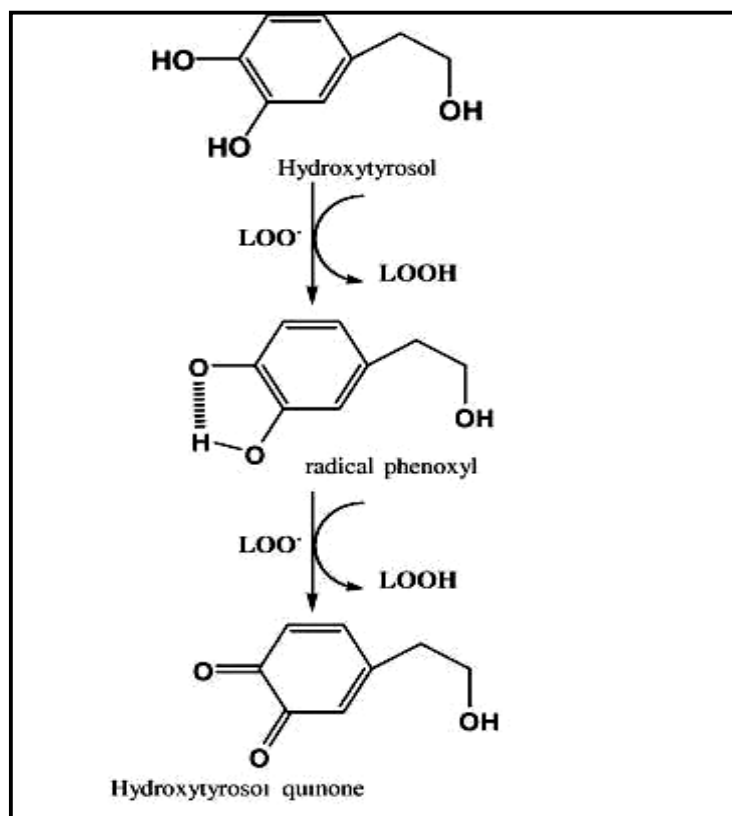
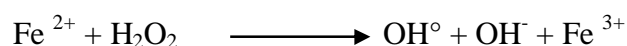


Figure 2 : Mécanisme antioxydant de l'hydroxytyrosol par donation d'hydrogène
(Visioli et Galli, 1998)

II.3.1.2 Chélation des ions métalliques

Les composés phénoliques inhibent la formation de radicaux libres par la chélation de métaux tels que le cuivre, le fer et l'aluminium. Ces métaux de transition sont essentiels pour le déroulement des différentes fonctions physiologiques et peuvent être aussi une source du radical OH° lors de la réaction de Fenton par réduction de l' H_2O_2 (Goudable et Favier, 1997; Pietta, 2000; Barouki, 2006)



Cette réaction peut être empêchée par les composés phénoliques de l'huile d'olive notamment l'hydroxytyrosol par formation des complexes de coordination avec ces métaux, ils peuvent ainsi convertir les ions métalliques en complexes, empêchant leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques (Visioli et Galli, 1998; Cillard et Cillard, 2006 ; Pereira-Caro *et al.*, 2009).

II.3.1.3 Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres

Les composés phénoliques peuvent affecter l'activité de nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans le stress oxydant. Il a été rapporté par Owen *et al.* (2000a) que l'huile d'olive est susceptible d'affecter l'activité de la xanthine oxydase qui est considérée comme étant une source biologique importante du radical superoxyde, ils ont supposé l'intervention des composés phénoliques d'une façon indirecte dans cette l'inhibition.

D'après Beauchamp *et al.* (2005), les oleocanths ou bien *p*-HPEA-EDA sont les molécules susceptibles d'être impliquées dans l'inhibition de la cyclooxygénase qui catalysent les étapes de la voie inflammatoire de l'acide arachidonique. L'hydroxytyrosol est impliqué dans l'inhibition de la lipoxygénase qui catalyse l'oxydation des acides gras (Visioli et Galli, 2002a; Cornwell et Ma, 2008)

II.3.2 Propriétés antibactériennes

Plusieurs études attestent du rôle incontestable des composés phénoliques de l'huile d'olive dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes. Ils sont considérés comme étant des agents antibactériens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinaux ou du système respiratoire (Furneri *et al.*, 2002 ; Tripoli *et al.*, 2005 ; Brenes *et al.*, 2006 ; Romero *et al.*, 2007).

En effet, d'après l'étude menée par Aziz *et al.* (1998) cités par Boskou, (2009), l'oleuropéine peut inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Bacillus cereus*. Bisignano *et al.* (1999) rapportent l'effet inhibiteur de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol sur cinq souches bactérienne (*Haemophilus influenzae* ATCC 9006, *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et sur quarante quatre souches cliniques.

Selon Furneri *et al.* (2004), l'hydroxytyrosol est doté d'une activité antimycoplasmale. Vingt souches de *Mycoplasma hominis*, trois souches *M. fermentans* et une *M. pneumoniae* ont été employés dans cette étude, des CMI de 0,5, 0,03 et 0,25 µg/ml ont été enregistrés respectivement pour les souches *M. pneumoniae*, *M. hominis*, et *M. fermentans* respectivement.

L'étude menée par Romero *et al.* (2007), portant sur cinq variétés d'huiles d'olive espagnoles révèle une activité bactéricide sur huit souches *Helicobacter pylori*, connu comme étant la principale cause de la maladie ulcéreuse gastroduodénale (De Koster *et al.*, 1995; De Korwin, 2006). Cette activité est liée aux secoiridoides aglycones en particulier la forme

aldehydique de ligstroside aglycone, qui a la particularité de résister à l'acidité gastrique pendant plusieurs heures (Romero *et al.*, 2007).

Plusieurs travaux rapportent l'effet inhibiteur des acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et acide *p*-coumarique sur la croissance de *E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. cereus* (Soler-Rivas *et al.*, 2000), et l'effet de l'acide caféique sur les espèces *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. tryphimurium* et *L. monocytogenes* (Tungel et Nergiz, 1993 ; Wen *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2006)

D'après Cowan (1999) et Friedman *et al.* (2003), les polyphénols fortement hydroxylés présentent un potentiel important autant qu'agents antibactériens. Bien que les effets antibactériens des composés phénoliques soient bien établis, leur mécanisme d'action n'est pas encore élucidé, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'éclaircir leur activité (Boskou, 2009):

II.3.2.1 Action sur la membrane cytoplasmique

D'après la littérature, la cible principale des composés phénoliques est la membrane cytoplasmique. D'après Rodríguez *et al.* (2009), une incubation de 30 à 60 min de *Lactobacillus plantarum* en présence de l'oleuropéine induit à une déformation et une irrégularité au niveau de la paroi. Grâce à un modèle de membranes bactériennes artificielles, Casas-Sanchez et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'oleuropéine s'intercale entre les phospholipides membranaires, la déstabilisation de la membrane peut avoir comme conséquence une fuite des constituants cellulaires (phosphate, calcium) qui ont un rôle dans le maintien et l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte induit à la baisse de synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéines) (Juven *et al.*, 1972 ; Bisignano *et al.*, 1999 ; Furneri *et al.*, 2002)

II.3.2.2 Action sur les enzymes

L'interaction des polyphénols avec les protéines enzymatiques peut bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité (Nychas *et al.*, 1990 ; Cowan, 1999 ; Ullah et Khan, 2008 ; Sher, 2009). D'après Cushnie et Lamb (2005), sept composés flavonoïques y compris la quercétine et l'apigénine sont capables d'inhiber *in vitro* l'ADN gyrase d'*Escherichia coli*, Plaper *et al.* (2003) ont rapporté que la liaison de la sous unité GyrB avec la quercétine induit l'inhibition de l'activité ATPasique de l'ADN gyrase.

L'étude menée par Wu *et al.* (2008) a montré que la quercétine et l'apigénine peuvent inhiber l'activité de D-alanine ligase qui catalyse la formation d'un dimère de D-alanine avant son incorporation dans la paroi bactérienne, inhibant ainsi la croissance bactérienne.

II.4 Facteurs influençant les polyphénols de l'huile d'olive

Les composés phénoliques de l'huile d'olive présentent un profil variable du point de vue qualitatif et quantitatif, ils sont influencés par une combinaison des facteurs tels que : les facteurs climatiques et pratiques culturales (climat, sol, irrigation), génétique (cultivar) et agronomique (technique de culture et modalités de récolte, de transport et de stockage) (Tsimidou, 1998; Servili *et al.*, 2004; Cicerale *et al.*, 2009).

II.4.1 Effet de la variété

Le cultivar paraît être un facteur déterminant sur la composition en polyphénols de l'huile d'olive, ils varient selon le patrimoine génétique du cultivar. (Selvaggini *et al.*, 2006 ; Ortega-Garcia et Peragon, 2009).

Le profil en composés phénoliques de chaque variété est une caractéristique intrinsèque de la variété permettant la caractérisation variétale des huiles d'olives (Gomez-Alonso *et al.*, 2002; Oliveras-Lopez *et al.*, 2007). Selon une étude menée par Dhifi *et al.* (2006), la teneur en polyphénols totaux peut facilement distinguer entre quatre variétés d'huiles tunisiennes cultivées dans la même parcelle expérimentale. La différenciation variétale est également relevée au niveau des teneurs en polyphénols individuels ; Brenes *et al.* (2002) ont noté des différences significatives dans la teneur en 1-Acetoxypinoresinol entre les variétés espagnoles *Empeltre* (94,2 mg/kg) et *Picual* (1,9 mg/kg). Alors que Baiano *et al.* (2009) ont révélé différents teneurs de 3,4-DHPEA-EDA pour les variétés italiennes *Leccino* (76.80 mg/kg) et *Frantoio* (34.60mg/kg)

III.4.2 Effet des conditions climatiques et pratiques culturales

L'effet des conditions climatiques pendant le développement du fruit, ainsi que les travaux prodigués (irrigation) peuvent avoir une incidence sur le profil en composés phénoliques (Criado *et al.*, 2004 ; Gomez-Rico *et al.*, 2007)

Morelló *et al.* (2006) ont observé une baisse de taux du 3,4-DHPEA-EDA pour la variété *Arbequina* récoltée en 2001/02 par rapport aux années (2002/03, 2003/04). Cette diminution est due à l'abaissement de température (-5 °C) dans le mois de décembre, ce qui a

induit une congélation du fruit d'olive provoquant ainsi la rupture de sa paroi. La destruction des tissus favoriserait l'oxydation des composés phénoliques.

La teneur en polyphénols est plus importante quand la pluviométrie et l'irrigation sont faibles (Tovar *et al.*, 2001; Paz Romero *et al.*, 2003; Dag *et al.*, 2008). D'après Tovar *et al.* (2002) et Guerfel *et al.* (2009), un déficit hydrique peut créer une situation de stress qui accentue l'activité de la L-phénylalanine ammonia-lyase (PAL) impliquée dans la synthèse des composés phénoliques.

II.4.3 Effet de l'état sanitaire des olives

L'état sanitaire des olives revêt une grande importance sur les caractéristiques quantitatives des composés phénoliques de l'huile d'olive. L'action des parasites, telle la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*, sont en général, les principaux agents externes responsables des processus métaboliques de décomposition dans les fruits (Michelakis, 1992 ; Çavusoglu et Oktar, 1994 ; Wiesman, 2009).

D'après les travaux de Tamendjari *et al.* (2009), une diminution progressive des teneurs en composés phénoliques est enregistrée avec l'augmentation du taux d'infestation des olives par *B.oleae*, un taux d'attaque de 100%, entraîne des pertes de l'ordre de 67,58, 66,9 et 59,82 % respectivement pour les variétés algériennes *Azzeradj*, *Chemlal* et *Bouchouk*.

La diminution remarquable de la fraction phénolique avec l'attaque serait probablement due à l'exposition de la pulpe des olives aux facteurs externes. En outre, la destruction des tissus favoriserait l'activité de la polyphénoloxydase présente dans la pulpe des fruits d'olive (Tamendjari *et al.*, 2004; Gomez-Caravaca *et al.*, 2008)

II.4.4 Effet du stockage des olives

Le stockage des olives influe négativement sur les teneurs en composés phénoliques de l'huile d'olive (Metzidakis *et al.*, 1995; Tamendjari *et al.*, 2004; Maestro *et al.* (1993) ont signalé que la basse température de stockage des olives (5°C) retarde la diminution de la teneur des huiles en composés phénoliques par rapport à une température de 12°C, des résultats similaires ont été enregistrés par Kiritsakis *et al.* (1998). Selon Clodoveo *et al.*, 2007 la diminution de la température retarde l'activité enzymatique de la polyphenoloxidase (POO)

II.4.5 Effet de la maturation des olives

La composition en polyphénols de l'huile d'olive varie en fonction du stade de maturité (Ait Yacine *et al.*, 2001; Rovellini et Cortesi, 2003) . La teneur en composés phénoliques

diminue fortement au cours de la maturation (Damak *et al.*, 2008). Les travaux de Laribi *et al.* (2009) sur quatre variétés algériennes (*Boughenfous*, *Blanquette*, *Takesrit* et *Chemlal*) ont montré une diminution substantielle des composés phénoliques en passant du stade vert au stade noir. D'après Ortega-Garci et Peragon (2009), cette réduction peut être due à la diminution de l'activité de L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) durant le processus de maturation des olives. Aussi, cette diminution peut être expliquée par l'oxydation de composés phénoliques par la polyphenoloxidase.

La teneur de l'huile en phénols individuels montre une certaine variation due à la période de récolte, Dugo *et al.* (2004) ont observé chez la variété sicilienne *Necellara del Belice* une diminution de la forme dialdéhydrique des aglycones du ligstroside et une augmentation du tyrosol entre la première époque de récolte (07/10/99) et la troisième récolte (04/11/99). Cette variation peut être due aux réactions d'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside (constituants majeurs de la fraction phénolique dans l'olive) qui se produisent au cours de la maturation par les estérases et la β -glucosidase ce qui engendre l'accumulation de dérivés glycosidiques et de phénols libres (Briante *et al.*, 2002 ; Waterman et Lockwood, 2007 ; Baccouri *et al.*, 2008b)

II.4.6 Effet des facteurs technologiques

Pour un cultivar donné et une stade de maturité défini, les diverses étapes d'extraction peuvent également avoir une incidence sur les caractéristiques de l'huile notamment les composés phénoliques (Cortesi *et al.*, 2000 ; Cicerale *et al.*, 2009).

Le broyage et le malaxage sont les étapes les plus importantes et critiques dans l'extraction de l'huile d'olive (Servili *et al.*, 2004). C'est pendant ces phases que se produisent des processus oxydatifs et enzymatiques, permettant à l'huile d'olive de s'enrichir en polyphénols (Cortesi *et al.*, 2000).

- **Broyage**

Selon Ryan *et al.* (2002), Servili *et al.* (2004), Artajo *et al.* (2007), Conde *et al.* (2008), durant le broyage de l'olive se produit une activation de l'enzyme β -glucosidase qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'oleuropeine, demethyloleuropeine et du ligstroside en secoiridoïdes aglycones comme 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA, *p*-HPEA-EA et 3,4-DHPEA-EA.

- **Malaxage**

Durant le malaxage, les concentrations des secoiridoïdes aglycones sont largement influencées par deux paramètres : le temps (durée de malaxage) et la température de la pâte (Servili *et al.*, 2002; Gómez-Rico *et al.*, 2009).

Selon Gómez-Rico *et al.* (2009), une augmentation du temps de malaxage au delà de 60 min conduit à une diminution des composés phénoliques. Cette diminution a été aussi observée par Ranalli *et al.* (2003), par une augmentation de la température de malaxage au delà de 30°C. Cette perte en polyphénols est due aux réactions oxydatives catalysées par les enzymes oxydoréductases comme la polyphénoloxydase et la peroxydase (Servili *et al.*, 2003; Migliorini *et al.*, 2006).

L'impact de cette oxydation peut être minimisé par le contrôle du taux d'oxygène durant l'étape de malaxage (Servili *et al.*, 2003; Migliorini *et al.*, 2006), les travaux de Parenti *et al.* (2006) ont rapporté que la teneur en composés phénoliques des huiles d'olive vierges obtenues après malaxage en chambre fermée est deux fois plus élevée que celle mesurée dans les huiles d'olive vierges obtenues après malaxage en chambre ouverte. Cela est dû à l'inhibition des enzymes polyphénoloxydase et peroxydase par le manque d'oxygène (Servili *et al.*, 2004; Parenti *et al.*, 2008).

- **Système d'extraction**

Le système d'extraction influe significativement sur le taux des composés phénoliques dans l'huile d'olive (Vekiari et Koutsaftakis, 2002; Artajo Medina, 2006). L'étude menée par De Stefano *et al.* (1999) montre que l'huile obtenue à partir d'un système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases se trouve appauvri en polyphénols par rapport au système continu d'extraction avec centrifugation à deux phases. Des résultats similaires ont été trouvés par Cortesi *et al.* (2000) avec une différence moyenne entre les deux systèmes de plus de 30%.

En effet, le système de centrifugation à trois phases nécessite l'adjonction de l'eau tiède (40% à 60% du poids de la pâte) pour séparer les deux phases (huile, margines et grignon), ce qui n'est pas le cas pour le système de centrifugation à deux phases et par conséquent une quantité notable de polyphénols est entraînée dans les margines (Gimeno *et al.*, 2002; Servili *et al.*, 2004; Chimi, 2006)

II.4.7 Effet du stockage de l'huile

La teneur en polyphénols des huiles d'olive vierges est largement influencée par la durée du stockage de l'huile (Cicerale *et al.*, 2009). Brenes *et al.* (2001) ont observé une réduction de 15 % à 20 % du taux des polyphénols totaux dans des huiles conservées pendant une année à 30°C dans des bouteilles en verre fumé. Cette diminution en polyphénols est due à deux mécanismes concomitants qui se produisent durant la conservation : l'hydrolyse et l'autoxydation (Cinquanta *et al.*, 1997; Psomiadou et Tsimidou, 2002; Cortesi et Rovellini, 2004 ; Tsimidou, 2006).

Durant le stockage, les teneurs en hydroxytyrosol et en tyrosol, augmentent de façon linéaire, cette augmentation s'explique par l'hydrolyse de certaines substances phénoliques complexes, telles que 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA et 3,4-DHPEA-EA (Morello *et al.*, 2004; Ben Tekaya et Hassouna, 2005 ; Obied *et al.*, 2008)

Par ailleurs, Cortesi et Rovellini (2004) ont noté une diminution des formes naturelles des diphénols (471mg/kg à 267mg/kg), parallèlement à une augmentation des formes oxydées (0 mg/kg à 77mg/kg) de deux échantillons d'huile d'olive conservés durant 16 mois à l'obscurité.

*Partie
expérimentale*

Chapitre I
Matériel et méthodes

I. Matériel et méthode

I.1. Matériel végétal

Onze variétés d'huile d'olive récoltées durant la campagne 2008/2009 sont utilisées dans notre expérimentation. Dix variétés proviennent de la même région : l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (I.T.A.F.V) situé à Takerietz, la onzième variété *Chemlal* provient d'une ferme pilote de Tazmalt, wilaya de Bejaia.

Les caractéristiques, synonyme, rendement en huile et la répartition géographique des variétés étudiées sont représentées dans le tableau IX, en se référant au catalogue des variétés algériennes de l'olivier de l'I.T.A.F.V (Mendil et Sebai, 2006).

I.1.1 Récolte :

La récolte des olives est réalisée à la main sur différents arbres adultes, choisis au hasard à hauteur d'homme et aux quatre points cardinaux. Le transport des échantillons est effectué dans des caisses en plastiques aérées, les olives de chaque variété sont effeuillées et bien homogénéisées puis lavées.

I.1.2 Indice de maturité :

La détermination de l'indice de maturité est réalisée selon la méthode mise au point par l'Institut National des Recherches Agronomiques de Jean en Espagne rapporté par Rahmani (1996) en se basant sur la couleur du fruit (épiderme et pulpe). Sur cent fruits choisis au hasard sur un lot d'un kilogramme, l'indice de maturité est déterminé par la notation visuelle selon une échelle de coloration de 0 à 7 variant d'un épiderme vert intense jusqu'à un épiderme noir et une pulpe entièrement violette.

Tableau IX : Caractéristiques des variétés d'olives (Mendil et Sebai, 2006).

Variété	Synonyme	Rendement en l'huile (%)	Répartition géographique	Caractéristiques
<i>Aghenfás</i>	<i>Aghenfous</i>	16 à 20	Bougaa (Sétif)	Variétés à double utilisation ; fruit à poids élevé, de forme allongée, au sommet pointu et à base arrondie, légère asymétrie
<i>Akerma</i>	Pas de synonymes connus	18 à 22	Hammam Guergour (Sétif)	Variétés à double utilisation ; fruit à poids élevé, de forme allongée, au sommet pointu et à base arrondie, légère asymétrie
<i>Blanquette de Guelma</i>	Pas de synonymes connus	18 à 22	Guelma	Variétés à l'huile ; fruit poids moyen, de forme ovoïde, au sommet pointu et à base arrondie, légère asymétrie
<i>Bouchouk Soummam</i>	<i>Bouchouk Sidi-Aich (Avouchouk)</i>	22 à 26	Sidi-Aich (Bejaia)	Variétés double utilisation ; fruit à poids élevé, de forme ovoïde, au sommet arrondi et à base arrondie, légère asymétrie
<i>Bouricha</i>	<i>Olive d'El-Arrouch</i>	18 à 22	El-Arrouch (Skikda)	Variétés à l'huile ; fruit à poids faible, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, légère asymétrie
<i>Chemlal</i>	<i>Achemlal Achemli</i>	18 à 22	Kabylie Sidi-Aich	Variétés à l'huile ; fruit à poids faible, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, asymétrique
<i>Chemlal Tazmalt</i>	<i>Achemlal Achemli</i>	18 à 22	Tazmalt	Variétés à l'huile ; fruit à poids faible, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, asymétrique
<i>Ferkani</i>	<i>Ferkane</i>	28 à 32	Ferkane (Tébessa)	Variétés à l'huile ; fruit à poids moyen, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, asymétrique
<i>Limli</i>	<i>Imeli</i>	20 à 24	Sidi-Aich (Bejaia)	Variétés à l'huile ; fruit à poids faible, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, légère asymétrie
<i>Neb Djemel</i>	Pas de synonymes connus	16 à 20	Vallée d'OueELArab (cherchal-khnchela)	Variétés à l'huile ; fruit à poids moyen, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, asymétrique
<i>Tabelout</i>	<i>Abelout</i>	20 à 24	Zone montagneuse de Bejaia	Variétés à l'huile ; fruit à poids moyen, de forme allongée, au sommet pointu et à base tronquée, légère asymétrie

L'indice de maturité est donné par la formule suivante :

$$IM = [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) + (5 \times n_5) + (6 \times n_6) + (7 \times n_7)] / 100$$

Où **n** est la fréquence sur cent olives et les chiffres de 0 à 7 représentent :

0 : épiderme vert intense ;

1 : épiderme vert jaunissant ;

2 : épiderme vert avec taches rougeâtres ;

3 : épiderme rougeâtre à violet ;

4 : épiderme noir à pulpe blanche ;

5 : épiderme noir et pulpe violette sur moins de la moitié de la pulpe ;

6 : épiderme noir et pulpe violette sur plus de la moitié de la pulpe ;

7 : épiderme noir et pulpe entièrement violette.

I.1.3 Extraction des huiles

L'extraction de l'huile des différents échantillons d'olives est effectuée au niveau du laboratoire de l'*I.T.A.F.V* de Takerietz au moyen d'un oléodoseur (Levi-Dilon-Lerogsame), selon les étapes suivantes : broyage, malaxage et centrifugation.

✚ Le broyage est réalisé par un broyeur à marteau ;

✚ Le malaxage est effectué en deux temps : 15 minutes sans eau et 15 minutes après ajout de 50 ml d'eau à 30°C pour 920g de pates d'olives ;

✚ La centrifugation pendant une minute de la pate malaxée est réalisée à l'aide d'une centrifugeuse verticale ayant une vitesse de 4845 tours /min; qui sépare la phase liquide de la phase solide.

Après décantation, les huiles sont recueillies dans des flacons en verre fumé, remplis, étiquetés et conservés à une température de 4°C.

I.2 Détermination des indices de qualité de l'huile d'olive

I.2.1 Acidité

L'acidité qui mesure le pourcentage en acides gras libres, est déterminée selon la méthode décrite dans le règlement CEE/2568/91 relative aux caractéristiques des fruits d'olives et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes. Le principe de la

méthode consiste en un titrage des acides gras libres présents par une solution ethanolique d'hydroxyde de potassium.

Un échantillon d'huile de 5 ml est solubilisé dans 20 ml d'un mélange (V/V) d'oxyde diéthylique-ethanol à 95%. Le mélange est titré, en agitant, avec une solution d'hydroxyde de potassium à 0,1N jusqu'à un virage de l'indicateur coloré (la phénolphthaléine), vers le rose, persistant pendant au moins 10 secondes. L'acidité est exprimée en pourcentage de poids d'acide oléique, elle est égale à :

$$A \% (\text{d'acide oléique}) = (V - V_0) * (N * M / 10 * m)$$

V et V_0 : volume en ml de KOH nécessaire pour neutraliser l'échantillon et le blanc, respectivement ;

N : normalité de l'hydroxyde de potassium ;

M : masse molaire g/ml de l'acide oléique qui est égale à 282 g/ml ;

m : masse en g de la prise d'essai.

I.2.2 Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde représente la quantité des substances de l'échantillon exprimée en meq d' O_2 actif /Kg, qui oxydent l'iodure de potassium.

La méthode utilisée est celle du règlement CEE /2568/91. Un échantillon de 2 g d'huile est introduit dans une fiole à col rodé, 10 ml de chloroforme sont ajoutés, tout en agitant, afin de dissoudre l'huile ; suite à quoi 15 ml d'acide acétique glaciale et 1 ml d'iodure de potassium saturé sont ajoutés, la fiole est bouchée rapidement, puis agitée vigoureusement pendant 1 minute et laissée à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante. 75 ml d'eau distillée sont ensuite ajoutés ainsi que quelques gouttes d'empois d'amidon, le tout est titré avec le thiosulfate de sodium ($Na_2 S_2 O_3$) à 0,01N en agitant vigoureusement. L'indice de peroxyde est donné par l'expression ci après :

$$I_P = N (V - V_0) * 1000 / m \text{ (meq d}'O_2 \text{ /Kg)}$$

N: normalité $Na_2S_2O_3$;

V, V_0 : volume en ml de $Na_2S_2O_3$ nécessaire pour le titrage de l'échantillon et de l'essai à blanc, respectivement ;

m : masse en gramme de la prise d'essai.

I.2.3 Absorbance spécifique dans l'Ultraviolet

Les absorbances à 232 nm et 270 nm d'un corps gras renseignent sur son degré d'oxydation. L'extinction spécifique est déterminée selon la méthode décrite par COI (1996). Après filtration des échantillons d'huiles à travers le sulfate de sodium anhydre, une solution à 1% d'huile dans le hexane est préparée. L'absorbance est mesurée à deux longueurs d'ondes 232 nm et 270 nm. Les coefficients d'extinction E_{232} et E_{270} sont exprimés par l'équation suivante :

$$E = A\lambda / C * l$$

E : extinction spécifique à la longueur d'onde λ ;

$A\lambda$: absorbance à λ nm ;

C : concentration de la solution en g/100 ml ;

l : épaisseur de la cuve en centimètre.

I.3 Composition en acides gras des huiles

a) Préparation des esters méthyliques

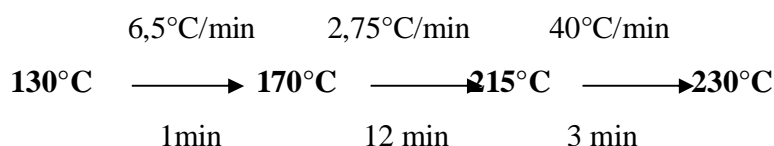
Les esters méthyliques sont préparés suivant la méthode E.C. (2002). Une aliquote de 0,5g d'huile est dissoute dans 5ml d'hexane pour chromatographie, à laquelle sont ajoutés 0,5 ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (2 N). Le tout est agité pendant 30 secondes, puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 5 minutes. 2 gouttes du surnageant sont prélevées et mélangées avec 1ml d'hexane.

b) Dosage qualitatif et quantitatif

Un volume de 1 μ l des esters méthyliques sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse de type Chrompack C 9002 dont les conditions d'analyse sont décrites ci après :

- ✓ Injecteur : SPLIT 1/100 ;
- ✓ Colonne capillaire DB 23 : (longueur : 30, diamètre intérieur : 0,32 mm et épaisseur : 0.25 μ m);
- ✓ Gaz vecteur : Azote ;
- ✓ Détecteur : FID ;
- ✓ Températures :(injecteur : 250 °C, détecteur : 250 °C et le four : 200 °C) ;
- ✓ Vitesse du papier : 0.5 cm/min ;

- ✓ Programme (gradient de température).



Les acides gras sont identifiés en fonction de leur temps de rétention au niveau de la colonne par comparaison à des acides gras étalons. La quantité de chaque acide gras est donnée en % d'acide gras totaux.

I.4 Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est réalisée suivant le protocole de Tsimidou *et al* (1992) modifié. Cinquante grammes d'huile sont dissout dans 50 ml d'hexane, cette solution est introduite dans une ampoule à décanter ou 30 ml du mélange méthanol/eau (80/20) sont ajoutés, le mélange est agité vigoureusement durant 5 min puis laissé décanter, la phase polaire (phase méthanolique) contenant les composés phénoliques est récupérée, tandis que la phase apolaire subit une 2^{ème} et une 3^{ème} extraction pour récupérer la fraction phénolique restante. Chaque fraction polaire récupérée subit un lavage avec 50 ml d'hexane. Les solutions sont concentrées sous vide à l'aide d'un rotavapor, à une température de 40 °C, jusqu'à avoir des volumes d'extraits d'environ 2 ml. Le séchage des extraits est complété dans l'étuve a 40 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Les extraits secs obtenus sont pesés pour estimer le rendement d'extraction par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P1 - P0)/E] \times 100$$

P0 : poids du récipient vide (g).

P1 : poids du récipient après évaporation du solvant (g).

E : poids de l'échantillon initial (Huile d'olive en g).

Les extraits sont dissous dans du méthanol/eau (80/20) à des volumes connus pour donner des solutions mères à des concentrations connues, les extraits sont conservés à 4 °C

I.5 Dosages des composés phénoliques

I.5.1 Dosage des composés phénoliques totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques a été réalisée selon la méthode au Folin-Ciocalteu utilisée par Favati *et al.* (1994).

Dans des fioles de 20 ml, sont mélangés 2 ml d'extrait méthanolique, 5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 4 ml de solution de carbonate de sodium (10%) sont ajoutés, ensuite ajuster à 20 ml avec de l'eau distillée. Après 90 min d'incubation à l'obscurité, le mélange est filtré et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm.

La concentration en composés phénoliques des extraits de l'huile est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe 2) obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. Les concentrations en polyphénols totaux des extraits méthanoliques d'huile d'olive sont exprimées en mg d'E.A.G./Kg.

I.5.2 Détermination de la teneur en *ortho*-diphénols

La méthode est basée sur la formation de complexe jaune, entre les *ortho*-diphénols et les ions molybdate, qui absorbent au voisinage de 370 nm (Ollivier *et al.*, 2004).

La concentration en *ortho*-diphénols des extraits méthanoliques des échantillons d'huile est déterminée suivant la méthode de Bendini *et al.* (2003). Un volume de 0,5 ml d'extrait méthanolique est additionné de 5 ml du mélange méthanol/eau (1 :1), 4 ml du mélange est additionné à une solution de molybdate de sodium dishydraté à 5% dans l'éthanol-eau (V/V), le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 1min, puis mis à l'obscurité pendant 15min et ensuite il est filtré. L'absorbance est mesurée à 370 nm.

Les teneurs en *Ortho*-diphénols des échantillons sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 2) réalisée avec de l'acide caféique comme standard. Les résultats sont Exprimés en mg d'E.A.C./Kg d'huile d'olive.

I.6 Détermination des phénols des huiles d'olive par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) (Norme Grassi e Derivati, 2007) :

La méthode se base sur une extraction des composés mineurs polaires de nature phénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique « méthanol/ eau

(80/ 20) » suivie de leur dosage par HPLC au moyen d'un révélateur UV à 280 nm. L'étalon interne est l'acide syringique.

Un volume de 20 μ L d'échantillon est injecté sur une colonne C18 de type Spherisorb ODS-2 (4,6 mm \times 250 mm, taille des particules : 5 μ m). La phase mobile est composée : eau/acide orthophosphorique (99,8 : 0,2 V/V), méthanol, acide acétonitrile.

La teneur correspondant aux polyphénols totaux, individuelles sont exprimé en mg/kg et les polyphenols oxydés (%).

I.7 Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques

I.7.1 Pouvoir réducteur

Ce pouvoir mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique Fe^{3+} (FeCl_3) en fer ferreux Fe^{2+} (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène ferricyanure de potassium $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$. Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (Chou *et al.*, 2003)

Le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques a été déterminé selon la méthode de Lugasi *et al.* (2003). Un volume de 1 ml d'extrait méthanolique est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH=6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés au mélange avant d'être centrifugé à 1500 tours par min pendant 10 minutes. Dans un tube à essai, sont mélangés 2,5 ml de surnageant, 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (Fe Cl_3) à 0,1%. L'absorbance est mesurée à 700 nm après 10 min.

La quantité d'antioxydants ayant un pouvoir réducteur est déterminée à partir des courbes d'étalonnage réalisées avec l'acide gallique (annexe2), les résultats sont exprimés en mg d'E.A.G./Kg

I.7.2 Activité scavenger sur le radical DPPH

Le Diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration jaune pâle. Ce

passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (Molyneux, 2004 ; Villano *et al.*, 2007).

Un volume de 0,1 ml d'extrait est mélangé avec un volume de 2,9 ml solution méthanolique de DPPH (6×10^{-5} M). La décoloration par rapport au témoin, contenant le DPPH et le solvant, est mesurée au spectrophotomètre à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité (Keceli *et al.*, 2001).

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon la formule suivante :

$$\text{(\% d'inhibition du DPPH)} = (\text{Ac} - \text{Ae} / \text{Ac}) \cdot 100$$

Ac : Absorbance du contrôle ;

Ae : Absorbance de l'échantillon.

I.7.3 Activité scavenger sur le radical ABTS :

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans en 1993 (Prior and Cao., 1999; Van den Berg *et al.*, 2000), elle consiste en la réduction du radical-cation 2,2'-azobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) plus connu sous le nom de ABTS⁺. Ce dernier est mis en solution aqueuse avec persulfate du potassium pour générer le radical, ce radical ABTS⁺ stable, coloré présente une absorbance maximale à 734nm, une fois que le radical est formé, l'antioxydant est ajouté, la diminution de l'intensité de la couleur bleu verte du radical cationique traduit son interaction avec un électron ou un hydrogène provenant de l'échantillon antioxydant (Pannala *et al.*, 2001; Marc *et al.*, 2004; Nenadis *et al.*, 2004)

Le pouvoir anti-radicalaire contre le radical cationique ABTS⁺ a été déterminé selon la méthode de RE *et al.* (1999). Une solution d'ABTS à 7mM et 2,45mM persulfate du potassium est préparée dans 25ml d'eau distillée, cette solution est incubée à l'obscurité pendant 18h à température ambiante. Ce laps de temps permet la formation du radical ABTS⁺. La solution ainsi obtenue est bleue verte et stable, elle peut être conservée à température ambiante.

Un volume de 10 μ l d'extrait est additionné à un volume de 990 μ l de solution ABTS⁺. La décoloration par rapport au témoin, contenant l'ABTS⁺ et le solvant (éthanol), est mesurée au spectrophotomètre à 734 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ selon la formule suivante :

$$\text{(\% d'inhibition du ABTS}^+\text{)} = (\text{Ac} - \text{Ae} / \text{Ac}) \cdot 100$$

Ac : Absorbance du contrôle ;

Ae : Absorbance de l'échantillon.

Les graphiques de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration a permis de déterminer le EC₅₀ (concentration correspondant à 50% d'inhibition)

I.7.4 Détermination de l'activité scavenging du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule stable, qui diffuse très facilement à l'intérieur de la cellule (Goudable et Favier, 1997). C'est un oxydant très puissant, la majeure partie de sa toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle en présence d'ions ferreux (réaction de Fenton) (Vamecq *et al.*, 2004; Kevin *et al.*, 2005).

La capacité des extraits méthanoliques d'huile à piéger le peroxyde d'hydrogène a été mesurée selon la méthode rapportée par Benkeblia, (2005). Un volume de 2 ml d'extrait méthanolique est ajouté à 1,2 ml de solution de H₂O₂ (40 mM) qui a été préparée dans un tampon phosphate (0,1M, pH = 7,4). La concentration en H₂O₂ est déterminée au spectrophotomètre en mesurant l'absorbance de l' H₂O₂ (coefficient d'extinction est 81 M⁻¹ cm⁻¹). L'absorbance de H₂O₂ est mesurée à 230 nm après 10 min de réaction. Le témoin est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant.

Le pouvoir antioxydant est exprimé en pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène par les antioxydants selon la formule suivante :

$$\text{(\% d'inhibition d'H}_2\text{O}_2\text{)} = [(\text{Ac} - \text{Ae}) / \text{At}] \cdot 100$$

Ac : Absorbance du témoin ;

Ae : Absorbance de l'échantillon.

I.8 Détermination de l'activité antibactérienne :

➤ Les souches bactériennes :

Six souches sur lesquelles nous avons testées l'activité antibactérienne des extraits ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène pour l'homme. Elles sont issues de sources différentes.

✚ Bactéries à Gram positif

-*Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538 (SAIDAL- Antibiotical)

- *Listeria innocua*; CLIP 74915

-*Bacillus subtilis* ; ATCC 6633 (SAIDAL Antibiotical)

✚ Bactéries à Gram négatif

-*Escherichia coli* ; Nalidixic Acid Resistant (NAR) (LMA)

-*Klebsiella pneumoniae* ; E47 (LMA)

-*Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC 27853 (Institut Pasteur)

I.8.1 Standardisation des inocula bactériens :

Il a bien été établi que la taille de l'inoculum bactérien est susceptible de modifier largement les résultats des tests de détermination de la sensibilité in vitro pour de nombreux antibiotiques et chez de nombreuses espèces bactériennes (Garrabé *et al.*, 1998). C'est pour cela que la standardisation de l'inoculum bactérien est un facteur qui contribue de façon essentielle à la qualité des résultats de l'antibiogramme.

Une suspension bactérienne de quelques colonies d'une culture fraîche (18 heures) préparée dans de l'eau physiologique est soumise à un balayage entre 380-780 nm. Les longueurs d'onde maximale ont été déterminées pour chaque souche.

A partir de la suspension bactérienne initiale préparée à une absorbance de 0,5, une série de dilutions décimales est effectuée (10^{-4} jusqu'à 10^{-8}). Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé en surface se servant d'un râteau étaleur sur gélose PCA, des dénombrements sont alors effectués après incubation à 37°C pendant 24 heures.

I.8.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques :

I.8.2.1 Diffusion sur milieu gélosé :

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques est évaluée par la méthode diffusion sur milieu gélosé «l'antibiogramme». Cette méthode repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support en papier pré imprégné (Denis *et al.*, 2007). L'antibiotique diffuse à partir du disque de papier selon un gradient de concentration, après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition claire entourant le disque sert à mesurer la puissance de l'antibiotique contre le microorganisme (Jawetz *et al.*, 1973).

Le protocole suivi pour réaliser cet antibiogramme est rapporté par plusieurs auteurs (Bisignano *et al.*, 1999; Canadanovic-Brunet *et al.*, 2008; Kappel *et al.*, 2008)

- A partir d'une culture pure et fraîche de 24 heures, des colonies isolées sont raclées puis mises dans 9 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, les inocula sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0,50 aux absorbances déjà déterminées.
- Un écouvillon stérile trempé dans une suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml sert àensemencer des géloses Mueller-Hinton coulées dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre avec une épaisseur d'au moins 4mm.
- Des disques de papier stérile (REF-NO : 321 261,06 mm de diamètre) sont disposés à égale distance les uns des autres et de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibition sur la gélose. Une légère pression sera exercée sur chaque disque afin d'obtenir une bonne adhérence.
- Chaque disque est imprégné à l'aide d'une pipette Eppendorf d'une quantité de 20µl d'une solution d'extrait préparé dans du méthanol/eau (80/20) aux dilutions suivantes (solution mère (SM), 1/2, 1/4, 1/8 correspondant 1, 0,5, 0,25, 0,12 mg/disque respectivement). Des disques imprégnés de 20µl de méthanol/eau (80/20) sans extraits sont utilisés comme témoins négatifs et des standards d'acide gallique, quercétine, acide cinnamique et d'acide caféique ont été également testés.
- Les boites sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, les boites sont par la

suite mises à incuber pendant 24 h à la température de croissance du germe cible. Les diamètres des zones d'inhibition seront alors mesurés à l'aide d'un « pied à coulisse ».

I.8.2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactericides (CMB) sur milieu solide :

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration de d'extrait qui inhibe en 18 heures la croissance visible d'un inoculum bactérien (Thabaut et Durosoir, 1979), le principe consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'extrait. La CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'extrait.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits méthanolique ont été déterminées selon la méthode décrite par Tunçel et Nergiz (1993).

a) Préparation des boîtes :

- Une solution mère de l'extrait à 5 mg/ml a été préparée.
- A partir de cette solution mère, une gélose Mueller Hinton en surfusion est additionnée aux concentrations croissante d'extraits méthanoliques (annexe 3 tableau II)
- Après homogénéisation, le milieu (Mueller Hinton + extrait methanolique) est coulé sur boite puis séché 30 minutes à l'étuve à 37° C.

b) Ensemencement

L'inoculation est effectuée en surface, sous forme de spot de 1µl de suspension bactérienne (10^7 cellules/ml), soit 10^4 UFC/spot, un témoin sans extraits a été réalisé et des standards d'acide gallique, quercétine, acide cinnamique et d'acide caféique ont été également testés. La lecture du résultat a été effectuée après 24h d'incubation à 37C°. Les valeurs de CMI sont déterminées comme étant la plus petite concentration d'extrait déposé avec absence visible de croissance à chaque temps de lecture.

- Dans le but de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB), des tubes de bouillon nutritif ont été ensemencés par un prélèvement effectué au niveau du spot où il n'ya pas croissance, l'absence de trouble après 24h d'incubation à 37 C° indique un effet bactéricide.

I.8.2.3 Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait de la variété *Bouricha* :

Dans le but de déterminer le pouvoir de l'extrait à inhiber la croissance *S. aureus*, nous avons suivi l'évolution de la croissance de ce dernier en présence et en absence de l'extrait, le protocole suivi est décrit par Sousa *et al.* (2006) (figure 3).

Un volume de 1,2 ml du bouillon nutritif stérile est additionné avec 1,5ml d'extrait méthanolique à une concentration de 50mg/ml, la suspension estensemencée avec 300µl d'une culture *S. aureus* (10^8 cellules/ml) pour atteindre un taux de 10^7 cellules/ml dans la solution finale. Un tube témoin est réalisé en remplaçant 1,5 de l'extrait par 1,5 de la solution méthanol/eau (80/20).

Les cultures sont incubées à 37°C, et la croissance de *S. aureus* est suivie par des dénombrements sur gélose de PCA.

Les prélèvements sont effectués au moment de l'ensemencement (Temps 0), puis toutes les 2h pendant 24h d'incubation.

I.9 Etude statistique

Chaque test est réalisé en trois essais et les résultats représentent la moyenne des trois mesures. Une étude statistique a été réalisée pour la comparaison des résultats et la mise en évidence des différences significatives entre les échantillons, et ce, pour chaque paramètre en appliquant une analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de Newman-keuls à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5. Le degré de signification des résultats est pris à la probabilité $p < 0,05$. Les coefficients de corrélation de PEARSON sont réalisés avec le même logiciel.

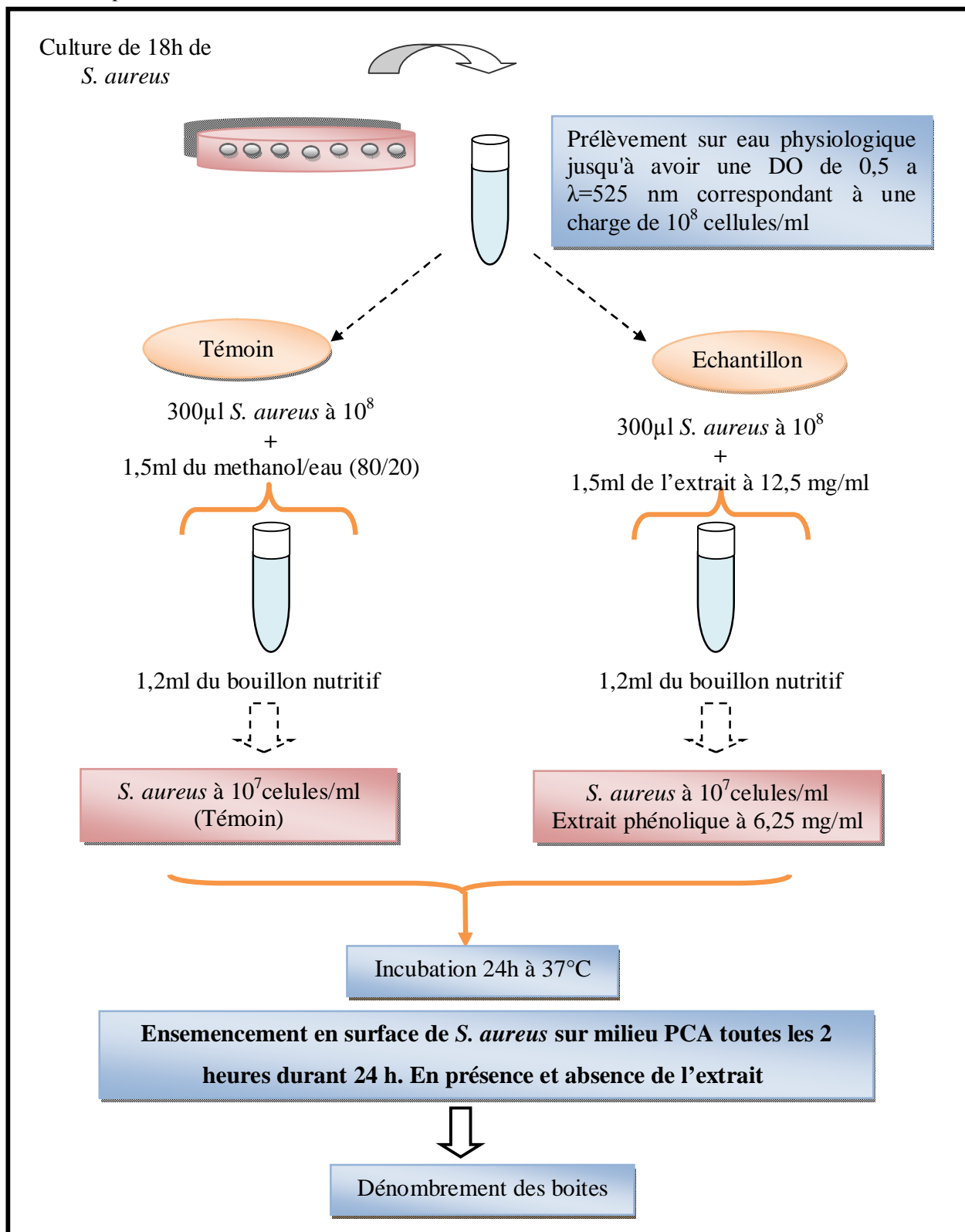


Figure 3 : Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété *Bouricha* (Sousa *et al.*, 2006)

Chapitre II
Résultats et Discussion

II. Résultats et discussion

II.1 Indice de maturité

L'indice de maturité est un paramètre qui nous renseigne d'une façon globale sur la maturité des fruits. Les résultats obtenus représentés dans le tableau ci-dessous, montrent des valeurs de l'indice de maturité qui varient entre 3,38 pour la variété *Aghenfas* et 6,79 pour la variété *Tabelout*. Cette variation peut être liée à la variation de la période de récolte étant donné que la variété *Tabelout* est récoltée à une époque tardive (03/01/2009) par rapport aux variétés *Limli*, *Bouricha*, *Aghenfas* et *Neb Djemel* (entre 05/11/2008 et 02/12/2008)

L'analyse statistique permet de répartir nos variétés en groupes homogènes (*Aghenfas*, *Bouricha* et *Limli*), (*Akerma*, *Bouchouk Soummam* et *Neb Djemel*) et (*Akerma*, *Blanquette de Guelma* et *Ferkani*).

Tableau X : Valeurs de l'indice de maturité des olives.

Variété	Date de la récolte	Indice de maturité
<i>Aghenfas</i>	02/12/2008	3,38±0,17 ^a
<i>Akerma</i>	20/12/2008	4,73±0,08 ^{c.d}
<i>Blanquette de Guelma</i>	24/12/2008	4,85±0,01 ^d
<i>Bouchouk Soummam</i>	20/12/2008	4,46±0,19 ^c
<i>Bouricha</i>	10/11/2008	3,88±0,17 ^{a.b}
<i>Chemlal</i>	30/12/2008	5,55±0,44 ^e
<i>Chemlal Tazmalt</i>	01/01/2009	4,01±0,01 ^b
<i>Ferkani</i>	23/12/2008	5,02±0,09 ^d
<i>Limli</i>	05/11/2008	3,72±0,07 ^{a.b}
<i>Neb Djemel</i>	02/12/2008	4,40±0,06 ^c
<i>Tabelout</i>	03/01/2009	6,79±0,12 ^f

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative (p<0,05),

* Chaque valeur représente la moyenne ± écart type (n = 3).

Bien que les variétés *Bouchouk Soummam*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani* et *Tabelout* soient récoltées à la même période (fin décembre début janvier), elles enregistrent un écart non négligeable dans l'indice de maturité, ceci est probablement lié à l'effet variétal suite à des facteurs génétiques ; certaines variétés entrent en maturation plus vite que d'autres. Des

résultats similaires sont observés par El Antari *et al.* (2003) qui ont noté que la variété marocaine *Manzanilla* se distingue par sa vitesse élevée d'entrée en maturité.

D'autres facteurs peuvent également influencer l'indice de maturité dont la charge de l'olivier. Selon El Antari *et al.* (2000), la charge des arbres en fruits engendre une compétition entre les fruits dont résultent les faibles valeurs d'indice de maturité au moment de la récolte.

II.2 Indices de qualité de l'huile d'olive

II.2.1 Acidité

L'acidité est l'un des principaux critères de qualité de l'huile d'olive. Des dix variétés étudiées, *Chemlal Tazmalt* se caractérise par une huile à faible acidité (0,05%) alors que la valeur la plus élevée est enregistrée pour la variété *Tabelout* avec une acidité de 0,23 % (Figure 4), elle reste néanmoins inférieure à la limite établie par le COI (2003) qui est de 0,8% pour l'huile d'olive extra vierge. Selon El Antari *et al.* (2000), dans les conditions où les olives sont récoltées à la main et transformées directement sans procéder au stockage, l'acidité de l'huile ne devrait guère dépasser 0,5 %, ce qui est le cas de nos huiles extraites des variétés étudiées.

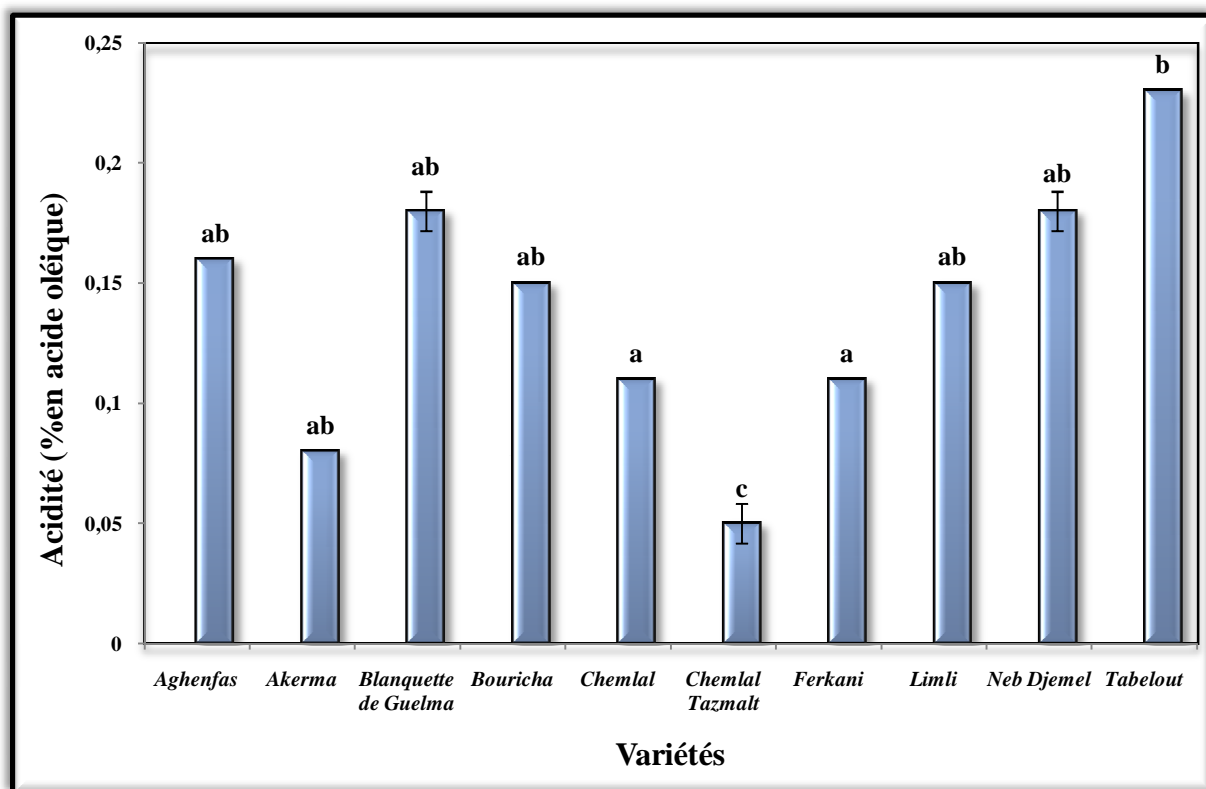


Figure 4 : Acidité des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

Les huiles des variétés étudiées sont moins acides que les huiles des variétés tunisiennes analysées par Zarrouk *et al.* (2008), pour lesquelles l'acidité libre est comprise entre 0,38 et 0,41% d'acide oléique, elles sont proches des huiles des variétés espagnoles *Picual*, *Cornicabra*, *Manzanilla*, *Arbequina* et *Local* dont les valeurs sont comprises entre (0,10 et 0,25 %) (Pardo *et al.*, 2007) et des variétés d'huiles européennes introduites en Tunisie ainsi que la variété tunisienne *Chemlali* dont les teneurs varient entre (0,11 et 0,28 %) (Dabbou *et al.*, 2010).

Des différences significatives sont relevées entre la variété *Tabelout* et *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt* et *Ferkani* et entre *Chemlal Tazmalt* et les neuf autres variétés. L'indice de maturité peut expliquer en plus de l'influence du cultivar les différences obtenues entre les différentes variétés.

L'acidité élevée de l'huile de la variété *Tabelout* peut être expliquée par le fait que les olives de cette variété sont récoltées tardivement. D'après Yousfi *et al.* (2006), l'acidité de l'huile de la variété *Arbequina* passe de 0,13% à 0,29% au bout d'un mois et demi de maturation durant lequel l'indice de maturité passe de 3,5 à 5,5. Cette élévation est due à l'augmentation de l'activité enzymatique spécialement l'enzyme lipolytique (Salvador *et al.*, 2001; Ben Youssef *et al.*, 2010). D'autre part, Michelakis (1992) a rapporté qu'une cueillette au delà de la période optimale de maturité prolonge le risque d'endommagement de l'olive, ce qui provoque des lésions cellulaires de la pulpe des olives. Ces lésions peuvent contribuer à l'accélération des processus d'hydrolyse qui se traduisent par une augmentation de l'acidité libre.

II.2.2 Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde détermine la quantité d'hydroperoxydes présents dans l'huile d'olive, ce qui permet de mesurer l'autooxydation des lipides (Haddada *et al.*, 2008). On note des différences significatives entre les variétés étudiées ($p < 0,05$) (figure 5) sauf entre les variétés *Bouricha* et *Ferkani*, entre *Bouricha* et *Aghenfes* entre *Chemlal* et *Neb Djemel* et entre, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* et *Limli*.

Les huiles analysées montrent des indices de peroxyde qui varient entre 3,25 meq O₂/Kg pour la variété *Tabelout* et 8,75 meq O₂/Kg pour la variété *Limli*. Les valeurs atteintes sont inférieures à la norme commerciale du COI, (2003) (20 meq O₂/Kg) des huiles d'olives de catégorie extra-vierge. Les huiles de nos variétés présentent des indices de peroxyde proches de ceux enregistrés pour les huiles des variétés tunisiennes *Chétoui*, *Jarboui*, *Ain Jarboua*, *Neb Jmel*, *Rekhami*, *Regregui* qui varient entre 2,63 et 7,90 meq d'O₂/Kg (Haddada

et al., 2008) et des variétés espagnoles *Picual*, *Hojiblanca* et *Arbequina* (4,30 et 7,5 meq d'O₂/Kg) (Gutiérrez et al., 2002) mais inférieures à certaines variétés italiennes pour lesquelles l'indice de peroxyde varie entre 5,3 et 24 meq d'O₂/Kg (Del Carlo, 2004) et des variétés turques (entre 7,37 et 16,08 meq d'O₂/Kg) (Ocakoglu et al., 2009).

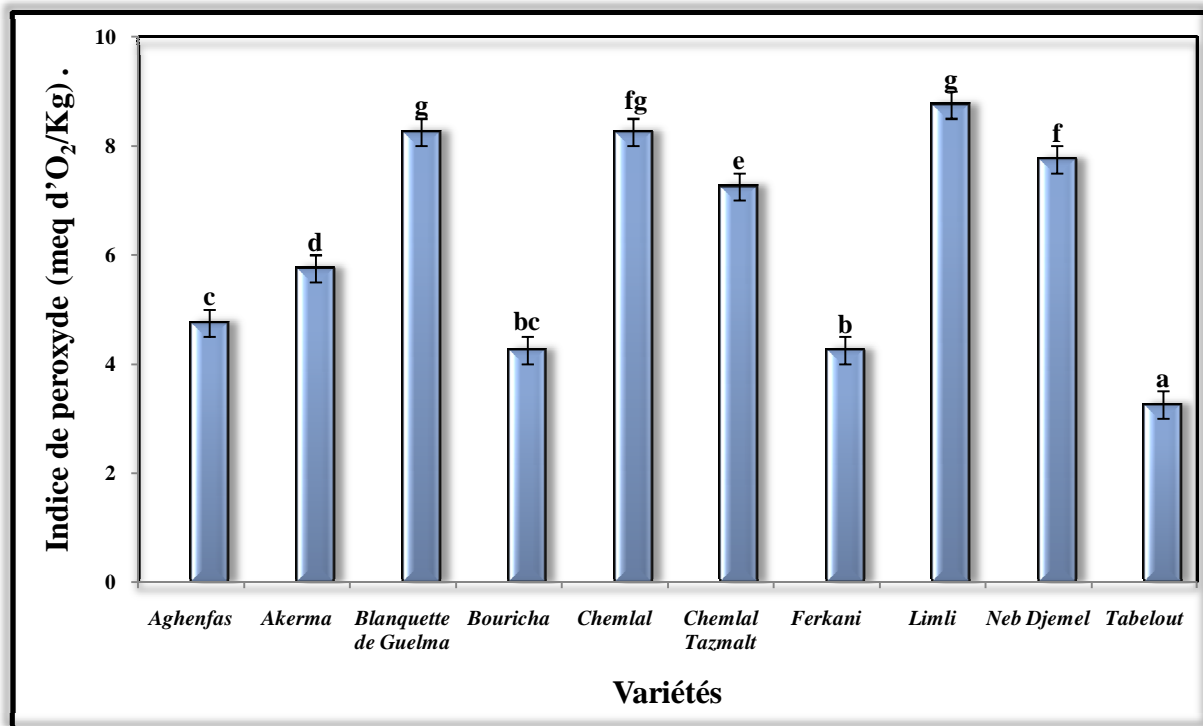


Figure 5 : Indice de peroxyde des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),
* les barres verticales représentent les écarts types.

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs relativement faibles d'indice de peroxyde, ce qui traduit une faible oxydation de l'huile. Selon Sanchez Casas et al. (1999), l'indice de peroxyde pourrait être retenu pour contrôler les problèmes de production, en particulier les problèmes qui peuvent se produire après la récolte et au cours de la transformation.

II.2.3 Absorbance dans l'ultraviolet

Les extinctions spécifiques d'une huile d'olive à 232 et 270 nm reflètent l'état d'oxydation de l'huile. L'oxydation conduit à la formation des diènes conjugués qui absorbent à 232 nm, les produits secondaires d'oxydation présentent un maximum d'absorbance vers 270 nm.

Des différences significatives ($p < 0,05$) sont enregistrées au sein des cultivars sauf entre les variétés *Akerma* et *Chemlal* pour le coefficient K_{232} (figure 7) et entre les huiles *Aghenfas*, *Akerma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Limli* et *Neb Djemel* pour le coefficient K_{270} (figure 6).

Les valeurs les plus élevées du coefficient K_{232} sont relevées pour la variété *Akerma* (2,46) et *Chemlal* (2,44) et la valeur la plus basse pour la variété *Tabelout* (1,15). Quant au coefficient K_{270} , les valeurs se situent entre 0,107 et 0,206. Les échantillons d'huile présentent tous des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K_{232} , K_{270}) inférieurs aux limites établies par le COI (2003) pour une huile d'olive extra-vierge ($K_{232} \leq 2,5$ et $K_{270} \leq 0,22$).

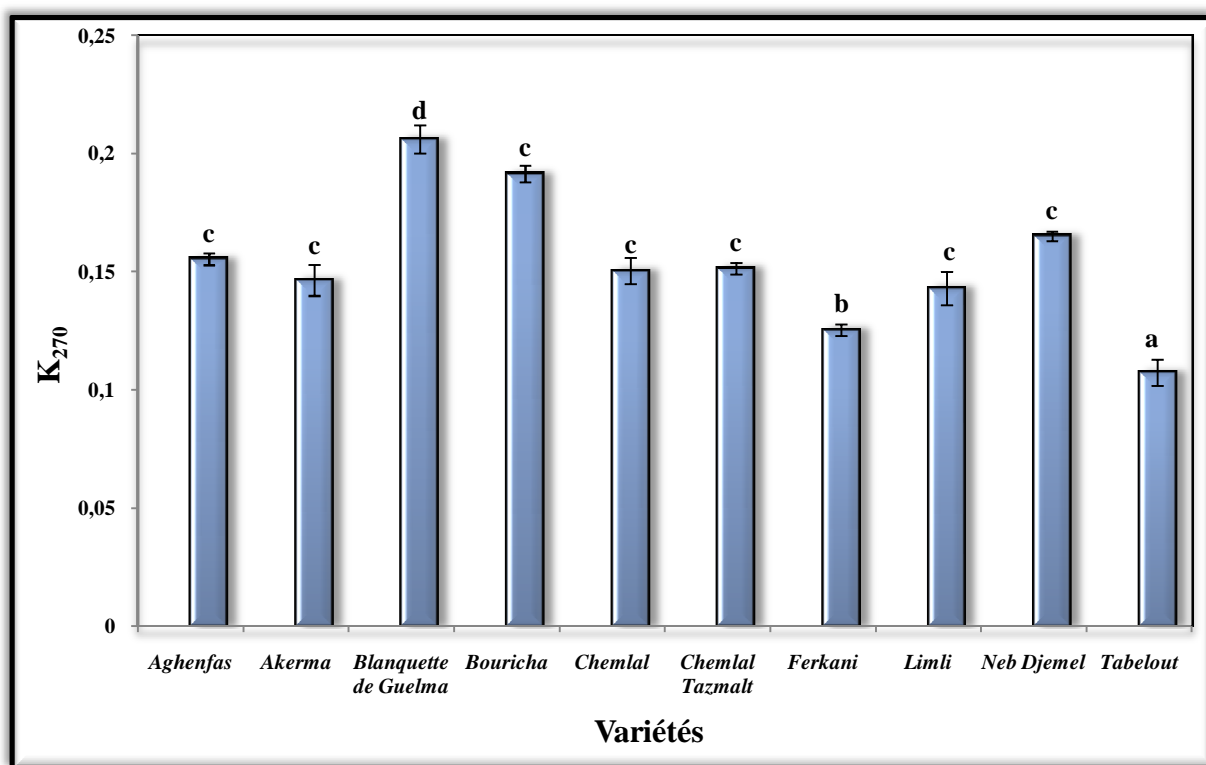


Figure 6 : Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

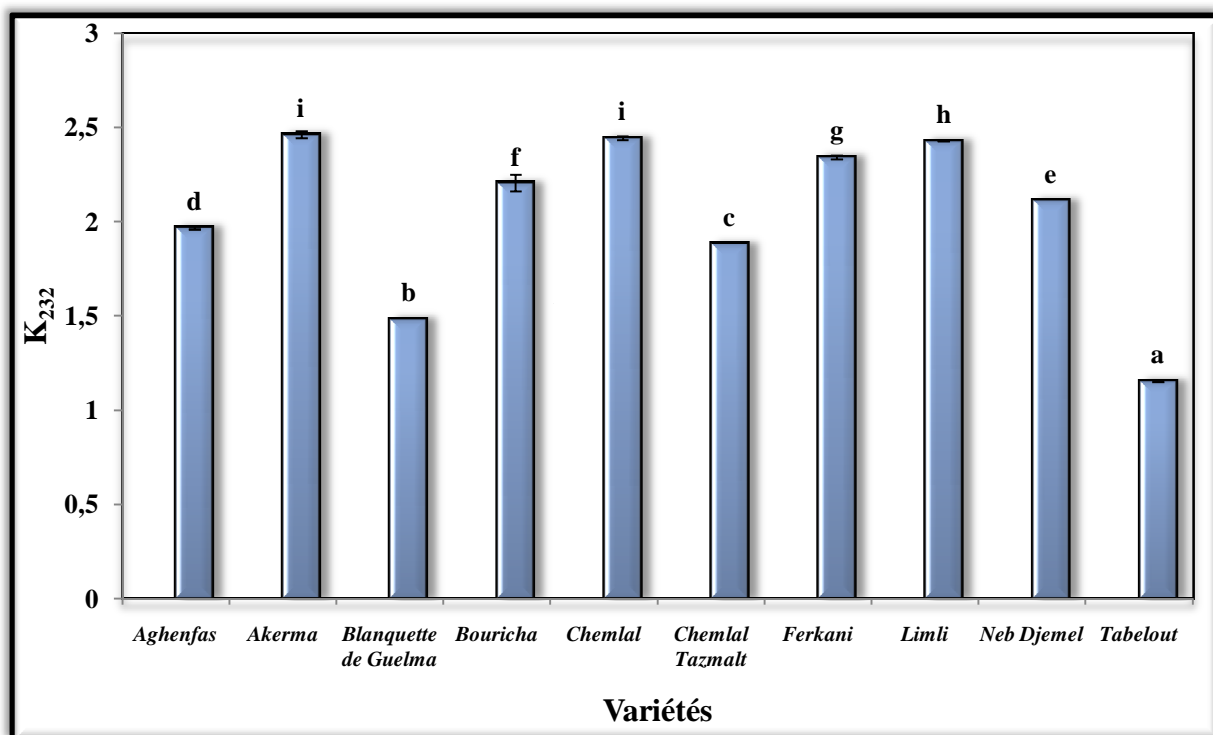


Figure 7: Coefficient d'extinction spécifique à 232 nm des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

Nos résultats sont proches de ceux enregistrés pour les variétés européennes introduites en Tunisie *Ascolana Tenera*, *Koroneiki* et *Picholine* qui varient entre 1,6 et 2,8 (pour le coefficient K_{232}) et entre 0,1 et 0,2 (pour coefficient K_{270}) (Dabbou *et al.*, 2009) et des variétés grecques (1,20 à 2,40 pour le coefficient K_{232} et 0,07 à 0,20 pour coefficient K_{270}) (Blekas *et al.*, 2002).

Les principaux facteurs responsables de l'oxydation sont le contact de l'huile avec l'air et son exposition à la lumière. Ceci est favorisé par les attaques d'insectes ou les blessures des fruits, ce qui permet le contact de l'oxygène avec l'huile contenue dans le mésocarpe.

Les résultats d'analyses (acidité, indice de peroxyde et des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K_{232} , K_{270})) effectuées sur les huiles produites à partir des dix variétés étudiées s'inscrivent tous parfaitement dans les limites définies par le COI (2003) pour une huile d'olive extra vierge, ce qui nous permet de classer les huiles issues de ces variétés dans cette catégorie « extra vierge ».

II.3 Composition en acides gras des huiles

L'analyse de la composition des acides gras totaux (tableau XI), est qualitativement similaire entre les échantillons. Quantitativement, toutes les huiles des variétés étudiées présentent des teneurs en différents acides gras répondant aux normes établies par le COI (2003) pour les huiles d'olives extra vierge.

L'acide oléique est l'acide gras dominant, toutes les variétés étudiées ont des proportions supérieures à 60%. Ces proportions peuvent distinguer entre les variétés, les valeurs les plus élevées sont enregistrées respectivement pour les variétés *Bouchouk Soummam*, *Aghenfas* et *Tabelout* (73,11%, 72,13% et 70,97%) suivies des variétés *Akerma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli* et *Neb Djemel*, la plus faible valeur étant notée pour la variété *Blanquette de Guelma* (61%). Ces taux sont très proches de ceux obtenus pour des variétés marocaines (El Antari *et al.*, 2003), des variétés tunisiennes (Haddada *et al.*, 2007) et des variétés turques (Gurdeniz *et al.*, 2008) ; supérieurs aux teneurs des variétés *Chemlali* et *Chétoui* de Sousse et de Sfax (Guerfel *et al.*, 2009) et de la variété espagnole *Arbequina* (Allalout *et al.*, 2009) et inférieurs aux taux enregistrés par Pardo *et al.* (2007) pour des variétés espagnoles (*Picual*, *Cornicabra*, *Manzanilla*, *Arbequina*, *Local*).

D'après Gutierrez *et al.* (1999), au cours de la maturation des olives, l'acide oléique est transformé en acide linoléique par l'enzyme oléate désaturase. Le rapport acide oléique/acide linoléique est utilisé comme paramètre de stabilité, plusieurs études ont montré qu'un rapport élevé engendre une stabilité oxydative importante (Haddada *et al.*, 2007)

Les variétés *Bouchouk Soummam*, *Aghenfas* et *Tabelout* se distinguent des autres variétés par les taux les plus faibles en acide linoléique soit 9,23, 9,31 et 8,93% respectivement. Ces variétés se caractérisent ainsi par les rapports acide oléique/acide linoléique les plus élevés (7,92, 7,75 et 7,95). Des résultats similaires sont rapportés par Oueslati *et al.* (2009) pour la variété tunisienne *Fakhari Douirat*. La variété *Blanquette de Guelma* présente le taux le plus élevé en acide linoléique (21,67%), elle se caractérise ainsi par le rapport acide oléique/acide linoléique le plus faible. Des résultats proches sont relevés pour la variété *Chétoui* cultivée à Sousse ville de la Tunisie (Guerfel *et al.*, 2009).

Certains acides gras minoritaires peuvent également être utilisés comme indicateur variétal. La variété *Akerma* se distingue du reste des variétés par la plus faible proportion en acide gadoléique (0,10%), par rapport aux autres variétés dont les taux oscillent entre 0,23% et 0,43%.

Tableau XI : Valeurs moyennes des acides gras totaux des huiles des variétés (en % des acides gras totaux).

	<i>Aghenfas</i>	<i>Akerma</i>	<i>Blanquette de Guelma</i>	<i>Bouchouk Soummam</i>	<i>Bouricha</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Chemlal Tazmalt</i>	<i>Ferkani</i>	<i>Limli</i>	<i>Neb Djemel</i>	<i>Tabelout</i>
C16 :0	13,59	14,89	12,51	12,39	18,45	17,02	19,15	14,21	18,97	19,55	16,27
C18:0	2,85	2,35	2,65	3,12	2,70	1,75	1,82	2,52	2,57	1,88	2,47
C18:1	72,13	67,38	61	73,11	66,26	65,51	65,71	67,88	65,11	64,06	70,97
C18:2	9,31	13,88	21,67	9,23	10,77	14,39	11,48	13,25	11,5	12,75	8,93
C18:3	0,94	1,00	0,86	0,95	0,81	0,65	0,71	0,52	0,81	0,79	0,75
C20:0	0,43	0,40	0,49	0,47	0,45	0,38	0,40	0,46	0,46	0,37	0,38
C20:1	0,30	0,10	0,43	0,27	0,26	0,29	0,35	0,30	0,27	0,23	0,24
AGI	82,68	82,36	83,96	83,56	78,1	80,84	78,25	81,95	77,69	77,83	80,89
AGS	16,87	17,64	15,65	15,98	21,6	19,15	21,37	17,19	22	21,8	19,12
AGI/AGS	4,90	4,67	5,36	5,22	3,61	4,22	3,66	4,76	3,53	3,57	4,23
C18:1/C18:2	7,75	4,85	2,81	7,92	6,15	4,55	5,72	5,12	5,66	5,02	7,95

C16:0 : acide palmitique, **C18:0** : acide stéarique, **C18:1** : acide oléique, **C18:2** : acide linoléique, **C18:3** : acide linoléique, **C20:0** : acide arachidique, **C20:1** : acide gadoléique, **AGI** : acide gras insaturé, **AGS** : acide gras saturé.

Les taux d'acides gras saturés et insaturés varient en fonction de la variété, les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouchouk Soummam* présentent un pourcentage en acides gras saturés de 15,65 et 15,98% respectivement, et un total en acides gras insaturés de 86,18 et 87,65 % respectivement. Tandis que les variétés *Limli*, *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Chemlal Tazmalt*, enregistrent respectivement, un total en acides gras saturés de 22, 21,8, 21,6 et 21,37% et un total en acides gras insaturés de 77,69, 77,83, 78,1 et 78,25%.

Des variations cultivar-dépendante en profils d'acide gras des variétés d'huile d'olive sont relevées par plusieurs auteurs (Inglese, 1994 ; Di Bella *et al.*, 2007 ; Allalou *et al.*, 2009). Bien que les variétés soient cultivées dans la même parcelle expérimentale, elles conservent leur propre rythme de biosynthèse des lipides, la composition au acide gras varie sensiblement d'un cultivar à un autre, selon leur patrimoine génétique.

II.4 Dosages colorimétriques des composés phénoliques

II.4.1 Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux diffèrent significativement ($p < 0,05$) d'une variété à une autre (figure 8). Néanmoins, aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est relevée entre les huiles de *Chemlal Tazmalt* et *Limli*, ni entre *Aghenfas* et *Bouchouk Soummam*, ni entre *Ferkani* et *Tabelout*, ni entre *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* ni entre *Limli* et *Akerma*. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Haddada *et al.* (2007), Zarrouk *et al.* (2008) quant à l'influence de la variété sur la composition quantitative en composés phénoliques dans l'huile d'olive

Les teneurs les plus élevées sont enregistrées pour les variétés *Neb Djemel* (420,95 mg/kg) suivie des variétés *Bouricha* (369,79 mg/kg) et *Blanquette de Guelma* (365,24 mg/kg), tandis que les teneurs les plus faibles sont obtenues pour les variétés *Akerma* (130,92 mg/kg), *Limli* (123,43 mg/kg) et *Chemlal Tazmalt* (115,73 mg/kg). Le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 152,17 mg/kg à 243,23 mg/kg.

D'après Tsimidou (1998), on peut classer les variétés étudiées par rapport à leurs teneurs en polyphénols comme suit :

- Variétés à faible teneur en polyphenols totaux 50-200 mg/kg
- Variétés à teneur moyenne en polyphenols totaux 200-500 mg/kg
- Variétés à teneur élevée en polyphenols totaux 500-1000mg/kg.

D'après cette classification, les variétés *Aghenfas*, *Akerma*, *Bouchouk Soummam*, *Chemlal Tazmalt*, *Limli* sont classées dans la catégorie à teneur faible en polyphénols totaux, tandis que les variétés *Blanquette de Guelma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Neb Djemel* et *Tabelout* sont à teneurs moyennes en polyphénols totaux.

Nos variétés présentent des teneurs en polyphénols relativement proches de celles des variétés italiennes étudiées par Baiano *et al.* (2009), pour lesquelles les teneurs en polyphénols sont comprises entre 133,68 et 322,18 mg/kg, et des variétés turques étudiées par Ocakoglu *et al.* (2009) qui varient entre 75,46 et 333,37 mg/kg, mais supérieures aux teneurs des variétés espagnoles analysées par Ceci et Carelli (2007) qui présentent des teneurs en polyphénols totaux comprises entre 37,2 et 93,2 mg/kg, et aux variétés *Picual*, *Barnea*, *Empeltre*, *Manzanilla Californiana* et *Manzanilla Criolla* cultivées en Argentine, dont les teneurs varient de 25,3 à 92,7 mg/kg.

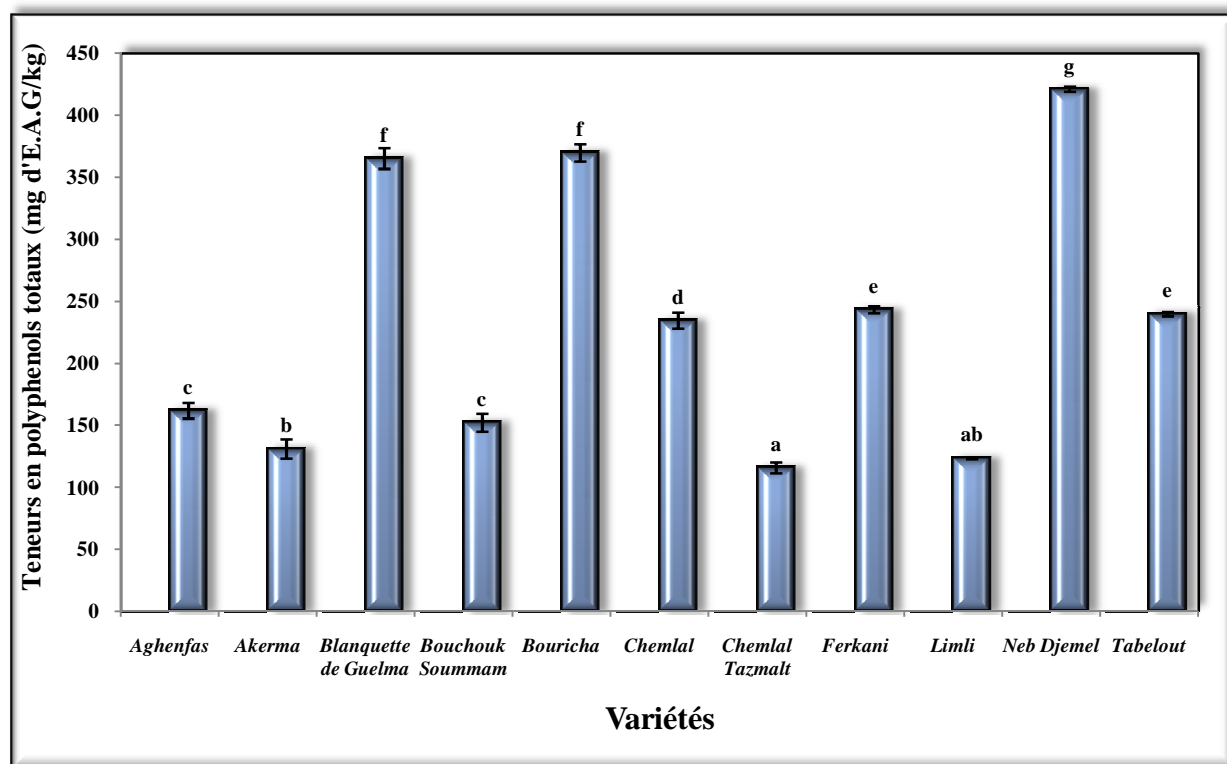


Figure 8 : Teneurs en polyphénols totaux des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

La concentration en polyphénols totaux dépend du système enzymatique spécifique pour chaque variété. D'après Artajo (2006), une corrélation positive est observée entre l'activité enzymatique de la L-phénylalanine ammonia lyase (PAL) et le taux de polyphénols

présents dans l'huile d'olive, ce qui démontre que cette enzyme conditionne les teneurs des huiles d'olives en composés phénoliques.

Plusieurs auteurs ont également rapporté que la fluctuation des teneurs en polyphénols totaux peut être liée aux origines géographiques associée au régime d'irrigation, ce qui pourrait expliquer le cas de l'huile provenant de la variété *Chemlal Tazmalt* qui présente de faibles teneurs en polyphénols totaux (115,73 mg/kg).

D'après Tovar *et al.* (2002), au cours de la maturation, l'activité de l'enzyme PAL diminue et l'activité des estérases et des glucosidases augmente (Ben Youssef *et al.*, 2010) entraînant ainsi une réduction des taux des polyphénols totaux, ce qui peut expliquer les faibles concentrations obtenues pour les huiles des variétés *Tabelout* et *Chemlal* pour lesquelles nous avons noté des indices de maturité de 6,79 et 5,55 respectivement, par rapport aux variétés *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* dont les teneurs en polyphénols sont élevées et un indice de maturité qui varie entre 3,38 et 4,85.

En plus des facteurs déjà cités, plusieurs auteurs ont mis en évidence d'autres paramètres qui peuvent influencer la teneur en polyphénols, à savoir l'état sanitaire des olives (Gomez-Caravaca *et al.*, 2008), les paramètres d'extraction (Servili *et al.*, 2004) et le stockage de l'huile d'olive (Brenes *et al.*, 2001).

II.4.2 Dosage des *ortho*-diphénols

Les teneurs en *ortho*-diphénols sont représentées dans la figure 9. Des différences significatives sont relevées ($p < 0,05$) (figure 9) entre les variétés d'huiles étudiées sauf entre les huiles des variétés *Bouchouk Soummam* et *Akerma*, entre *Chemlal* et *Bouricha* et entre *Ferkani* et *Tabelout*.

Les huiles des variétés des *Neb Djemel* (29,67 mg/kg) et *Blanquette de Guelma* (23,37 mg/kg) sont les plus riches en *ortho*-diphénols. En revanche, les variétés *Limli* et *Chemlal Tazmalt* donnent des huiles à teneurs inférieures (5,68 mg/kg, 7,54 mg/kg respectivement). Le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 10,07 à 19,36 mg/kg. Comparé aux teneurs en polyphénols totaux enregistrées pour les différentes huiles analysées, on remarque que l'huile la plus riche en polyphénols totaux (*Neb Djemel*) enregistre le taux le plus élevé en *ortho*-diphénols, ce qui n'est pas le cas des variétés *Ferkani* et *Tabelout* qui enregistrent des teneurs plus importantes en *ortho*-diphénols par rapport à *Chemlal* et *Bouricha* bien que ces dernières enregistrent des teneurs plus élevées en polyphénols totaux.

Un coefficient de corrélation positif est relevé entre le taux de polyphénols totaux et *ortho*-diphénols ($r=0,88$). Nos résultats sont en accord avec ceux de Di Giovacchino *et al.* (2001) et ceux de Cerretani *et al.* (2006) qui ont enregistré un coefficient de corrélation de 0,88 et 0,82 respectivement.

Les teneurs enregistrées en *ortho*-diphénols pour nos variétés sont relativement proches des variétés espagnoles *Picual*, *Hojiblanca* et *Arbequina* dont les teneurs varient entre 3,99 mg/kg et 18,92 mg/kg (Gutiérrez *et al.*, 2002), mais largement inférieures aux variétés tunisiennes telles rapportées par Zarrouk *et al.* (2008) dont les teneurs varient entre 188,12 et 213,24mg/kg.

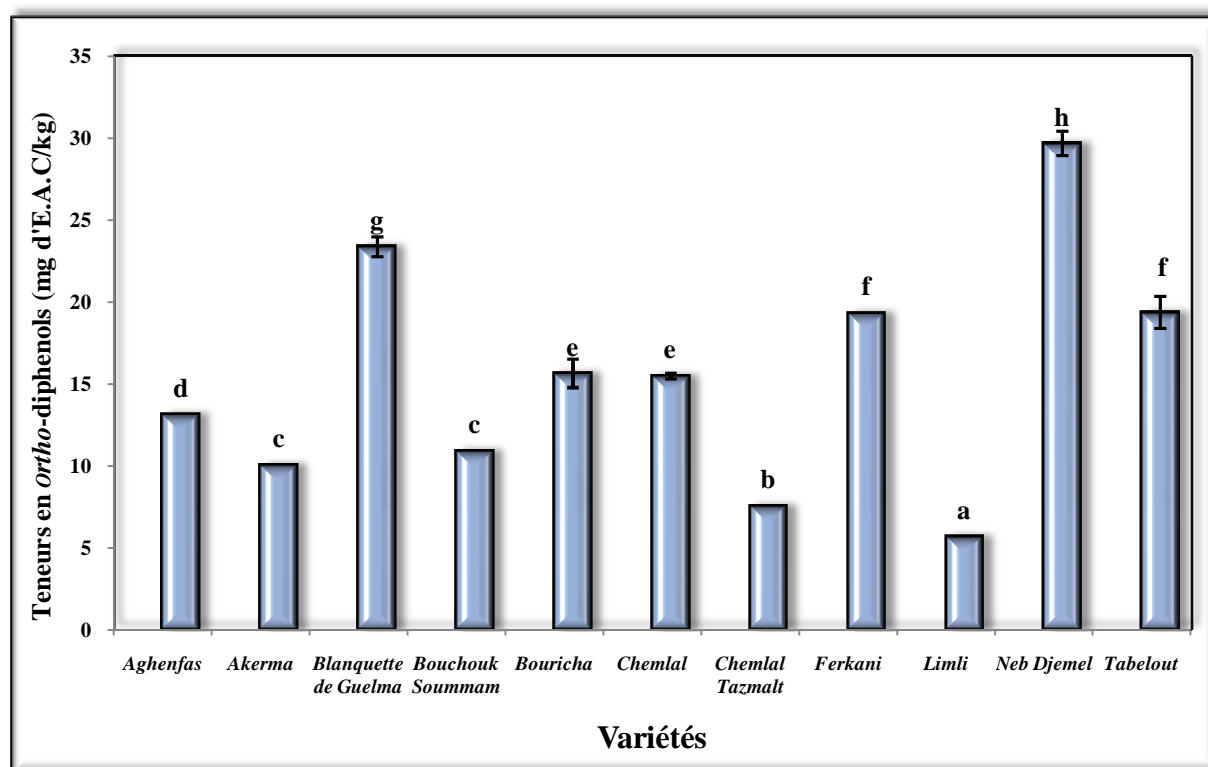


Figure 9 : Teneurs en *ortho*-diphénols des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p<0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types

II.5 Détermination des phénols des huiles d'olives par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

L'analyse des résultats obtenus par HPLC montre une composition qualitative en composés phénoliques similaire pour l'ensemble des échantillons, mais différente d'un point de vue quantitatif. La composition de la fraction phénolique présente un intérêt dans la caractérisation variétale des huiles d'olive vierges (Dhifi *et al.*, 2006).

L'analyse des extraits méthanoliques par HPLC a permis de détecter et quantifier les composés phénoliques individuels présents dans nos échantillons d'huile d'olive, cette méthode permet également de quantifier le taux des polyphénols oxydés.

L'analyse des résultats obtenus, révèle le profil en composés phénoliques suivant :

- Les secoiridoïdes : dérivés d'oleuropéine et de ligstroside.
- Les flavonoïdes
 - ✱ Apigénine
 - ✱ Lutéoline
- Les lignanes

Ce profil en composés phénoliques est analogue à celui observé par d'autres auteurs pour les variétés algériennes (Laribi *et al.*, 2009), les variétés espagnoles (García-Villalba *et al.*, 2010), les variétés turques (Ilyasoglu *et al.*, 2010) et les variétés françaises (Andjelkovic *et al.*, 2008).

Le tableau XII représente les teneurs des composés phénoliques individuels, polyphénols totaux déterminées par HPLC et par méthode colorimétrique ainsi que les polyphénols oxydés des huiles des variétés étudiées.

- **Les secoiridoïdes : dérivés d'oleuropéine et de ligstroside**

Les secoiridoïdes constituent la fraction phénolique la plus abondante dans toutes les huiles étudiées, leurs distributions varient d'une huile à une autre, ce qui est en accord avec les résultats de De La Torre-Carbot *et al.* (2005), de Gómez-Rico *et al.* (2008) et ceux de Dabbou *et al.* (2009). En comparant aux taux des polyphénols totaux, c'est la variété *Neb Djemel* qui enregistre le pourcentage le plus élevé 83,61%, le pourcentage minimal est obtenue pour l'huile de la variété *Chemlal Tazmalt* (43,19%).

Les variétés *Neb Djemel*, *Bouricha* se caractérisent par les teneurs les plus élevées en dérivés d'oleuropéine (276 et 235 mg/kg) et dérivés de ligstroside (173 et 150 mg/kg), suivies des variétés *Chemlal*, *Ferkani*, *Blanquette de Guelma* et *Tabelout* dont les teneurs oscillent entre 119 et 103 mg/kg (dérivés d'oleuropéine) et entre 91 et 124 mg/kg (dérivés de ligstroside)

Tableau XII : Teneurs des composés phénoliques individuels, polyphénols totaux déterminées par HPLC et par méthode colorimétrique et polyphénols oxydés des huiles des variétés.

	<i>Aghenfas</i>	<i>Akerma</i>	<i>Blanquette de Guelma</i>	<i>Bouchouk Soummam</i>	<i>Bouricha</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Chemlal Tazmalt</i>	<i>Ferkani</i>	<i>Limli</i>	<i>Neb Djemel</i>	<i>Tabelout</i>
Dérivées d'oleuropeine (mg/kg)	50	36	203	82	235	133	61	119	60	276	120
Hydroxytyrosol	0,5	0,9	5	2	5	3	2	1	3	4	4
Dérivées de ligstroside (mg/kg)	26	44	115	32	150	101	50	91	62	173	124
Tyrosol	3	4	28	2	26	3	3	4	26	5	11
Flavonoïdes (mg/kg)	44	49	18	41	25	23	34	14	10	33	13
Apigénine	12	11	6	12	7	8	14	4	3	13	7
Lutéoline	32	38	12	29	18	15	20	10	7	20	6
Lignanes (mg/kg)	16	38	33	12	51	38	41	42	25	21	29
Polyphénols totaux (HPLC) (mg/kg)	169	207	430	197	522	354	257	287	208	537	316
Polyphénols totaux (COL) (mg/kg)	161,78	130,92	365,24	152,17	369,79	234,38	115,73	243,23	123,43	420,95	239,79
Polyphénols oxydés (%)	8,6	7,0	11,8	9,2	10,6	15,1	26,9	4,6	20,2	3,5	6,9

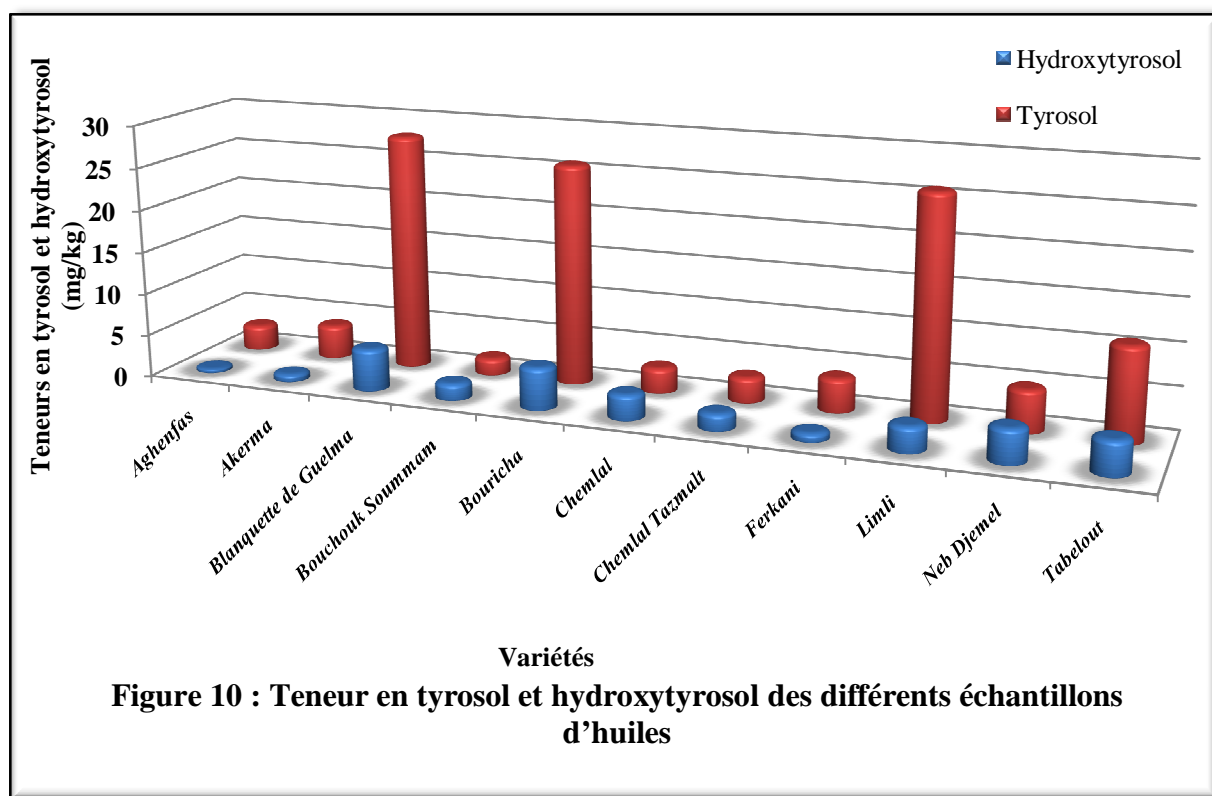
D'après Servili *et al.* (2004) et Dabbou *et al.* (2009), les dérivés secoiridoïdes sous forme dialdéhydrique de l'acide élénolique liés à l'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) ou liés au tyrosol (*p*-HPEA-EDA) et les isomères d'oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA) sont les secoiridoïdes les plus abondants dans l'huile d'olive. Ils sont issus de l'hydrolyse des secoiridoïdes glucosides présents dans le fruit d'olive par activation de l'enzyme β -glucosidase au cours de l'extraction (Servili et Montedoro, 2002 ; Artajo *et al.*, 2007).

- **Hydroxytyrosol et tyrosol**

L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et le tyrosol (*p*-HPEA) sont les principaux alcools phénoliques présents dans les huiles des variétés étudiées (figure 10), ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Servili *et al.* (2004) et Ocakoglu *et al.* (2009). Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs en tyrosol plus élevées que celles en hydroxytyrosol, les valeurs oscillent entre 2 et 28 mg/kg pour le tyrosol, et entre 0,5 et 5mg/kg pour l'hydroxytyrosol. Les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* enregistrent les valeurs les plus élevées en tyrosol (28 et 26 mg/kg) et hydroxytyrosol (5 mg/kg), tandis que la valeur la plus faible en tyrosol est enregistrée pour la variété *Bouchouk Soummam* (2 mg/kg) et la plus faible en hydroxytyrosol pour la variété *Aghenfas* (0,5 mg/kg).

Ce que l'on peut relever également est que malgré que la variété *Limli* se révèle pauvre en polyphénols totaux, elle enregistre un taux plus élevé en tyrosol que la variété *Neb Djemel* qui est considérée comme étant la variété la plus riche en polyphénols totaux. Les mêmes résultats sont obtenus par Dabbou *et al.* (2009) sur la variété *Ascolana Tenera* introduite en Tunisie.

Nos variétés présentent des teneurs en alcools phénoliques (hydroxytyrosol et tyrosol) proches de celles des variétés espagnoles étudiées par Gómez-Rico *et al.* (2008), pour lesquelles les teneurs en tyrosol sont comprises entre 1,2 et 29,8 mg/kg, celles en hydroxytyrosol entre 0,4 et 5 mg/kg ; supérieures aux teneurs des variétés tunisiennes qui présentent des teneurs en tyrosol comprises entre 0,65 et 5,36 mg/kg et l'hydroxytyrosol comprises entre 0,05 et 1,59 mg/kg (Haddada *et al.*, 2007), mais inférieures aux teneurs des huiles commerciales siciliennes (*Nocellara del Belice*) analysées par Saitta *et al.* (2009) présentant des teneurs qui varient de 10,5 à 32,3 (tyrosol) et de 12,8 à 36,1 (hydroxytyrosol).



Brenes *et al.* (2001) et Baiano *et al.* (2009) ont observé que les teneurs en tyrosol et l'hydroxytyrosol sont généralement faibles dans l'huile nouvellement extraite mais augmente graduellement au cours du stockage parallèlement à une diminution des formes phénoliques complexes telle que 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA ce qui permet de déduire que la dégradation de ces derniers génère les phénols simples tels que l'hydroxytyrosol et le tyrosol.

• Les lignanes

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en lignanes, la variété *Bouricha* se caractérise par la teneur la plus élevée (51 mg/kg), suivi des variétés *Ferkani* et *Chemlal Tazmalt* avec des teneurs de 42 et 41 mg/kg respectivement, les valeurs les plus faibles sont relevées pour les variétés *Aghenfah* et *Bouchouk Soummam*, le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 21 et 38 mg/kg.

Bien que la variété *Neb Djemel* se révèle riche en polyphénols totaux (537 mg/kg), elle ne renferme que 21 mg/kg en lignanes, par contre la variété *Chemlal Tazmalt*, qui est moins riche en polyphénols totaux (257 mg/kg), montre une teneur en lignanes de 41 mg/kg. En plus du facteur variété, ceci peut être attribué à l'origine géographique associé au régime d'irrigation, une forte irrigation augmente légèrement le taux des lignanes (Tovar *et al.*,

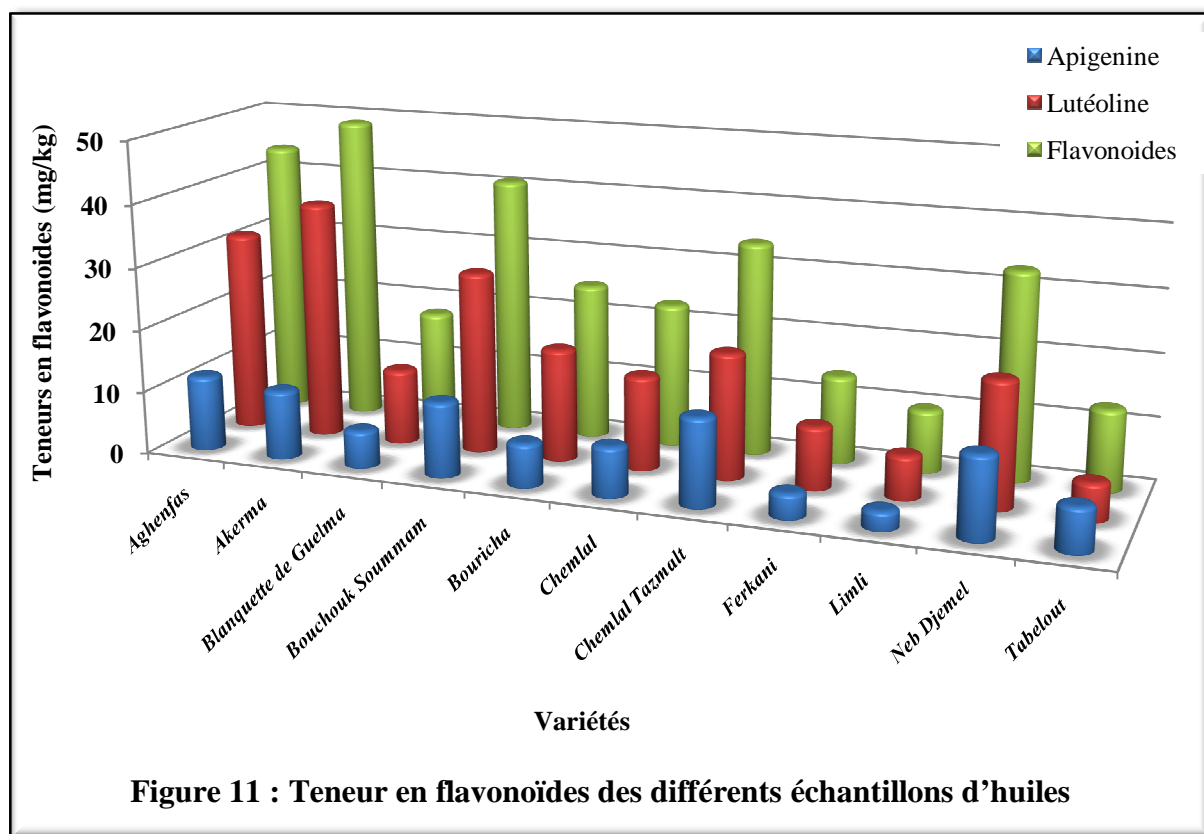
2001), ce qui explique encore les faibles teneurs en polyphénols obtenues, par contre aucune différence dans les teneurs en lignanes n'est observée par Artajo *et al.* (2006) entre les échantillons d'huiles issue d'oliviers irrigués et non irrigués pour la variété espagnole *Arbequina*.

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* (2004) sur les variétés espagnoles *Arbequina* cultivées à Tarragona et Jaén dont la teneur est de 65mg/kg et 61mg/kg respectivement, et largement inférieurs à ceux des variétés étudiées par Brenes *et al.* (2002) dont les teneurs sont supérieures à 100 mg/kg, mais supérieures aux teneurs des variétés *Picual* et *Hojiblanca* analysées par García-Villalba *et al.* (2010) et les variétés tunisiennes analysées par Haddada *et al.* (2008) dont les teneurs oscillent entre 3,15 et 9,35 mg/kg.

• Flavonoïdes

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en flavonoïdes (figure 11), les variétés *Akerma* et *Aghenfas* se caractérisent par les teneurs les plus élevées (49 et 44mg/kg respectivement), correspondant à 23,71 et 26,03% des polyphénols totaux, alors que les variétés *Limli*, *Tabelout* et *Ferkani* enregistrent les teneurs les plus faibles (10, 13 et 14 mg/kg respectivement), ces teneurs varient entre 3,57 et 4,87% des polyphénols totaux. Les teneurs du reste des variétés oscillent entre 18 et 41 mg/kg. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* (2004) et ceux étudiés par Ilyasoglu *et al.* (2010)

D'après les résultats obtenus, l'apigénine et la lutéoline sont les flavonoïdes présents dans toutes les huiles analysées, avec une prédominance de la lutéoline à l'exception de la variété *Tabelout* qui a enregistré un taux plus élevé en apigénine. Les variétés étudiées par Andjelkovic *et al.* (2009) et García-Villalba *et al.* (2010) présentent un taux plus élevé en luteoline alors que les variétés turques récoltées en 2006 révèlent une dominance de l'apigénine (Ocakoglu *et al.*, 2009). La variété *Akerma* se caractérise par la teneur la plus élevée en lutéoline 38 mg/kg, cette teneur est proche de celle des variétés françaises obtenues par Andjelkovic *et al.* (2008), cependant, c'est la variété *Chemlal Tazmalt* qui enregistre la teneur la plus importante en apigénine, néanmoins, elle enregistre tout de même une teneur assez élevée en lutéoline (20 mg/kg). On observe également que les variétés *Limli* et *Tabelout* se distinguent par leurs teneurs les plus faibles en apigénine (3 mg/kg), et lutéoline (6mg/kg) respectivement, ces teneurs sont proches de celles rapportées par Andjelkovic *et al.* (2009). Pour le reste des variétés, les valeurs varient entre 7 et 32 mg/kg (lutéoline) et 4 et 13 mg/kg (apigénine).



La lutéoline et l'apigénine appartiennent à la classe des flavones, ce sont des dérivées de 7- lutéoline glucoside et apigénine glucoside respectivement présents dans le fruit d'olive. D'après Brenes *et al.* (1999), la concentration de la lutéoline diminue avec la maturation du fruit d'olive par contre celle de l'apigénine ne subit aucun changement ce qui pourrait expliquer les faibles teneurs en lutéoline chez la variété *Tabelout* qui présente un indice de maturité élevé (6,97).

❖ Pour l'ensemble des résultats obtenus par HPLC, on remarque que les teneurs en polyphénols individuels dépendent étroitement de la variété, ce qui est en accord avec Dugo *et al.* (2004) qui ont observé dans leur étude le rôle particulier du cultivar dans la détermination de la composition qualitative et quantitative des substances de nature phénoliques.

II.6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques

II.6.1 Pouvoir réducteur

L'analyse des résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits d'huiles issues des variétés *Neb Djemel*, *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* exercent les meilleures activités réductrices 178,48, 150,28 et 143,07 mg E.A.G./kg tandis que les variétés *Limli* et *Chemlal Tazmalt* exercent un faible pouvoir réducteur, elles enregistrent les valeurs respectives de 39,71 et 37,06 mg E.A.G./kg. Le reste des variétés montre des valeurs comprises entre 47,58 et 114,25 mg E.A.G./kg (figure 12).

Nos résultats montrent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les variétés sauf entre *Limli* et *Chemlal Tazmalt*, entre *Limli* et *Akerma*, entre *Chemlal* et *Ferkani* et entre *Blanquette de Guelma* et *Bouricha*. Ces différences du pouvoir réducteur peuvent être attribuées aux variations quantitatives et qualitatives des composés phénoliques ; les extraits d'huiles riches en composés phénoliques totaux et en *ortho*-diphénols présentent les meilleurs pouvoirs réducteurs. Des corrélations significatives sont obtenues entre le pouvoir réducteur et les teneurs en polyphénols totaux ($r = 0,98$) ainsi que celles en *ortho*-diphénols ($r = 0,92$).

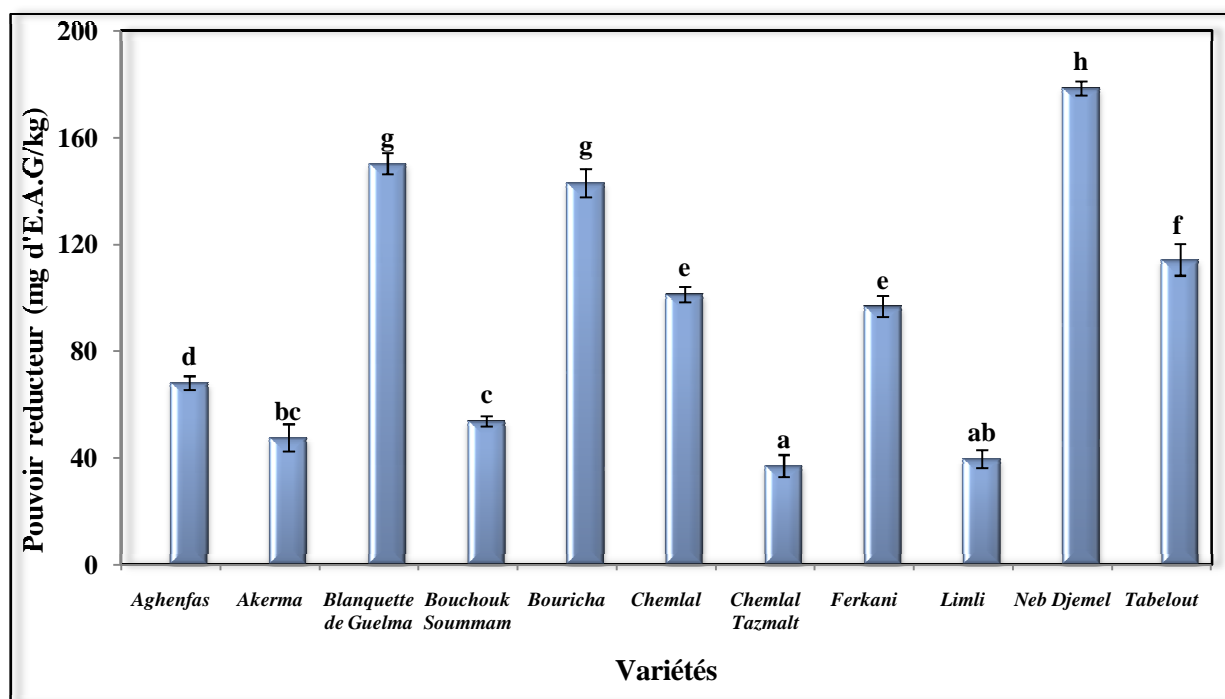


Figure 12 : Pouvoir réducteur des extraits des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

D'après nos résultats, on peut déduire que les composés phénoliques présents dans nos extraits d'huile d'olive sont dotés de propriétés réductrices, ils peuvent réagir comme donneurs d'électrons entraînant la réduction du complexe Fe^{3+} ferricyanide en ions ferreux (Fe^{2+}).

Un coefficient de corrélation positif est obtenu entre le pouvoir réducteur et les teneurs en hydroxytyrosol ($r= 72$), tandis que un coefficient de corrélation de $r=0,31$ est établie entre le pouvoir réducteur et les teneurs en tyrosol. D'après Bouaziz *et al.* (2004), les composés ayant une structure moléculaire possédant plusieurs groupements hydroxyles augmentent l'activité antioxydante.

II.6.2 Activité scavenger du radical DPPH

L'étude statistique révèle des différences significatives ($p<0,05$) entre les extraits d'huiles des différentes variétés (figure 13), néanmoins, aucune différence n'est relevée entre *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt*, entre *Aghenfas* et *Ferkani*, entre *Bouchouk Soummam*, *Chemlal*, *Aghenfas*, *Bouricha* et *Neb Djemel* et entre *Bouchouk Soummam*, *Chemlal*, *Blanquette de Guelma* et *Neb Djemel*.

Nos résultats révèlent la performance de la variété *Blanquette de Guelma* qui exerce le meilleur pourcentage d'inhibition du radical DPPH (72,20%). Les extraits des variétés *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt* enregistrent des valeurs minimales, ils n'inhibent respectivement que 39,96, 38,20 et 36,57% du radical DPPH. Cette faible activité pourrait être liée aux faibles teneurs en composés phénoliques et *ortho*-diphénols. Une corrélation significative ($p<0,05$) est notée entre cette activité et les concentrations en polyphénols totaux ($r = 0,72$) et en *ortho*-diphénols ($r = 0,67$). Samaniego Sanchez *et al.* (2007) ont abouti à des corrélations significatives entre l'activité antiradicalaire et les teneurs en polyphénols totaux avec un coefficient de corrélations de 0,79.

D'après Carrasco-Pancorbo *et al.* (2006), les *ortho*-diphénols de l'huile d'olive possèdent une forte activité antioxydante que les phénols monohydroxylés comme le tyrosol et le ligstroside aglycone. Cette propriété antioxydante élevée observé pour les *ortho*-diphénols est due à leur grande stabilité, par formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre leur groupement hydroxyle libre et leur radical phénoxy (Visioli et Galli, 1998, Ollivier *et al.*, 2004).

D'après les résultats, on constate également que les variétés *Bouchouk Soummam* et *Aghenfas* présentent une plus forte activité (61,77 et 60,15%) que les variétés *Ferkani* (57,84%) et *Tabelout* (49,34%) malgré que ces dernières soient plus riches

en polyphénols totaux. Ceci pourrait être en relation avec les concentrations en flavonoïdes, car les variétés *Bouchouk Soummam* et *Aghenfas* sont plus riches en flavonoïdes, elles contiennent respectivement 41 et 44 mg/kg correspondant à 26,03 et 23,71% des polyphénols totaux tandis que les variétés *Ferkani* et *Tabelout* contiennent respectivement 13 et 14 mg/kg correspondant à 4,87 et 4,11% des polyphénols totaux. La luteoline représente la fraction majoritaire des flavonoïdes présents dans les huiles étudiés, la présence d'un groupement catéchol (la structure *ortho*-diphénolique) sur l'un des ses cycles lui confèrent une activité antiradicalaire (Pannala *et al.*, 2001 ; Bouaziz *et al.*, 2004).

La variété *Akerma* enregistre des teneurs élevées en flavonoïdes soit 49 mg/mg (23,71% des polyphénols totaux) mais elle présente une activité antiradicalaire très faible par rapport aux autres variétés. Ceci pourrait être attribué au fait que cette variété enregistre de faibles taux en dérivés d'oleuropéine (36 mg/kg qui correspond à 4,16% des polyphénols totaux) et élevées en lignanes correspondant à 18,35% des polyphénols totaux. D'après Carrasco-Pancorbo *et al.* (2006), la présence du groupement COOCH₃ dans la molécule 1-acetoxypinoresinol ainsi que la *o*-méthylation (-OCH₃) du groupement hydroxyle des cycles benzoïques diminuent leur activité antioxydante.

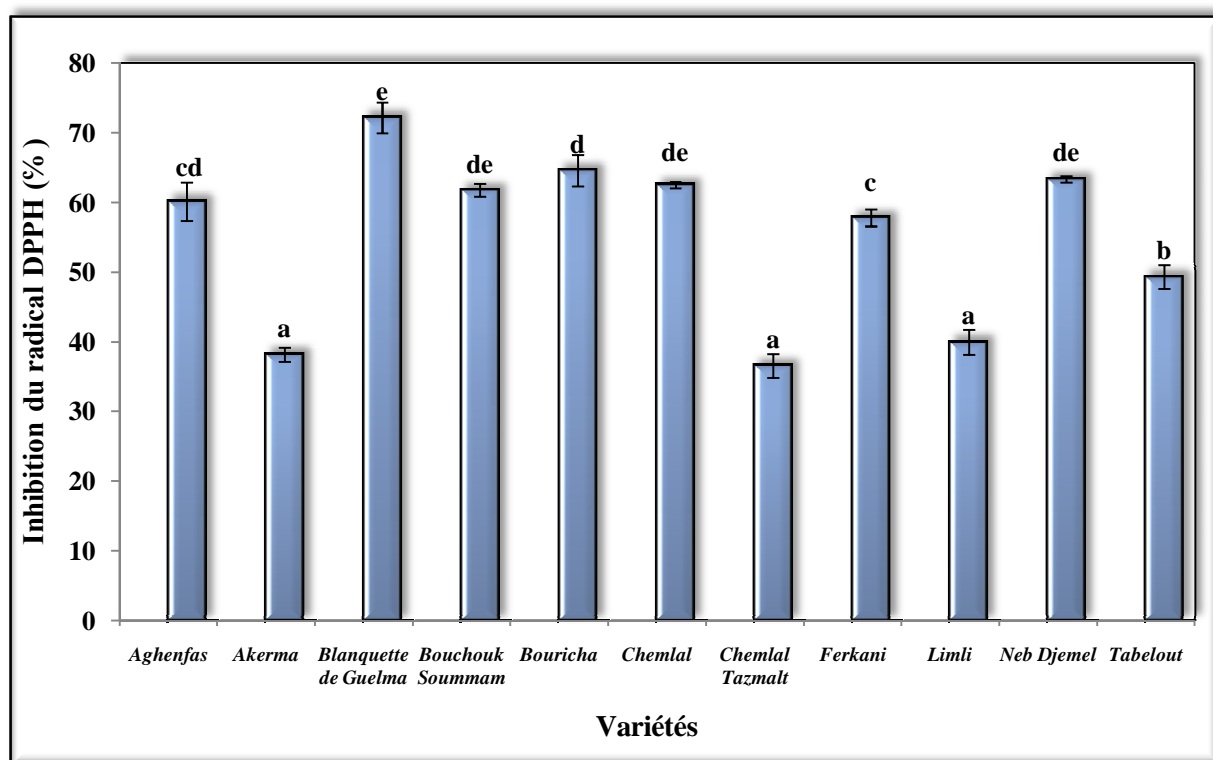


Figure 13 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

II.6.3 Activité scavenger du radical ABTS

Les résultats du pouvoir antiradicalaire des extraits méthanoliques, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ (figure 14), indiquent que tous les extraits d'huiles d'olive analysés possèdent la capacité de piéger le radical $ABTS^+$ et leur capacité diffèrent significativement ($p < 0,05$) entre les variétés, toutefois, aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est observée entre les extraits *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt*, et entre *Bouchouk Soummam*, *Chemlal*, *Aghenfas*, *Ferkani*, et *Neb Djemel*

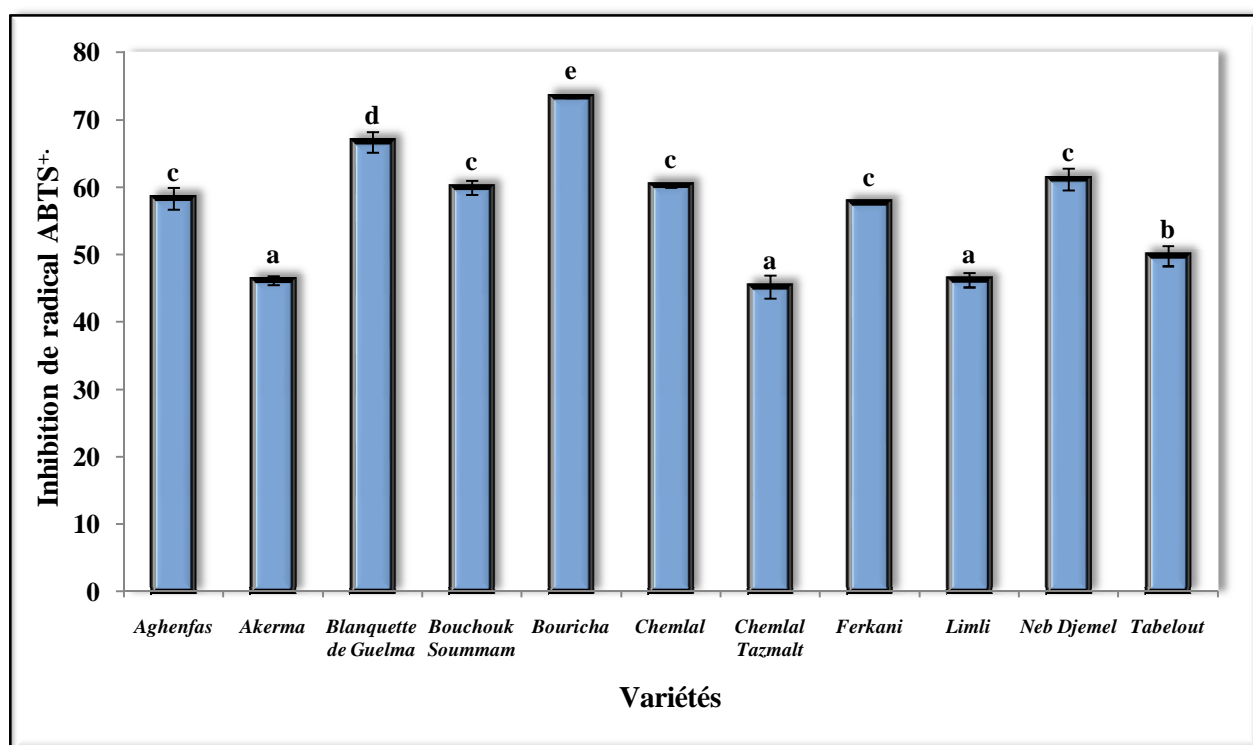


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical $ABTS^+$ des extraits des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

Le tableau XIII indique les IC_{50} des extraits méthanoliques des échantillons d'huile sur le radical $ABTS^+$. Les IC_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important. L'étude statistique révèle des différences significatives entre les échantillons néanmoins aucune différence n'est observée entre les échantillons *Neb Djemel* et *Chemlal*, entre *Bouchouk Soummam* et *Chemlal* et entre *Limli*, *Aghenfas* et *Tabelout*.

Tableau XIII : Détermination des IC₅₀ des différents extraits des échantillons d'huiles.

Variétés	Concentration (mg/ml)
<i>Aghenfas</i>	0,28±0,01 ^e
<i>Akerma</i>	0,42±0,01 ^g
<i>Blanquette de Guelma</i>	0,18±0,01 ^b
<i>Bouchouk Soummam</i>	0,27±0,007 ^d
<i>Bouricha</i>	0,12±0,17 ^a
<i>Chemlal</i>	0,26±0,006 ^{cd}
<i>Chemlal Tazmalt</i>	0,37±0,011 ^f
<i>Ferkani</i>	0,30±0,005 ^f
<i>Limli</i>	0,33±0,005 ^e
<i>Neb Djemel</i>	0,25±0,002 ^c
<i>Tabelout</i>	0,32±0,005 ^e

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative (p<0,05),

* Chaque valeur représente la moyenne ± écart type (n = 3)

La variété *Bouricha* enregistre le pourcentage d'inhibition le plus élevé du radical ABTS (73,38%) suivie de la variété *Blanquette de Guelma* (66,73%). Elles enregistrent, ainsi, les plus faibles valeurs IC₅₀ soit 0,12 mg/ml et 0,18 mg/ml respectivement, correspondant à une meilleure efficacité des extraits d'huiles dans la neutralisation du radical. On constate aussi que malgré l'écart important dans les teneurs en polyphénols totaux chez les variétés *Neb Djemel* (420,95 mg/Kg) et *Chemlal* (226,79 mg/Kg), leurs activités montrent un faible écart soit les valeurs respectives de 61,20% (IC₅₀ de 0,25mg/ml) et 60,23% (IC₅₀ de 0,26mg/ml), ceci pourrait être dû au taux d'hydroxytyrosol qui représente 2,25% des dérivées d'oleuropeine pour la variété *Chemlal*, plus que ceux enregistrés chez la variété *Neb Djemel* (1,45%). D'après Tuck *et al.* (2002), l'hydroxytyrosol est l'*ortho*-diphénol le plus impliqué dans l'activité antioxydante. Un coefficient de corrélation de 0,50 est obtenu entre le taux d'hydroxytyrosol et l'activité scavenger du radical ABTS⁺.

Une fois de plus, on constate que la variété *Tabelout* qui se distingue par des teneurs non négligeables en polyphénols totaux (239,79mg/Kg) et en *ortho*-diphénols (19,36 mg/Kg), mais présente une faible activité scavenger du radical ABTS⁺, soit un IC₅₀ de 0,32 mg/ml contrairement aux variétés *Bouchouk Soummam* et *Aghenfas* qui renferment des teneurs en

polyphénols largement inférieures (152 et 161mg/kg respectivement), mais présentent une activité de 59,96 et 58,33% avec des IC_{50} les moins élevées (0,27 et 0,28 mg/ml respectivement).

Les variétés *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt* enregistrent toujours les plus faibles activités, ils n'inhibent que 46,25, 46,19 et 45,25 % du radical $ABTS^{\cdot+}$ avec les IC_{50} les plus élevées. Cette faible activité est liée aux faibles teneurs en composés phénoliques et *ortho*-diphénols. Une corrélation positive significative est obtenue entre l'activité antiradicalaire sur le radical $ABTS^{\cdot+}$ et les teneurs en polyphénols totaux ($r = 0,76$) et en *ortho*-diphénols ($r = 0,55$).

II.6.4 Activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène

La figure 15, montre les taux d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des différents extraits méthanoliques d'huiles d'olive. D'après ces résultats, on remarque que la majorité des extraits méthanoliques d'huiles d'olive présentent un pourcentage d'inhibition important (>50%) à l'exception des variétés *Akerma*, *Limli* et *Chemlal Tazmalt* qui présentent les plus faibles activités : 32,23, 20,49 et 8,4% d' H_2O_2 respectivement.

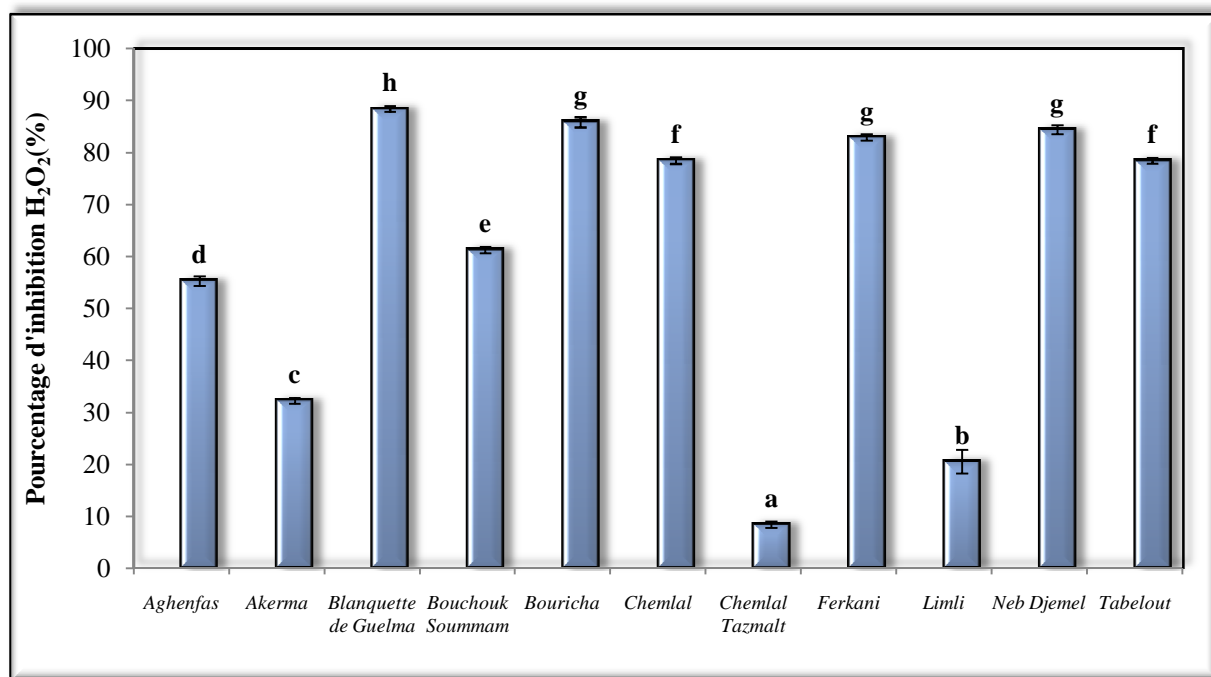


Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits des différents échantillons d'huiles.

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types.

L'analyse statistique relève des différences significatives ($p < 0,05$) entre les huiles des variétés. Les activités les plus élevées sont obtenues pour les extraits des variétés *Blanquette de Guelma*, *Bouricha*, *Neb Djemel* et *Ferkani* (82,88 à 88,33%), correspondant aux variétés à teneur élevée en polyphénols totaux, tandis que les plus faibles activités sont relevées pour les variétés *Akerma*, *Limli* et *Chemlal Tazmalt* qui renferment de faibles teneurs en polyphénols totaux. Une corrélation positive ($p < 0,05$) est notée entre les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène et les teneurs en polyphénols totaux ($r = 0,81$). Les polyphénols réagissent comme donneurs d'électrons entraînant la décomposition de l' H_2O_2 en eau selon la réaction : $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ (Balasundram *et al.*, 2005). L'extrait de la variété *Bouchouk Soummam* exerce une activité supérieure (61,23%) à celui de la variété *Aghenfas* (55,28) qui présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (152,17 et 161,78 mg/kg respectivement), ceci pourrait être lié à la plus grande richesse de cette variété en dérivées d'oleuropéine (*ortho*-diphénols) (82 et 50 mg/kg respectivement).

En plus de leurs faibles teneurs en composés phénoliques, les faibles activités enregistrées par les variétés *Limli* et *Chemlal Tazmalt* peuvent être expliquées par l'oxydation des polyphénols totaux. Ces deux variétés enregistrent les taux les plus élevés en polyphénols oxydés soit 20,2% des polyphénols totaux pour la variété *Limli* et 26,9% pour la variété *Chemlal Tazmalt*.

II.7 Evaluation de l'activité antibactérienne

II.7.1 Evaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur milieu gélosé

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'extrait à tester, cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition. Pereira *et al.* (2006) ont distingué différents niveaux d'activité des extraits en se basant sur le diamètre (D) des zones d'inhibitions : aucune activité : $D = 0\text{mm}$, faible activité : $2 \geq D \geq 3\text{ mm}$, activité intermédiaire : $4\text{ mm} \geq D \geq 5\text{mm}$, forte activité: $6\text{ mm} \geq D \geq 9\text{ mm}$ et très forte activité : $D \geq 9$.

Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne de divers extraits méthanoliques des huiles d'olive sont consignés dans le tableau XIV. Les extraits des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* montrent une meilleure activité antibactérienne à l'égard des différentes souches testées. On remarque également que pour tous les extraits testés, l'activité est proportionnelle (en termes de diamètre d'inhibition) aux concentrations des extraits testés.

II.7.1.1 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques

✚ Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats du tableau XIV indiquent que tous les extraits méthanoliques ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis de l'espèce *S. aureus*.

Des zones d'inhibition allant de 4,33 à 26 mm ont été observées pour une concentration de 1mg/disque. A cette concentration, des différences significatives sont relevées entre les échantillons ($p < 0,05$), néanmoins aucune différence n'est notée entre les extraits des variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* et entre *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout*

Les meilleures activités (en terme de diamètre de la zone d'inhibition) ont été obtenues avec les extraits de la variété *Bouricha* (26 mm), suivie de la variété *Blanquette de Guelma* pour laquelle on a enregistré une zone d'inhibition de 21 mm (figure 16). Les extraits des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* sont moins performants avec des diamètres qui oscillent entre 4 et 5 mm traduisant une activité intermédiaire de ces deux extraits vis-à-vis de *S. aureus*. Le reste des variétés présente une forte activité vis-à-vis de *S. aureus* présentant ainsi des zones d'inhibition qui varient entre 10,33 et 19 mm.

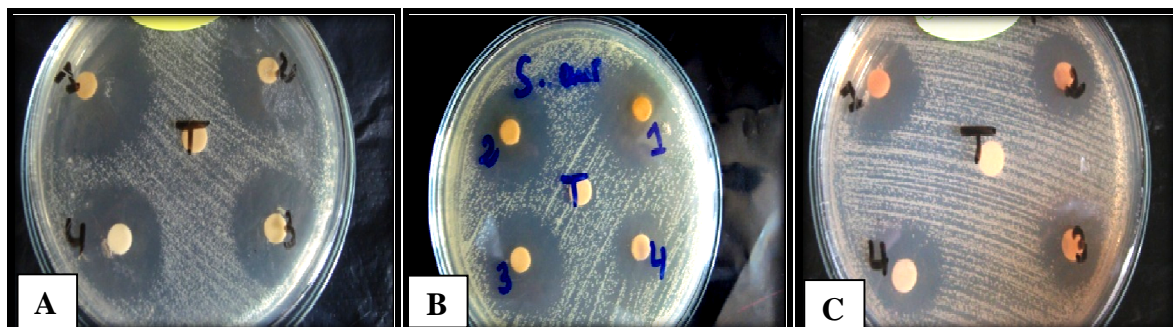


Figure 16 : Activité des extraits vis-à-vis de *S. aureus* A) Extraits de la variété *Bouricha*, B) Extraits de la variété *Blanquette de Guelma*, C) Extraits de la variété *Neb Djemel* à différentes concentrations, 1: 1mg/disque, 2: 0,5mg/disque 3 : 0,25mg/disque. 4: 0,12mg/disque. T: témoin « méthanol/eau (80/20) ».

A une concentration de 0,12 mg/disque, la souche *S. aureus* révèle une résistance pour les extraits des variétés *Tabelout* et *Chemlal Tazmalt*. Aucune différence significative n'est notée entre les extraits des variétés *Bouchouk Soummam*, *Ferkani* et *Limli* qui enregistrent de faibles activités vis-à-vis de cette souche à la concentration de 0,12 mg/disque.

Tableau XIV : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive

	Concentrations (mg/disque)	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Aghenfas</i>	1	19,00±0,00 ^p	4,00±1,00 ^d	--	--	--	--
	0,5	17,66±0,57 ^{no}	2,66±0,57 ^c	--	--	--	--
	0,25	15,00±0,00 ^{kl}	--	--	--	--	--
	0,12	13,00±0,00 ^{hij}	--	--	--	--	--
<i>Akerma</i>	1	18,00±0,00 ^{nop}	03,00±0,00 ^{cd}	--	--	--	--
	0,5	17,33±1,15 ^{mn}	01,00±0,00 ^{ab}	--	--	--	--
	0,25	14,33±1,15 ^{gk}	--	--	--	--	--
	0,12	11,00±1,00 ^{fg}	--	--	--	--	--
<i>Blanquette de Guelma</i>	1	21,33±0,57 ^q	06,33±0,57 ^{ij}	2,33±0,57 ^a	02,00±1,00 ^{ab}	--	04,00±1,00 ^b
	0,5	17,33±0,57 ^{mn}	05,33±0,57 ^{fg}	--	00,66±0,57 ^a	--	03,33±0,57 ^b
	0,25	13,00±0,00 ^{hij}	04,00±0,00 ^{de}	--	--	--	02,66±0,57 ^b
	0,12	08,33±0,57 ^{de}	01,00±0,00 ^a	--	--	--	00,66±0,57 ^a
<i>Bouchouk Soummam</i>	1	10,33±0,57 ^f	04,00±0,00 ^{de}	--	--	--	--
	0,5	08,33±0,57 ^d	02,33±0,57 ^{bc}	--	--	--	--
	0,25	05,00±0,00 ^c	01,00±0,00 ^{ab}	--	--	--	--
	0,12	02,00±0,00 ^{ab}	--	--	--	--	--
<i>Bouricha</i>	1	26,00±0,00 ^s	11,00±0,81 ^l	09,66±0,47 ^c	08,66±0,94 ^d	09,00±0,00 ^d	10,66±0,47 ^e
	0,5	22,66±0,47 ^r	10,33±0,94 ^l	09,00±0,81 ^{bc}	07,66±0,94 ^d	07,66±0,47 ^c	08,00±0,81 ^d
	0,25	20,33±0,47 ^q	09,33±0,47 ^k	08,00±0,81 ^{bc}	07,00±0,00 ^c	07,00±0,00 ^b	07,00±0,00 ^{cd}
	0,12	17,00±0,00 ^{mm}	08,66±0,47 ^{jk}	07,33±0,47 ^b	06,00±0,81 ^b	06,00±0,00 ^a	06,00±0,00 ^c
<i>Chemlal</i>	1	16,00±0,00 ^{lm}	06,00±0,00 ^{gh}	--	--	--	--
	0,5	12,00±1,00 ^{gh}	04,33±0,57 ^e	--	--	--	--
	0,25	09,66±0,57 ^f	02,00±0,00 ^{abc}	--	--	--	--
	0,12	07,33±0,57 ^d	01,00±0,00 ^a	--	--	--	--

Tableau XIV : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive (suite)

	Concentrations (mg/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	1	04,33±0,57 ^c	--	--	--	--	--
	0,5	03,00±0,00 ^b	--	--	--	--	--
	0,25	01,00±0,00 ^a	--	--	--	--	--
	0,12	--	--	--	--	--	--
<i>Ferkani</i>	1	14,66±0,57 ^k	06,66±0,57 ^h	--	--	--	--
	0,5	09,66±0,57 ^f	04,66±0,57 ^{ef}	--	--	--	--
	0,25	04,66±0,57 ^c	02,00±0,00 ^{ab}	--	--	--	--
	0,12	02,66±0,57 ^b	01,00±0,00 ^a	--	--	--	--
<i>Limli</i>	1	12,66±0,57 ^{hi}	2,33±0,57 ^{bc}	--	--	--	--
	0,5	07,66±0,57 ^d	01,00±0,00 ^{ab}	--	--	--	--
	0,25	05,66±0,57 ^c	--	--	--	--	--
	0,12	02,66±0,57 ^b	--	--	--	--	--
<i>Neb Djemel</i>	1	19,00±0,00 ^p	08,66±0,57 ⁱ	--	--	--	--
	0,5	17,33±0,57 ^{mn}	06,66±0,57 ^h	--	--	--	--
	0,25	14,00±1,00 ^{ijk}	04,00±0,00 ^{de}	--	--	--	--
	0,12	10,00±1,00 ^f	02,00±0,00 ^{abc}	--	--	--	--
<i>Tabelout</i>	1	05,00±0,00 ^c	--	--	--	--	--
	0,5	03,00±1,00 ^b	--	--	--	--	--
	0,25	01,66±0,57 ^{ab}	--	--	--	--	--
	0,12	--	--	--	--	--	--

*--: Pas de zone observée.

* Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

*Méthanol : -/-

✚ Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Bacillus subtilis*

A une concentration d'extrait de 1mg/disque, *B. subtilis* s'est montrée sensible vis-à-vis des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huiles d'olive à l'exception des extraits des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* pour les quelles on a observé la résistance de cette souche pour toutes les concentrations testées.

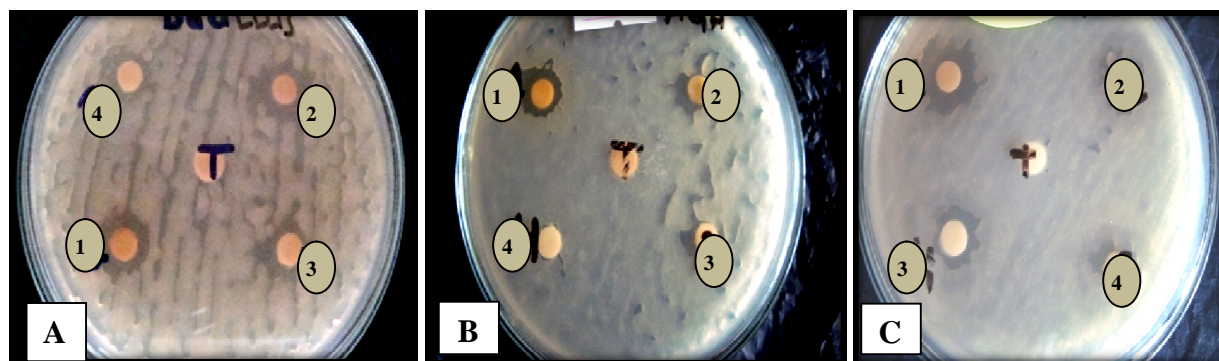


Figure 17: Activité des extraits vis-à-vis de *B. subtilis* A) Extraits de la variété *Bouricha*, B) Extraits de la variété *Blanquette de Guelma*, C) Extraits de la variété *Chemlal* à différentes concentrations, 1: 1mg/disque, 2: 0,5mg/disque 3 : 0,25mg/disque. 4: 0,12mg/disque. T: témoin « méthanol/eau (80/20) ».

Des diamètres d'inhibition de 2,33 à 11 mm ont été observés pour une concentration de 1mg/disque. Les diamètres les plus élevés ont été obtenus avec les extraits de la variété *Bouricha* (11 mm) (figure 17) indiquant ainsi la forte sensibilité de *B. subtilis*. Les plus faibles diamètres ont été obtenus pour les variétés *Akerma* et *Limli* (3 et 2,33 mm respectivement) et aucune différence significative n'est observée entre ces deux échantillons ($p < 0,05$). Les extraits des variétés *Aghenfas* et *Bouchouk Soummam* présentent une activité intermédiaire vis-à-vis de cette souche, le reste des extraits *Chemlal*, *Ferkani* et *Neb Djemel* enregistrent une forte activité.

La souche *B. subtilis* se montre résistante vis-à-vis des extraits des variétés *Aghenfas*, *Akerma*, *Limli* aux concentrations de 0,25 et 0,12 mg/disque et *Bouchouk Soummam* à une concentration de 0,12 mg/disque, tandis que la variété *Bouricha* révèle une très forte activité : 8,66 et 9,33 mm pour des concentrations de 0,25 et 0,12 mg/disque respectivement, aucune différence significative n'est relevée entre ces deux concentrations. Le reste des variétés enregistrent de faibles activités à ces deux concentrations à l'exception des variétés *Blanquette de Guelma* et *Neb Djemel* qui révèlent une activité intermédiaire à une concentration de 0,25 mg/disque.

Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*:

L'extrait méthanolique de la variété *Bouricha* s'est avéré plus actif (pour une charge de 1mg/disque) avec des diamètres d'inhibition de 10 mm pour la souche *K. pneumoniae*, 9,66 mm pour les souches *L. innocua*, 9 mm pour *P. aeruginosa* et 8 mm pour *E. coli* (figure 18), suivie de l'extrait de la variété *Blanquette de Guelma* dont on note une activité intermédiaire vis-à-vis de *K. pneumoniae*, avec des différences non significatives ($p < 0,05$) pour les concentrations de 1, 0,5 et 0,25 mg/disque, toutefois, une faible activité est relevée pour les souches *L. innocua* et *E. coli*. Une résistance des souches *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* est notée vis-à-vis des extraits méthanoliques des neuf variétés restantes.

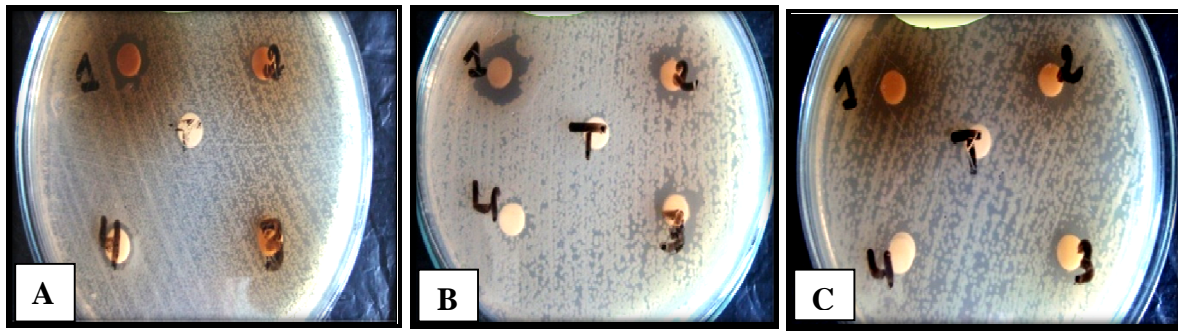


Figure 18 : Activité de l'extrait *Bouricha* A) vis-à-vis de *E. coli*, B) vis-à-vis de *L. innocua*, C) vis-à-vis de *P. aeruginosa* à différents concentrations, 1: 1mg/disque, 2: 0,5mg/disque 3 : 0,25mg/disque. 4: 0,12mg/disque. T: témoin « méthanol/eau(80/20)»

Des résultats obtenus, nous pouvons constater une nette différence dans les diamètres des zones d'inhibition en fonction de l'extrait testé. La variabilité du pouvoir inhibiteur des différents extraits méthanoliques pourrait être due à la sensibilité des microorganismes aux différents composés phénoliques présents dans ces extraits. En utilisant des extraits phénoliques purs d'hydroxytyrosol, Obied *et al.* (2007) ont observé des diamètres d'inhibition de 20 mm sur *S. aureus* avec des concentrations de 0,3 mg/disque. De même, des CMI allant de 3,9-31,25 $\mu\text{g/ml}$ ont été rapportées par Bisignano *et al.* (1999), indiquant la grande sensibilité de cette souche vis-à-vis de l'hydroxytyrosol, nos résultats sont en accord concernant la sensibilité élevée de *S. aureus* vis-à-vis des extraits *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* qui enregistrent les taux les plus élevés en hydroxytyrosol. De plus, les teneurs élevées en flavonoïdes notamment la luteoline pour les extraits *Aghenfes* et *Akerma* peuvent expliquer leurs fortes activités sur les souches *S. aureus* et *B. subtilis* par rapport aux extraits des variétés *Chemlal*, *Neb Djemel* et *Ferkani* malgré l'écart observé des teneurs en

polyphénols totaux. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sousa *et al.* (2006) concernant la sensibilité des souches *B. cereus*, *B. subtilis* et *S. aureus* à l'égard d'extraits méthanoliques de l'olive de table « *Alcaparra* » qui se sont avérés riches en luteoline. Xu et Lee (2001) ont également rapporté l'activité de la lutéoline à l'égard de staphylocoque résistant à la méthiciline, qui présente des zones d'inhibition de 10,5 mm à 11,5 mm à une charge de 0,05 mg/disque. Plusieurs autres composés phénoliques présents dans l'huile d'olive ayant une activité antibactérienne sont recensés ; le décarboxyméthyloléuropeïne aglycone, le ligstroside aglycone et le tyrosol (Medina *et al.*, 2006 ; Medina *et al.*, 2007), l'acide hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique et l'acide caffeique (Korukluoglu *et al.*, 2009).

Les activités antibactériennes observées peuvent également résulter d'une synergie entre les composés phénoliques présents dans l'extrait méthanolique. Lee et Lee (2010), en testant l'activité des extraits de feuille d'olivier ainsi que des composés phénoliques purs sur différentes souches Gram positif et négatif, ont constaté que l'extrait brut présente une meilleure activité que les composés phénoliques purs (oléuropeïne, rutine, vanilline, acide caféique) d'où la supposition d'une certaine synergie entre ces composés. Cette synergie peut expliquer la faible corrélation obtenue entre l'activité antibactérienne (diamètre des zones d'inhibition) et les teneurs polyphénols individuels (annexe 4)

En comparant la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des différents extraits, on constate que *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* sont les espèces les moins sensibles. Sur les onze extraits testés, seulement deux ont inhibé la croissance de *L. innocua*, *E. coli* et *K. pneumoniae* et un seul a inhibé la croissance *P. aeruginosa*. L'espèce *S. aureus* est sensible à tous les extraits testés. Les composés phénoliques présents dans nos extraits semblent avoir une meilleure activité à l'égard des bactéries Gram positif que sur les Gram négatif, ce qui est en accord avec Rahman *et al.* (2009) qui ont abouti aux mêmes constatations. Plusieurs auteurs ont expliqué cette résistance par rapport à la bicouche lipidique présente chez les Gram négatif, qui constitue une barrière pour les polyphénols (Al-Younis et Abdullah, 2008 ; Masibo et He, 2009).

Les résultats négatifs (absence de zone d'inhibition) n'indiquent pas automatiquement l'absence de l'activité, mais ceci pourrait être dû aux faibles concentrations de l'extrait. D'après Nychas *et al.* (1990) et Sousa *et al.* (2006), l'activité ainsi que le mode d'action des polyphénols dépendent de leur concentration.

II.7.1.2 Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs

L'activité antibactérienne de quelques composés phénoliques purs a été testée et les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont rapportés dans le tableau XV.

L'acide gallique a montré la meilleure activité à l'égard des souches bactériennes testées. Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été notées entre les différentes concentrations pour chaque souche bactérienne. *S. aureus* s'est avéré la souche la plus sensible vis-à-vis de l'acide gallique présentant ainsi les zones d'inhibition les plus élevées (14 mm à une concentration de 1 mg/disque). Les espèces *L. innocua*, *P. aeruginosa* et *E. coli* se sont montrées uniquement sensibles aux concentrations de 1 et 0,5 mg/disque, avec des zones d'inhibition qui varient entre 4 et 8 mm. Les espèces *B. subtilis* et *K. pneumoniae* ont montré une sensibilité vis-à-vis de toutes les concentrations testées, on relève des zones qui varient entre 4 et 11 mm.

Tableau XV : Activité antibactérienne de quelques composés phénolique purs

Standards	Concentrations (mg/disque)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Acide gallique	1	14,00±0,00 ^f	11,00±0,00 ^e	08,66±0,57 ^b	08,00±0,00 ^b	06,00±0,00 ^b	10,00±0,00 ^e
	0,5	10,66±0,57 ^e	09,00±0,00 ^c	06,00±0,00 ^a	06,00±0,00 ^a	04,00±0,00 ^a	08,00±0,00 ^d
	0,25	08,00±0,00 ^d	07,00±0,00 ^b	--	--	--	05,66±0,57 ^b
	0,12	06,00±0,00 ^b	05,66±0,57 ^a	--	--	--	04,00±0,00 ^a
Acide caféique	1	10,00±0,00 ^e	16,00±0,00 ^g	--	--	07,00±0,00 ^c	07,00±1,00 ^c
	0,5	09,33±0,57 ^e	14,66±0,57 ^f	--	--	05,66±0,57 ^b	04,00±0,00 ^a
	0,25	07,00±1,00 ^c	08,66±0,57 ^d	--	--	04,00±0,00 ^a	--
	0,12	04,00±0,00 ^a	07,00±0,00 ^b	--	--	--	--
Acide cinnamique	1	--	--	--	--	--	--
	0,5	--	--	--	--	--	--
	0,25	--	--	--	--	--	--
	0,12	--	--	--	--	--	--
Quercétine	1	--	--	--	--	--	--
	0,5	--	--	--	--	--	--
	0,25	--	--	--	--	--	--
	0,12	--	--	--	--	--	--

*--: Pas de zone observée.

* Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

*Méthanol : -/

Les souches *S. aureus* et *B. subtilis* sont les espèces les plus sensibles vis-à-vis de l'acide caféique, des zones d'inhibition de 4 et 7 mm sont notées respectivement pour de

faibles concentrations (0,12 mg/disque), le diamètre le plus élevé est relevé pour *B. subtilis* (16 mm à une concentration de 1 mg/ml). Les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* sont moins sensibles avec des zones de 7 mm pour une concentration de 1 mg/disque. *L. innocua* et *P. aeruginosa* se montrent résistantes vis-à-vis de l'acide caféique, aucune zone d'inhibition n'a été détectée.

A différentes concentrations testées, la quercétine et l'acide cinnamique ne montrent aucune zone d'inhibition sur toutes les souches testées. Contrairement aux résultats de Rodriguez-Vaquiroy *et al.* (2007) et King *et al.* (2008) qui ont détecté une activité de la quercétine vis-à-vis des souches *S. aureus*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, par contre aucune activité n'est détectée sur *L. monocytogenes* (King et Dykes, 2008) et *P. aeruginosa* (Rodriguez-Vaquiroy *et al.*, 2007). D'après Alvarez *et al.*, (2008), la quercétrine inhibe la croissance bactérienne en synergie avec d'autres composés phénoliques.

La sensibilité des souches *S. aureus*, *L. innocua*, et *E. coli* vis-à-vis de l'acide gallique et de l'acide caféique est détectée par King *et al.* (2008), ce qui est en accord avec nos résultats.

Egalement, Rodriguez-Vaquiroy et ses collaborateurs (2007) ont évalué l'activité de l'acide gallique et l'acide caféique vis-à-vis des souches *E. coli* et *K. pneumonia*, dans cette étude des zones d'inhibition de 2 à 3mm ont été enregistrées pour ces deux souches pour une concentration de 50mg/ml, ces résultats sont largement inférieurs à ceux que nous avons obtenus. Ceci pourrait être dû à la différence dans la taille de l'inoculum, utilisé dans leur étude, qui était de 2×10^9 .

II.7.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Afin de déterminer l'efficacité de nos extraits, on a procédé à la détermination des CMI et CMB (tableau XVI) des extraits qui se sont révélés actifs dans le test des disques (présentant des zones d'inhibitions). Globalement, l'activité antibactérienne de *Bouricha* est plus importante par rapport aux autres extraits avec un spectre antibactérien plus large et à des doses plus faibles.

Par ailleurs, la détermination des CMI et CMB relatives aux extraits actifs a mis en évidence des niveaux d'activité antibactérienne variables selon l'extrait utilisé et la souche testée. Ainsi, l'extrait de la variété *Bouricha* s'avère être plus actif sur *S. aureus*, elle enregistre les CMI et CMB les plus faibles (0,6 et 0,8 mg/ml respectivement). Tandis que l'extrait des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* révèlent les valeurs les plus élevées, soit

une CMI de 1,6 et 1,8 mg/ml et une CMB de 1,8 mg/ml respectivement traduisant ainsi une faible activité antibactérienne. Quant au reste des extraits, une CMI de 0,9 mg/ml est notée pour les variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* et 1,2 mg/ml pour les variétés *Limli*, *Chemlal* et *Bouchouk Soummam*.

Tableau XVI : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits méthanoliques des différentes variétés d'huile d'olive

Variétés	CMI et CMB en mg/ ml					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB
<i>Aghenfas</i>	0,9/1,2	1,3/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Akerma</i>	0,9/1,1	1,4/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Blanquette de Guelma</i>	0,7/0,9	1,2/2	1,8/1,8	NT	1,8/>2	>2/>2
<i>Bouchouk Soummam</i>	1,2/1,6	2/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Bouricha</i>	0,6/0,8	1,2/1,7	1,6/1,7	1/1,1	1,8/>2	>2/>2
<i>Chemlal</i>	1,2/1,4	1,2/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Chemlal Tazmalt</i>	1,6/1,8	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Ferkani</i>	1/1,1	1,2/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Limli</i>	1,2/1,5	1,8/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Neb Djemel</i>	0,9/1	1,2/>2	NT	NT	NT	NT
<i>Tabelout</i>	1,6/>2	NT	NT	NT	NT	NT
Standards						
Acide gallique	0,4/0,6	0,6/1,2	0,8/0,8	0,6/0,8	0,7/0,9	0,7/1
Acide caféique	0,6/0,6	0,6/1,4	NT	NT	2/2	>2/>2

NT : non testé

Concernant la souche *B. subtilis*, on note une moindre efficacité de nos extraits par rapport à *S. aureus*, aucun des extraits testés n'a dévoilé un effet bactéricide à l'égard de cette souche à la plus grande concentration testée (2 mg/ml), à l'exception de l'extrait de la variété *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, pour lesquelles des CMB de 1,7 mg/ml et 2 mg/ml sont notées. Nos extraits révèlent la même CMI à l'égard de *B. subtilis* qui est d'ordre de 1, 2 mg/ml pour les extraits *Ferkani*, *Blanquette de Guelma*, *Bouricha* et *Chemlal* et *Limli* tandis

que la CMI la plus élevée est obtenue pour l'extrait de la variété *Bouchouk Soummam*. L'espèce *P. aeruginosa* testée uniquement pour l'extrait de la variété *Bouricha* montre une valeur de CMI égale à 1mg/disque et une CMB de 1,1 mg/disque, ce qui indique la bonne activité de cet extrait.

Nous constatons que *K. pneumoniae* est l'espèce la plus résistante aux extraits méthanoliques testés, on note des valeurs de CMI et CMB supérieures à 2, suivie de *E. coli* pour laquelle on relève une CMI de 1,8 mg/ml pour les deux extraits méthanoliques des variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha*. *L. innocua* se montre moins résistante que *K. pneumoniae* et *E. coli* avec des valeurs de CMI et CMB qui varient entre 1,6 et 1,8 mg/ml.

Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Sousa *et al.* (2006), par rapport à l'ordre de sensibilité des souches à l'égard de l'extrait méthanolique de l'olive de table. Les CMI les plus faibles sont obtenues pour les souches *S. aureus* qui s'avère être l'espèce la plus sensible, suivie de *B. subtilis* tandis que les espèces *K. pneumoniae* et *E. coli* enregistrent les CMI les plus élevées dévoilant ainsi leur résistance.

Toutes les souches testées se montrent sensibles à l'égard de l'acide gallique, des valeurs de CMI et CMB comprises entre 0,4 et 0,8 mg/ml et 0,6 et 1,2 mg/ml sont notées respectivement. Les valeurs les plus faibles sont obtenues pour *S. aureus* (0,4/ 0,6 mg/ml) traduisant sa grande sensibilité. La concentration en CMI enregistrée pour ce composé phénolique est proche de celle obtenue pour la variété *Bouricha*, elle est deux fois moins faible que l'extrait de la variété *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* et quatre fois moins faible que l'extrait de la variété *Tabelout*. Quant à l'acide caféique, on relève la résistance de *K. pneumoniae* tandis qu'on note toujours la sensibilité élevée de *S. aureus* (CMI de 0,6mg/ml)

D'après Taguri *et al.* (2004), la sensibilité des bactéries aux polyphénols dépend de l'espèce bactérienne et de la structure des composés phénoliques. Malgré que le mécanisme exact n'est pas encore connu, plusieurs auteurs ont observé une augmentation de l'activité antibactérienne des composés phénoliques avec l'augmentation des groupements hydroxyles portés par ces molécules, ce qui expliquerait la meilleure activité observée pour l'acide gallique.

II.7.3 Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait de la variété *Bouricha* :

L'extrait méthanolique ayant donné le meilleur effet inhibiteur vis-à-vis de la souche de *S. aureus* a été retenu afin de mettre en évidence le taux d'inhibition de cette souche en présence de l'extrait pendant 24h.

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution du taux de *S. aureus* (ensemencé à 10^7 cellules/ml) en fonction du temps, en présence d'une concentration de 6,25mg/ml d'extrait méthanolique de la variété *Bouricha*. Un témoin a été également réalisé en cultivant *S. aureus* en culture pure. Les dénombrements ont été effectués toutes les deux heures pendant 24h d'incubation à 37°C (Figure 19).

Les résultats rapportés sur la figure montrent que la souche de *S. aureus* en culture pure, (en l'absence de l'extrait), suit une courbe de croissance classique, abordant la phase exponentielle dès les premières heures de culture et atteint un taux de croissance maximal de 9,75 log après 16 heures de culture. Au bout de 24h (fin de phase de latence) un taux de $3,8 \times 10^9$ est enregistré.

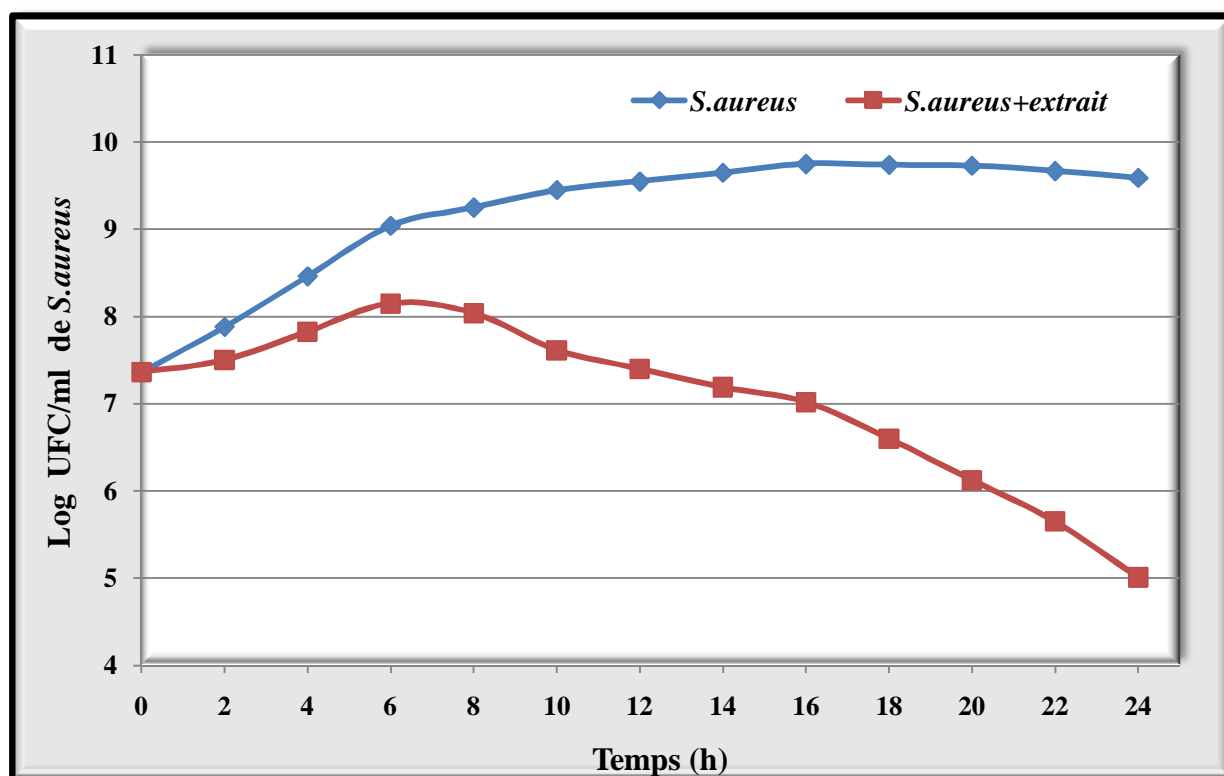


Figure 19: L'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété *Bouricha*

Par ailleurs, la souche *S. aureus* en culture avec 6,25 mg/ml d'extrait croît et atteint un taux de 10^8 au bout de 6 heures de culture, ce taux est inférieur à celui noté dans la culture pure (10^9), à partir de ce point, une réduction de la population bactérienne est observée. Au bout de 10 heures de culture, les taux redeviennent presque égaux aux taux d'ensemencements, tandis qu'une différence d'environ 2 log est observée par rapport à la

culture pure. Le nombre de *S. aureus* subit une réduction notable au bout de 24h de culture témoignant ainsi de son effet bactéricide, une diminution supérieure à 2 log par rapport au taux d'inoculation initiale est enregistrée, tandis qu'une différence de 4 log est notée par rapport à la croissance de *S. aureus* en culture pure.

Cette inhibition peut être reliée aux composés phénoliques présents dans cet extrait. D'après Amarti *et al.* (2008), les composés phénoliques peuvent causer des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires.

Les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive peuvent, par conséquent, jouer un rôle déterminant dans la limitation de la croissance de *S. aureus*, leur activité peut constituer une barrière efficace à sa prolifération. D'après Sousa *et al.* (2006), ce niveau d'activité peut être élevé avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

Medina *et al.* (2007), ont démontré le potentiel d'inhibition de *L. monocytogenes* par les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive. Dans cette étude, l'utilisation de l'huile d'olive extra vierge dans la préparation de la mayonnaise réduit le taux de cette souche de 3 log par rapport au taux initial tandis qu'une réduction minimale de cette population bactérienne a été relevée lors de l'utilisation de huile d'olive et l'huile de tournesol, cette action réduite est due à leur pauvreté en polyphénols.

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'étude réalisée a pour but d'évaluer la qualité, le pouvoir antioxydant et antibactérien des composés phénoliques présents dans l'huile de quelques variétés d'huile d'olives algériennes.

L'évaluation des indices de qualité des huiles d'olive montre que les huiles produites à partir de dix variétés, présentent toutes, sans exception, des valeurs d'acidité, d'indice de peroxyde et des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K_{232} , K_{270}) inférieures aux limites établies par le COI (2003) pour une huile d'olive extra vierge, ce qui nous permet de les classer dans la catégorie « extra vierge ».

La composition en acides gras indique que toutes les huiles étudiées présentent des teneurs en différents acides gras répondant aux normes établies par le COI (2003), pour les huiles d'olives extra vierges. Des variations cultivar-dépendantes en profils d'acides gras des variétés d'huile d'olive sont relevées. L'acide oléique est l'acide gras dominant de la composition des huiles étudiées, il présente des proportions supérieures à 60%, la valeur la plus élevée est enregistrée chez la variété *Bouchouk Soummam* (73,11%).

Le dosage des polyphénols totaux et des *ortho*-diphénols montre que leurs teneurs sont fonction de la variété considérée. La variété *Neb Djemel* se distingue des autres variétés par les teneurs les plus élevées en polyphénols et *ortho*-diphénols suivie des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*.

L'analyse de la composition en polyphénols des échantillons des huiles d'olive par HPLC, nous révèle une composition qualitative similaire en composés phénoliques individuels, mais différente d'un point de vue quantitatif, ce qui nous a permis de faire une distinction variétale; les variétés *Neb Djemel* et *Bouricha* se caractérisent par les teneurs les plus élevées en dérivés d'oleuropéine (276 et 235 mg/kg respectivement) et en dérivés ligstroside (173 et 150 mg/kg respectivement). Les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* enregistrent les taux les plus élevés en tyrosol (28 et 26 mg/kg) et hydroxytyrosol (5 mg/kg), la variété *Limli* se distingue des autres variétés par son taux élevé en tyrosol (26 mg/kg) alors qu'elle a enregistré une teneur faible en polyphénols totaux. La variété *Bouricha* se caractérise par la teneur la plus élevée en lignanes (51 mg/kg), tandis que les variétés *Akerma* et *Aghenfas* enregistrent les taux les plus faibles en polyphénols totaux mais elles se caractérisent par les teneurs les plus élevées en flavonoïdes 49 et 44 mg/kg respectivement.

L'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive varie considérablement en fonction de la nature et de la concentration en composés phénoliques qui sont eux même fonction de la variété.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des huiles d'olive montre que les variétés *Neb Djemel*, *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* se caractérisent par des meilleures activités réductrices : 178,48, 150,28 et 143,07 mg E.A.G./kg respectivement. Les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, refermant les taux les plus élevés en hydroxytyrosol se montrent très performantes avec les meilleurs pouvoir antiradicalaire (DPPH et ABTS⁺) des extraits phénoliques, les plus faibles EC₅₀ du radical ABTS⁺ et les activités scavenger les plus élevées sur le peroxyde d'hydrogène. Les variétés *Limli* et *Chemlal Tazmalt* enregistrent les plus faibles activités, ceci pourrait être due d'une part aux faibles teneurs en composés phénoliques et d'autre part aux taux élevés en polyphénols oxydés. Ces deux variétés enregistrent les taux les plus élevés en polyphénols oxydés soit 20,2% des polyphénols totaux pour la variété *Limli* et 26,9% pour la variété *Chemlal Tazmalt*. Des coefficients de corrélation significatifs ont été établis entre les polyphénols totaux et les *orthodiphénols* avec les différentes activités antioxydantes des extraits étudiées : le pouvoir réducteur (0,97 et 0,92), l'activité scavenger du radical DPPH (0,81 et 0,74) et du radical ABTS⁺ (0,76 et 0,55), l'inhibition du peroxyde d'hydrogène (0,81 et 0,82), ce qui nous laisse suggérer l'importante implication des polyphénols dans l'activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive révèle que les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* sont les plus actives sur toutes les souches bactériennes testées, des zones d'inhibition de diamètres variables ont été observées pour les différentes concentrations testées. Nous constatons également que les extraits d'huiles étudiées présentent une activité antibactérienne, particulièrement intéressante contre *S.aureus* et *B. subtilis*. Par ailleurs, les plus faibles concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sont obtenues avec l'extrait des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* vis-à-vis des souches *S.aureus* (0,6/0,8 mg/ml et 0,7/0,9 mg/ml) et *B. subtilis* (1,2/1,7 et 1,2/2 mg/ml).

L'effet antibactérien a également été étudié en milieu liquide, le suivi de la croissance de *S. aureus* a montré que ce dernier est remarquablement inhibé en présence de 6,25 mg/ml d'extrait

de la variété *Bouricha*. Une diminution de 4 unités logarithmiques par rapport au témoin a été observée au bout de 24h de culture.

Au terme de cette étude, nous constatons que les extraits des huiles d'olive extra vierge constituent une source importante en divers composés phénoliques doués d'une activité biologique, ce qui confirme l'intérêt de la consommation des huiles d'olive des variétés algériennes, dans la lutte contre le stress oxydant et les maladies infectieuses. Cependant et malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux s'imposent car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits. Aussi, il serait intéressant de :

- ✚ Tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests *in vivo* complémentaires qui permettraient une meilleure évaluation de l'activité biologique des polyphénols d'huile d'olive.
- ✚ Effectuer des essais sur de nouvelles souches bactériennes à des concentrations plus élevées afin de confirmer les performances mises en évidence.
- ✚ Utiliser ces types d'extraits comme agent conservateur des produits agroalimentaires.
- ✚ Etudier l'influence de certains paramètres sur la qualité et l'activité antioxydante et antibactérienne des composés phénoliques d'huile d'olive (la maturation, le stockage des olives, paramètres d'extraction et le stockage de l'huile).

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- Ait Yacine Z., Hilali S. and Serhrouchni M.** 2001. Etude de quelques paramètres déterminants de la date de récolte des olives dans le périmètre du Tadla. *Olivae*, 88: 39-45.
- Ait Yacine Z., Serhrouchni M. and Hilali S.** 2002. Evolution de la composition acide de l'huile d'olive à différents stades de la maturité des olives. Cas du Périmètre du Tadla- Maroc. *Olivae*, 94:51-53.
- Alba Mendoza J.A.** 1999. Separation des phases solide et liquide (analyse des différentes méthodes). Séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs applications en oléiculture et oleotechnique, Florence, 10, 11 et 12 mars 1999. Conseil Oleicole International, 1-20.
- Allalout A., Krichène D., Methenni K., Taamalli A., Oueslati I., Daoud D. and Zarrouk M.** 2009. Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120: 77-83.
- Alvarez M.A., Debattista N.B., Pappano N.B.** 2008. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiologica*, 53 (1): 23-28.
- Al-Younis K.N. and Abdullah Z.M.** 2008. Isolation and antibacterial evaluation of plant extracts from some medicinal plants in Kurdistan region. *Journal of Dohuk University*, 12 (1): 250-255.
- Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S. and Chaouch, A.** 2008. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *thymus capitatus* et de *thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, 6: 342-347.
- Andjelkovic M., Van C.J., Pedra M., Renders K., Socaciu C. and Verhé R.** 2008. Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13): 5181-5187.
- Andjelkovic M., Acun S., Van Hoed V., Verhe R. and Van Camp J.** 2009. Chemical composition of Turkish olive oil-Ayvalik. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86:135-140.

- Angerosa F., Alessandro N., Corana F. and Mellerio G.** 1996. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 736: 195-203.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. and Vito R.** 2001. Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72: 19-28.
- Angerosa F.** 2002. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 639-660.
- Artajo L.S., Romero M.P., Tovar M.J. and Motilva M.J.** 2006. Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108:19-27.
- Artajo Medina L.S.** 2006. Phenolic compounds: Their role during olive oil extraction and in flaxseed – transfer and antioxidant function. Thèse doctorat Technologie des aliments. pp. 1-21.
- Artajo L.S., Romero M.P., Suarez M. and Motilva M.J.** 2007. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*, 225:617-625.
- Azzi A. and Stocker A.** 2000. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*. 39 (3): 231-255.
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A. and Abo-Zaid M.A.** 1998, Comparative antibacterial and antimicrobial effects of some phenolics compounds. *Microbios*, 93: 43-54.

B

- Baccouri O., Bendini A., Cerretani L., Guerfel M., Baccouri B., Lercker G., Zarrouk M. and Ben Miled D.D.** 2008a. Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry*, 111: 322-328.
- Baccouri O., Guerfel M., Baccouri B., Cerretani L., Bendini A., Lercker G., Zarrouk M. and Ben Miled D.D.** 2008b. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*.109: 743-754.
- Baiano A., Gambacorta G., Terracone C., Previtali M.A., Lamacchia C. and La Notte E.** 2009.Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science*, 74(2): 177-183.
- Balasundram N., Yew Ali T., Sambanthamurthi R., Sundram K. and Samman S.** 2005.

Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4 (4): 319-324.

Balasundram N., Sundram K. and Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.

Barouki R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Medicine/ Science*. 22 : 266-72.

Beauchamp G.K., Keast R.S.J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C.H., Smith A.B. and Breslin P.A.S. 2005. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437: 45-46.

Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Bigguzi B., Lercker G. and Toschi T.G. 2003. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olives oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*, 985:425-433.

Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaco A.M., Segura-Cerretano A., Fernandez-Gutierrez A. and Lercker G. 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils; a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12 (8): 1679-1719.

Benkeblia N. 2005. Free-Radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa L.*) and garlic (*Allium sativum L.*) extracts. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 48:753-759.

Ben Tekaya I. and Hassouna M. 2005. Etude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *Oléagineux Corps gras Lipides*, 12 (5-6) : 447-453.

Ben Tekaya I. and Hassouna M. 2007. Effets des chlorophylles, du bêta-carotène, de l'alphatocophérol du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne. *Oléagineux Corps gras Lipides*. 14:60-67.

Ben Temime S., Manai H., Methenni K., Baccouri B., Abaza L., Daoud D., Sanchez Casas J., Bueno E.O. and Zarrouk M. 2008. Sterolic composition of Chetoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, 110: 368-374.

Ben Youssef N., Zarrouk W., Carrasco-Pancorbo A., Ouni Y., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Daoud D. and Zarrouk M. 2010. Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 199–204.

Berra B. 1998. Les composants mineurs de l'huile d'olive: aspects biochimiques et nutritionnels. *Olivae*, 73: 29-30.

Bianchi G. 2003. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipids and Science. Technology*, 105: 229- 242.

- Bianco A., Coccioli F., Guiso M. and Marra C.** 2001. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*, 77: 405-411.
- Bianco A., Coccioli F., Guiso M. and Marra C.** 2001. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans, *Food Chemistry*, 77: 405-411.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccelle N. and Saija, A.** 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 971-974.
- Blekas G., Psomiadou E., Tsimidou M., and Boskou, D.** 2002. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 340–346.
- Bouaziz M., Chamkha M. and Sayadi S.** 2004. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52 (17): 5476-5481.
- Boskou D.** 2006a. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit: in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Ed. The American Oil Chemists' Society, pp 13-20.
- Boskou D.** 2006b. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 505-512.
- Boskou D., Blekas G. et Tsimidou M.** 2006a. Olive Oil Composition in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, Boskou, D., Ed., The American Oil Chemists' Society, pp 41-72.
- Boskou D., Tsimidou M. and Blekas G .** 2006 b. Polar Phenolic Compounds: in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Ed. The American Oil Chemists' Society, PP 3-92.
- Boskou D.** 2009. Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil in *Olive oil: minor constituents and Health*. Ed. CRC press. pp 11-44.
- Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N.** 2009. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et maladies infectieuses*, 39 :142-143.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E and Berset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie* , 28 : 25-30.
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Rios J.J. and Garrido A.** 1999. Phenolic compounds in spanish olive oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47(9): 3535-3539.
- Brenes M., Hidalgo F.J., García A., Ríos J.J., García P., Zamora R. and Garrido A.** 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 77(7): 715-720.

Brenes M., Garcia A., Garcia P. and Garrido A. 2001. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5609-5614.

Brenes M., Garcia A., Rios J.J., Garcia, P. and Garrido A. 2002. Use of 1 acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 615-625.

Brenes M., Medina E., Romero C. and De Castro A. 2006, Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food industry hi-tech*, 18 (4): 6-8.

Briante R., Patumi M., Limongelli S., Febbraio F., Vaccaro C., Di Salle A., La Cara F. and Nucci R. 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162: 791-798.

C

Canadanovic-Brunet J., Cetkovic G., Djilas S., Tumbas V., Bogdanovic G., Mandic A., Markov S., Cvetkovic D. and Canadanovic V. 2008. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 11(1): 133-143.

Carrasco-Pancorbo A., Cruces-Blanco C., Segura-Carretero A. and Fernandez-Gutierrez A. 2004. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (22): 6687-6693.

Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina-Toschi T. and Fernandez-Gutierrez. 2005a. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28 :837-858.

Carrasco-Pancorbo A., Segura-Carretero A. and Fernandez- Gutierrez A. 2005b. Co-electroosmotic capillary electrophoresis determination of phenolic acids in commercial olive oil. *Journal of Separation Science*, 28: 925-934.

Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A. and Fernandez-Gutierrez A. 2006. Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21):7984-7991.

Casas-Sanchez J., Alsina M.A., Herrlein M.K. and Mestres C. 2007. Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid & Polymer Science*, 285:1351-1360.

Çavusoglu A. and Ohtar A. 1994. Les effets des facteurs agronomiques et des conditions de stockage avant la mouture sur la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 52 :18-24.

- Ceci L.N. and Carelli A.A.** 2007. Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 84: 1125-1136.
- C.E.E. 2568/91.** Communauté Economique Européenne. Règlement (CEE) N°2568/91 de la commission du 11 juillet 1991. Relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes : 27-30.
- Cerretani L., Bendini A., Del Caro A., Piga A., Vacca V., Caboni M.F. and Toschi T.G.** 2006. Preliminary characterization of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *European Food Research and Technology*, 222: 354-361.
- Cerretani L., Motilva M.J., Romero M.P., Bendini A. and Lercker G.** 2008. Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. *European food research & technology*, 226:1251-1258.
- Chimi H., Cillard C., Cillard P and Rahmani M.** 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68: 307-312.
- Chimi H.** 2001. Qualité des huiles d'olive au Maroc. Transfert de technologie en agriculture. *Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture*, 79: 1-4.
- Chimi H.** 2006. Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture*, 141: 1-4.
- Chou S.T., Chao W.W. and Chung Y.C.** 2003. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus radiatus* L. var. *Aurea*). *Journal of food science*, 68(1) : 21-25.
- Cicerale S., Conlan X.A., Sinclair A. J. and Keast R. S. J.** 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 218-236.
- Cillard J et Cillard P.** 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux Corps gras Lipides*, 13 (1):24-29.
- Cinquanta L., Esti M. and La Notte E.** 1997. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(10): 1259-1264.
- Clodoveo M.L., Delcuratoro D., Gomes T. and Celelli G.** 2007. Effect of different temperatures and storage atmospheres on Coratina olive oil quality. *Food Chemistry*, 102: 571-576.
- C.O.I.** 1996. Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet. *Conseil Oléicole International/ T20/ Doc 19 6 juin 1996, Madrid. Espagne.*

- C.O.I.** 2003. Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. Conseil Oléicole International.
- C.O.I.** 2009. Production de l'huile d'olive. Conseil Oléicole International.
- Conde C., Delrot S. and Geros H.** 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1545-1562.
- Cornwell D.J., Ma J.** 2008. Nutritional Benefit of Olive Oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19): 8774-8786.
- Cortesi N., Rovellini P. and Fedeli E.** 2000. Cultivars, technologie et qualité des huiles d'olive. *Olivae*, 81: 26-35.
- Cortesi N. and Rovellini P.** 2004. L'état d'oxydation de l'huile d'olive vierge : effet des antioxydants naturels. *Olivae*, 101: 27-33.
- Covas M.I.** 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Nutritional Pharmacology*, 55 (3): 175-186.
- Cowan M.M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12(4): 564-582.
- Criado M. N., Morello J. R., Motilva M. J., and Romero M. P.** 2004. Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *Journal of American Oil Chemists Society*, 81: 633-640.
- Criado M.N., Motilva M.J., Goni M. and Romero M.P.** 2007. Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. *Food Chemistry*, 100: 748-755.
- Cushnie T.P.T. and Lamb A.J.** 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356.

D

- Dabbou S., Issaoui M., Servili M., Taticchi A., Sifi S., Montedoro G.F. and Hammami M.** 2009. Characterisation of virgin olive oils from European olive cultivars introduced in Tunisia. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 111: 392-401.
- Dabbou S., Rjiba I., Nakbi A., Gazzah N., Issaoui M. and Hammami M.** 2010. Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to Chemlali cultivars. *Scientia Horticulturae*, 124: 122-127.

- Dag A., Ben-Gal A., Yermiyahu U., Basheer L., Nir Y. and Kerem Z.** 2008. The effect of irrigation level and harvest mechanization on virgin olive oil quality in a traditional rain-fed 'Souri' olive orchard converted to irrigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 1524-1528.
- Damak N., Bouaziz M., Ayadi M., Sayadi S. and Damak M.** 2008. Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the chétoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5): 1560–1566.
- De Korwin J.D.** 2006. La gastrite à *Helicobacter pylori*, une pathologie frontière *Helicobacter pylori* gastritis: a connective disease. *La Revue de Médecine Interne*, 27 : 61–63.
- De Koster E., Buset M., Fernandes E. and Deltenre M.** 1995. *Helicobacter pylori* et lésions précancéreuses de l'estomac. *Acta Endoscopica*, 25(1): 33-44.
- De La Torre-Carbot D., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M. and Lopez-Sabater M.C.** 2005. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11) : 4331-4340.
- Del Carlo M., Sacchetti G., DI Mattia C. and Compagnone D.** 2004. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (13): 4072-4079.
- Denis F., Ploy N-C., Martin C. and Bingen E.** 2007. Instauration et surveillance d'un traitement d'antibiotique in Bactériologie médicale: techniques usuelles. ED. Masson. pp 543-554.
- De Stefano G., Piacquadio P., Servili M., Di Giovacchino L. and Sciancalepore V.** 1999. Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. *Fett/Lipid*, 101 (9): 328-332.
- Dhifi W., Angerosa F., Serraiocco A., Oumar I., Hamrouni I. and Marzouk B.** 2005. Virgin olive oil aroma: Characterization of some Tunisian cultivars. *Food Chemistry*, 93(4): 697-701.
- Dhifi W., Ben Khedher M., Elyes Kechouk M. and Marzouk B.** 2006. Etude qualitative et quantitative des arômes et des polyphénols de quelques huiles d'olive de Tunisie. *Olivae*, 105: 36-40.
- Di Bella G., Maisano R., La Pera L., Lo Turco V., Salvo F and Dugo G.** 2007. Statistical characterization of Sicilian Olive oils from the peloritana and maghrebian zones according to the fatty acid profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (16): 6568-6574.
- Di Giovacchino L.** 1991. L'extraction de l'huile d'olive par le système de la pression, de la centrifugation et de la percolation: incidence des techniques d'extraction sur les rendements en huile. *Olivae*, 36 :14-40.

Di Giovachino L. 1999. La technologie d'élaboration de l'huile d'olive vierge : Opérations préliminaires en huilerie et préparation de la pâte d'olives. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs applications en oléiculture et oleotechnique. Florence, 10, 11 et 12 mars 1999. Conseil Oléicole International, 1-39.

DI Giovacchino L., Costantini N., Serraiocco A., Surricchio G. and Basti C. 2001. Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European journal of lipid science and technology*, 103: 279-285.

Di Giovachino L., Sestili S. and Di Vincenzo D. 2002. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 104: 587–601.

D'Imperio M., Dugo G., Alfa M., Mannina L. and Segre A.L. 2007. Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102: 956– 965.

Dugo G., Lo Turco V., Pollicino D., Mavrogeni E. and Pipitone F. 2004. Caractérisation d'huiles d'olive vierges siciliennes. Variation qualitative des huiles des fruits des cultivars « *Biancolilla* , *Nocellara del Belice* , *Cerasuola* , *Tonda Iblea* et *Crastu* » en fonction des techniques et de l'époque de récolte des olives. *Olivae*, 101: 44-52.

E

E.C. 2002. Regulation n° 796 of 6 May 2006 on changes EC- Regulation. 2568/91. Official J.L.128/815/05/02. 2002. Bruxelles (Belgium).

El Antari A., Hilal A., Boulouha. and El Moudni A. 2000. Etude de l'influence de la variété, de l'environnement et des techniques culturales sur les caractéristiques des fruits et la composition chimiques de l'huile d'olive vierge extra au Maroc. *Olivae*, 80: 29-36.

El Antari A., El Moudni A. and Ajana H. 2003. Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. *Olivae*, 95: 26-31.

Esti M., Contini M., Moneta E. and Sinesio F. 2009. Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*, 113:1095–1100.

F

Favati F., Caporale G. and Bertuccioli M. 1994. Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. *Grasas y. Aceites*, 45: 68-70.

Favier A.2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique, 108-115.

Friedman M., Henika P.R. and Mandrell R.E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. Journal of Food Protection, 66(10): 1811-1821.

Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N. and Bisignano G. 2002. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. International Journal of Antimicrobial Agents. 20: 293-296.

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

G

Gallardo-Guerrero L., Roca M. and Mínguez-Mosquera I. 2002. Distribution of chlorophylls and carotenoids in ripening olives and between oil and alperujo when processed using a two-phase extraction system. Journal of American Oil Chemist's Society, 79 (1): 105- 109.

Gandul-Rojas B., Cepero M.R. and Mínguez-Mosquera M.I. 2000. Use of Chlorophyll and Carotenoid Pigment Composition to Determine Authenticity of Virgin Olive Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77(8): 853-858.

Garcia-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Oliveras-Ferraros C., Vazquez-Martin A., Menendez J. A., Segura-Carretero A. and Fernandez- Gutierrez A. 2010. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 51: 416-429.

Garrabé E., Cavallo J.D., Fabre R. and Hernandez E. 1998. AntibioGramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode «Presto ABG ®». Revue Française des Laboratoires. 307: 65-69.

Ghedira K. 2008. L'olivier. Phytothérapie, 6 (2) : 83-89.

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M., De la Torre M.C. and Lopez- Sabater M.C. 2002. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, a-tocopherol, and b-carotene) in virgin olive oil. Food Chemistry, 78: 207-211.

Gomez-Alonso S., Salvador M.D. and Fregapane G.2002. Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (23) : 6812-6817.

- Gomez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Seguera-Carretero A., Fernandez-Gutierry A., Del Carlo M., Compagnone D. and Cechelli A.** 2008. Effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 4577-4583.
- Gomez-Rico A., Salvador M.D., Moriana A. and Perez D.** 2007. Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*. 100: 568-578.
- Gómez-Rico A., Fregapane G. and Salvador M.D.** 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41: 433-440
- Goudable J. and Favier A.** 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11:115-20.
- Guerfel M., Ouni Y., Taamalli A., Boujnah D., Stefanoudaki E. and Zarrouk M.** 2009. Effect of location on virgin olive oils of the two main Tunisian olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 926-932.
- Gurdeniz G., Ozen B. and Tokatli F.** 2008. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *European Food Research & Technology*, 227:1275-1281.
- Gutierrez F., Jimenez B., Ruiz A. and Albi M.A.** 1999. Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1): 121-127.
- Gutiérrez F., Villafranca M.J. and Castellano J.M.** 2002. Changes in the Main Components and Quality Indices of Virgin Olive Oil During Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7): 669-676.

H

- Haddada F.M., Manai H., Oueslati I., Daoud D., Sanchez J., Osorio E. and Zarrouk M.** 2007. Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10941-10946.
- Haddada F.M., Krichène D., Manai H., Oueslati I., Daoud D. and Zarrouk M.** 2008. Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 905-913.

Hollman P.C.H. and Katan M. B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 937-942.

Hrncirik K. and Fritsche S. 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(8) :540-549.

Huang C.L. and Sumpio B.E. 2008. Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *American College of Surgeons*, 207(3): 407-416.

I

Ilyasoglu H Ozcelik B., Hoed V.V. and Verhe R. 2010.Characterization of Aegean Olive Oils by Their Minor Compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, DOI 10.1007/s11746-009-1538-5.

Inglese P. 1994. L'influence de la variété sur les caractéristiques qualitatives de l'huile d'olive. *Olivae*, 54 : 42-44.

J

Jacotot. 1996. Huile d'olive et prévention. *Clinical Nutrition & Metabolic*, 10: 7-9.

Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg E.A. 1973. Chimiothérapie antimicrobienne in *Microbiologie médicale*. Les Presses université de Laval. pp 136-162.

Judde A. 2004. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?. *Oléagineux Corps gras Lipides* . 11(6): 414-418.

Juven B., Henis Y. and Jacoby B. 1972. Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology*. 35: 559-567.

K

Kalua C.M., Allen M.S., Bedgood D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D. and Robards K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100 (1): 273-286.

Kappel V.D., Costa GM., Scola G., Silva F.A ., Landell M.F., Valente P., Souza D., Vanz D., Reginatto F. and Moreira C.F.G. 2008. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *Journal of Medicinal Food*, 11(2): 267-274.

- Keceli T. and Gordon M.H.** 2001. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of Science and Food Agriculture*, 81: 1391-1396.
- Kevin L.G., Novalija E. and Stowe D.F.** 2005. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg*, 101: 1275-1287.
- King T., Dykes G. and Kristianti R.** 2008. Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, 91(6):1423-1429.
- Kiritsakis A., Nanos G.D., Polymenopoulos Z., Thomai T. and Sfakiotakis E.M.** 1998. Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6): 721-724.
- Koutsaftakis A., Kotsifaki F., Christopoulou E. and Cert A.** 2000. Etude triennale sur les variations de plusieurs caractéristiques chimiques et de divers composants mineurs des huiles d'olive vierges obtenues à partir d'olives cueillies à différents degrés de maturité. *Olivae*, 80: 22-27.
- Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer T.E. and Gücer S.** 2009. Antibacterial activity and chemical constitutions of OLEA EUROPAEA L. Leaf extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, DOI: 10.1111/j.1745-4549.

L

- Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte L., Pina M. and Villeneuve P.** 2007. Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux Corps gras Lipides* .14 (5): 278-292.
- Laribi R., Rovellini P., Deflaoui L., Aidli A., Mettouchi S., Arrar L. and Tamendjari A.** 2009. Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 86 (3): 151-161.
- Lee C.H., Jenner A.M., Low C.S. and Lee K.Y.** 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157 : 876-884.
- Lee O-H. and Lee B-Y.** 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754.
- Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V. and Bíró L.** 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (1-4):119-125.

M

- Maestro R., Garcia J.M. and Castellano J.M.** 1993. Changes in polyphenol content of olives stored in modified atmospheres. *HortScience*, 28: p 1.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L .** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5): 727-747.
- Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. and Fritsch P.** 2004. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, 20 (4) :458-463.
- Masibo M. and He Q.** 2009. In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2): 2073-80.
- Mateos R. and García-Mesa J.A.** 2006. Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1247-1254.
- Medina E., De Castro A., Romero C. and Brenes M.** 2006. Phenolic compounds in olive oil and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(14): 4954-4961.
- Medina E., Romero C., Brenes M. and de Castro A.** 2007. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 70: 1194-1199.
- Mendil M. and Sebai A.** 2006. L'olivier en Algérie, aperçu sur le patrimoine génétique autochtone. *Institut Technique de L'arboriculture fruitière et de la vigne*. pp 99.
- Metzidakis I., Gerasopoulos D. and Kiritsakis K.** 1995. Effet de la durée du séjour des olives dans les filets sur les caractéristiques qualitatives de l'huile d'olive. *Olivae*, 56 : 40-43.
- Michelakis N.**1992. L'amélioration de la qualité de l'huile d'olive en Grèce. Passé, présent et avenir. *Olivae*,42 :22-30.
- Migliorini M., Mugelli M., Cherubini C., Viti P. and Zanoni B.** 2006. Influence of O₂ on the quality of virgin olive oil during malaxation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:2140-2146.
- Molyneux P.** 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 26 (2): 211-219.

Montealegre C., Alegre M.L.M. and Garcia-Ruiz C. 2010. Traceability Markers to the Botanical Origin in Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1):28–38.

Montedoro G., Servili, M., Baldioli, M. and Miniati M. 1993. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2228- 2234.

Morales M.T., Luna G. and Aparicio R. 2005. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2): 293–301.

Morello J., Motilva M., Tovar M. and Romero M. 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv. Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85: 357-364.

N

Nenadis N., Wang., Tsimidou M. and Zhang H-Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15): 4669-4674.

Nergiz. and Onal k. 1991. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 39: 237-240.

Norme Grassi e Derivati. 2007. NGD, edito da Stazione Sperimentale Oli e Grassi, Milano. NGD C89.

Nychas G.J.E., Tassou S.C. and Board R.G. 1990. Phenolic extract from olives : inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 217-220.

O

Obied H. K., Bedgood D. R., Prenzler P.D. and Robards, K. 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1238-1248.

Obied H.K., Prenzler P.D., Ryan D, Servili M., Taticchi A., Esposito S. and Robards K. 2008. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, 25: 1167-1179.

Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B. and Korel F. 2009. Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113: 401-410.

- Oliveras-Lopez M.J., Innocenti M., Giaccherini C., Ieri F., Romani A. and Mulinac N.** 2007. Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73: 726-732.
- Ollivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillol S., Guèrère M. and Artaud J.** 2004. Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique (2ème Semestre)*, 965:169-196.
- Ortega-Garcia F. and Peragon J.** 2009. Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(21): 10331-10340.
- Oueslati I., Anniva C., Daoud D., Tsimidou M.Z. and Zarrouk M.** 2009. Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: The commercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry*, 112: 733-741.
- Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B. and Bartsch H.** 2000a. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36: 1235-1247.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B. and Bartsch H.** 2000b. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46: 976-988.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B. and Bartsch H.** 2000c. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, 1: 107-112.

P

- Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J. and Rice-Evans C.A.** 2001. Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5): 1161-1168.
- Pardo J.E., Cuesta M.A. and Alvarruiz A.** 2007. Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel"(Ciudad Real, Spain). *Food Chemistry*, 100: 977-984.
- Parenti A., Spugnoli P., Masella P., Calamai L. and Pantani L.O.** 2006. Improving olive oil quality using CO₂ evolved from olive pastes during processing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 904-912.
- Parenti A., Spugnoli P., Masella P. and Calamai L.** 2008. The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 735-741.

- Paz Romero M., Tovar M.J., Ramo T. and Motilva J.** 2003. Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin “Les Garrigues”. *Journal of American Oil Chemist’s Society*, 8 (5): 423-430.
- Pereira J.A., Pereira A.P.G., Ferreira I.C.F.R., Valentao P., Andrade B.P., Seabra R., Estevinho L. and Bento A.** 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (22): 8425-8431.
- Pereira-Caro G., Madrona A., Bravo L., Espartero J.L., Alcudia F., Cert A. and Mateos R.** 2009. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 115 : 86-91.
- Perrin J.L.** 1992. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l’olive et de son huile. *Etude et Recherche*, 4: 25-31.
- Petrakis C.** 2006. Olive Oil Extraction in Olive Oil: Chemistry and Technology: in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Ed. The American Oil Chemists’ Society, pp 191-224.
- Petti S. and Scully C.** 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37(6): 413-423.
- Pietta P.G.** 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer S., T. and Jeralab R.** 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306: 530-536.
- Prior R.L. and Cao G.** 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11-12): 1173-1181.
- Psomiadou E. and Tsimidou M.** 2002. Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4): 716-721.

R

- Rahmani M.** 1996. Critère d’évaluation de l’époque optimal de la récolte des olives. *Cours international sur l’amélioration de la qualité de l’huile d’olive*. 1-8.
- Rahman A., Eun L.K. and Sun C.K.** 2009. Antibacterial and antioxidant properties of ailanthus altissima swingle leave extract to reduce foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Journal of Food Safety*, 29: 499–510.

- Ramírez-Tortosa M.C., Granados S. and Quiles J.L.** 2006. Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil in Olive Oil and Health. CABI Publishing, pp 45-62.
- Ranalli A., Pollastri L., Contento S., Iannucci E. and Lucera L.** 2003. Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 105: 57-67.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M and Rice-Evans C.** 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-1237.
- Rivera del Alamo R.M., Fregapane G., Aranda F., Gomez-Alonso S. and Salvador M.D.** 2004. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: The campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chemistry*, 84: 533-537.
- Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R. and Manca de Nadera M.C.** 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.
- Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., de las Rivas B., López de Felipe F., Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M. and Muñoz R.** 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 79-90.
- Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M. and De Castro A.** 2007. In vitro activity of olive polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3): 680-686.
- Romero-Segura C., Sanz C. and Perez A.G.** 2009. Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17): 7983-7988.
- Rovellini P. and Cortesi N.** 2003. Détermination des composants phénoliques de différents cultivars au cours de la maturation des olives par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. *Olivae*, 95: 32-38.
- Runcio A., Sorgona L., Mincione A., Santacaterina S. and Poiana M.** 2008. Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. *Food Chemistry*, 106: 735-740.
- Ryan D., Antonovitch M., Prenzel P. and Lavee S.** 2002. Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176.
- Ryan D., Robardas K. and Lavee S.** 1998. Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 72 : 26-38.

S

- Saitta M., Salvo F., DI Bella G., Dugo G. and Loredana LA Torre G.** 2009. Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 112: 525-532.
- Salvador M.D., Aranda F. and Fregapane G.** 2001. Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73: 45-53.
- Salvador M.D., Aranda F., Gomez-Alonso S. and Fregapane G.** 2003. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80: 359-366.
- Samaniego-Sanchez C., Troncoso Gonzalez A.M., Garcia-Parrilla M.C., Quesada Granados J.J., Lopez Garcia de la Serrana H. and Lopez Martinez M.C.** 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593:103-107.
- Sanchez Casas J.J., De Miguel Gordillo C. and Marin Exposito J.** 1999. La qualité de l'huile d'olive provenant de variétés cultivées en Estrémadure en fonction de la composition et de la maturation de l'olive. *Olivae*, 75: 31-36.
- Sanchez J. and Harwood J.L.** 2002. Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 564-573.
- Selvaggini R., Servili M., Urbani S., Esposto S., Taticchi A. and Montedoro G.F.** 2006. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54(4): 2832-2838.
- Servili M. and Montedoro G.** 2002. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 602-613.
- Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S. and Montedoro G.** 2003. Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27): 7980-7988.
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. and Morozzi G.** 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography*, 1054: 113-127.

- Servili M., Esposito S., Fabiani R., Urbani S., Taticchi A., Mariucci F., Selvaggi R. and Montedorol G.F.** 2009. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and Organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17: 1-9.
- Shahidi F. and Nacz M.** 2004. Nutritional and Pharmacological Effects of Food Phenolics in Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, pp 327-328.
- Sher A.** 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*. 7(1):72-78.
- Soler Rivas C., Espin J.C. and Wichers H.J.** 2000. Review : Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013-1023.
- Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Calhelha R., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R., Estevinho L., Bento A. and Pereira J.A.** 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 8533-8538.
- Stefanoudaki E., Kotsifaki F. and Koutsaftakis A.** 1999. Classification of virgin olive oils of the two major cretan cultivars based on their fatty acid composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (5): 623-626.

T

- Tamendjari A., Bellal M.M. Laribi R. and Angerosa F.** 2004. Impact de l'attaque de *Bactrocera oleae* et du stockage des olives de la variété *Chemlal* sur la qualité de l'huile. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 81 : 23-27.
- Tamendjari A., Angerosa F., Mettouchi S. and Bellal M.M.** 2009. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of *Chemlal* olive oil. *Grasas y Aceites*, 60: 507-513.
- Taguri T., Tanaka T. and Kouno I.** 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(12): 1965-1969.
- Thabaut A. and Durosoir J.L.** 1979. L'Antibiogramme : Méthodes classiques et Méthodes automatisées. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 9: 490-495.
- Tovar J., Motilva M.J. and Romero P.M.** 2001. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49(11): 5502-5508.
- Tovar M.J., Paz Romero M., Girona J. and Motilva M.J.** 2002. L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea*_L cv

Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82: 892-898.

Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S. and La Guardia M. 2005. The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18: 98-112.

Tsimidou M., Papadopoulou G and Boskou D. 1992. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chemistry*, 45:141-144.

Tsimidou M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Journal of Food Science*, 10 (2): 99-112.

Tsimidou M. 2006. Olive Oil Quality: in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, Boskou, D., Ed., 2nd Ed. The American Oil Chemists' Society, pp 93-111

Tuck K.L. and Hayball P.J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(11): 636-644.

Tunçel G. and Nergiz C. 1993. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 300-302.

Tungel G. and Nergiz C. 1993. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, 17 : 300-302.

U

Uceda M., Jiménez A. and Beltrán G. 2006. Olive oil extraction and quality. *Grasas y Aceites*, 57 (1): 25-31.

Ullah M.F. and Khan M.W. 2008. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9: 187-95.

Unal M.K. 1994. Polyphenols, *O*-diphénols et acides phenoliques totaux dans les grignons d'olive et les margines. *Olivae*, 34:34-35.

Uzzan A. 1994. Huile d'olive. In : manuel des corps gras. Lavoisier, Ed. Technique et Documents, pp. 763-766.

V

Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P. and Bordet R. 2004. Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1) : 16-23.

- Van den Berg R., Haenen R.M.M., Van den Berg H., Van der Vijgh W. and Bast A.** 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70: 391-395.
- Van der Vossen H.A.M. and Mkamilo G.S.** 2007. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 14. Oléagineux. Backhuys Publishers. pp 216.
- Vazquez Roncero A.** 1978. Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Revue Française des Corps Gras*, 78 (4) : 21-26.
- Velasco J. and Dobarganes C.** 2002. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 104: 661-676.
- Vekiari S.A. and Koutsaftakis A.** 2002. The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. *Grasas y Aceites*. 53(3): 304-308.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. and Garcia-Parrilla M.C.** 2007 Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- Visioli F. and Galli C.** 1998. Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46: 4292-4296.
- Visioli F., Bellomo G. and Galli C.** 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247 (1): 60-64.
- Visioli F., Poli A. and Galli C.** 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22 (1): 65-75.
- Visioli F., Bogani P., Grande S. and Galli C.** 2004. Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites*, 55: 66-75.

W

- Waterman E. and Lockwood B.** 2007. Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review*, 12 :331-342.
- Wen A., Pascal D., Kareem S. and Peter T.** 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 20: 305-311.
- Wiesman Z.** 2009. Oil extraction and processing biotechnologies: in *Desert Olive Oil Cultivation*. Advanced Bio Technologies. Elsevier's Science & Technology Rights. pp 223-239.

Willför S.M., Smeds A.I. and Holmbom B.R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112: 64-77.

Wu D., Kong Y., Han C., Chen J., Hu L., Jiang H. and Shen X.2008. D-Alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(5):421-426.

X

Xu H-X. Lee S.F. 2001. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria, *Phytotherapy Research*, 15: 39-43.

Y

Yousfi K., Cert R.M. and Garcia J.M. 2006. Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *European Food Research Technology*, 223: 117–124.

Z

Zarrouk M., Marzouk B., Ben Miled Daoud D. and Chérif A. 1996. Accumulation de la matière grasse de l'olive et l'effet du sel sur sa composition. *Olivae*, 61: 41-45.

Zarrouk W., Haddada F.M., Baccouri B., Oueslati I., Taamalli W., Fernandez Z., Lizzani-Cuvelier L., Daoud D. and Zarrouk M. 2008. Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 110: 81-88.

Glossaire

Glossaire

- **Cardiovasculaire** : Relatif au cœur et aux vaisseaux sanguins.
- **Antithrombotiques** : Substances très utilisés dans la prévention primaire et secondaire des maladies thrombotiques cérébrovasculaires ou cardiovasculaires.
- **Cholestérol LDL** : Appelé "mauvais cholestérol", est une lipoprotéine qui amène le cholestérol aux tissus
- **Scavenger** : terme Anglo-saxon signifiant « piègeur ».
- **Radical libre**: Espèce chimique possédant un électron non apparié
- **Alzheimer** : Maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales
- **Neuro-dégénératives** : Sous groupe de maladies dégénératives (dans lesquelles un ou plusieurs organes sont progressivement dégradés), qui affecte le fonctionnement du cerveau ou plus généralement le système nerveux.
- **Parkinson** : Maladie neurologique chronique affectant le système nerveux central responsable de troubles essentiellement moteurs d'évolution progressive.
- **Cyclo-oxygénase (COX)** est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine.

Annexes

Tableau I : Composition en polyphénols individuels de quelques variétés d'huile d'olive vierge d'origines différente (mg/kg)

Origine	Echantillons	Polyphenols totaux	Secoiridoïdes			Alcools phénoliques		Lignanes		Flavonoïdes		Acides phénoliques			Référence
			D.oleuro		D. lig	3,4-DHPEA	p-HPEA	Acetoxy pinosésinol	Pinosésinol	Apigénine	Lutéoline	Acide vanillique	Acide p-coumarique	Acide ferulique	
			3,4-DHPEA-EDA	3,4-DHPEA-EA	p-HPEA-EDA										
Tunisie	<i>Chétoui</i>	669	272	286	47	6	21	6	31	--	--				Dabbou <i>et al.</i> (2009)
	<i>Chemlali</i>	304.72	38.88	--	254.63	2.31	6.33	--	--	--	--	0,25	0.44	0.76	Guerfel <i>et al.</i> (2009)
Espagne	<i>Arbequina</i>	Lleida	453,55	130	137	54	1.83	2.65	38	1.26	1.24	0.11	--	--	Criado <i>et al.</i> (2004)
		Jaén	484,74	112	103	43	4.71	4.75	61	1.99	1.98	0,26	--	--	
Algérie	<i>Chemlal</i>	366	137		99	3	8	50	31	--	--	--	--	Laribi <i>et al.</i> (2009)	
	<i>Boughenfous</i>	107	7		39	3	6	4	5.2	--	--	--	--		
	<i>Takesrit</i>	94	16		33	0.6	8	8	15	--	--	--	--		
	<i>Blanquette</i>	46	31		38	0.3	9	3	4	--	--	--	--		
Italie	<i>Leccino</i>	228.58	76.80	13.71	44.80	0.46	2.51	--	25.32	--	--	--	--	Baiano <i>et al.</i> (2009)	
	<i>Peranzana</i>	253.36	75.75	8.61	40.79	1.52	3.80	--	8.91	--	--	--	--		
	<i>Frantoio</i>	178.34	34.60	14.98	24.43	0.54	3.92	--	7.85	--	--	--	--		

Dérivés d'oleuropéine (**D.oleuro**); Dérivés Ligstroside (**D. lig**); Décarboxyméthyloleuropéine aglycone (**3,4-DHPEA-EDA**); Décarboxyméthyl ligstroside aglycon (**p-HPEA-EDA**); Oleuropéine aglycone (**3,4 DHPEA-EA**); Hydroxytyrosol (**3,4-DHPEA**); Tyrosol (**p-HPE**)

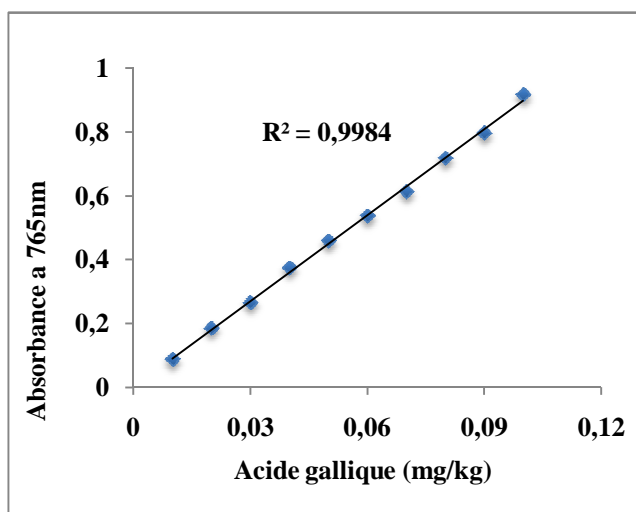


Figure 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

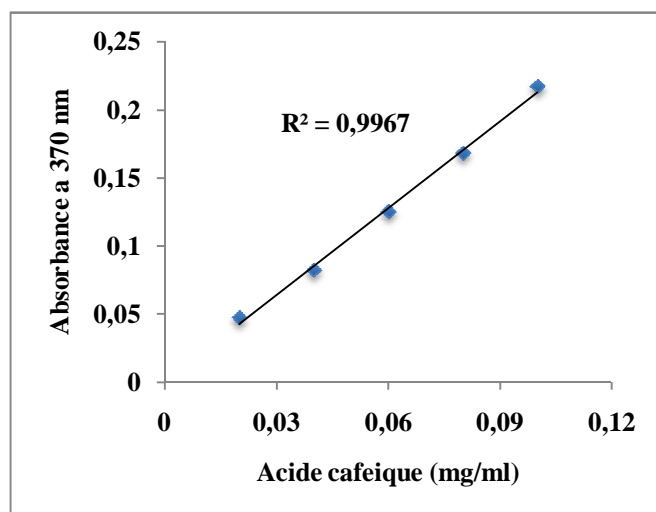


Figure 2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des *Ortho*-diphénols

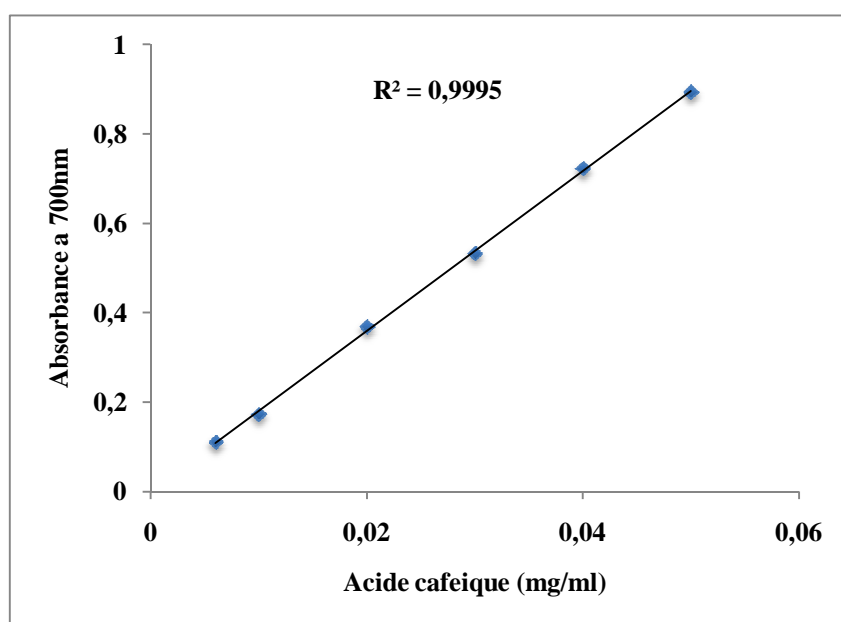


Figure 3 : Courbe d'équivalences pour le pouvoir réducteur

Composition des milieux de culture

- **Gélose Mueller Hinton** (milieu de culture déshydraté)

Extrait de viande : 2 g, hydrolysate acide de caséine : 17,5 g, amidon : 1,5 g, agar : 10 g, eau distillée : 1 litre. pH=7,4

- **Gélose Chapman**

Extrait de viande : 1g, Chlorure de sodium : 75g, Peptone : 10g, agar : 15g, mannitol : 10g, rouge de phénol : 0.025g, eau distillée : 1 litre. pH=7,4

Bouillon nutritif

Extrait de viande : 5g, Peptone tryptique 10g, NaCl 5g, eau distillée : 1 litre. pH=7,2

- **Milieu PCA (Plate Count Agar).**

Peptone : 5g, extrait de levure : 2,5g, glucose : 1g, agar : 15g, eau distillée : 1 litre. PH= 7

Tableau II: Gamme de concentrations réalisées pour la détermination de la CMI et CMB

Concentration (mg/ml)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1
Volume de l'extrait (ml)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1
Volume de Mueller Hinton en (ml)	4,7	4,6	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1	4	3,9
Concentration (mg/ml)	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2
Volume de l'extrait (ml)	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2
Volume de Mueller Hinton en (ml)	3,8	3,7	3,6	3,5	3,4	3,3	3,2	3,1	3

Tableau III : Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log UFC/ml) en culture pure et en présence d'extrait méthanolique de la variété *Bouricha*

Temps (heure)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Log UFC /ml de <i>S. aureus</i>	7,36	7,88	8,46	9,04	9,25	9,45	9,55	9,65	9,75	9,74	9,73	9,67	9,59
Log UFC /ml de <i>S. aureus</i> + extrait de la variété <i>Bouricha</i>	7,36	7,5	7,82	8,15	8,04	7,61	7,4	7,19	7,02	6,6	6,12	5,65	5,01

Tableaux IV(a) : Coefficients de corrélation

	Teneurs en polyphénols	Teneurs en odiphénols	Pouvoir réducteur	Activité scavenger de DPPH	Activité scavenger de ABTS	IC50 ABTS	Activité scavenger de H ₂ O ₂
Teneurs en polyphénols	1						
Teneurs en odiphénols	0,88	1					
Pouvoir réducteur	0,98	0,92	1				
Activité scavenger de DPPH	0,72	0,67	0,72	1			
Activité scavenger de ABTS	0,76	0,55	0,71	0,91	1		
Ec 50 ABTS	-0,77	-0,50	-0,72	-0,85	-0,95	1	
Activité scavenger de H ₂ O ₂	0,81	0,82	0,85	0,86	0,79	-0,73	1

Les valeurs en rouge indiquent une corrélation significative ($p < 0,05$).

Tableaux IV(b): Coefficients de corrélation

	Polyphénols HPLC	Polyphénols COL	<i>o</i> -diphénols	Hydroxyrosol	Tyrosol	Flavonoides	Lignanes	Dérivées d'oleuropeine	Dérivées de ligstroside
Polyphénols HPLC	1								
Polyphénols COL	0,95	1							
<i>o</i> -diphénols	0,75	0,88	1						
Hydroxyrosol	0,81	0,74	0,49	1					
Tyrosol	0,39	0,37	0,05	0,71	1				
Flavonoides	-0,28	-0,28	-0,21	-0,52	-0,57	1			
Lignanes	0,37	0,20	-0,03	0,22	0,26	-0,28	1		
Dérivées d'oleuropeine	0,95	0,91	0,79	0,80	0,37	-0,46	0,33	1	
Dérivées de ligstroside	0,97	0,98	0,82	0,78	0,37	0,28	0,19	0,93	1
Pouvoir réducteur	0,91	0,99	0,92	0,72	0,31	-0,29	0,15	0,92	0,95
Activité scavenger de DPPH	0,55	0,72	0,66	0,43	0,19	-0,10	-0,11	0,45	0,67
Activité scavenger de H2O2	0,66	0,82	0,82	0,49	0,15	-0,30	0,07	0,69	0,74
Activité scavenger de ABTS	0,67	0,77	0,55	0,50	0,33	-0,08	0,14	0,53	0,74

Les valeurs en rouge indiquent une corrélation significative ($p < 0,05$).

Tableaux IV(c): Coefficients de corrélation a une concentration de 1 mg/disque

	Polyphénols HPLC	Polyphénols COL	<i>o</i> -diphénols	Hydroxyrosol	Tyrosol	Flavonoïdes	Lignanes	Dérivées d'oleuropeïne	Dérivées de ligstroside
<i>S. aureus</i>	0,51	0,59	0,36	0,26	0,39	0,13	0,21	0,36	0,52
<i>B. subtilis</i>	0,75	0,81	0,70	0,38	0,14	0,06	-0,01	0,68	0,83
<i>K. pneumoniae</i>	0,61	0,54	0,14	0,61	0,66	-0,14	0,53	0,47	0,55
<i>L. innocua</i>	0,58	0,51	0,09	0,56	0,61	-0,12	0,54	0,45	0,53
<i>E. coli</i>	0,58	0,50	0,09	0,56	0,60	-0,11	0,54	0,45	0,52
<i>P. aeruginosa</i>	0,52	0,41	0,01	0,46	0,48	-0,06	0,53	0,41	0,45

Les valeurs en rouge indiquent une corrélation significative ($p < 0,05$)

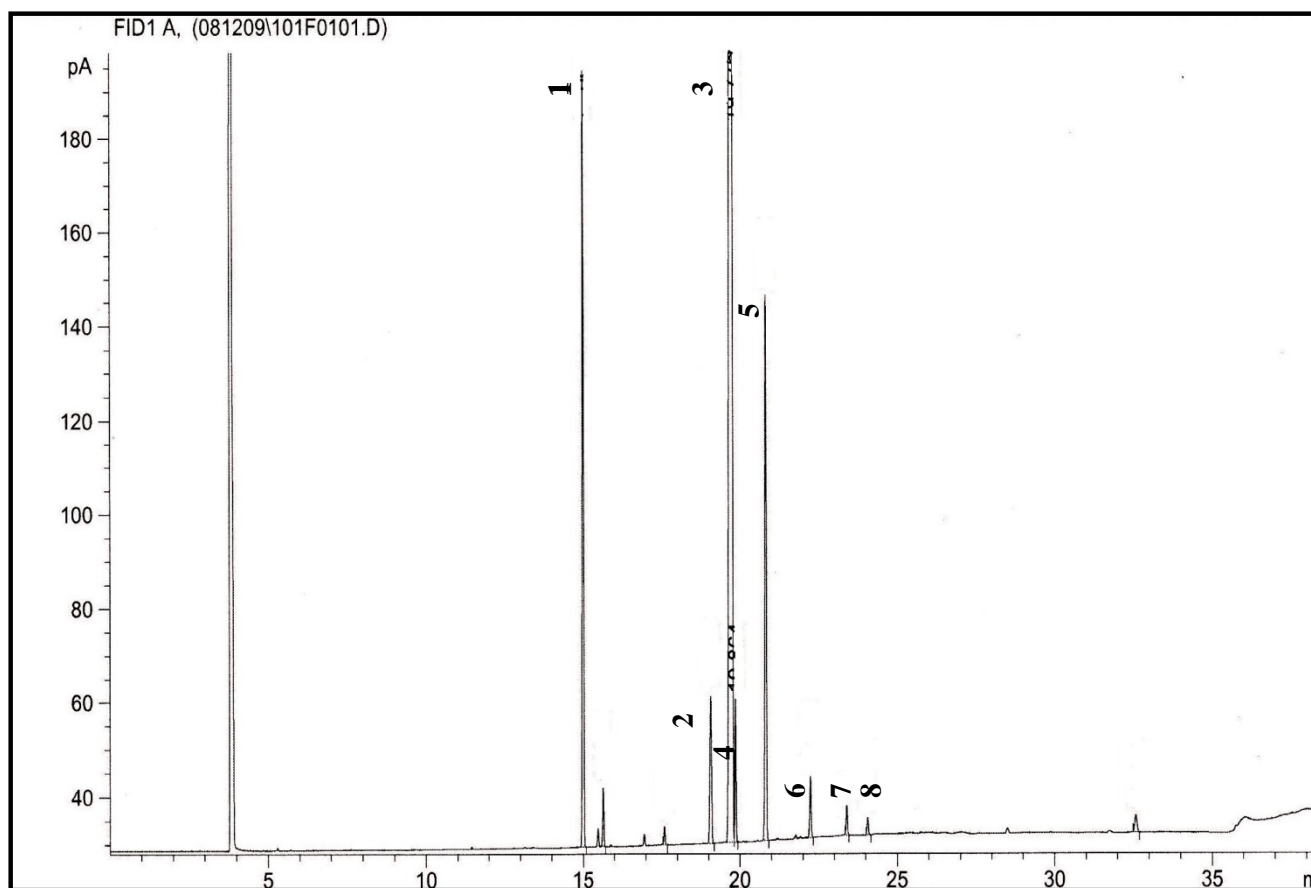


Figure 4 : Chromatogramme type des esters méthyliques des acides gras d'une huile d'olive

1 : acide palmitique ($C_{16} :0$), **3 :** acide stéarique ($C_{18} :0$), **4 :** acide oléique ($C_{18} :1$ [n-9]), **5 :** acide oléique ($C_{18} :1$ [n-7]), **6 :** acide linoléique ($C_{18} :2$), **7 :** acide linoléique ($C_{18} :3$), **8 :** acide arachidique ($C_{20} :0$), **9 :** acide gadoléique ($C_{20} :1$).

Résumé

La présente étude porte sur la caractérisation des huiles d'olive issues de variétés algériennes, et l'évaluation de l'activité biologique des extraits phénoliques, à savoir l'activité antibactérienne et antioxydante. Les huiles de onze variétés « *Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* et *Tabelout* » ont été utilisées dans notre expérimentation. L'évaluation des indices de qualité nous permet de classer les huiles issues de ces variétés dans la catégorie « extra-vierge ». L'acide oléique est l'acide gras dominant de la composition des huiles étudiées, la variété *Bouchouk Soummam* enregistre le pourcentage le plus élevé (73,11%). des variations cultivar-dépendantes en profils d'acide gras, teneurs en polyphénols totaux et les *ortho*-diphénols sont relevées. la variété *Neb Djemel* se distingue par les teneurs les plus élevées en polyphénols et *ortho*-diphénols suivie des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*. L'analyse par HPLC de la composition en polyphénols des échantillons huiles d'olive nous révèle une composition qualitative similaire en composés phénoliques individuels, mais différente d'un point de vue quantitatif, ce qui nous a permis de faire une distinction variétale. La variété *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, refermant les taux les plus élevés en hydroxytyrosol, se montrent très performantes avec de bonne activité réductrice, les meilleurs pouvoir antiradicalaire (DPPH, ABTS⁺) des extraits phénoliques et la plus faible IC₅₀ du radical ABTS⁺. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive révèle que les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* sont les plus actives sur toutes les souches bactériennes testées. Les extraits des huiles étudiées présentent une activité antibactérienne, particulièrement intéressante contre *S.aureus* et *B. subtilis* avec les zones d'inhibitions les plus élevées et des (CMI) et (CMB) les plus faibles. Le résultat du suivi de la croissance de *S. aureus* en présence de 6,25 mg/ml d'extrait de la variété *Bouricha* a montré une inhibition remarquable de cette souche. Les résultats de cette étude montrent que les extraits des huiles d'olive extra vierge constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité biologique, ce qui confirme l'intérêt de la consommation des huiles d'olive des variétés algériennes, dans la lutte contre le stress oxydant et les maladies infectieuses.

Mots clés : Variété, huile d'olive, polyphénols, HPLC, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

This study aims to characterize several varieties of Algerian olive oil, the biological activity of their phenolic extracts has been evaluated ie: antibacterial and antioxidant activity. Eleven olive oil varieties « *Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* and *Tabelout* » have been used in our investigations. The evaluation of the quality index of these oil varieties allows classifying them as extra virgin olive oil. The oleic acid is the dominant fatty acid; *Bouchouk Soummam* variety is distinguished by the highest level (73,11%). Cultivar-dependent variations in fatty acids profiles, levels of antioxidant substances (total polyphenols and *orthodiphenol*) are noticed. *Neb Djemel* variety is distinguished by the highest levels in polyphenols and *ortho*-diphenols followed by *Bouricha* and *Blanquette de Guelma*. The analysis of the methanolic extract of oil samples by HPLC reveals a similar qualitative composition of individual phenolic component but a different quantitative composition which allowed to establish a varietal distinction. *Bouricha* and *Blanquette de Guelma* varieties which contain the highest amount of hydroxytyrosol are very efficient with the best reducing power and antiradical (DPPH, ABTS⁺) activities and a least IC₅₀ of ABTS⁺ radical. The methanolic extract of *Bouricha* and *Blanquette de Guelma* showed the best antibacterial activities on all bacterial strains used. The oil extracts used in our study exhibit an interesting antibacterial activity against *S.aureus* and *B. subtilis*. The follow-up study of *S. aureus* growth in mixed culture with 6.25 mg/ml of *Bouricha* methanolic extract showed a noticeable inhibition of *S. aureus*. Results of this study show extra virgin olive oils extracts are a good source of several phenolic components endowed with biological activities which confirms interest in the consumption of Algerian varieties olive oil to fight oxidative stress and infection diseases.

Key words: Varieties, olive oil, phenolic compounds, HPLC, antibacterial activity, antioxidant activity.

ملخص:

ان هذه الدراسة تخص معايير النوعية و التركيب الكمي من حيث الأحماض الدسمة وكذلك تقييم الأنشطة البيولوجية للمستخلصات البوليفينولية لمختلف أنواع الزيتون الجزائري ومن بين هذه الأنشطة، تقييم القدرة ضد الأكسدة و ضد البكتيريا. إستعملنا في تجاربنا احد عشر نوعا «اغفاس، اكرمة، بلونكات قالمه، بوشوك صومام، بوريشة، شمال، شمال تازمالت، فركاني، ليملي، نب جمل وطابلوط»، نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية تسمح بتصنيف عينات الزيوت في قسم زيت الزيتون البكر الممتاز. حمض الأوليك هو الحمض الدهني السائد، اكبر نسبة سجلت عند نوع بوشوك صومام مما يسمح لنا ان نستنتج تاثير نوع الزيت على تركيبة الاحماض الدهنية. تقييم المركبات المضادة للاكسدة في العينات المدروسة من حيث البوليفينول والارثوديفينول يظهران كميتهما مرتبط بنوع الزيت. نوع نب جمل يسجل أعلى نسبة من البوليفينول و ارثوديفينول يتبع بنوع بوريشة و بلونكات قالمه تحاليل المستخلصات الميثانولية لمختلف عينات الزيوت ب HPLC يظهر نفس التركيبة النوعية من حيث مركبات الفينول لكنها مختلفة من حيث الكمية مما يسمح لنا التمييز بينانواع الزيوت المدروسة. النوعين بوريشة و بلونكات قالمه اللتان تحتويان على اعلى نسبة من الهيدروكسيتيروزل مما يعطي لها اكبر قدرة للإرجاع، اكبر قدرة مضادة للجذور (DPPH و ABTS)، اضعف تركيز IC₅₀ للتثبيت جذر ABTS و قدرة أكبر على تثبيط بيروكسيد الهيدروجين. تقييم النشاط ضد البيكتيرية للمستخلصات الميثانولية تظهر نشاط كبير عند مستخلصات بوريشة و بلونكات قالمه وبالخصوص ضد *S.aureus* و *B.subtilis* مع منطقة تثبيط كبيرة و CMI و CMB صغيرة. اتباع نمو *S.aureus* في وجود 6,25 ملغ / مل لمستخلص بوريشة تظهر فعاليتها الهامة لكبح نمو هذه البيكتيريا. نتائج هذه الدراسة تبين ان المستخلصات الميثانولية لزيت الزيتون البكر الممتاز يعتبر مصدرا لمختلف المركبات الفينولية التي تمتلك الأنشطة البيولوجية مما يؤكد منفعة استهلاك زيت الزيتون الجزائري لمكافحة الامراض الناتجة عن الأكسدة و البكتيريا الممرضة.

مفتاح الكلمات : النوع، المركبات البوليفينولية، زيت الزيتون، HPLC، القدرة المضادة للأكسدة و البكتيريا.