



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA-BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires

# Mémoire

Présenté par :

M<sup>elle</sup> **BEDJAOUI** Kenza

Pour l'obtention du diplôme de Magister

**Filière:** Sciences Alimentaires

**Option:** Alimentation et Technologie Alimentaire

## Thème

Etude de l'activité antibactérienne *in vitro*  
des extraits phénoliques des olives  
fraîches et confites

Soutenu le: Juin 2015

Devant le jury composé de:

M <sup>r</sup> <b>ATMANI</b> Djebbar.	Professeur	Univ.de BEJAIA	Président
M <sup>r</sup> <b>TAMENDJARI</b> Abderezak.	Professeur	Univ.de BEJAIA	Rapporteur
M <sup>me</sup> <b>BEDJOU</b> Fatiha.	Professeur	Univ.de BEJAIA	Examineur
M <sup>r</sup> <b>KECHA</b> Mouloud.	Professeur	Univ.de BEJAIA	Examineur

*Année Universitaire: 2014-2015*



## Remerciements

*En premier lieu, je tiens à remercier le Bon Dieu tout puissant de m'avoir accordé le courage, la patience et la santé pour réaliser ce travail.*

*Au terme de ce travail je tiens particulièrement à exprimer mes vifs remerciements et mes sincères gratitude à mon promoteur M<sup>R</sup>. TAMANDJARI .A qui m'a accordé une opportunité d'acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine de la microbiologie en proposant ce thème. Je tiens à lui remercier également pour sa directive précieuse, conseils, et son suivi scientifique, « Merci M<sup>R</sup>. TAMANDJARI de m'avoir fait bénéficier de votre expérience avec beaucoup de patience ».*

*Je tiens à remercier vivement M<sup>me</sup> TAMANDJARI .S qui à remplis son rôle comme co-promotrice, pour ces conseils, son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail.*

*J'exprime mes sincères gratitude, à Mr. le Professeur ATMANI.D pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail. J'adresse mes remerciements à l'égard de M<sup>me</sup>. le Professeur BEDJOU.F et Mr. le Professeur KECHA.M qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je suis également très reconnaissant à M<sup>lle</sup> LAINCER .F et M<sup>lle</sup> DJENADI.K qui m'ont énormément aidé avec leur conseil et leur expérience dans le domaine de la microbiologie.*

*Je voudrais exprimer ma gratitude à 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 tout le personnel de l'I.T.A.F.V. Je voudrais également exprimer ma gratitude à tout le personnel des usines DES FRERES AIT AABASS et KHOUDJA qui nous ont fournis des échantillons commerciaux.*

*J'associe mes remerciements aux membres du laboratoire de Biochimie appliquée, M<sup>lle</sup> MEDJEKOUH .L, M<sup>lle</sup> BOUAROU DJ .K, M<sup>lle</sup> Boucheffa .S ainsi qu'aux techniciens et ingénieurs des laboratoires de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mr BOUCHENOI et M<sup>me</sup>. KHERBACHI. N.*

## *Dédicaces*

*A l'aide de DIEU, le tout puissant  
ce travail est achevé, je le dédie à tous ceux qui me  
sont très chers A mes parents, ceux qui j'ai tant aimé  
avec beaucoup d'affection et que jamais je ne saurais  
m'exprimé quant à l'éducation qu'ils m'ont prodigué.*

*A mes frères Yanis et Abderezak,*

*A mes adorables sœurs : Amina, Asma, Siham et Thiziri.*

*A vous, dont le cœur est plein d'amour et d'amitié :*

*Assia, Lynda, Nabila, Siham, Wassila, Dehya, Lili*



*Kenza*

**Liste des abréviations**

*A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*.

*B. subtilis*: *Bacillus subtilis*.

**CMB** : Concentration minimale bactericide.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**COI** : Conseil oléicole international.

**COL** : Colorimétriques.

**DNS** : dinitosalicylique.

**E.A.C** : Equivalent en acide caféique.

**E.A.G** : Equivalent en acide gallique.

*E.coli* : *Escherichia coli*.

**HPLC** : High-performance liquid chromatography.

**I.T.A.F.V** : Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne.

*K.pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*.

**LAB** : Bactérie Lactique .

*L. innocua*: *Listeria innocua*.

**LPS**: Lipopolysaccharide.

**MS** : Matière sèche.

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*.

**p-HPEA** : Tyrosol.

**p-HPEA-EA** : Ligstroside aglycone.

**p-HPEA-EDA** : Décarboxyméthyl ligstroside aglycon.

**rpm** : Rotation par minute

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline.

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*.

**UFC** : Unités Formant Colonies.

**3,4-DHPEA** : Hydroxytyrosol.

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

*Liste des figures*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Composition physique de l'olive.	<b>3</b>
<b>02</b>	Localisation des différents constituants d'olive.	<b>4</b>
<b>03</b>	Rôles physiologiques et biologiques des polyphénols.	<b>13</b>
<b>04</b>	Classification des olives de table selon les préparations commerciales.	<b>17</b>
<b>05</b>	Etapas de traitement des olives selon le style espagnol.	<b>18</b>
<b>06</b>	Mécanisme de décomposition chimique et enzymatique de l'oleuropéine.	<b>20</b>
<b>07</b>	Teneur en eau des échantillons d'olive.	<b>36</b>
<b>08</b>	Teneur en sucres réducteurs des échantillons d'olive.	<b>37</b>
<b>09</b>	Teneur en polyphénols totaux des échantillons d'olive.	<b>39</b>
<b>10</b>	Teneur en <i>ortho</i> -diphénols des échantillons d'olive.	<b>40</b>
<b>11</b>	Quotients <i>ortho</i> -diphénols/ polyphénols totaux des échantillons d'olive.	<b>42</b>
<b>12</b>	Teneurs en flavonoïdes des échantillons d'olive.	<b>43</b>
<b>13</b>	Quotients flavonoïdes / polyphénols totaux des échantillons d'olive.	<b>44</b>
<b>14</b>	Activité des extraits vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .	<b>50</b>
<b>15</b>	Activité des extraits vis-à-vis de <i>B. subtilis</i> .	<b>51</b>

**Liste des figures en annexes**

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>
<b>01</b>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.
<b>02</b>	Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques, <i>ortho</i> -diphénols et flavonoïdes.

**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Composition chimique d'olive verte.	<b>4</b>
<b>II</b>	Structures chimiques des secoiridoïdes présents dans l'olive.	<b>6</b>
<b>III</b>	Structures chimiques des acides phénoliques présents dans l'olive.	<b>7</b>
<b>IV</b>	Structures chimiques des alcools phénoliques présents dans l'olive.	<b>8</b>
<b>V</b>	Structures chimiques des flavonoïdes présents dans l'olive.	<b>9</b>
<b>VI</b>	Structures chimiques des lignanes présents dans l'olive.	<b>9</b>
<b>VII</b>	Récapitulatif des principaux microorganismes constituant la flore microbienne des olives vertes.	<b>10</b>
<b>VIII</b>	Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.	<b>15</b>
<b>IX</b>	Quelques polyphénols dégradés par les souches de <i>L.plantarum</i> .	<b>26</b>
<b>X</b>	Régions d'origine et phénotypes multi-caractères des variétés d'olivier étudiées	<b>28</b>
<b>XI</b>	Souches microbiennes testées et leur pathogénicité.	<b>32</b>
<b>XII</b>	Composition en polyphénols des olives fraîches et confites.	<b>46</b>
<b>XIII</b>	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne des extraits méthanoliques d'olives exprimés en millimètre.	<b>49</b>
<b>XIV</b>	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits méthanoliques des différentes variétés d'olive avant et après élaboration.	<b>55</b>

**Tableaux en annexe**

Tableau I : Composition des milieux de culture.

Tableau II: Gamme de concentration réalisée pour la détermination des CMI.

Tableau III : Coefficients de corrélation des diamètres d'inhibitions et les composés phénoliques.

Tableau IV : Rapports CMB/CMI des échantillons d'olive.

## *Sommaire*

*Introduction* ..... 1

### *Synthèse bibliographique*

#### *Chapitre I : Généralités sur l'olive*

I.1. Taxonomie et origine génétique de l'olivier..... 3

I.2. Fructification de l'olivier ..... 3

I.3. Composition de l'olive verte..... 4

I.3.1. Composition chimique de l'olive verte..... 4

I.3.1.1. Composés phénoliques ..... 4

I.3.1.1.1. Sécoïridoïdes ..... 5

I.3.1.1.2. Acides phénoliques..... 6

I.3.1.1.3. Alcools phénoliques..... 7

I.3.1.1.4. Flavonoïdes ..... 8

I.3.1.1.5. Lignanes..... 9

I.3.2. Composition microbiologique des olives ..... 10

I.4. Facteurs déterminant la composition en polyphénols des olives..... 11

I.4.1. Variabilité génétique entre les cultivars..... 11

I.4.2. Facteurs agronomiques et environnementaux..... 11

I.4.3. Disponibilité en eau ..... 12

I.4.4. Indice de maturité des fruits d'olive ..... 12

I.4.5. Etat sanitaire des drupes..... 12

I.4.6. Conditions de stockage des olives..... 13

I.5. Rôle biologique des polyphénols..... 13

#### *Chapitre II : Technologie d'élaboration des olives de table vertes*

II.1. Définition de l'olive de table..... 16

II.2. Classification des olives de table ..... 16

II.3. Confiserie des olives de table ..... 16

II.3.1. Olives vertes confites. .... 17

II.3.2. Olives noircies par oxydation.....	17
II.3.3. Olives noires naturelles.....	18
II.4. Technologie d'élaboration des olives vertes au style espagnole.....	18
II.4.1. Cueillette des olives.....	18
II.4.2 Transport et stockage .....	19
II.4.3. Triage et calibrage.....	19
II.4.4. Désamérisation.....	19
II.4.5. Lavage.....	20
II.4.6. Saumurage et fermentation.....	21
II.4.7. Conditionnement.....	24
II.5. Influence du procédé espagnol sur la composition phénolique des olives.....	25

***Partie expérimentale***

***Chapitre I : Matériel et méthodes***

I.1. Matériel végétal.....	27
I.2. Echantillonnage et élaboration des olives vertes.....	27
I.3.1.1. Teneur en eau des olives .....	29
I.3.1.2. Dosage des sucres réducteurs.....	29
I.3.1.3. Extraction et dosage des polyphénols totaux.....	30
I.3.1.4. Dosage des <i>ortho</i> -diphénols.....	30
I.3.1.5. Dosage des flavonoïdes.....	31
I.3.1.6. Détermination des phénols des olives par HPLC.....	31
I.3.2.1. Souches microbiennes testées.....	32
I.3.2. 2. Test de sensibilité aux extraits d'olives.....	33
I.3.2.3. Détermination des CMI et CMB sur milieu solide.....	34
I.4. Etude statistique .....	35

***Chapitre II : Résultats et discussion***

II.1.1. Teneurs en eau .....	36
II.1.2. Teneur en sucres réducteurs.....	37

## *Sommaire*

---

II.1.3. Teneurs en polyphénols totaux.....	38
II.1.4. Teneurs en <i>ortho</i> -diphénols.....	40
II.1.5. Teneur en flavonoïdes.....	42
II.1.6. Identification des composés phénoliques par HPLC.....	45
II.2.1. Résultats de l'activité antimicrobienne testée par la méthode de diffusion ....	48
II.2.2. Détermination des CMI et CMB sur milieu solide.....	54
<i>Conclusion</i> .....	59
Références bibliographiques.....	61

*Annexes*

# *Introduction*

## **Introduction**

L'olive de table représente depuis des siècles une source typique de lipide de régime méditerranéen. La production moyenne mondiale d'olives de table pour les six dernières campagnes (2008/2009-2013/2014) a atteint 2.42 millions de tonnes, dont plus de 98% de cette production se trouve localisée dans le Bassin Méditerranéen. L'Algérie représente l'un des principaux producteurs de cette denrée alimentaire avec une production moyenne estimée à 159.200 tonnes pour la même période, ce qui représente 6,6 % de la production mondiale (COI, 2014). Les plus importantes préparations commerciales sont les olives vertes confites (style espagnol), les olives noires au naturel (style grec) et les olives tournantes noircies par oxydation (style californien) (Ozdemir *et al.*, 1997; Panagou *et al.*, 2008). De nos jours, l'olive verte monopolise le marché mondial des olives de table, avec plus de 60% de la production (COI, 2014).

Les composés les plus abondants dans les olives de table sont l'eau, les lipides dans une moindre proportion. Les olives de table apportent aussi des fibres, des vitamines et des minéraux. Les effets bénéfiques du point de vue nutritionnel sont associés à leur composition en acides gras mono-insaturés (De Faveri *et al.*, 2008) et/ou à la présence des biomolécules notamment les composés phénoliques. Une attention particulière est accordée aux composés phénoliques en raison de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes vis-à-vis d'une large gamme de souches responsables de maladies infectieuses et de désordres intestinaux (Sandhar *et al.*, 2011).

Au cours de l'élaboration des olives de table selon le style espagnol qui comprend : une désamerisation, des lavages et une fermentation lactique, il se produit en plus de nombreuses réactions chimiques, une diffusion des phénols vers l'eau ou la saumure. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'élaboration engendre des pertes considérables en composés phénoliques (Ben Othman *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2006), corrélées pour longtemps à une réduction de la valeur biologique de cet aliment. Cette notion étant controversée par des travaux de recherches qui stipulent une augmentation de l'activité antioxydante après élaboration des olives (Parinos *et al.*, 2007), ce qui laisse des interrogations sur l'influence de l'élaboration sur l'efficacité antimicrobienne des olives de table. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des olives fraîches et confites de quelques variétés locales et étrangères vis-à-vis de 8 souches bactériennes pathogènes, en réponse aux exigences relatives à la mise en

évidence de nouvelles sources naturelles bioactives permettant de lutter contre le phénomène de multirésistance des souches bactériennes.

Outre l'étude de l'activité antibactérienne, cette présente étude a pour objectif d'évaluer l'impact du procédé d'élaboration sur les différents composés phénoliques.

Cette présente étude est subdivisée en deux parties :

- ✓ Une revue bibliographique aborde des généralités décrivant l'olive et l'olivier dans leur contexte botanique, composition phénolique, activité antimicrobienne, avant de terminer par les différents modes d'élaboration des olives de table.
- ✓ Une étude expérimentale est réservée en premier temps à la présentation de l'ensemble des méthodes analytiques mises en œuvre pour la détermination de la composition chimique des olives (teneurs en sucres réducteurs, composés phénoliques et leur profil), ainsi que pour l'évaluation de l'activité antibactérienne à l'égard de 8 souches bactériennes. En dernier temps, une partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur discussion.

# *Synthèse bibliographique*

# *Chapitre I : Généralités sur l'olive*



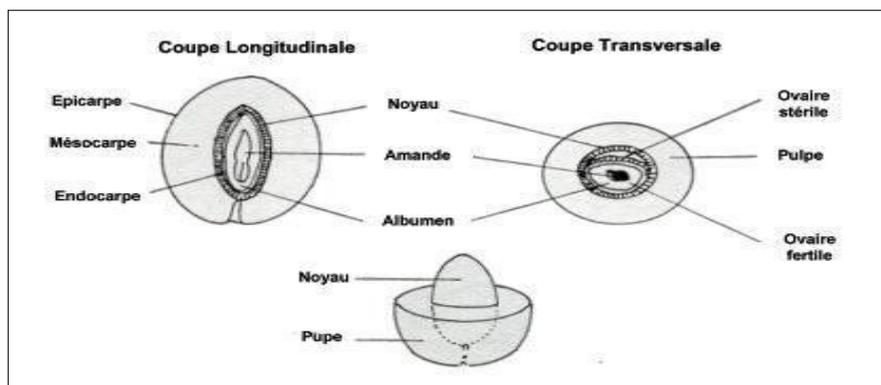
### I.1. Taxonomie et origine génétique de l'olivier

L'olivier appartient à la famille des *Oleaceae* dont le patrimoine variétal comprend plus de 3000 cultivars ayant une diversité phénotypique et génétique importante (Cimato *et al.*, 1997). L'étude de la diversité moléculaire des cultivars révèle que ces derniers s'apparentent aux oléastres (Besnard *et al.*, 2001). L'olivier et l'oléastre, représentent un très bon exemple de biodiversité, on distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé (*Olea europaea sativa*) et l'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*) (Ellstrand, 2003). L'espèce *Olea europaea* L. a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. La classification d'olivier est représentée comme suit:

- ✓ Règne: *Plantae*.
- ✓ Division: *Magnoliophyta*.
- ✓ Classe: *Magnoliopsida*.
- ✓ Ordre: *Scrophulariales*.
- ✓ Famille: *Oleaceae*.
- ✓ Genre: *Olea*.
- ✓ Espèce: *Olea europaea*.

### I.2. Fructification de l'olivier

Le fruit de l'olivier est une drupe à peau lisse, de forme ovoïde ou ellipsoïde. Il est constitué d'épicarpe (la pellicule qui recouvre le fruit), de mésocarpe (la partie charnue appelée pulpe) et d'endocarpe (le noyau fusiforme) constitué d'une amande ayant une texture rigide, protégeant une seule graine à albumen huileux cellulaire (figure 01). La forme de l'olive est variable et caractéristique de la variété. Au cours de la maturation du fruit, le mésocarpe de couleur d'abord verte (olive verte), vire au bleu violacé (olive tournante) et au noire à maturité complète (Bianchi, 1999).

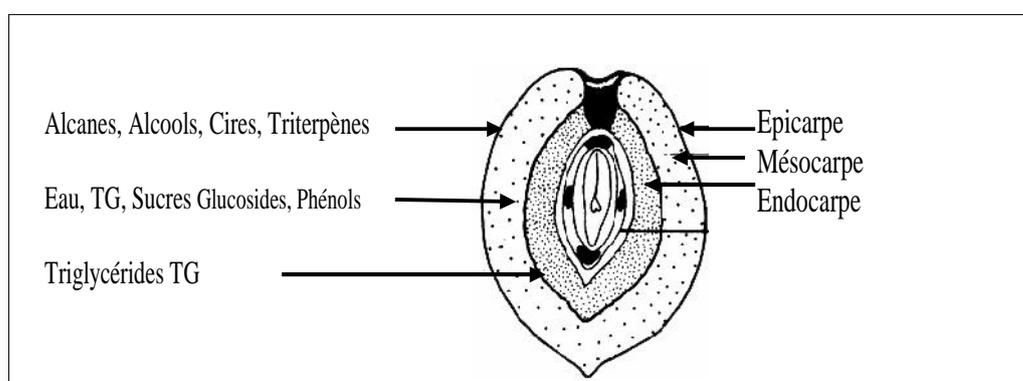


**Figure 01:** Composition physique de l'olive (Amouretti et Comet, 2000).

### I.3. Composition de l'olive verte

#### I.3.1. Composition chimique de l'olive verte

A l'égal de tous les fruits, l'olive contient un grand nombre de composés structurellement hétérogènes (Tableau I), dont les principaux sont l'eau, les polysaccharides, triacylglycérols et en moindre quantité les acides gras libres, les mono et diacylglycérols (Servili *et al.*, 2004). Outre sa richesse en lipides, l'olive contient près de 250 composés mineurs qui lui confèrent ses qualités organoleptiques et nutritionnelles (Servili *et al.*, 2004; Covas *et al.*, 2006). La localisation de ces différents constituants est montrée dans la figure 02.



**Figure 02:** Localisation des différents constituants d'olive (Bianchi, 1999).

**Tableau I:** Composition chimique d'olive verte (Bianchi, 1999; Boudhrioua *et al.*, 2009).

Composé	Teneur (%)
Eau	47
Polysaccharides <sup>a</sup>	26
Huiles	21
Mono- et disaccharides	3
Cires, triterpènes, phénols	2
Autres composés <sup>b</sup>	Traces

<sup>a</sup>: hémicellulose, cellulose, pectines; <sup>b</sup>: alcanes, alkyl-esters, methyl-phenyl-esters, sterylestes, aldéhydes, alcools, stérols, triterpénoïdes polycycliques et acides gras à très longue chaîne carbonée.

##### I.3.1.1. Composés phénoliques

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (Gee et Johnson, 2001). Ils sont cités parmi les composés les plus importants dans les métabolites secondaires rencontrés dans la nature. Ces composés sont responsables des propriétés organoleptiques chez la majorité des végétaux, en

plus de la diversité bénéfique de leurs effets biologiques (Dacosta, 2003). Actuellement, plus de 8000 structures de polyphénols sont connues, l'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique substitué au moins par un hydroxyle et des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (Bruneton, 1999).

L'olive renferme particulièrement une quantité assez remarquable en composés phénoliques appartenant à plusieurs classes (Bendini *et al.*, 2007). Leur teneur varie de 1 à 10 g/kg (Léger, 1999), dont les polyphénols complexes représentent 90% (Tasioula-Margari et Okogeri, 2001). La famille des secoiridoïdes est la principale fraction phénolique caractérisant les plantes oléacées (Bendini *et al.*, 2007), tandis que les acides phénoliques, les alcools phénoliques et les flavonoïdes sous leur forme glucosidique constituent la fraction mineure des composés phénoliques de l'olive verte (Servili *et al.*, 2004).

#### I.3.1.1.1. Sécoiridoïdes

Les sécoiridoïdes phénoliques ou phénols complexes sont principalement constitués de l'oleuropéine et du ligstroside, ainsi que de leurs dérivés aglycones, décarboxyméthylés et aldéhydiques. L'oleuropéine et le ligstroside sont des esters formés à partir de deux alcools, respectivement l'hydroxytyrosol et le tyrosol, et de l'acide élénolique. L'oleuropéine et le ligstroside sont les composés prépondérants des polyphénols de l'olive, ils peuvent atteindre 2% du poids frais. La fraction phénolique des olives de table dérive principalement de l'hydrolyse de ces deux composés (Covas, 2006).

Mise à part leur propriété biologique, ces deux composés contribuent aux propriétés organoleptiques des olives qualifiées d'être amères, piquantes (Cerretani *et al.*, 2008; Esti *et al.*, 2009) et astringentes (Morales et Tsimidou, 2000). Des études antérieures indiquent que l'intensité d'amertume des olives est fortement reliée à la présence des formes dialdéhydiques et aldéhydiques de l'oleuropéine aglycone et du ligstroside (Gutierrez-Rosales *et al.*, 2003). Le deacetoxy-ligstroside aglycone est responsable de la sensation piquante, alors que le deacetoxy-oleuropéine aglycone occasionne une sensation piquante très faible (Andrewes *et al.*, 2003). Les structures chimiques des principaux secoiridoïdes retrouvés dans l'olive sont présentées dans le tableau II.

**Tableau II :** Structures chimiques des secoiridoïdes présents dans l'olive (Hrncirik et Fritsche, 2004; Bendini *et al.*, 2007).

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

### I.3.1.1.2. Acides phénoliques

Premier groupe de composés phénoliques décrit dans l'olive (Servili *et al.*, 2004; Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006), présent en faible quantité (Gomez-Alonso *et al.*, 2002). Les acides phénoliques sont subdivisés en deux sous-groupes notamment les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.

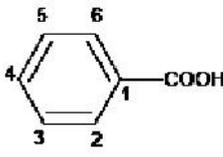
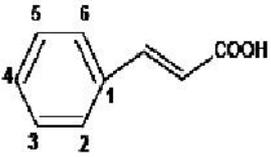
- *Acides hydroxybenzoïques*

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Obied *et al.*, 2012). L'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine contrairement à ceux d'acides hydroxycinnamiques (Macheix *et al.*, 2006). Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants dont l'olive sont les acides benzoïque, *p*-hydroxybenzoïque (Kountouri *et al.*, 2007), vanillique, protocatechique, syringique et gallique (Ben Othman *et al.*, 2009).

- *Acides hydroxycinnamiques*

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base est de type (C6-C3), dérive de celle de l'acide cinnamique (Obied *et al.*, 2012). Ces composés existent souvent sous forme conjugués avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Ajila et Brar, 2012). Les principaux acides hydroxycinnamiques identifiés dans l'olive incluent les acides cinnamique (Boskou *et al.*, 2006), *p*-coumarique, *o*-coumarique (Ucella, 2001), caféique, férulique (Chanchal et Swarnlata, 2009), chlorogénique et sinapique (Ramírez- Tortosa *et al.*, 2006). Les structures chimiques des différents acides phénoliques présents dans l'olive sont répertoriées dans le tableau III.

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

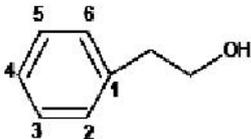
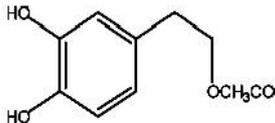
Composé	Substituant	Structure
<i>Dérivés hydrobenzoïque</i>		
Acide benzoïque	3-OH	
<i>p</i> -acide hydroxybenzoïque	4-OH	
Acide protocatéchique	3,4-OH	
Acide gallique	3,4,5-OH	
Acide vanillique	3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	
Acide syringique	3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	
<i>Dérivées hydroxycinnamique</i>		
Acide <i>p</i> -coumarique	4-OH	
Acide caféique	2-OH	
Acide férulique	3,4-OH	
Acide sinapique	3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	
	3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	

### I.3.1.1.3. Alcools phénoliques

L'hydroxytyrosol « (3,4-dihydroxyphenyl)-éthanol ou (3,4-DHPEA) » et le tyrosol « (*p*-hydroxyphenyl)-éthanol ou (*p*-HPEA) » (tableau IV) sont les principaux alcools phénoliques présents dans l'olive (Pereira *et al.*, 2006). Leurs teneurs sont généralement faibles dans l'olive fraîche (Servili et Montedoro, 2002). Toutefois, ces teneurs augmentent

graduellement au cours du procédé d'élaboration suite à la libération des molécules d'hydroxytyrosol et du tyrosol des secoiridoïdes (Servili *et al.*, 2004). D'autres travaux ont révélé la présence d'autres alcools phénoliques, caractérisés par la présence d'hydroxytyrosol et du tyrosol dans leur structure notamment les acétates de tyrosol et d'hydroxytyrosol (Romero *et al.*, 2004), l'hydroxytyrosol-4' -O-glucoside et le (4- -D glucosyl-3-hydroxyphényl)-éthanol (Arroyo-L pez *et al.*, 2009).

**Tableau IV:** Structures chimiques des alcools phénoliques présents dans l'olive  
(Bendini *et al.*, 2007).

Composé	Substituant	Structure
Tyrosol	4-OH	
Hydroxytyrosol	3,4-OH	
Hydroxytyrosol acétate ou 4-(acétoxyéthyl)-1,2dihydroxybenzène		

#### I.3.1.1.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques, avec plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Knežević *et al.*, 2012). Ces composés représentent un groupe de polyphénols avec un squelette de base à quinze atomes de carbones, dont la structure est disposée sous la configuration C6-C3-C6 (Bruneton, 1999). Ils sont composés de deux noyaux aromatiques liés par un hétérocycle oxygéné (Ignat *et al.*, 2011), une substitution dans cet hétérocycle différencie les principales classes de flavonoïdes : les flavones, flavonols, flavanes, flavanones, isoflavones, flavanonol et les anthocyanidines (Apak *et al.*, 2007). La lutéoline et l'apigénine sont les flavones dominants dans l'olive. Ce sont des dérivées de 7-glucoside lutéoline et apigénine glucoside (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Bendini *et al.*, 2007) rajoutant la quercétine et la rutine qui sont omniprésents (Maestro-Durán *et al.*, 1994). Le tableau V illustre les différentes structures appartenant aux flavonoïdes retrouvés dans l'olive.

**Tableau V :** Structures chimiques des flavonoïdes présents dans l'olive  
(Malheiro *et al.*, 2011).

Composé	Substituant	Structure
<i>Flavones</i>		
Apigénine	R <sub>1</sub> -OH, R <sub>2</sub> -H	
Lutéoline	R <sub>1</sub> -OH, R <sub>2</sub> -OH	
<i>Flavanonol</i>		
Quercétine	<sup>1</sup> R-OH, <sup>2</sup> R-OH, <sup>3</sup> R-H	

### I.3.1.1.5. Lignanes

Les lignanes est 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). Ils sont présents dans la matrice végétale sous forme libres et glycosylée (Cai *et al.*, 2004). Oliveras Lopez *et al.* (2008) et Owen *et al.* (2000) ont identifié (+)-1-acétoxypinosésinol, composé majeur des lignanes présents dans l'olive. De plus, Romero *et al.* (2004) ont rapporté la présence du (+)- pinosésinol (tableau VI). Selon Brenes *et al.* (2000), l'hydrolyse des composés similaires aux lignanes liés aux glucosides secoiridoïdes sont à l'origine de ces deux composés phénoliques.

**Tableau VI:** Structures chimiques des lignanes présents dans l'olive  
(Bendini *et al.*, 2007).

Composé	Substituant	Structure
(+)-Pinosésinol	R-H	
(+)-1-acétoxypinosésinol	R-OCOCH <sub>3</sub>	

### I.3.2. Composition microbiologique des olives

Les olives représentent un milieu favorable pour la prolifération d'une flore microbienne diverse (tableau VII) favorisant leur fermentation spontanée. Selon Kotzekidou, (1997) et Alves *et al.* (2012), cette flore est constituée principalement de bactéries Gram négatif, de bactéries lactiques et de levures. En effet, les microorganismes isolés à partir des olives vertes commercialisées sous forme saumurées appartiennent pour la plupart d'entre eux aux bactéries lactiques et aux levures. L'étude taxonomique des mêmes auteurs a prouvé que plusieurs espèces de levures sont présentes durant le temps de fermentation. Alors que les bactéries lactiques constituées principalement de lactobacillus se développent pendant la première et/ou la dernière phase de fermentation (De Castro *et al.*, 2002; Randazzo *et al.*, 2012). Les aérobies mésophiles générateurs de spores tels que les Bacillus et Clostridium, considérés comme des contaminants du produit lors de sa manipulation, ont aussi été isolés à partir de quelques échantillons (I pez-I pez *et al.*, 2004). Cependant, des études réalisées sur des échantillons d'olives vertes fermentées selon les techniques artisanales et industrielles, ont rapporté la présence d'autres microorganismes responsables d'une fermentation indésirable avec la production de gaz, à savoir Enterobacter, Pseudomonas (De Castro *et al.*, 2002; Tassou *et al.*, 2010), Aspergillus, Penicillium, Fusarium qui modifient l'aspect et la qualité organoleptique des olives (Guiraud, 1998).

**Tableau VII :** Récapitulatif des principaux microorganismes constituant la flore microbienne des olives vertes.

Microorganisme	Nature de l'olive	Référence
<i>Leuconostoc citreum</i>	Olive verte fraîche (cv. Nocellara Etnea)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012
<i>Pediococcus parvulus</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese) (cv. Alorena)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012 Abrilouel <i>et al.</i> , 2012
<i>Lactobacillus bravis</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012
<i>L. coryniformis</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese) Olive confite* (cv. Nocellara de Belice)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012 Aponte <i>et al.</i> , 2012
<i>L. paracasei</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	Olive verte fraîche (cv. Conservolea)	Argyri <i>et al.</i> , 2013
<i>L. paracollenoides</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012
<i>L. paraplanarium</i>	Olive verte fraîche (cv. Conservolea et halkidiki)	Argyri <i>et al.</i> , 2013
<i>L. plantarum</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese et Nocellara Etnea) Olive verte confite*	Randazzo <i>et al.</i> , 2012 Boulgerali <i>et al.</i> , 2013

<i>L. pentosus</i>	Olive verte fraîche (cv. Conservolea) Olive verte fraîche (cv. Alorena) Olive confite*	Panagou <i>et al.</i> , 2008 Abrilouel <i>et al.</i> , 2012 Aponte <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Olive verte fraîche (cv. Gueracese)	Randazzo <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterobacteriaceae</i>	Olive verte fraîche Olive confite*	Alves <i>et al.</i> , 2012 De Castro <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterococcus ssp</i>	Olive confite	De Castro <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium ssp</i>	- <sup>a</sup>	Luh et Martin, 1996
<i>Pseudomonas ssp</i>	Olive verte fraîche Olive confite*(cv. Nocellara de Belice) <sup>b</sup>	Tassou <i>et al.</i> , 2010 Aponte <i>et al.</i> , 2012
<i>Staphylococcus ssp</i>	Olive confite*(cv. Nocellara de Belice)	Aponte <i>et al.</i> , 2012

a: pas d'information, <sup>b</sup>cv: cultivar, \*: olive confite selon le procédé Espagnol, L. coryniformis: Lactobacillus coryniformis, L. paracasei: Lactobacillus paracasei, L. paracollenoides: Lactobacillus paracollenoides, L. paraplantarum: Lactobacillus paraplantarum, L. plantarum: Lactobacillus plantarum, L. pentosus: Lactobacillus pentosus.

#### I.4. Facteurs déterminant la composition en polyphénols des olives

##### I.4.1. Variabilité génétique entre les cultivars

Plusieurs études ont démontré que la composition des olives est fortement déterminée par le facteur génétique. Une large gamme de variation a été observée pour tous les acides gras et les composés mineurs évalués par Leon *et al.* (2011). Le contenu phénolique montre une variation drastique entre les cultivars (Baccouri *et al.*, 2008; Issaoui *et al.*, 2010). En effet, une étude effectuée sur 24 cultivars de la Banque de Córdoba, a montré que la variation des phénols totaux en raison du cultivar peut atteindre 78% (Uceda *et al.*, 2005).

De même, les composés phénoliques pourraient constituer un paramètre de discrimination entre les cultivars; par exemple le demethyloléuropéine est présent seulement dans les variétés Coratina et Leccino parmi huit variétés italiennes (Esti *et al.*, 1998) et dans deux variétés françaises (Cailletier et L11) parmi 11 cultivars étudiés (Amiot *et al.*, 1989). Toutes ces études indiquent que ces métabolites s'accumulent différemment selon le cultivar. En fait, l'accumulation de ces métabolites est en étroite dépendance avec l'activité enzymatique génétiquement déterminée (Tena *et al.*, 2007).

##### I.4.2. Facteurs agronomiques et environnementaux

La zone de culture de l'olivier a un effet considérable sur certains traits de qualité de fruits; il semble qu'il y ait une interaction génotype-conditions pédo-climatiques (Allalout *et al.*, 2011).

a) **Altitude:** l'effet de l'altitude sur la composition des olives étudié par Osman *et al.* (1994) et Mousa *et al.* (1996), ont conclu que les drupes cultivées à des basses altitudes ont une plus grande teneur en polyphénols que celles cultivées à haute altitude.

c) **Type du Sol :** l'effet du sol sur le profil phénolique est peu clair, mais certaines relations entre les caractéristiques du sol et la composition des olives ont été présentées (Ranalli *et al.*, 1997). Dans ce contexte, il a été signalé que l'olivier de la variété Moraiollo cultivé dans les sols pierreux, produit des olives dont le contenu phénolique est plus élevé que celui des olives de la même variété cultivée dans des sols argileux. Selon Servili *et al.* (1990), ce comportement est lié à la disponibilité inférieure en eau des sols pierreux, plutôt qu'à la texture du sol.

#### **I.4.3. Disponibilité en eau**

L'olivier réagit favorablement à l'irrigation, le bilan hydrique du sol a une incidence sur les caractéristiques du fruit. L'irrigation réduit considérablement le phénomène de la chute physiologique et favorise le déroulement normal du processus de maturation (Çavusoglu et Oktar, 1994). Les olives cueillies d'oliviers irrigués présentent un arôme rehaussé et une faible teneur en composés phénoliques par rapport à celles non irriguées (Patumi *et al.*, 2002; Gomez-Rico *et al.*, 2007).

#### **I.4.4. Indice de maturité des fruits d'olive**

Au cours de la période de maturation, plusieurs processus métaboliques prennent lieu dans le fruit induisant la variation des profils de certains composés en fonction du cultivar (Leonardis *et al.*, 2002). Ces changements sont pertinents sur le plan commercial car ils ont un effet significatif sur les caractères sensoriels et la valeur nutritionnelle des olives (Matos *et al.*, 2007). Une recherche menée par Baccouri *et al.* (2007) et Matos *et al.* (2007) dans le but d'élucider l'effet de la date de récolte sur la composition chimique des olives de sept oléacées ont conclu que la majorité des biophénols décroient en parallèle avec le mûrissement des fruits.

#### **I.4.5. Etat sanitaire des drupes**

Un des principaux ravageurs d'olivier dans le bassin méditerranéen est la mouche de l'olive (*Bactrocera olea*). Cet insecte a une influence préjudiciable sur la qualité des olives puisqu'elle affecte les principaux paramètres analytiques (Evangelisti *et al.*, 1994; Tamendjari *et al.*, 2004). Le degré d'infection par la mouche est négativement corrélé à la teneur en

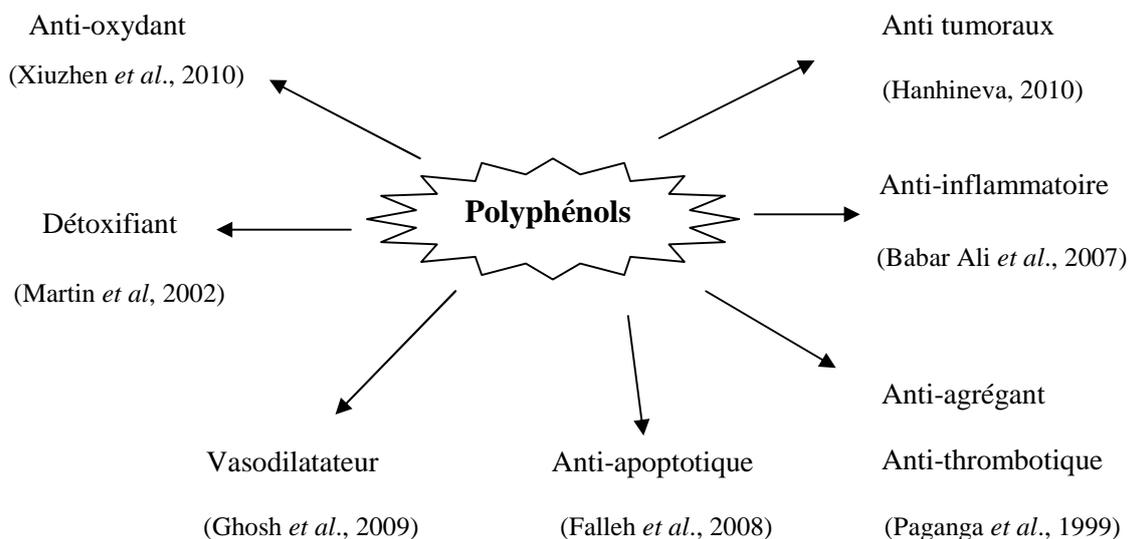
composés phénoliques notamment les *ortho*-diphénols en raison de l'autooxydation (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008; Tamendjari *et al.*, 2009).

#### I.4.6. Conditions de stockage des olives

Il est recommandé de conserver les olives en couches fines dans des locaux frais et bien aérés et de les traiter dans un délai de deux à trois jours après la récolte (Argenson, 1999), afin d'empêcher leur fermentation qui provoque à son tour l'augmentation de l'acidité libre, la diminution du contenu phénolique et l'augmentation de la teneur en alcools totaux ce qui détériore la qualité des olives (Brenes *et al.*, 2001; Clodoveo *et al.*, 2007).

#### I.5. Rôle biologique des polyphénols

Les composés phénoliques sont largement reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Gee et Johnson, 2001). En effet, la consommation d'aliments riches en polyphénols a été potentiellement associée à une faible incidence de maladies cardiovasculaires (Paganga *et al.*, 1999), neurologiques et cancéreuses (Brown *et al.*, 1998; Hanhineva, 2010). Ces bienfaits ont été attribués à la capacité de ces composés à modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies. Les principaux rôles physiologiques et biologiques des polyphénols sont répertoriés dans la figure 03.



**Figure 03:** Rôles physiologiques et biologiques des polyphénols.

Outre les rôles sous cités, les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement due à leur diversité structurale (Babar Ali *et al.*, 2007). Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes (Cowan, 1999). L'oleuropeine et les flavonols ont reçu plus d'attention due à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols (tableau VIII). En effet, la capacité à supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi que la capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques sont des mécanismes adaptés par ces composés dans l'inhibition des bactéries (Daglia, 2011). En outre, la quercétine et la catéchine sont des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus nervous*, *Staphylococcus epidermis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhar *et al.*, 2011). De plus, les acides phénoliques possèdent des activités antivirale, antibactérienne et antifongique (Brantner *et al.*, 1996). L'acide caféique et le catéchol, possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearotherophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholera*. Les flavonones glucosides ont aussi montré une activité antimicrobienne (Cowan, 1999; Sandhar *et al.*, 2011).

Le mécanisme responsable de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes est sans doute très complexe, les hypothèses les plus avancées incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydriles ou par les interactions non spécifiques avec les protéines (Prasad *et al.*, 2004). L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (Daglia, 2011). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la séquestration des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc, sont parmi les mécanismes mis en évidence par Mila et Scalbert, (1994) et Daglia, (2011).

**Tableau VIII** : Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2011).

Composé phénolique	Microorganisme sensible	Exemple
<b>Acides phénoliques</b>	Bactéries	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i>
<b>Flavonole</b>	Bactéries	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus nervous</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> .
	Virus	<i>Adénovirus</i> , <i>Entérovirus</i> , <i>Flu virus</i> .
	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
<b>Lignane</b>	Bactéries	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

*Chapitre II: Technologie d'élaboration  
des olives de table vertes*

Outre sa richesse en lipides, l'olive est une drupe qui contient un principe amer, l'oleuropéine, avec une teneur estimée à 2% de sa composition chimique. Ce composé rend l'olive un fruit qui ne peut pas être consommé en l'état. Il doit être alors soumis à des traitements qui varient considérablement d'une région à une autre et qui dépendent également de la variété (Arroyo-López *et al.*, 2008).

### **II.1. Définition de l'olive de table**

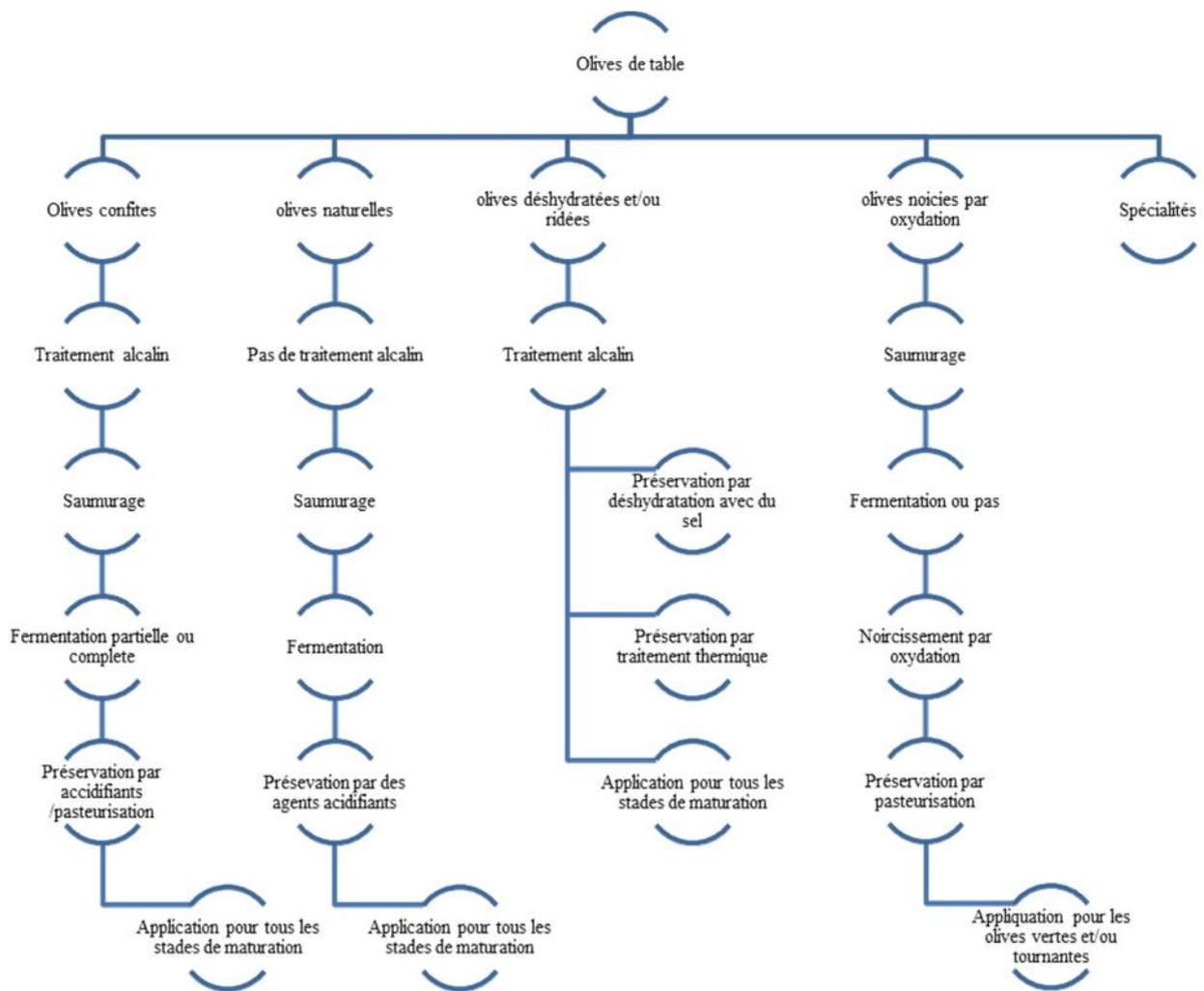
Selon le COI, (2004), le terme «olive de table» désigne le produit préparé à partir des fruits sains de variétés de l'olivier cultivé qui sont choisis pour leur production de fruits, dont le volume, la forme, la proportion de chair par rapport au noyau, la finesse de la chair, la saveur, la fermeté et la facilité à se séparer du noyau les rendent particulièrement aptes à la confiserie. Soumis aux traitements pertinents, conservés par fermentation naturelle ou par traitement thermique, avec ou sans agent de conservation, conditionnés avec ou sans liquide de couverture et offerts au commerce et à la consommation finale comme olives de table.

### **II.2. Classification des olives de table**

Les olives de table ont été classées selon le degré de maturité des fruits frais, le procédé de traitement, et les modèles utilisés pour classer les différents processus existants sont les plus importantes préparations industrielles (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Panagou *et al.*, 2008). Toutefois, la norme actuelle du commerce (COI, 2004) classifie les olives de table exclusivement par le procédé de traitement. La figure 04 rapporte les différentes préparations commerciales d'olives de table.

### **II.3. Confiserie des olives de table**

La confiserie des olives de table comporte au moins 3 étapes : le saumurage, le rinçage et la conservation. Néanmoins, des préparations très diverses et typiques sont mises en œuvre selon les variétés d'olive, leur stade de maturité au moment de l'élaboration et les traditions locales, assurant ainsi une grande diversité au niveau des produits proposés aux consommateurs (Ercolini *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010). Les préparations industrielles les plus courantes sont : les olives vertes confites (style espagnol), les olives noircies par oxydation et les olives noires naturelles (style grec) (Panagou *et al.*, 2008).



**Figure 04:** Classification des olives de table selon les préparations commerciales

(COI, 2004).

### II.3.1. Olives vertes confites

On distingue différents types d'olives vertes correspondant à des processus de préparation un peu différents, quoique basés sur les mêmes principes. Le principal type de production de ce genre d'olives est le style espagnol (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2004). Il consiste à faire tremper les olives non mûres et encore fermes dans une solution de soude caustique qui permet d'éliminer leur amertume naturelle; elles sont rincées à l'eau et mises dans une saumure de fermentation qui leur permet d'acquérir leur couleur verte caractéristique. Les olives peuvent être dénoyautées et farcies (Romero *et al.*, 2004; Aponte *et al.*, 2012).

### II.3.2. Olives noircies par oxydation

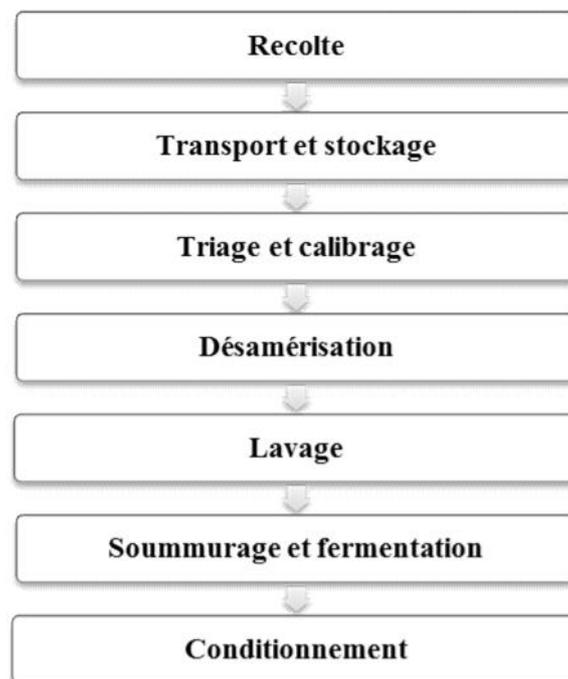
Le style californien diffère du procédé espagnol par le fait que la mise des olives en saumure s'effectue sans fermentation. Les olives sont cueillies lorsqu'elles sont à moitié mûres et qu'elles passent du jaune au violet; elles sont mises ensuite dans une solution alcaline et exposées à l'air jusqu'à ce qu'elles deviennent noires. Ces olives «noires» sont ensuite mises en conserve dans une solution saline puis stérilisées (Marsilio *et al.*, 2001; Arroyo-López *et al.*, 2008).

### II.3.3. Olives noires naturelles

La méthode grecque consiste à récolter des olives complètement mûres, lorsqu'elles sont pourpres foncé, presque noires et à les placer dans une saumure à forte teneur en sel (Tassou *et al.*, 2002; Arroyo-López *et al.*, 2008). Le processus de fermentation prend plus de temps du fait que les olives n'ont pas été traitées précédemment avec de la lessive de soude (Boskou *et al.*, 2006).

## II.4. Technologie d'élaboration des olives vertes au style espagnole

Après la cueillette, les olives subissent un cycle de transformation qui prévoit les étapes présentées dans la figure 05.



**Figure 05:** Etapes de traitement des olives selon le style espagnol (COI, 2004).

#### II.4.1. Cueillette des olives

Le temps de récolte et le procédé sont d'une importance capitale en termes de qualité du produit fini. En effet, les olives doivent être cueillies pendant le cycle de maturation, lorsqu'elles atteignent une taille maximale, au moment où se produit un léger changement de coloration d'un vert feuille à un vert légèrement jaunâtre, et où la pulpe commence à changer de consistance, mais avant son ramollissement (Vega *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2007).

La récolte peut s'effectuer manuellement ou mécaniquement. La cueillette à la main est l'opération qui convient le mieux pour éviter l'altération des fruits, car les olives sont cueillies sélectivement selon leur degré de maturité (Rejano y Sánchez, 2004; Veillet, 2010).

#### II.4.2 Transport et stockage

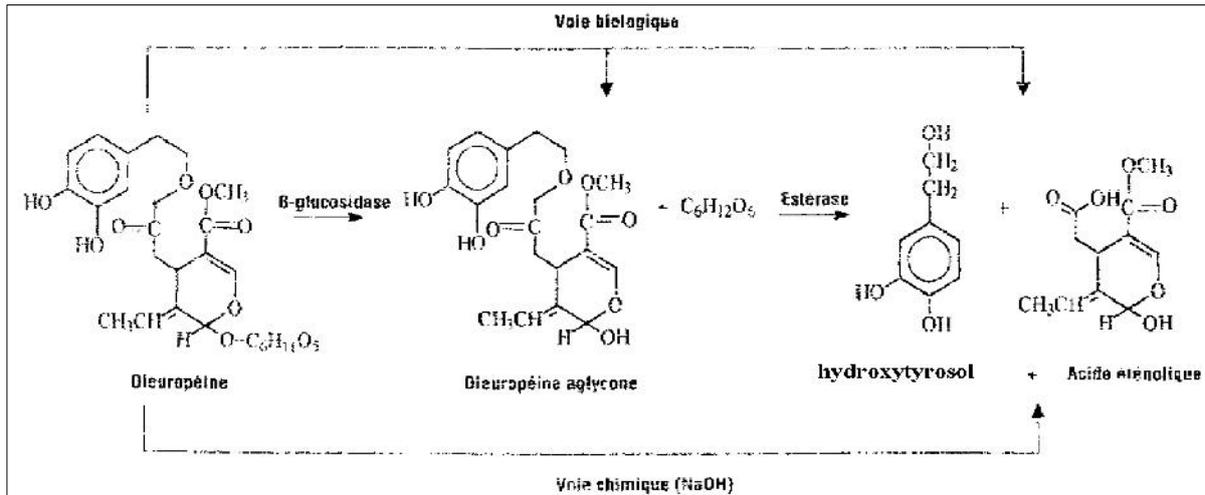
Quel que soit le mode de cueillette, Les olives sont ensuite mises dans des caisses perforées en plastique et acheminées rapidement aux unités de transformation. Il est recommandé de conserver les olives en couches fines dans des locaux frais et bien aérés et de les traiter dans un délai de deux à trois jours après la récolte afin d'éviter leur fermentation (Argenson, 1999; Rejano y Sánchez, 2004).

#### II.4.3. Triage et calibrage

La première opération de transformation consiste à éliminer les feuilles, séparer les fruits piqués, blessés ou altérés. L'épiderme des olives doit être mince, élastique, résistant aux chocs et à l'action de la soude et du sel. Les olives sont calibrées et classées selon leur grosseur pour faciliter les opérations ultérieures et mettre sur le marché des produits finis homogènes. Les olives de table doivent présenter une taille assez importante et le rapport pulpe/noyau doit être le plus élevé possible (COI, 2004).

#### II.4.4. Désamérisation

Cette étape a pour but l'élimination de l'amertume naturelle des olives suite à l'action hydrolytique de la soude qui rend soluble le principe amer présent dans les olives, l'oléuropéine, et qui peut entraver la fermentation (Brenes *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2007). Pendant cette phase l'oléuropéine est scindé en glucose, acide élénolique et en hydroxytyrosol (figure06), métabolites qui sont successivement éliminés suite à l'étape du lavage (Amiot *et al.*, 1990; Hurtado *et al.*, 2012).



**Figure 06:** Mécanisme de décomposition chimique et enzymatique de l'oleuropéine

(Idrissi *et al.*, 2004).

Cette opération permet également d'augmenter la perméabilité de l'épiderme suite à l'action hydolytique de la soude sur les substances pectino-cellulosique des membranes cellulaires, ce qui facilite le phénomène d'osmose entre les cellules et le milieu environnant et favorise la diffusion des composés fermenticibles dans la saumure (Garrido Fernández *et al.*, 1997; Brenes et de Castro, 1998).

La concentration de la soude utilisée varie entre 1,5 et 3% selon la température du milieu, la variété d'olive ainsi que l'état de maturation des drupes (Hurtado *et al.*, 2012). En effet, les olives plus mures nécessitent des concentrations plus basses (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). La phase de désamérisation se termine lorsque la solution est pénétrée dans les 2/3 du mésocarpe des drupes. Exposée à l'air, la partie de pulpe pénétrée par la soude s'oxyde tout de suite et devient plus sombre, alors que le reste maintient sa couleur vert jaunâtre (De Lorenzo *et al.*, 2000).

En général, ce traitement dure 8 à 12 heures, selon la concentration de la solution, la température, le degré de maturation, le rapport olives/solution de soude (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

#### II.4.5. Lavage

Lorsque le traitement alcalin est achevé, les olives sont lavées pour éliminer la soude résiduelle (De Castro *et al.*, 2002; Aponte *et al.*, 2012). La méthode varie et consiste à réaliser

un à trois trempages des olives dans l'eau potable pendant des durées déterminées (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

#### II.4.6. Saumurage et fermentation

Après désamérisation et lavage, les olives sont mises dans une saumure dont la concentration en NaCl est, généralement, comprise entre 8 et 10 %. Cette concentration diminue pour atteindre 6% à l'équilibre (Chammen *et al.*, 2005; Domínguez-Manzano *et al.*, 2012). Si cette concentration en NaCl est inférieure, il y a risque de développement microbiologique indésirable et si elle est supérieure, les olives peuvent se rider en raison de l'échange osmotique (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Les fruits doivent être complètement immergés dans la saumure. Au contact de l'air, des moisissures et des levures, se développent, présentant une activité enzymatique susceptible de dégrader les olives (De Castro *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2003).

Le sel détermine la sortie d'une partie du jus cellulaire riche en éléments nutritifs indispensables pour les microorganismes, entre autre, il favorise le développement des bactéries lactiques acidifiantes, évite le développement des germes nocifs et contribue à l'amélioration de la saveur et la consistance des olives (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Domínguez-Manzano *et al.*, 2012).

Au cours du saumurage, les olives subissent une fermentation lactique conduite lentement qui finit par être assez importante au détriment de la disponibilité des substrats fermentescibles, teneur en sel, pH, température, aération et la présence de micro-organismes de contamination (Tassou *et al.*, 2002; Abriouel *et al.*, 2011). La maîtrise des processus survenant durant cette phase d'élaboration est fondamentale pour améliorer la préparation, le stockage et la sécurité du produit fini (Tassou *et al.*, 2002). Divers groupes de microorganismes sont impliqués à la fois dans la fermentation des olives de table et leur conditionnement, déterminant la qualité et la saveur du produit fini. Cette flore hétérogène est apportée en général par le fruit, l'eau de saumurage ou par le matériel de fermentation (Brenes, 2004; Aponte *et al.*, 2010).

Au cours de la fermentation spontanée des olives de table de style espagnol, il y a une succession des espèces de micro-organismes présents, qui dépend de leurs besoins nutritifs respectifs et leurs physiologies (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010; Ghabbour *et al.*, 2011). Les bactéries lactiques (LAB) et les levures sont les micro-organismes les plus pertinents

(Garrido-Fernandez *et al.*, 1997; Franzetti *et al.*, 2011). Ces microorganismes sont en concurrence pour être les principaux acteurs de la fermentation (Tassou *et al.*, 2002; Aponte *et al.*, 2010). De nombreuses études rapportent que *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus pentosus* sont les principales espèces de LAB impliquées dans la fermentation des olives de table (Randazzo *et al.*, 2004; Bevilacqua *et al.*, 2010). La présence d'autres espèces de LAB a été rapportée, il s'agit de *Enterococcus faecium*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* et *L. paraplantarum*, mais toujours en tant qu'une population minoritaire (Randazzo *et al.*, 2004; Bevilacqua *et al.*, 2010). Entre autres, des études microbiologiques ont montré que les espèces de levure principalement identifiées des olives au style espagnol appartiennent aux genres *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* et *Debaryomyces* (Arroyo-López *et al.*, 2008). A savoir, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranifaciens*, *Candida boidinii*, *Candida diddensiae* (Oliveira *et al.*, 2004; Coton *et al.*, 2006).

### ➤ Etapes de la fermentation

Schématiquement, la fermentation se déroule en 3 phases selon la nature des microorganismes qui se développent (Garrido Fernández *et al.*, 1997; Arroyo-López *et al.*, 2008). Une 4<sup>ème</sup> phase dite indésirable, peut survenir :

#### ✓ 1<sup>ère</sup> phase

Cette phase dure en moyenne 7 à 10 jours, elle débute avec la mise en saumure des olives et se termine avec le développement des bactéries lactiques (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Arroyo-López *et al.*, 2008). Elle est caractérisée par le développement intense d'une flore hétérogène composée de bactéries et de champignons. Les bactéries sont représentées par les Gram négatif notamment *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Aerobacter* et *Aeromonas*, par les coques lactiques à savoir *Leuconostoc*, *Pediococcus* et dans une moindre mesure par des bactéries sporulées, il s'agit de *Bacillus* et *Clostridium*. Toutefois, les moisissures sont représentées par les genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Ces microorganismes apparaissent dans les premières étapes du processus (2-3 jours) en raison du pH alcalin et leur faible besoin en éléments nutritifs (Panagou *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2011). Les bactéries Gram négatif produisent des acides et du dioxyde de carbone qui induisent une diminution du pH à 6 ce qui élicite le développement des LAB. Cependant, la population des entérobactérie qui varie de 2,6 à 3,5 log UFC/ml diminue à mesure que le pH diminue due aux acides organiques produits par les LAB (Alves *et al.*, 2012).

Les coques lactiques du genre *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont les premiers genres de LAB à apparaître, suivie par les espèces homofermentaires, *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus plantarum* (Bevilacqua *et al.*, 2010). Au terme de cette phase une baisse du pH de 10 à 6, une baisse de la teneur en sel de la saumure de 10-8 % à 6-5 %, une augmentation de l'acidité libre de 0 à 0,1-0,2 % sont notées (Campaniello *et al.*, 2005).

### ✓ 2<sup>ème</sup> phase

Cette phase dure en moyenne 10 à 15 jours, elle débute avec le développement des bactéries lactiques et se termine par la disparition des bactéries à Gram négatif à un pH de l'ordre de 4,5. Pendant cette phase, les bactéries lactiques qui se développent durant la 1<sup>ère</sup> phase continuent leur croissance et dominent dans le milieu. Par contre, les *Lactobacillus* sont encore en début de croissance (De Bellis *et al.*, 2010). A la fin de cette phase, les *Leuconostoc* ne tolérant pas l'acidité diminuent pour être remplacées par les espèces du genre *Lactobacillus* tolérant les fortes acidités (Arroyo-López *et al.*, 2008). Les espèces de *Pediococcus* se développent au même temps que les *Leuconostoc*, mais elles restent toujours moins importantes que ces dernières (De Bellis *et al.*, 2010). Au terme de cette phase une baisse du pH de 6 à 4,5, une stabilisation de la teneur en sel de la saumure à 5-6 %, une augmentation de l'acidité libre de 0,2 à 0,4% sont notées (Campaniello *et al.*, 2005).

### ✓ 3<sup>ème</sup> phase

Cette phase peut durer de 1 à 3 mois durant laquelle, seule la croissance exponentielle de l'espèce *L. plantarum* et *L. pentosus* est révélée (Bevilacqua *et al.*, 2010; Gallego *et al.*, 2013). Ces espèces montrent une synergie avec les levures avec lesquelles coexistent. En effet, les levures peuvent améliorer la croissance de LAB par la libération des composés nutritifs comme elles jouent un rôle clé dans la définition des profils organoleptiques grâce à la production de composés volatils (alcools, acétate d'éthyle, acétaldéhyde). Toutefois, la dominance de ces dernières induit une formation des poches de gaz, le ramollissement des olives et même la génération de saveurs désagréables (Arroyo-López *et al.*, 2008, 2012; Corsetti *et al.*, 2012).

D'un point de vue biochimique, cette phase est caractérisée par la désamérisation biologique des olives (Sabatini *et al.*, 2009), la production des composés aromatiques (Muriana, 1993) et bactériocines ainsi que l'accumulation de l'acide lactique responsable de la stabilisation du produit fini grâce à son activité inhibitrice de la croissance des bactéries

pathogènes (Lanza, 2010; Corsetti *et al.*, 2012). *L. pentosus* présente une activité -glucosidase visible et contribue, avec les levures, au processus de désamérisation biologiques des olives (Franzetti *et al.*, 2011). Dans ce contexte, Servili *et al.* (2006) ont sélectionné une souche de *L. pentosus* capable de réduire la concentration des composés amers des olives dans les 8 premiers jours de fermentation. Landete *et al.* (2008) ont également noté cette propriété chez *L. plantarum*. Cette activité consiste à la dégradation enzymatique de l'oleuropéine et à la libération consécutive de glucose et d'aglycone ainsi que la conversion de ce dernier, à son tour, à des composés non amers tels que l'acide élénolique et l'hydroxytyrosol. Ce dernier est le composé phénolique le plus abondant présent dans la saumure d'olives fermentées et capable d'inhiber la croissance des LAB, mais pas aux concentrations généralement détectées dans les saumures des olives de table (Marsilio et Lanza, 1998; Landete *et al.*, 2008).

Une fois que les substrats fermentescibles sont épuisés, l'acidité produite atteint 0,5 à 0,7% d'acide lactique ce qui entraîne l'abaissement du pH à 4,1. Il est à considérer alors que la phase finale de la fermentation est achevée (Abriouel *et al.*, 2012; Randazzo *et al.*, 2012).

#### ✓ 4<sup>ème</sup> phase

Cette phase est favorisée lorsque le pH n'est pas suffisamment bas. En effet, ils se développent des espèces du genre *Propionibacterium* induisant l'augmentation du pH en raison de la production d'acide acétique et propionique suite à la métabolisation de l'acide lactique produit lors de la phase de fermentation (Heperkan *et al.*, 2009). Ces modifications peuvent faciliter la croissance des micro-organismes pathogènes ou d'altérations provoquant à leur tour des détériorations connues sous le nom de «zapateria» (Cawthorne *et al.*, 2005; Jalava *et al.*, 2011).

### II.4.7. Conditionnement

Que la présentation se fasse dans des emballages hermétiques ou non, les olives emballées sont stabilisées uniquement par leurs caractéristiques physico-chimiques qui doivent être en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication recommandées par le COI. En effet, la commercialisation de ces produits nécessite une concentration en sel de 5 à 7% et une acidité libre exprimée en acide lactique de 0,4 à 0,7% avec un PH < 3,8 (COI, 2004). Cependant, la préférence progressive des consommateurs pour de faible concentration en sel a modifié ces conditions et la stabilisation du produit fini par de faibles concentrations

en sel nécessite une série d'opérations complémentaires. A l'heure actuelle, l'ajout des acidifiants et/ou l'utilisation de la pasteurisation s'avère une bonne alternative (Díaz *et al.*, 2000, 2004).

### **II.5. Influence du procédé d'élaboration (style espagnol) sur la composition phénolique des olives**

L'influence du traitement technologique du style espagnol sur la composition phénolique des olives a été étudiée par plusieurs auteurs. En effet, il a été rapporté que la désamérisation des olives par la soude engendre une diminution intensive de la concentration des secoiridoides et la libération de l'hydroxytyrosol et de l'acide élénolique glucoside ( Domínguez-Manzano *et al.*, 2012, Goulas *et al.*, 2012). Tandis que la mise en saumure des olives favorise la migration réversible des molécules hydrophiles (Mombiela, 2012). En effet, des réductions des teneurs des olives en acide caféique et en acide *p*-coumarique, au cours de cette étape ont été notées (Balatsouras, 1997).

Lors de la fermentation et le stockage, la composition phénolique change simultanément suite à l'hydrolyse des glucosides présents initialement dans la pulpe fraîche (Marsilio *et al.*, 2005). La chaleur dégagée par la fermentation permet l'activation des polyphénols-oxydases et la polymérisation des phénols en saumure (Romeo *et al.*, 2009). En suivant l'évolution du profil phénolique lors de la fermentation, Ben Othman *et al.* (2009) ont signalé que les pertes en biophénols sont plus remarquables au niveau des olives vertes riches en phénols simples (hydroxycinnamique, acide férulique, acide benzoïque) assimilables par les bactéries lactiques. Cependant, d'autres auteurs ont rapporté l'aptitude de *L. plantarum* à dégrader l'oleuropéine, les dérivés d'acide hydroxycinnamique et les acides caféique, gallique et protocatéchique (Rodríguez *et al.*, 2009 ; Di Cagno *et al.*, 2013). Les enzymes responsables de la dégradation de ces composés sont illustrées dans le tableau IX.

**Tableau IX:** Quelques polyphénols dégradés par les souches de *L. plantarum*  
(Ben Othman *et al.*, 2009; Landete *et al.*, 2010).

Polyphénols	Enzyme impliquée	Produit de dégradation
<b>Acide caféique</b>	Polyphénols décarboxylase	Vinyl catéchol
	Réductase	Ethyl-catéchol
<b>Acide <i>p</i>-coumarique</b>	Polyphénols décarboxylase	Vinyl-phénol
	Réductase	Ethyl phénol
<b>Acide férulique</b>	Polyphénols décarboxylase	Vinyl gaïacol
	Réductase	Ethyl gaïacol
<b>Acide gallique</b>	Décarboxylase	Pyrogallol
<b>Acide protocatechique</b>	Décarboxylase	Catéchol
<b>Oleuropéine</b>	-glucosidase	Hydroxytyrosol

# *Partie expérimentale*



# *Chapitre I: Matériel et méthodes*

### **I.1. Matériel végétal**

Les variétés d'olives retenues pour cette étude sont d'origines locales, implantée à l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (I.T.A.F.V), situé à Takerietz, commune de Souk-Ouefella, Wilaya de Bejaia. Des échantillons commerciaux de deux variétés (*Sevilla* et *Sigoise*) d'olives de table sont utilisés dans notre expérimentation. L'origine et les phénotypes multi-caractères des variétés sont présentés dans le tableau X.

### **I.2. Echantillonnage et élaboration des olives vertes**

Les échantillons d'olive sont issus des fruits récoltés manuellement et à hauteur d'Homme sur toute les frondaisons sur le site de l'I.T.A.F.V durant la campagne oléicole 2013-2014.

Après triage et calibrage, les olives ont été transportées au laboratoire dans la même journée. La moitié de la quantité d'olives de chaque variété a été élaborée selon le style espagnol. 2 kg d'olives ont été plongé dans une solution de soude à 1,5 % (p/v) à raison d'un litre et demi de lessive par kilogramme d'olives jusqu'à pénétration de la soude aux 2/3 de la chair suivie une étape de lavage comprenant trois trempages dans de l'eau potable de durées respectives 8, 8 et 12 heures. Les olives sont ensuite mises dans des cuves de fermentation avec la saumure, dont la concentration en chlorure de sodium est de 8%. Toutes les fermentations lactiques spontanées ont été maintenues à température ambiante pendant une période globale de 4 mois jusqu'à réduction du pH à 4,5.

Les échantillons d'olives (fraîches et confites) ont été lyophilisés, broyés et tamisés ( $\varnothing=1\text{mm}$ ). Les poudres ainsi obtenues ont été conservées au congélateur, dans des flacons en verre fumé bien scellés.

Tableau X : Régions d'origine et phénotypes multi-caractères des variétés d'olivier étudiées

Variétés	Régions d'origine	Phénotypes multi-caractères
<i>Azzeradj</i>	Bejaia (Seddouk)	Variété à double utilisation, gros fruit ( <b>PM= 5,56g</b> ) au sommet pointu et à la base tronquée, de couleur vert jaunâtre avec un noyau arrondie et symétrique.
<i>Azzeradj</i>	Bejaia (Tazmalt)	Fruit de taille moyenne ( <b>PM= 4,02g</b> ) de forme allongée, au sommet pointu et à la base arrondie.
<i>Bouchouk</i>	Bejaia (Sidi Aich)	Fruit de taille moyenne ( <b>PM= 3,07g</b> ) de forme allongée, légèrement asymétrique, avec un noyau mince.
<i>Grosse du Hamma</i>	Bejaia (Sidi Aich)	Gros fruit ( <b>PM=7,46g</b> ) de forme allongée, légèrement asymétrique, au sommet pointu et base tronquée, de couleur vert avec de taches blanches.
<i>Gordal</i>	Bejaia (Seddouk)	Gros fruit ( <b>PM=8,47g</b> ) au sommet pointu et à la base tronquée avec un noyau long et fin.
<i>Teffahi</i>	Bejaia (Seddouk)	Gros fruit ( <b>PM= 6,46g</b> ) de forme arrondi et symétrique de couleur vert jaunâtre avec un mince noyau.
<i>Manzanilla</i>	Bejaia (Sidi Aich)	Variété destinée principalement à la production d'olives de table, fruit de taille moyenne ( <b>PM=3,85g</b> ) de forme ovoïde et légèrement asymétrique.
<i>Sigoise</i>	Mascara	Fruit de taille moyenne ( <b>PM= 4,60g</b> ) de forme allongée, asymétrique, au sommet pointu et à la base tronquée, de couleur vert jaunâtre avec un noyau elliptique.
<i>Sevilla</i>	Bejaia (Seddouk)	Très gros fruit ( <b>PM= 10,6g</b> ) de forme ovoïde, au sommet pointu et à la base arrondie, de couleur vert brun, avec un noyau elliptique et asymétrique.
<i>Vasilicada</i>	Bejaia (Sidi Aich)	Gros fruit ( <b>PM=5,41g</b> ) de forme allongée, asymétrique, au sommet pointu et à la base tronquée, de couleur vert jaunâtre avec un noyau elliptique.

PM: Poids Moyen.

### I.3. Techniques d'analyse

#### I.3.1. Déterminations sur les olives

##### I.3.1.1. Teneur en eau des olives

L'humidité des fruits a été déterminée en calculant la différence entre le poids de l'échantillon humide et celui de l'échantillon séché Tovar *et al.* (2002).

Un échantillon de matière fraîche de 5 g a été mis à sécher à 105°C pendant 48 h, celui-ci a été régulièrement pesé après refroidissement au dessiccateur jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids sec au moyen de la formule ci- après :

$$H\% = [(P - P_s) / (P - P_0)] * 100$$

**H:** humidité des fruits exprimée en pourcentage.

**P** et **P<sub>s</sub>**: poids du creuset plus la prise d'essai avant et après séchage, respectivement.

**P<sub>0</sub>**: poids du creuset vide.

##### I.3.1.2. Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode de Miller (1959). Les sucres réduisent l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, à chaud, le produit de la réaction en milieu basique développe une coloration jaune orangée avec un pic d'absorption à 546 nm.

- **Préparation du réactif**

3,5 g de DNS ont été dissouts dans 20 ml de NaOH (2N). Après 12h, 50 ml d'eau distillée ont été rajoutées et homogénéisées après avoir ajouté 30g de tartrate de sodium et de potassium. La préparation a été ajustée à 100 ml et gardée à l'obscurité.

- **Dosage**

1g d'olive a été macéré dans 50 ml d'eau distillée à 20°C pendant 30min puis filtré. 1ml du réactif a été rajouté au même volume du filtrat. Le mélange a été porté à ébullition pendant 10 min et refroidi rapidement. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes a été homogénéisé, puis analysé contre un blanc à 546 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de glucose de 0,2 à 2g/l et les résultats sont exprimés en g équivalent de glucose par kg de matière sèche (annexe 01).

### I.3.1.3. Extraction et dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux sont dosés par le suivi de leur capacité à réduire les acides Phosphotungstiques ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdiques ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ), contenus dans le réactif de Folin-Ciocalteu en oxydes de tungstène et molybdène. Ces derniers présentent une coloration bleutée mesurée à 725 nm proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les échantillons (Singleton *et al.*, 1999).

- **Extraction**

L'extraction des polyphénols a été réalisée suivant le protocole de McDonald *et al.* (2001). 5 g d'échantillon lyophilisé ont été macérés avec 17,5 ml du méthanol à 80% et agités pendant 20 min. La préparation a été centrifugée à 3000 rtp/5min, puis lavée avec 2x15 ml d'hexane.

- **Dosage**

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon la méthode décrite par Borzillo *et al.* (2000). 0,1 ml de l'extrait phénolique a été ajouté à 0,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 min d'incubation à température ambiante, le mélange a été additionné de 4 ml de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 20 %. Le mélange a été porté à un volume final de 10 ml par de l'eau distillée. Après incubation pendant 90 min à l'obscurité, la préparation a été centrifugée à 1500 rtp/15min puis analysée à 725 nm contre un blanc dont l'extrait phénolique est remplacé par le même volume du méthanol à 80%.

La concentration en phénols est calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique (0-0,75 mg/ml). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 100g de matière sèche (annexe 02 (a)).

### I.3.1.4. Dosage des *ortho*-diphénols

Le contenu en *ortho*-diphénols des extraits est mesuré par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de molybdate. Ce réactif forme un complexe diphénols- molybdate ayant un maximum d'absorption à 370 nm (Djeridane *et al.*, 2006). La concentration en *ortho*-diphénols des extraits phénoliques a été déterminée selon la méthode décrite par Bendini *et al.* (2003).

4ml d'extrait phénolique ont été ajoutés à 1ml de la solution de molybdate de sodium dihydraté à 5% dans l'éthanol-eau à 50% (V/V). Après 15min, l'absorbance est mesurée à 370nm contre un blanc (éthanol-eau à 50% + extrait à analyser). La concentration en *ortho*-diphénols est calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme étalon avec

de l'acide caféique (0-0,028 mg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide caféique/100 g de matière sèche (annexe 02 (b)).

#### **I.3.1.5. Dosage des flavonoïdes**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) en suivant le protocole de Djeridane et ses collaborateurs (2006). La réaction consiste en la formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produisant un complexe de couleur jaune mesurée à 430 nm.

1,5 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol) ont été ajoutés au même volume d'échantillon. Après 10min d'incubation, l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec de la quercétine (0-0,4 mg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine /100 g de matière sèche (annexe 02 (c)).

#### **I.3.1.6. Détermination des phénols des olives par HPLC**

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par HPLC (Chromatographie liquide Shimadzu LC-10ADVP). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne en phase inverse: Spherisorb S5 ODS-3 (250 mm x 4,6 mm di). Le système de solvant utilisé est un gradient de solvant A (eau: acide trifluoroacétique, 97: 3, v / v), et le solvant B (acétonitrile: méthanol, 80:20, v / v) à un débit de 1 ml / min. La quantification des pics a été effectuée à 279 nm. Les principaux composés phénoliques ont été identifiés par comparaison avec les temps de rétention relatifs de composés purs, si possible, ou en comparant l'ordre d'élution et les spectres UV par rapport à ceux rapportés dans la littérature (Brenes *et al.*, 2000, Rovellini et Cortesi, 2002).

#### **I.3.2. Déterminations du pouvoir antimicrobien des olives**

Deux méthodes différentes ont été employées pour évaluer l'effet antimicrobien des différents extraits méthanoliques des olives. Il s'agit de la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (Essawi et Srour, 2000) qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits et la méthode des microdilutions (Billerbeck *et al.*, 2002) qui a

pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations du produit dans le milieu de culture.

### I.3.2.1. Souches microbiennes testées

L'évaluation de l'activité antimicrobienne relative aux extraits méthanoliques des olives retenues dans le cadre de cette étude a été étudiée vis-à-vis de 8 souches bactériennes choisies pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Les souches utilisées proviennent de la collection du laboratoire de la microbiologie appliquée de l'université de Bejaia (tableau XI). Elles sont responsables de nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants, provoquant ainsi d'importantes mycoses, des allergies et des intoxications.

**Tableau XI:** Souches microbiennes testées et leur pathogénicité.

Gram positif			
Bactérie	Référence	Pathogénicité	Référence bibliographique
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	--	
<i>L. innocua</i>	CLIP74915	Listériose glandulaire et typhoïdique. méningo-encéphalites, gastro-entérite fébrile.	Doganay, 2003
<i>S.aureus</i>	ATCC 6538	Infections cutanées, endocardites, pneumopathies, infections neuro méningées, toxi-infection alimentaire.	Chambers, 1997
<i>SARM</i>	ATCC 43300	Infections neuro méningées, septicémie.	Mena et Gerba, 2009
Gram négatif			
<i>A.baumannii</i>	610	Infections nosocomiales, pneumonies associées à des bactériémies.	Nataro et Kaper, 1998
<i>E. coli</i>	Nalidixic Acid Resistant (NAR)	Gastro-entérites, infections urinaires, méningites, septicémies.	Nataro et Kaper, 1998
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 25922	Pneumonies nosocomiales, septicémies, infections urinaires, infections hépatiques, endocardite, péritonite, cholécystite aiguë.	Janda et Abbott, 2006
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Pneumonie nosocomiale, endocardite, infections urinaires, inflammation de la cornée et perte d'acuité visuelle.	Mena et Gerba, 2009

ATCC: American Type Culture Collection, CLIP: Collection Listeria Institut Pasteur. -: espèce inoffensive.

### I.3.2. 2. Test de sensibilité aux extraits d'olives

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques d'olive est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (antibiogramme). Cette technique repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Il est à noter que dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Denis *et al.*, 2007). 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)

- **Standardisation des inocula bactériens**

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 a été soumise à un balayage entre 380-780 nm. La longueur d'onde d'absorbance maximale a été déterminée pour chaque souche.

A partir de la suspension bactérienne initiale préparée à une absorbance de 0,50, une série de dilutions décimales a été effectuée ( $10^{-4}$  jusqu'à  $10^{-8}$ ). Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé en surface avec un râteau étaleur sur gélose PCA, des dénombrements ont été effectués après incubation à 37°C pendant 24 heures.

- **Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes à tester ont été ensemencées dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.50 ont été préparées, pour chaque souche, dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

- **Ensemencement et dépôt des disques**

Des disques de papier wattman de 6mm de diamètre ont été imbibés de 20µl des extraits méthanolique des olives, soit une concentration de 2,1mg par disque, puis placés à la

surface de la gélose Mueller Hinton sèche (annexe 03 (a)), inoculée au préalable par écouvillonnage d'une suspension bactérienne contenant approximativement  $10^6$  UFC/ml. Après incubation à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. La sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition.

Les résultats obtenus sont comparés à ceux du méthanol à 80% testés sur les mêmes souches et par le même protocole.

### I.3.2.3. Détermination des CMI et CMBs sur milieu solide

Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations aux quelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'oeil nu (Billerbeck *et al.*, 2002). Les concentrations minimales inhibitrices des extraits méthanolique des olives ont été déterminées selon la méthode décrite par Tunçel et Nergiz, (1993), dont 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.

- **Préparation des boîtes**

Une série de dilutions d'extrait méthanolique de raison géométrique de 0,4 a été réalisée en gélose Mueller Hinton en surfusion avec une solution-mère d'extrait à 25 mg/ml (annexe 03 (b)). Après homogénéisation, le mélange (Mueller Hinton + extrait méthanolique) a été coulé sur boîte de Petri puis séché pendant 30 minutes à  $37^\circ\text{C}$ .

- **Ensemencement**

Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin) est effectuée en surface, sous forme de spot de  $1\mu\text{l}$  de suspension bactérienne ( $10^6$  UFC/ml). La lecture du résultat a été effectuée après 24h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . La CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait. Des témoins de croissance et de stérilité du milieu sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais.

Les concentrations minimales bactéricides (CMBs), ont été révélées par ensemencement des tubes de bouillon nutritif à partir des prélèvements effectués au niveau des spots où il n'y a pas de croissance, l'absence de trouble après 24 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  indique un effet bactéricide de l'extrait testé.

#### **I.4. Etude statistique**

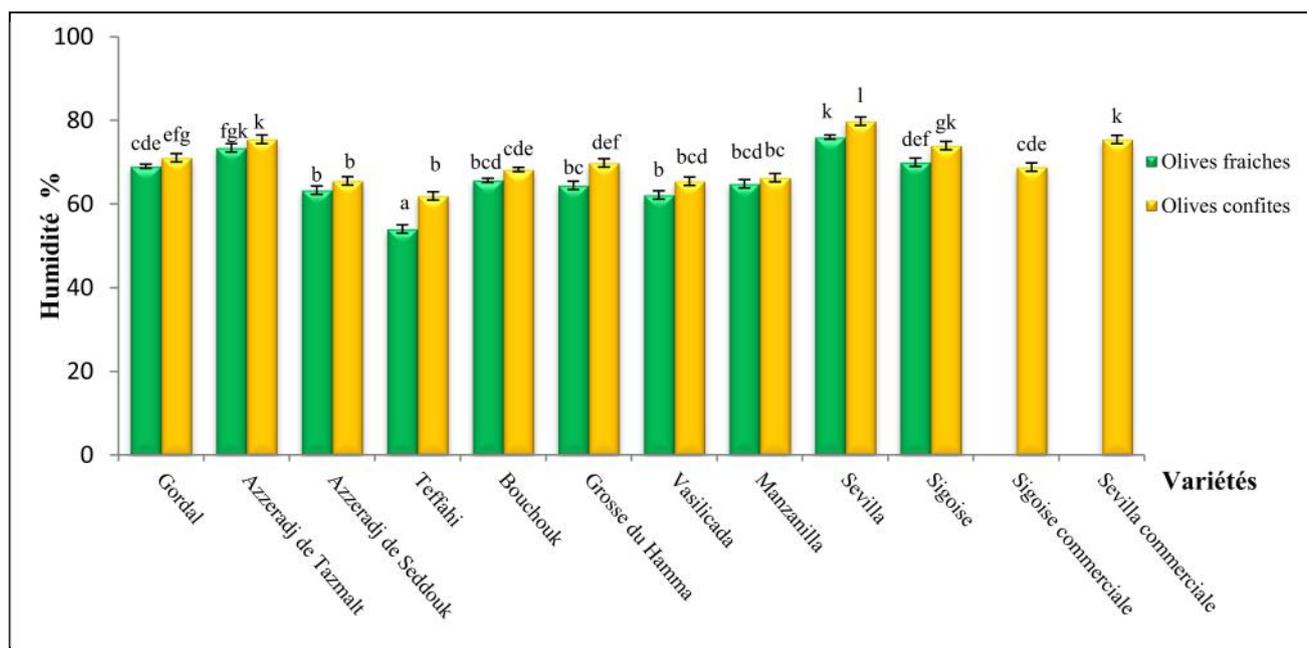
Chaque analyse a été réalisée en trois reprises et les résultats représentent la moyenne des trois mesures. Les données ainsi obtenues à partir de différentes variétés étudiées ont été comparées en appliquant une analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de Newman-Keuls à l'aide d'un logiciel STATISTICA 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.

## *Chapitre II: Résultats et discussion*

## II.1. Déterminations sur les olives

### II.1.1. Teneurs en eau

Les teneurs en eau des fruits révèlent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différents échantillons analysés (figure 07). Pour les olives fraîches, la variété *Teffahi* enregistre la plus faible teneur en eau estimée à 54,05%. Tandis que la teneur la plus élevée est enregistrée pour la variété *Sevilla* (76%). Pour les olives, une humidité supérieure à 50% favorise un bon déroulement des réactions biochimiques qui s'y produisent (Sanchez-Casas *et al.*, 1999).



**Figure 07:** Teneur en eau des échantillons d'olive.

\*Les valeurs portant des différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ) ;

\* Les barres verticales représentent les écarts types avec  $a < b$ .

Les différences significatives en humidité notées pour certaines variétés ne peuvent pas être attribuées aux conditions environnementales ni à l'effet de maturation, mais peuvent être reliées au processus métabolique qui pourrait survenir à l'intérieur des fruits qui est d'après Leonardi et Macciola, (2002) caractéristique de chaque variété.

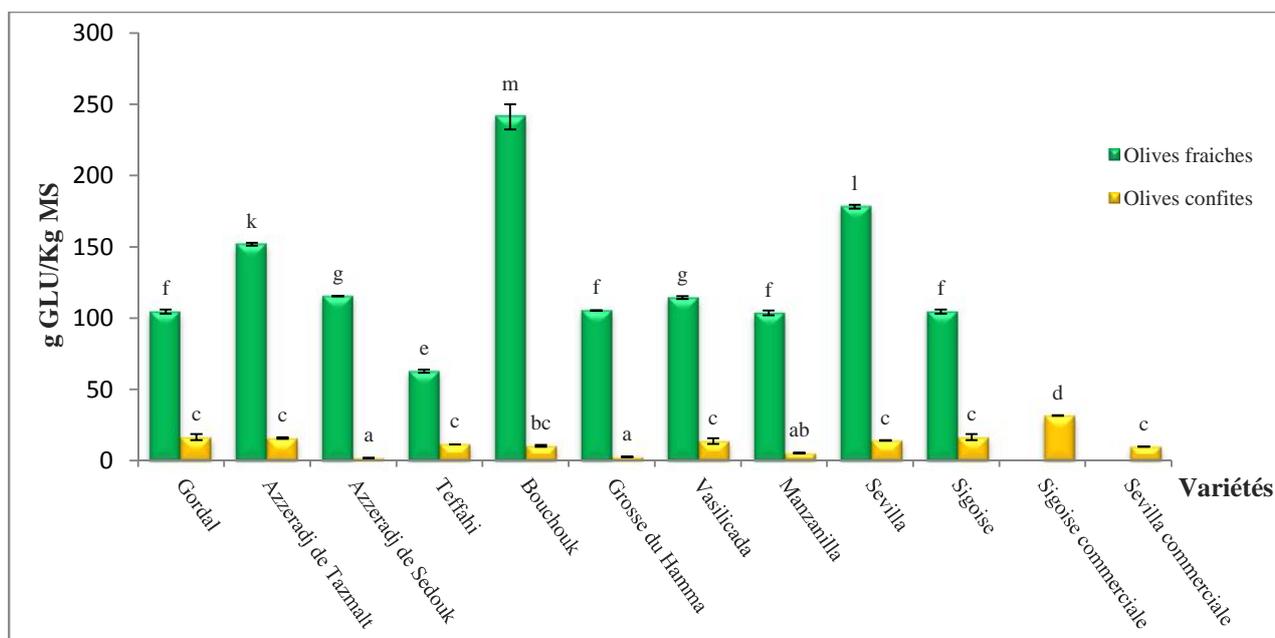
Après élaboration, une augmentation allant de 2,06 (*Gordal*, *Azzeradj de seddouk*) à 7,91% (*Teffahi*) de l'humidité est notée. Cette augmentation est justifiée par l'établissement d'un échange hydrique entre la matrice végétale et la saumure. Par ailleurs, les

fluctuations de valeurs sont bien corrélées avec la perméabilité et l'épaisseur de l'épicarpe caractéristique pour chaque cultivar (Poiana et Romeo, 2006). Les variétés commerciales présentent des teneurs proches de nos olives confites.

### II.1.2. Teneur en sucres réducteurs

L'analyse statistique des résultats relatifs aux sucres réducteurs montrent que ces composés sont influencés significativement par le facteur variétal et la technologie d'élaboration. Toutefois des différences non significatives ont été enregistrées entre les variétés *Gordal*, *Grosse du Hamma*, *Manzanilla* et *Sigoise* et entre *Azzeradj de Seddouk* et *Vasilicada* (figure08).

Les teneurs en sucres réducteurs obtenues pour les olives fraîches oscillent entre 241,19 g/kg MS (*Bouchouk*) et 62,74g/kg MS (*Teffahi*).



**Figure 08:** Teneur en sucres réducteurs des échantillons d'olive.

\*Les valeurs portant des différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ) ;

\* Les barres verticales représentent les écarts types avec  $a < b$ .

Après élaboration, ces teneurs chutent d'une manière spectaculaire pour atteindre 1,8 et 2,66g /kg MS pour les variétés *Azzeradj de Seddouk* et *Grosse du Hamma*, respectivement. Les pourcentages de perte enregistrés pour ces deux variétés sont estimés à 98,43% et 97,48%, respectivement. Quant aux restes des variétés, les pourcentages de pertes sont compris entre 95,69% (*Bouchouk*) et 81,34% (*Teffahi*). Les résultats obtenus sont

comparables à ceux rapportés par Kiai et Hafidi, (2014) qui ont notés des pourcentages de pertes en ces composés estimés à 79,39% et 75,70% pour les variétés *Gordal* et *Ascolana Marocaine*, respectivement.

La diffusion des sucres dans la saumure semble être à l'origine de ces pertes. Cependant, l'intensité de cette diminution reste selon Garrido-Fernandez *et al.* (1997) fortement dépendante de la perméabilité de l'épicarpe de la variété d'olive conséquente au traitement alcalin. Par ailleurs, Skevin *et al.* (2003) ont signalé que la teneur en sucres a tendance à diminuer avec la progression de la fermentation lactique. En effet, d'autres composés se forment, en l'occurrence l'acide lactique. Une forte corrélation est établie entre l'apparition de ce dernier et la consommation des sucres et confirmée par les travaux de Kiai et Hafidi, (2014).

Les teneurs en sucres réducteurs des olives confites des variétés *Sevilla* et *Sigoise* préparées au laboratoire sont presque comparables à celles des échantillons commerciaux pour les mêmes variétés.

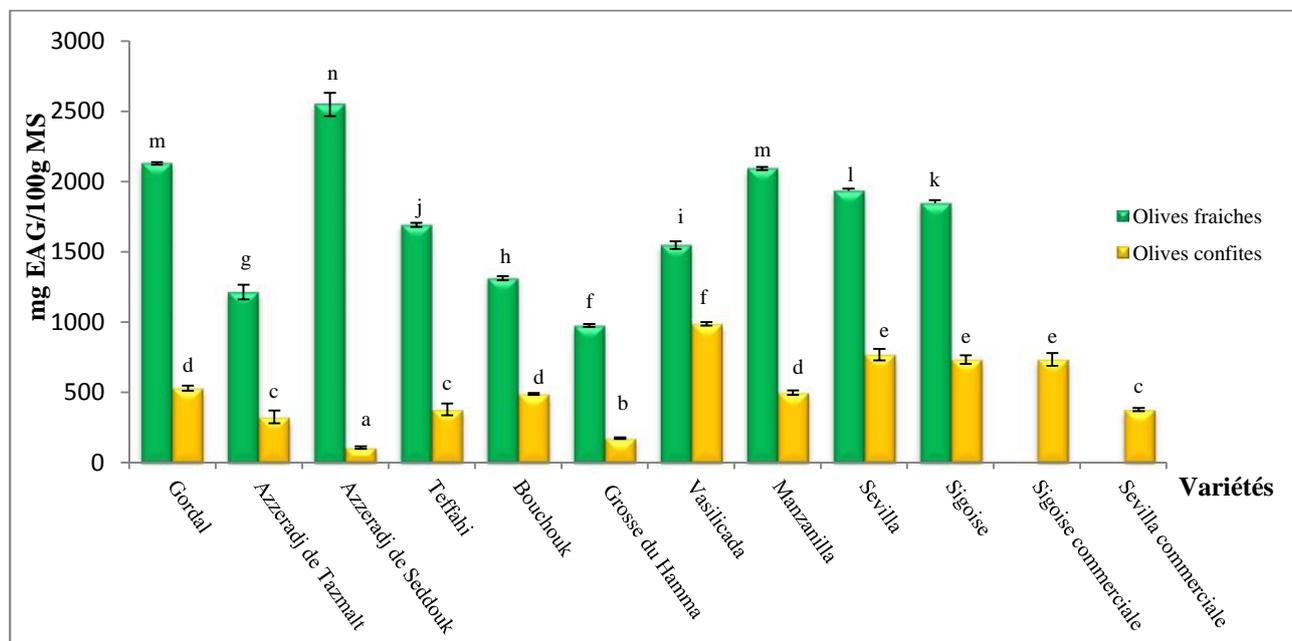
### II.1.3. Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats obtenus présentés dans la figure 09 montrent que le contenu en polyphénols totaux des olives analysées est fortement influencé par les facteurs variété et technologie d'élaboration. Des différences significatives ont été enregistrées entre tous les échantillons ( $p < 0,05$ ) sauf entre les variétés *Gordal* et *Manzanilla* fraîches.

Les teneurs en polyphénols totaux les plus élevées pour les olives fraîches correspondent à la variété *Azzeradj de Seddouk* avec une teneur de 2549,3 mg /100g MS. Elle est environ 3 fois plus élevée que celle enregistrée pour la variété *Grosse du Hamma* qui montre la plus faible teneur (975,3 mg/100g MS). Les variétés *Gordal* (2128,7 mg /100g MS) et *Manzanilla* (2092,8 mg/100g MS) contiennent aussi des quantités appréciables. Ces variations des teneurs en polyphénols sont principalement liées à la variété (Malheiro *et al.*, 2011).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Benlarbi, (2004) pour des extraits d'olive cultivée au nord-ouest Algérien, dont le contenu phénolique varie entre 431,6 et 2288 mg/100g MS. Une étude similaire réalisée par Bisset, (2011) a montré que trois variétés d'olive de l'Est Algérien, à savoir *Chemlali*, *Farhi* et *Beskri* possèdent un contenu phénolique de 1919; 2664 et 2931mg/100g MS, respectivement. En comparaison aux variétés Grecs et Portugaises, les contenus phénoliques de nos variétés sont nettement supérieurs à ceux

rapportés par Boskou *et al.* (2006) et Malheiro *et al.* (2011), qui oscillent entre 82 et 171mg /100g MS. Ceci peut être expliquées par l'effet de la zone géographique oléicole (Mousa *et al.*, 1996) et/ou par la différence du solvant d'extraction (Kayel *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2008; Conde *et al.*, 2008).



**Figure 09:** Teneur en polyphénols totaux des échantillons d'olive.

\*Les valeurs portant des différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ) ;

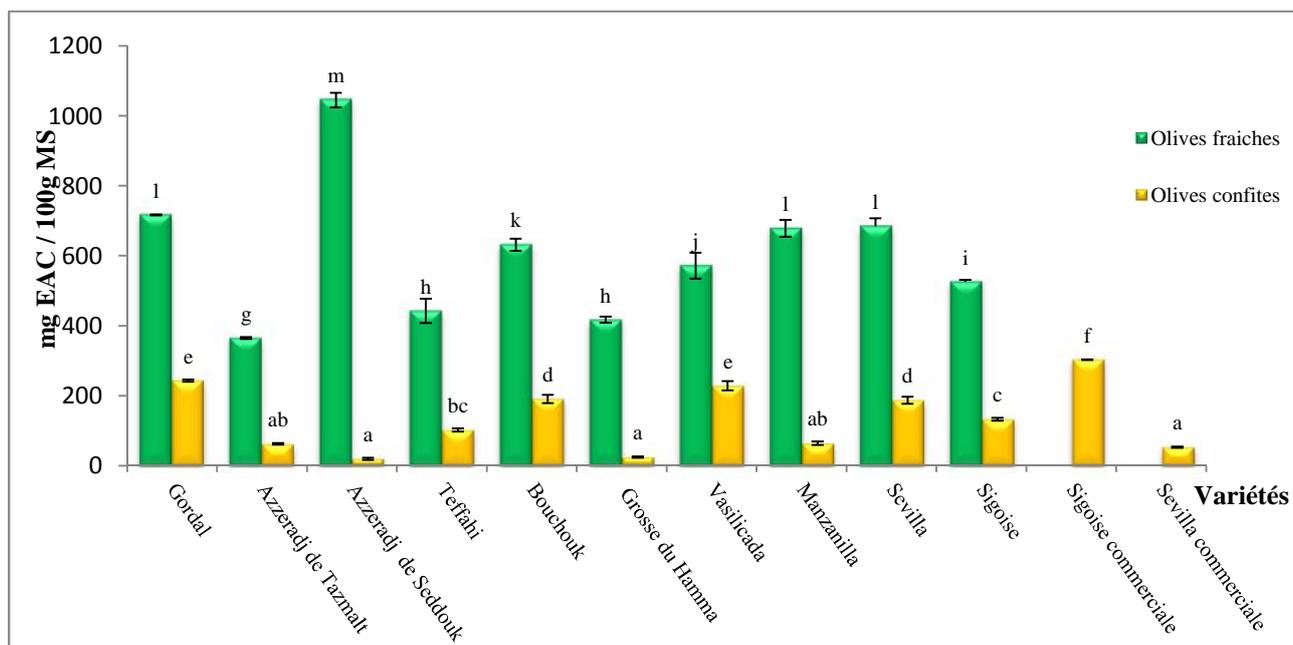
\* Les barres verticales représentent les écarts types avec  $a < b$ .

Les teneurs en polyphénols totaux enregistrées pour les olives confites oscillent entre 107,54 et 987,31mg/100g MS pour les variétés *Azzeradj de Seddouk* et *Vasilcada*, respectivement. Les pourcentages de pertes en composés phénoliques des différents échantillons varient de 36 à 96%. Les variétés *Azzeradj de Seddouk* (96%) et *Grosse du Hamma* (82%) marquent des pourcentages de perte en polyphénols les plus élevés. Elles semblent être les variétés les plus vulnérables au traitement d'élaboration. Ceci peut être alors justifié par la dissimilitude des caractéristiques intrinsèques en termes de caractères pomologiques et la composition de la microflore de chaque variété. D'après Poiana et Romeo, (2006), la vitesse de diffusion des molécules polaires dans la saumure est bien corrélée avec la perméabilité et l'épaisseur de l'épicarpe ainsi que la teneur en matière sèche et grasse propre à chaque variété. De plus, Landete *et al.* (2010) rapportent que la fermentation et la désamérisation biologique sont des facteurs inducteurs d'une réduction du contenu phénolique dont la cinétique est fortement influencée par la composition de la microflore correspondante à chaque variété.

L'analyse de la variance des teneurs en polyphénols de nos olives confites et celles des échantillons commerciaux pour les mêmes variétés (*Sigoise*, *Sevilla*) n'a révélé aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) pour la variété *Sigoise*. Tandis que l'extrait de la variété *Sevilla* est plus riche en polyphénols totaux que l'échantillon commercial.

#### II.1.4. Teneurs en *ortho*-diphénols

L'analyse de la variance montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) dans les teneurs en *ortho*-diphénols au sein de la gamme variétale testée. Néanmoins, aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'est relevée entre *Gordal*, *Sevilla* et *Manzanilla* ni entre *Teffahi* et *Grosse du Hamma*, à l'état frais. Les teneurs en *ortho*-diphénols enregistrées pour les olives fraîches (figure 10) oscillent entre 1045,01 et 364,86 mg/100g MS, dont les limites supérieures et inférieures sont attribuées, respectivement, aux variétés *Azzeradj de Seddouk* et *Azzeradj de Tazmalt*.



**Figure 10:** Teneur en *ortho*-diphénols des échantillons d'olive.

\*Les valeurs portant des différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ );

\* Les barres verticales représentent les écarts types avec  $a < b$ .

Quant à l'état élaboré, ces variétés montrent des valeurs allant de 243,13 à 19,66 mg/100g MS, dont les limites supérieures et inférieures sont attribuées, respectivement, aux variétés *Gordal* et *Azzeradj de Seddouk*. Il est à noter que la variété *Azzeradj de Seddouk* renferme la teneur la plus importante en *ortho*-diphénols à l'état frais bien qu'elle enregistre

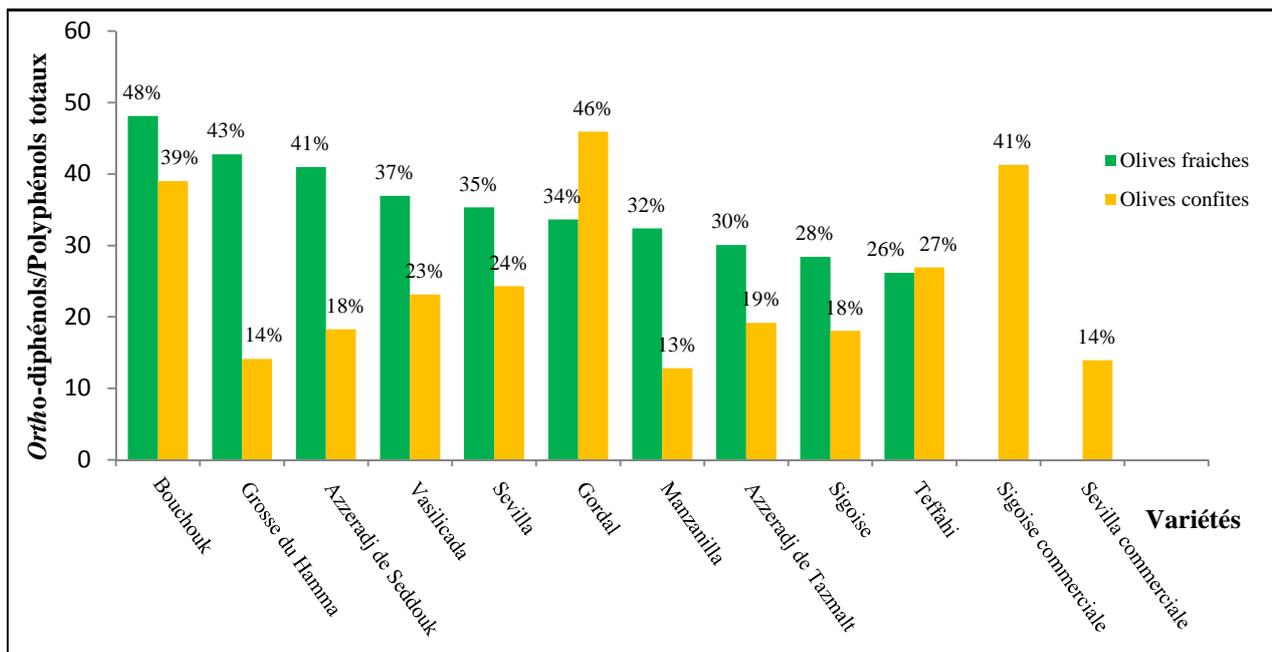
la teneur la plus faible après élaboration, ce qui coïncide avec la constatation ultérieure concernant la sensibilité de cette variété à la technologie d'élaboration selon le style espagnol.

Il apparaît que l'élaboration des olives suivant le style espagnol entraîne des pertes plus importantes en *ortho*-diphénols que celles enregistrées pour les polyphénols totaux qui sont évoquées en ordre décroissant comme suit : 98,11% ; 94,14% ; 90,57 % ; 82,94 % ; 76,98% ; 74,81% ; 72,67% ; 69,81% ; 60,06% pour les variétés *Azzeradj de Seddouk*, *Grosse du Hamma*, *Manzanilla*, *Azzeradj de Tazmalt*, *Teffahi*, *Sigoise*, *Sevilla*, *Bouchouk*, *Gordal* et *Vasilicada*, respectivement. Selon Kahouli, (2010) et Uyla er et Yıldız, (2013), cela peut être justifié par la diffusion irréversible des molécules hydrophiles, notamment, l'hydroxytyrosol, hydroxytyrosol 1-glucoside, hydroxytyrosol 4-glucoside, et l'acide caféique à cause de leur oxydation en conditions alcalines (López *et al.*, 2008). En plus, de leur brunissement par polymérisation chimique (Issaoui *et al.*, 2011) et leur biodégradation enzymatique via les polyphénols oxydases et les peroxydases (Piscopo *et al.*, 2014).

La comparaison des olives confites élaborés (*Sevilla*, *Sigoise*) avec les échantillons commerciaux, fait ressortir que l'extrait de la variété *Sevilla* est plus riche en *ortho*-diphénols que l'échantillon commercial et l'échantillon commercial de *Sigoise* renferme une teneur plus élevée que celle notée pour notre échantillon élaboré.

Globalement, les pertes en *ortho*-diphénols sont presque proportionnels aux pertes en polyphénols, une corrélation linéaire ( $r=0,95$ ) est notée entre les deux dosages.

Les rapports logiques *ortho*-diphénols/polyphénols totaux présentés sur la figure 11 montrent des variations qui peuvent expliquer les pertes enregistrées après l'élaboration des olives, exception faite pour la variété *Gordal* qui montre une élévation de 10% liée à la teneur initiale en polyphénols totaux, tandis que la variété *Teffahi* garde le même quotient. Ces rapport permettent de dire que la variation des teneurs en *ortho*-diphénols est relative à celle des polyphénols cela peut être expliqué par la prépondérance des *ortho*-diphénols dans les extraits phénoliques des olives vertes.

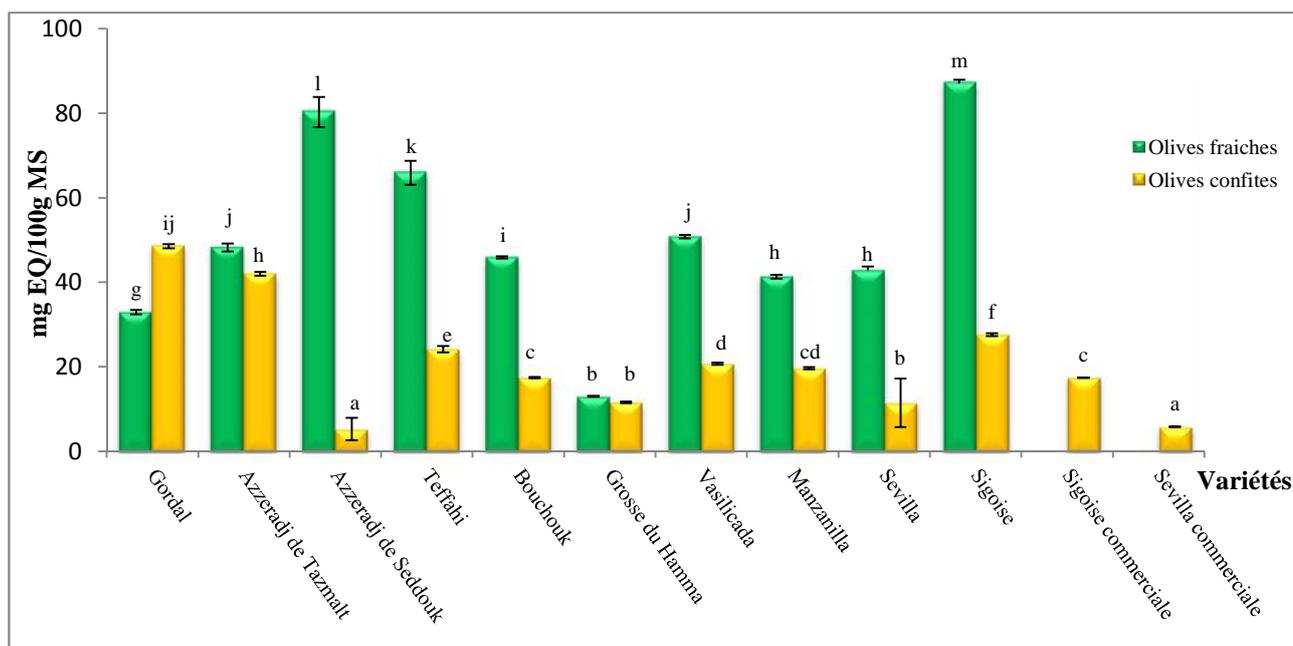


**Figure 11:** Quotients *ortho*-diphénols/polyphénols totaux des échantillons d'olive.

### II.1.5. Teneur en flavonoïdes

Les résultats obtenus présentés sur la figure 12, montrent que le contenu en flavonoïdes des extraits d'olive fraîches et confites varie fortement d'un échantillon à un autre ( $p < 0,05$ ).

Concernant les olives fraîches, Les teneurs en flavonoïdes enregistrées oscillent entre 87,03 et 13,01 mg /100g MS. Les plus importantes teneurs sont celles correspondantes aux variétés *Sigoise* (87,03 mg /100g MS), *Azzeradj de Seddouk* (80,25 mg /100g MS). Elles sont environ 7 fois plus élevées que celles enregistrées pour la variété *Grosse du Hamma* qui montre la plus faible teneur (13,01 mg /100g MS). Cependant ces valeurs sont inférieures aux résultats trouvés par Benlarbi, (2004) pour les mêmes variétés cultivées au nord-ouest Algérien qui varie selon cet auteur entre 214 et 260 mg/100g MS. Ces variations, observées peuvent être dues à la différence de degré de maturité des olives et les conditions pédoclimatiques et du solvant d'extraction (Sousa *et al.*, 2008; Conde *et al.*, 2008). En effet, les olives issues des oliviers cultivés à une faible altitude et à haute température, se montrent plus riches en flavonoïdes (Arslan et Özcan, 2010; Brahmi *et al.*, 2014).



**Figure 12:** Teneur en flavonoïdes des échantillons d'olive.

\*Les valeurs portant des différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ) ;

\* Les barres verticales représentent les écarts types avec  $a < b$ .

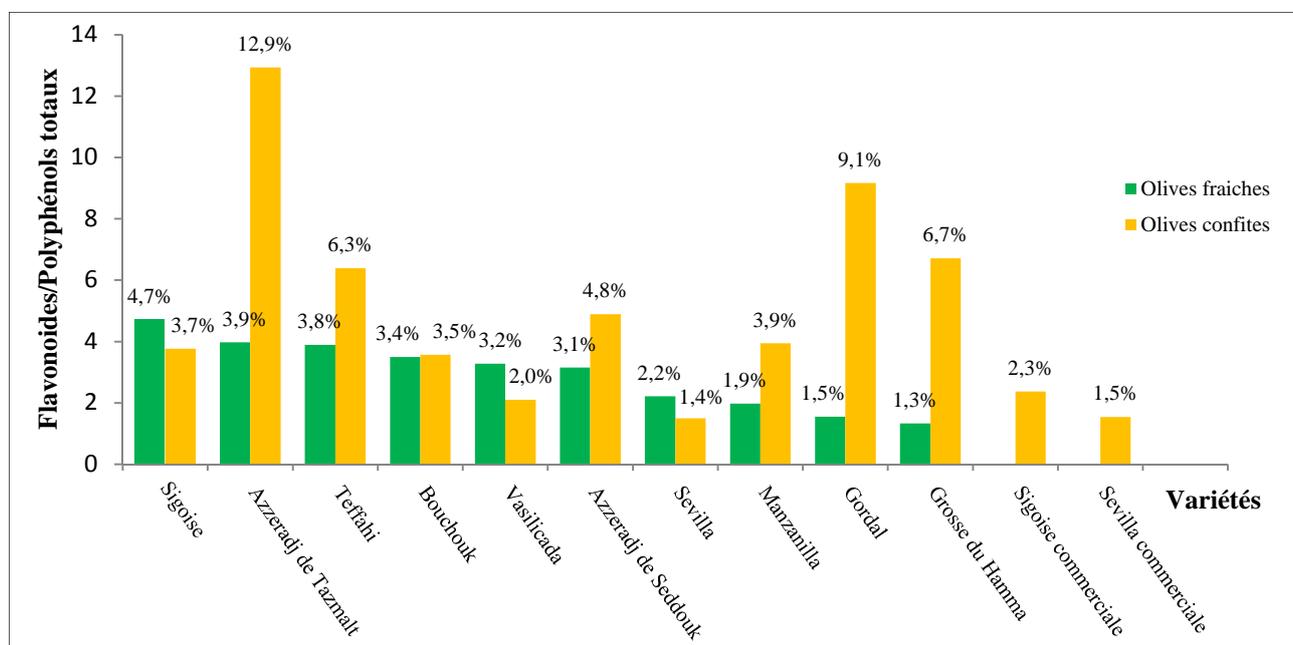
Après élaboration, les teneurs en flavonoïdes enregistrées oscillent entre 48,52 et 5,23 mg/100g MS. Les plus importantes teneurs sont celles correspondantes aux variétés *Gordal* (48,52 mg /100g MS) et *Azzeradj de Tazmalt* (41,96 mg /100g MS). Alors que la variété *Azzeradj de Seddouk* (5,23mg /100g MS) marque la plus faible teneur. Les pertes en flavonoïdes tributaire du procédé d'élaboration sont de l'ordre de 93,44 % (*Azzeradj de Seddouk*); 73,20% (*Sevilla*); 68,30% (*Sigoise*); 62,04 % (*Bouchouk*); 59,21% (*Vasilicada*) 52,45% (*Manzanilla*); 12,97% (*Azzeradj de Tazmalt*) et 10,91% (*Grosse du Hamma*). Il apparaît que les variétés *Grosse du Hamma* et *Azzeradj de Tazmalt* sont les plus résistantes en terme de perte en ces composés, car elles marquent les pourcentages de perte les plus faibles (10,91 et 12,97 %, respectivement). Alors que la variété *Gordal* manifeste un bouleversement en flavonoïdes entre l'état frais et élaboré, elle marque une élévation de 32,19% de la teneur en flavonoïdes après élaboration. Les pertes enregistrées en flavonoïdes sont moins prononcées comparativement à celles en *ortho*-diphénols. Selon Bastoni *et al.* (2001), ceci peut être relié à leurs polarités, poids moléculaire et leurs états physiques dans la pulpe. Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Hurtado *et al.* (2009) et Kiai et Hafidi, (2014) qui dévoilent 60% de perte en flavonoïdes pour les variétés Marocaines (*Ascolana*, *Sevillana*, *Languedoc Picholine*). D'après Kiai et Hafidi, (2014), la diffusion des flavonoïdes

est dépendante des cultivars, elle est rapide au stade primaire de fermentation mais reste lente à la fin du procédé, contrairement aux *ortho*-diphénols.

La comparaison des teneurs en flavonoïdes de nos olives confites et celles des échantillons commerciaux pour les mêmes variétés fait ressortir que nos olives confites sont plus riches en ces composés que les échantillons commerciaux avec des différences estimées à 22,6% pour la variété *Sigoise* et 32,8% pour la variété *Sevilla*.

En complément, une corrélation linéaire ( $r=0,76$ ) a été observée entre les teneurs en polyphénols totaux et celles correspondantes aux flavonoïdes.

Les fractions flavonoïdes/polyphénols totaux rapportés dans la figure 13 sont relativement faibles en comparaison avec celles enregistrées pour les *ortho*-diphénols. Ce qui laisse dire que la variation des flavonoïdes n'est pas relative à celle des polyphénols, ceci peut être expliqué par la prépondérance des polyphénols non flavonoïdiques (acides phénoliques, alcools phénoliques, secoiridoïdes...) dans les olives vertes. Ce qui coïncide avec les conclusions rapportées par Ryan *et al.* (1999) et Obied *et al.* (2008) dévoilant que les flavonoïdes ne constituent pas les composés majoritaires des polyphénols totaux des olives vertes.



**Figure 13:** Quotients flavonoïdes/polyphénols totaux des échantillons d'olive.

### II.1.6. Identification des composés phénoliques par HPLC

L'analyse qualitative des composés phénoliques par HPLC a été réalisée seulement pour sept variétés parmi l'ensemble des variétés étudiées notamment *Azzeradj de Seddouk*, *Gordal*, *Sevilla*, *Sigoise*, *Teffahi*, *Bouchouk* et *Azzeradj de Tazmalt*.

Les résultats obtenus pour les olives fraîches montrent (tableau XII) des profils phénoliques relativement similaires en terme qualitatif mais différents du point de vue quantitatif, avec un nombre considérable de constituants. Cependant ces profils montrent un bouleversement dans leur composition entre l'état frais et l'état confit, car des différences significatives ont été notées ( $p < 0,05$ ). Le profil en composés phénoliques révélé pour l'ensemble des variétés d'olives fraîches est le suivant:

- ✓ Les secoiridoïdes : ligstroside, oleuropéine et dérivés.
- ✓ Les flavonoïdes : quercitine -3galactoside.
- ✓ Alcools phénoliques : hydroxytyrosol, tyrosol, hydroxytyrosol-4' -O-glucoside.
- ✓ Acides phénoliques : verbascosides et dérivés, dérivés de l'acide caféique.

Ce profil est similaire à celui observé par d'autres auteurs pour des variétés Tunisiennes (Ben Othman *et al.*, 2009), Turques (Sahan *et al.*, 2013) et Italiennes (Piscopo *et al.*, 2014).

L'oleuropeine est le composé phénolique majoritaire des olives fraîches, sa proportion varie entre 25,43% (*Sevilla*) et 39,10% (*Gordal*). Cette constatation coïncide avec les résultats rapportés par Ben Othman *et al.* (2009). La variété *Azzeradj de Seddouk* renferme la teneur la plus élevée (994,267mg/100g MS), tandis que la variété *Bouchouk* ne présente aucune trace de ce composé. Ces fluctuations des teneurs en ce composé sont reliées au processus métabolique qui pourrait survenir à l'intérieur des fruits et qui est d'après Leonardi et Macciola, (2002) caractéristique de chaque variété. Après élaboration des olives, la teneur en oleuropeine diminue d'une manière spectaculaire pour atteindre une concentration nulle, due à sa dégradation alcaline et son hydrolyse par la flore microbienne indigène de l'olive (Brainte *et al.*, 2000). Toutefois, la variété *Sigoise* préserve une teneur en oleuropeine estimée à 184,29 mg/100g, probablement due à une dégradation partielle de ce composé, suite à une désamerisation insuffisante.

Les variétés étudiées renferment des teneurs nettement plus élevées en oleuropeine par rapport aux variétés Tunisiennes (Ben Othman *et al.*, 2009), Turques (Sahan *et al.*, 2013) et Italiennes (Piscopo *et al.*, 2014); ceci confirme l'influence du cultivar et de l'origine géographique sur le contenu phénolique des olives.

Tableau XII: Composition en polyphénols des olives fraîches et confites.

	<i>Azzeradj de Seddouk</i>	<i>Gordal</i>	<i>Sevilla</i>	<i>Sigoise</i>	<i>Teffahi</i>	<i>Bouchouk</i>	<i>Azzeradj de Tazmalt</i>
<b>Composés phénoliques (mg/100g MS)</b>							
<b>Oleuropeine</b>	F : 994, 267±26,64 <sup>g</sup> C : 0, 00±0,00 <sup>a</sup>	836,42±40,56 <sup>f</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	563,66±15,43 <sup>e</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	433 ,03±0,00 <sup>d</sup> 184,29±49,27 <sup>d</sup>	270,16±81,29 <sup>c</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	427,03 ±24,71 <sup>d</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Oleuropeine -der</b>	F : 375, 63±0,23 <sup>f</sup> C : 0, 00±0,00 <sup>a</sup>	164,62±5,53 <sup>d</sup> 233,23±13,68 <sup>e</sup>	164,51±11,34 <sup>d</sup> 129,15±54,85 <sup>cd</sup>	167,79±0,00 <sup>d</sup> 124,43±24,02 <sup>cd</sup>	105,45±21,04 <sup>bc</sup> 79,84±11,19 <sup>bc</sup>	78,75±10,93 <sup>bc</sup> 56,65±6,21 <sup>b</sup>	170,43 ±9,72 <sup>d</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Hydroxytyrosol</b>	F : 255 ±72 ,15 <sup>g</sup> C : 105,97 ±12 ,2 <sup>bc</sup>	159,39±16 ,05 <sup>c</sup> 45,68 ± 1,49 <sup>a</sup>	168,98 ±5,01 <sup>e</sup> 545,42 ±13,24 <sup>f</sup>	445,5 ±0,00 <sup>f</sup> 98,80 ±19,8 <sup>b</sup>	29,79±0,00 <sup>a</sup> 14,49 ± 1,49 <sup>a</sup>	23,21 ±0 ,68 <sup>a</sup> 100,60 ±1,65 <sup>b</sup>	135,342 ±11,37 <sup>b</sup> 38,22 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Hydroxytyrosol-Glu</b>	F : 141,64 ±7,06 <sup>d</sup> C : 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>	257,97± 31,75 <sup>e</sup> 80,23±5 ,18 <sup>c</sup>	172 ,93±16,54 <sup>de</sup> 81,03±7,90 <sup>c</sup>	99,00±0 ,00 <sup>c</sup> 71,10±9,58 <sup>bc</sup>	38,51±0,00 <sup>abc</sup> 14,66± 2,85 <sup>ab</sup>	61,35±1,77 <sup>bc</sup> 16,72±1,56 <sup>ab</sup>	174,81 ±23,86 <sup>d</sup> 64,52 ±0,00 <sup>bc</sup>
<b>Verbascoside</b>	F : 391, 08±5,50 <sup>d</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	200,84±12,32 <sup>c</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	393,30±6,63 <sup>d</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	407,54±0,00 <sup>d</sup> 131,58±18,34 <sup>b</sup>	138,57±0,00 <sup>b</sup> 0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	207,03 ±20,06 <sup>c</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Verbascoside-der</b>	F : 215, 57±42,27 <sup>bc</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	151,44±14,17 <sup>bc</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	270,12±3,35 <sup>c</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	306,47±0,00 <sup>d</sup> 100,57±25,48 <sup>ab</sup>	106,54±14,57 <sup>ab</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	104,40 ±6,37 <sup>ab</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Quercetine 3-Galactoside</b>	F : 205,29±0,61 <sup>c</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	356,65±26,98 <sup>e</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	188,22±19,59 <sup>c</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	256,77±0,00 <sup>d</sup> 120,92±32,78 <sup>c</sup>	109,47±16,68 <sup>b</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	187,73 ±12,76 <sup>c</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Tyrosol</b>	F : 53,23±0,55 <sup>e</sup> C : 37,27±0,73 <sup>c</sup>	84,08±2,10 <sup>g</sup> 43,65±1,09 <sup>d</sup>	80,13±1,94 <sup>fg</sup> 106,49±0,26 <sup>h</sup>	76,60±0,00 <sup>f</sup> 35,84±8,76 <sup>c</sup>	25,44±0,00 <sup>b</sup> 24,38±0,00 <sup>b</sup>	22,26± 0,16 <sup>b</sup> 27,60±4,23 <sup>b</sup>	48,72 ±0,47 <sup>e</sup> 24,35 ±0,00 <sup>b</sup>
<b>Ligstroside</b>	F : 334,89±86,71 <sup>e</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	164,39±3,95 <sup>d</sup> 0,00± 0,00 <sup>a</sup>	140,06±3,90 <sup>cd</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	70,31±0,00 <sup>ab</sup> 52,68± 16,76 <sup>ab</sup>	86,02±3,91 <sup>bc</sup> 51,10±0,00 <sup>ab</sup>	65,30±8,64 <sup>ab</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	114,52 ±3,79 <sup>d</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Acide benzoïque/Acide cinnamique-der</b>	F : 0,00±0 ,00 <sup>a</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 195,22±14,81 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 154,37±4,11 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 37,16±2,55 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 51,26±2,35 <sup>c</sup>	0,00 ±0,00 <sup>a</sup> 133,94 ±0,00 <sup>e</sup>
<b>Acide Benzoïque -der</b>	F : 0,00± 0,00 <sup>a</sup> C : 312,23± 26,32 <sup>c</sup>	476,08±7,01 <sup>f</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	195,75±37,6 <sup>c</sup> 295,45±34,64 <sup>de</sup>	471,13±0,00 <sup>f</sup> 258,66±51,56 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 101,69±20,31 <sup>b</sup>	97,98±7,16 <sup>b</sup> 195,80±3,32 <sup>c</sup>	0,00 ±0,00 <sup>a</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Hydroxytyrosol-acide elenolique</b>	F : 295,68±17,74 <sup>f</sup> C : 0,00±0,00 <sup>a</sup>	98,90±2,35 <sup>c</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	159,82±5,79 <sup>e</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	121,96±0,00 <sup>d</sup> 74,102±21,88 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	110,84 ±7,71 <sup>cd</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Acide caffeique-der</b>	F : 133, 57±10,95 <sup>bc</sup> C : 35,37±3,76 <sup>a</sup>	221,95±33,78 <sup>e</sup> 197,86±22,65 <sup>cde</sup>	212,91±16,13 <sup>de</sup> 141,38±3,27 <sup>bc</sup>	146,25±0,00 <sup>bc</sup> 156,4±59,13 <sup>bcd</sup>	142,95±35,82 <sup>bc</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	107,26±1,80 <sup>b</sup> 56,42± 3,08 <sup>a</sup>	136,23±27,20 <sup>bc</sup> 0,00 ±0,00 <sup>a</sup>
<b>Flavonoides</b>	F : 231, 51±34,72 <sup>g</sup> C : 0, 00±0,00 <sup>a</sup>	215,93±8,10 <sup>fg</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	103,54±16,1 <sup>cd</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	149,81±41,63 <sup>de</sup> 142,72±0,00 <sup>de</sup>	137,74±33,06 <sup>de</sup> 47,09±10,49 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup> 0,00±0,00 <sup>a</sup>	185,90±4,38 <sup>ef</sup> 76,93±0,00 <sup>bc</sup>

\*-der : dérivés, Hydroxytyrosol-Glu : hydroxytyrosol-4' -O-glucoside.

Le verbascoside est le second composé abondant dans les olives fraîches avec des valeurs allant de 138,57 (*Teffahi*) à 407,54 mg/100g (*Azzeradj de Seddouk*), tandis que la variété *Bouchouk* ne présente aucune trace de ce composé. Après élaboration des olives, l'évolution de la teneur en ce composé est similaire à celle notée pour l'oleuropeine, exception faite pour la variété *Sigoise* qui détient une teneur en verbascoside estimée à 131,58 mg/100g.

Les teneurs en ligstroside des olives fraîches varient entre 65,30 (*Bouchouk*) et 334,89mg/100g (*Azzeradj de Seddouk*), alors que, les olives confites marquent une absence de ce composé (sauf pour les variétés *Sigoise* et *Teffahi*) relative à son hydrolyse alcaline en tyrosol (Servili *et al.*, 2004).

Concernant la quercétine 3- galactoside, les teneurs enregistrées pour les olives fraîches varient de 109,47mg/100g (*Teffahi*) à 356,65 mg/100g (*Gordal*) à l'exception de la variété *Bouchouk* qui marque l'absence de ce composé. Ces teneurs sont largement supérieures à celles rapportées par Piscopo *et al.* (2014). Les olives confites marquent une absence de ce composé à l'exception de la variété *Sigoise* qui présente une teneur appréciable estimée à 120,92 mg/100g.

Quant aux hydroxytyrosol et tyrosol, les olives fraîches renferment des teneurs allant de 23,21 à 445,5mg/100g et de 22,26 à 84,26mg/100g, respectivement. La plus part des variétés montrent des réductions importantes de ces teneurs après élaboration. Cette observation ne coïncide pas avec celle rapportée par Sahan *et al.* (2013) qui note une augmentation des teneurs en ces composés après élaboration relative à l'hydrolyse alcaline des secoiridoïdes, notamment les 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA et 3,4-DHPEA-EA (Servili *et al.*, 2004). Ceci est justifié alors par la diffusion de ces composés polaires vers la saumure et/ou par leur oxydation durant la phase de désamerisation (Pasqualone *et al.*, 2014).

Après élaboration des olives, on constate que l'hydroxytyrosol est le composé majoritaire dans tous les échantillons analysés, dont il représente des teneurs allant de 14,42mg/100g (*Teffahi*) à 545,42mg/100g (*Sevilla*). De plus, on note l'apparition de nouveaux composés phénoliques à savoir l'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique dans les variétés *Gordal*, *Sevilla*, *Teffahi*, *Bouchouk* et *Azzeradj de Tazmalt*.

## II.2. Déterminations sur le pouvoir antimicrobien des olives

### II.2.1. Résultats de l'activité antimicrobienne testée par la méthode de diffusion

L'activité antimicrobienne des extraits des olives fraîches et confites vis-à-vis de huit souches bactériennes est évaluée qualitativement et quantitativement par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des CMI.

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 exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition. Sousa *et al.* (2006) ont distingué différents niveaux d'activité des extraits en se basant sur le diamètre (D) des zones d'inhibitions: aucune activité :  $D < 1\text{mm}$ , faible activité :  $2 \leq D < 3\text{ mm}$ , activité intermédiaire :  $4 \leq D < 5\text{mm}$ , forte activité:  $6 \leq D < 9\text{ mm}$  et très forte activité :  $D \geq 9\text{mm}$ .

Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des olives fraîches et confites sont consignés dans le tableau XIII. Ils révèlent que ces extraits exercent à la même concentration (105 mg/ml) un effet antibactérien considérable avec un large spectre d'action recouvrant les bactéries Gram positif et négatif.

Les diamètres d'inhibition enregistrés démontrent un effet inhibiteur significatif sur la croissance des souches testées avec *S. aureus* comme espèce la plus sensible. Toutefois, aucun extrait n'a exercé un effet positif vis-à-vis de *SARM*, ce qui permet de qualifier cette souche d'être résistante aux molécules bioactifs constitutifs des olives de table vertes.

Comme contrôle négatif, le méthanol/eau (80/20) n'a affecté en aucun cas la croissance des souches bactériennes aux concentrations utilisées dans cette étude, ce qui coïncide avec les résultats obtenus par Korukluoglu *et al.* (2010).

**Tableau XIII** : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne des extraits méthanoliques d'olives exprimés en millimètre.

Variétés d'olive	Etat des olives	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	SARM	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Gordal</i>	F	21,50±0,50 <sup>j</sup>	6,50±0,50 <sup>a</sup>	6,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	6,50±0,50 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	2,75±0,25 <sup>a</sup>	8,00±0,00 <sup>d</sup>
	C	6,00±0,00 <sup>a</sup>	6,00±1,00 <sup>a</sup>	4,00±0,00 <sup>a</sup>	--	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	4,25±0,25 <sup>a</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	5,50±0,5 <sup>abc</sup>
<i>Azzeradj de Tazmalt</i>	F	11,50±0,50 <sup>bc</sup>	7,00±1,00 <sup>a</sup>	6,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	6,50±0,50 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	5,25±0,25 <sup>abc</sup>	--
	C	5,50±0,50 <sup>a</sup>	6,50±0,50 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	6,00±0,00 <sup>abcd</sup>	4,00±0,00 <sup>a</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	4,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>Azzeradj de Seddouk</i>	F	24,50±0,50 <sup>j</sup>	7,50±1,50 <sup>a</sup>	8,50±0,50 <sup>c</sup>	--	5,50±0,50 <sup>abc</sup>	9,00±1,00 <sup>e</sup>	5,25±0,75 <sup>abc</sup>	7,00±1,00 <sup>cd</sup>
	C	5,50±0,50 <sup>a</sup>	5,50±1,50 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	6,00±1,00 <sup>bcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	5,50±0,50 <sup>abc</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>
<i>Teffahi</i>	F	20,00±1,00 <sup>ghi</sup>	7,00±0,00 <sup>a</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	7,00±0,00 <sup>abcd</sup>	7,00±1,00 <sup>bcd</sup>	5,62±0,37 <sup>abc</sup>	6,50±0,50 <sup>bcd</sup>
	C	8,50±1,00 <sup>a</sup>	5,25±0,75 <sup>a</sup>	4,00±1,00 <sup>a</sup>	--	6,00±0,00 <sup>abcd</sup>	6,00±1,00 <sup>abcd</sup>	5,50±0,00 <sup>abc</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>
<i>Bouchouk</i>	F	17,50±0,50 <sup>efgh</sup>	7,00±0,00 <sup>a</sup>	--	--	4,00±0,00 <sup>a</sup>	8,00±0,00 <sup>de</sup>	3,75±0,25 <sup>ab</sup>	6,00±0,00 <sup>ab</sup>
	C	14,50±1,00 <sup>def</sup>	6,50±0,50 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	6,00±0,00 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>	3,50±0,50 <sup>a</sup>
<i>Grosse du Hamma</i>	F	17,00±1,00 <sup>efg</sup>	6,00±0,00 <sup>a</sup>	4,25±1,25 <sup>ab</sup>	--	7,50±1,50 <sup>bcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	4,50±1,50 <sup>abc</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>
	C	7,00±0,50 <sup>a</sup>	6,50±0,50 <sup>a</sup>	4,50±1,50 <sup>ab</sup>	--	7,00±1,00 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	6,50±0,50 <sup>bc</sup>	--
<i>Vasilicada</i>	F	18,00±1,00 <sup>fgh</sup>	6,75±0,75 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	6,50±0,50 <sup>abcd</sup>	9,00±0,00 <sup>e</sup>	4,75±0,25 <sup>abc</sup>	--
	C	14,50±1,00 <sup>cdef</sup>	7,75±0,25 <sup>a</sup>	4,50±1,50 <sup>ab</sup>	--	5,50±0,50 <sup>abcd</sup>	8,00±0,00 <sup>cde</sup>	5,25±0,25 <sup>abc</sup>	--
<i>Manzanilla</i>	F	22,00±0,00 <sup>i</sup>	5,75±0,75 <sup>a</sup>	6,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	9,00±0,50 <sup>d</sup>	4,50±0,50 <sup>a</sup>	7,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±1,00 <sup>ab</sup>
	C	12,00±1,00 <sup>bcd</sup>	6,00±0,00 <sup>a</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	8,00±0,00 <sup>cd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	7,25±0,00 <sup>c</sup>	--
<i>Sevilla</i>	F	17,00±1,00 <sup>efgh</sup>	5,75±0,75 <sup>a</sup>	4,00±1,50 <sup>a</sup>	--	6,50±0,50 <sup>abcd</sup>	4,50±0,50 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>abc</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>
	C	16,50±0,50 <sup>efg</sup>	6,75±0,25 <sup>a</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	6,50±0,50 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>abcd</sup>	6,75±0,75 <sup>bc</sup>	5,00±0,00 <sup>abc</sup>
<i>Sigoise</i>	F	20,00±1,00 <sup>hi</sup>	6,00±0,00 <sup>a</sup>	4,00±1,00 <sup>a</sup>	--	5,50±0,50 <sup>abcd</sup>	6,50±0,50 <sup>ab</sup>	5,50±0,50 <sup>abc</sup>	8,00±0,00 <sup>d</sup>
	C	16,50±1,00 <sup>ef</sup>	6,50±0,50 <sup>a</sup>	5,00±1,00 <sup>ab</sup>	--	5,50±0,50 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	7,00±0,75 <sup>bc</sup>	4,00±1,00 <sup>a</sup>
<i>Sigoise commerciale</i>	C	16,50±0,25 <sup>ef</sup>	5,00±1,00 <sup>a</sup>	5,00±1,00 <sup>ab</sup>	--	5,00±1,00 <sup>abcd</sup>	5,00±1,00 <sup>ab</sup>	4,50±0,50 <sup>abc</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>
<i>Sevilla commerciale</i>	C	14,00±0,50 <sup>cde</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	4,50±0,50 <sup>ab</sup>	--	5,50±0,50 <sup>abcd</sup>	5,00±0,00 <sup>ab</sup>	4,25±0,25 <sup>abc</sup>	4,00±0,00 <sup>a</sup>

\*F : fraîche, C: confite.

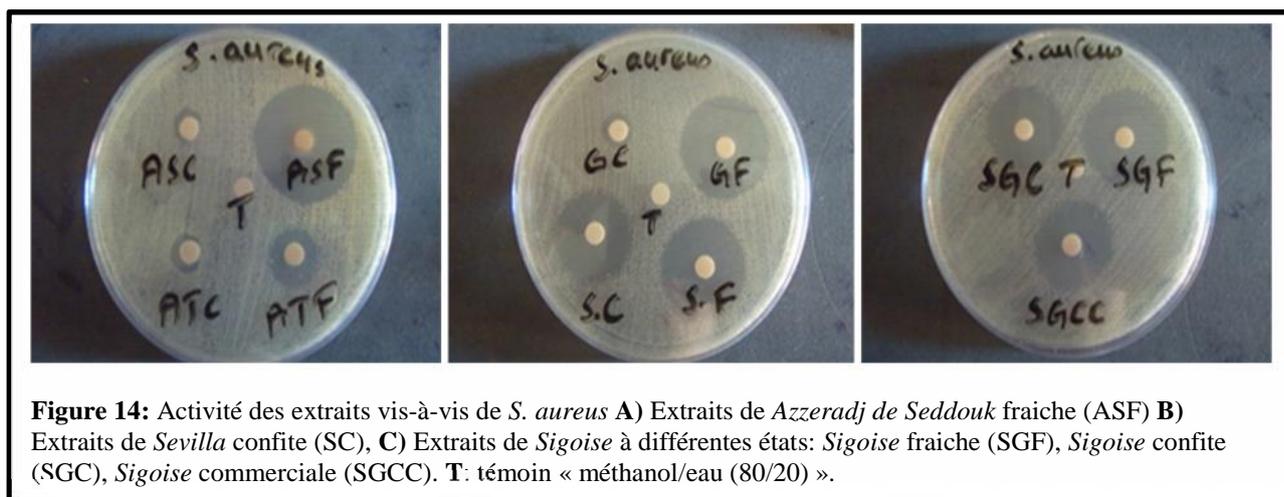
\*--: Pas de zone observée.

\* Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement (p&lt;0,05).

### ✓ Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis des bactéries à Gram positif

Toutes les souches à Gram positif testées ont manifesté une sensibilité vis-à-vis des différents extraits dont la plus prononcée est celle enregistrée pour *S. aureus*.

Concernant la souche *S. aureus*, des différences significatives ont été relevées entre les extraits des olives fraîches et confites ( $p < 0,05$ ). L'extrait des olives fraîches de la variété *Azzeradj de Seddouk* enregistre le plus grand diamètre d'inhibition (24,5mm) traduisant ainsi une meilleure activité antibactérienne de cette variété à l'égard de cette souche. Tandis que l'extrait de la variété *Azzeradj de Tazmalt* marque le plus faible diamètre d'inhibition (11,5mm). L'efficacité de l'extrait d'*Azzeradj de Seddouk* peut être due aux teneurs importantes en oleuropeine, verbascoside, ligstroside et quercetine notées pour cette variété. En effet, de nombreux auteurs ont rapporté que l'oleuropéine est le composé phénolique d'*Olea europea* le plus puissant sur les microorganismes (Aziz *et al.*, 1998; Bisignano *et al.*, 1999; Markin *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2007).



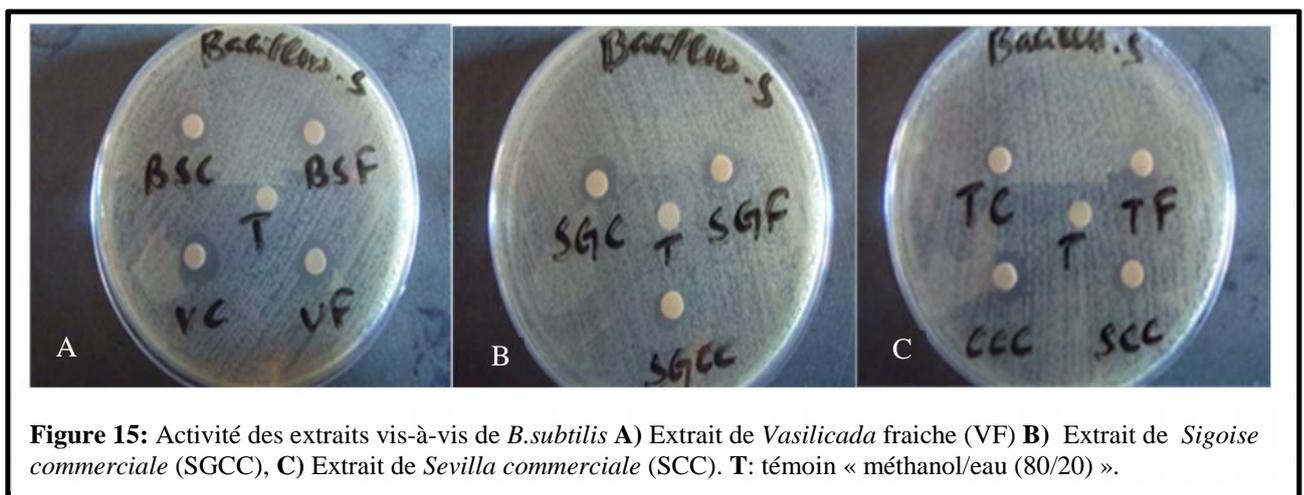
Après élaboration, c'est les extraits d'olives des variétés *Sevilla* et *Sigoise* qui exercent une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche, en enregistrant le plus grand diamètre d'inhibition (16,5 mm). Tandis que l'extrait de la variété *Azzeradj de Seddouk* marque le plus faible diamètre d'inhibition (5,5mm).

Il est à noter que l'extrait des olives fraîches de la variété *Azzeradj de Seddouk* qui exerce une meilleure activité à l'égard de cette cible enregistre la plus faible activité après élaboration. Cette observation est corrélée aux constatations ultérieures concernant les pertes considérable enregistrées en composés phénoliques pour cette variété.

Un premier diagnostic nous révèle que les effets antimicrobiens des extraits des olives fraîches sont nettement plus efficaces que ceux des olives confites. Ceci est montré par les réductions importantes des diamètres d'inhibition observées après élaboration des olives. La variation de la composition chimique des extraits interprète les variations observées de leur activité.

En complément, une corrélation significative a été observée entre les diamètres d'inhibitions enregistrés par ces extraits vis-à-vis de *S.aureus* et leur teneur en polyphénols totaux ( $r=0,85$ ), *ortho*-diphénols ( $r=0,79$ ), oleuropeine ( $r=0,67$ ), ligistroside ( $r=0,64$ ), hydroxytyrosol ( $r=0,63$ ), quercitine ( $r=0,61$ ), verbascoside ( $r=0,58$ ), dérivés d'acide caféïque ( $r=0,52$ ) et flavonoïdes ( $r=0,57$ ) (annexe 04).

Concernant la souche *B. subtilis*, aucune différence significative ( $p<0,05$ ) n'est révélée entre les effets inhibiteurs des extraits des olives fraîches et confites, dont les limites supérieures et inférieures des diamètres enregistrés (7,75 et 5mm) sont attribuées aux variétés *Vasilicada* et *Sigoise*, respectivement. Bien que les pertes enregistrées en composés phénoliques après élaboration sont considérables, les activités inhibitrices des olives confites à l'égard de cette souche sont relativement similaires à celles notées pour les olives fraîches. Ceci peut être attribué à l'évolution du profil phénolique des olives observée après leur élaboration, qui note la génération de l'acide benzoïque et des dérivés de l'acide cinnamique, composés réputés pour leur réactivité chimique (Macheix *et al.*, 2005).



**Figure 15:** Activité des extraits vis-à-vis de *B.subtilis* **A)** Extrait de *Vasilicada* fraîche (VF) **B)** Extrait de *Sigoise commerciale* (SGCC), **C)** Extrait de *Sevilla commerciale* (SCC). T: témoin « méthanol/eau (80/20) ».

Concernant la souche *L. innocua*, aucune différence significative ( $p<0,05$ ) n'est relevée entre les diamètres d'inhibitions observés pour les extraits des olives fraîches et confites, vis-à-vis de cette souche. Les extraits testés ont présenté un effet allant

d'intermédiaire à forte activité antimicrobienne à l'égard de cette cible. Le plus important diamètre d'inhibition obtenu pour les extraits des olives fraîches est celui montré par l'extrait de la variété *Azzeradj de Seddouk* (8,5mm). Alors que le plus faible diamètre d'inhibition est enregistré pour les variétés *Sevilla* et *Sigoise* (4mm). Après élaboration, les extraits phénoliques des olives confites présentent des diamètres d'inhibition relativement similaires (4 à 5mm). Il est à noter que la variété *Bouchouk* montre un effet négatif sur cette souche à l'état frais tandis qu'à l'état confit manifeste un diamètre d'inhibition de 4,5 mm traduisant ainsi une activité intermédiaire vis-à-vis de cette cible. Ceci peut être expliqué par l'augmentation considérable des teneurs en hydroxytyrosol (77,39%) et en dérivés d'acide benzoïque (50%) notées après élaboration pour cette variété. En effet, Medina et ses collaborateurs ont déjà démontré l'efficacité antimicrobienne de ces composés (2006). En complément, une corrélation linéaire a été observée entre les diamètres d'inhibition enregistrés par ces extraits vis-à-vis de *L. innocua* et leur teneur en oleuropeine ( $r=0,54$ ) (annexe 04).

#### ✓ **Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis des bactéries à Gram négatif**

L'analyse globale des résultats obtenus (tableau XIII) dévoilent une moindre efficacité des extraits testés vis-à-vis de *K. pneumoniae* par rapport aux autres bactéries Gram négatif testées à savoir *E. coli*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. Des différences significatives ( $p<0,05$ ) ont été enregistrées.

Les résultats obtenus pour *E. coli* sont comparables à ceux obtenus pour *A. baumannii*. L'extrait méthanolique de la variété *Manzanilla* s'avère le plus actif avant et après élaboration vis-à-vis de ces souches. Les diamètres d'inhibition notés sont de 9 et 8mm pour la souche *E. coli*, 7 et 7,25 pour la souche *A. baumannii*, avant et après élaboration, respectivement. Cependant, les extraits les moins performants sont ceux correspondants aux variétés *Bouchouk* pour *E. coli* (4mm) et *Gordal* pour *A. baumannii* (2,75mm). Une corrélation linéaire a été notée entre les diamètres d'inhibition enregistrés par ces extraits vis-à-vis de *A. baumannii* et leur teneur en hydroxytyrosol ( $r=0,53$ ) (annexe 04).

Concernant *P. aeruginosa*, les extraits des olives fraîches des variétés *Azzeradj de Seddouk* et *Vasilicada* enregistrent le plus grand diamètre d'inhibition (9mm) traduisant ainsi une forte activité antibactérienne de ces variétés à l'égard de cette souche. Tandis que l'extrait de la variété *Sevilla* et *Manzanilla* marque le plus faible diamètre d'inhibition (4,5mm). Après élaboration, les extraits des olives des variétés *Teffahi* et *Bouchouk* exercent une meilleure

activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche, en enregistrant le plus grand diamètre d'inhibition (6 mm). Tandis que l'extrait de la variété *Azzeradj de Tazmalt* marque le plus faible diamètre d'inhibition (4mm). En complément, une corrélation linéaire a été observée entre les diamètres d'inhibition enregistrés par ces extraits vis-à-vis de *P. aeruginosa* et leur teneur en *ortho*-diphénols ( $r=0,52$ ) (annexe 04).

Quant à *K. pneumoniae*, les extraits des olives fraîches des variétés *Gordal* et *Sigoise* enregistrent le plus grand diamètre d'inhibition (8mm) traduisant ainsi une forte activité antibactérienne de ces variétés à l'égard de cette souche. Tandis que l'extrait de la variété *Sevilla* marque le plus faible diamètre d'inhibition (5mm). Après élaboration, les extraits des olives des variétés *Gordal* enregistre le plus grand diamètre d'inhibition (5,5mm). Il est à noter que les extraits des variétés *Grosse du Hamma*, *Vasilicada* et *Manzanilla* ne montrent aucune zone d'inhibition indiquant ainsi la résistance de *K. pneumoniae* envers leurs extraits phénoliques.

L'efficacité des extraits de *Gordal* et *Sigoise* peut être tributaire aux teneurs importantes en flavonoïdes notées pour ces deux variétés. Ces composés connus pour leur pouvoir chélateur du fer, empêche la pénétration intracellulaire du cofacteur  $Ca^{2+}$  à la cellule bactérienne, ce qui provoque l'inhibition de leur activité enzymatique (Raj *et al.*, 2001). En outre, une corrélation linéaire a été observée entre diamètres d'inhibition enregistrés par ces extraits vis-à-vis de *K. pneumoniae* et leur teneur en polyphénols totaux ( $r=0,63$ ), *ortho*-diphénols ( $r=0,62$ ), flavonoïdes ( $r=0,50$ ) et en dérivés d'acide caféique ( $r=0,57$ ) (annexe04).

La comparaison des diamètres d'inhibition de nos olives confites et celles des échantillons commerciaux pour les mêmes variétés (*Sigoise*, *Sevilla*) vis-à-vis des bactéries Gram positif et négatif testées, fait ressortir que les extraits des olives commerciales exercent des activités antimicrobiennes comparables à celles obtenues pour nos olives élaborées.

Les effets antimicrobiens observés dans ce travail sont comparables dans la plupart des cas à ceux rapportés par Sousa *et al.* (2006). Leurs résultats affirment que l'activité antimicrobienne des extraits de la variété *Alcappara* va de faible à fort pouvoir antimicrobien.

Nous constatons à travers ces résultats que les effets antimicrobiens des extraits des olives fraîches et confites sont similaires vis-à-vis de *B. subtilis*, *L. innocua*, *E. coli*, *P.aeruginosa* et *A. baumannii*. Cette observation est relative à la génération après fermentation des olives de nouveaux composés doués d'un pouvoir antimicrobien et/ou à leur

action combinée avec d'autres composés phénoliques. En effet Sarker *et al.* (2005), signalent que l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait. En accord avec ces observations, Lee et Lee, (2010), ont constaté que l'effet antimicrobien de l'oleuropéine et de l'acide caféique est beaucoup plus important lorsque les deux composés sont appliqués sous forme combinée qu'individuelle. Ce qui rend difficile à corrélérer les activités antimicrobiennes de ces extraits à un composé spécifique en raison de leur complexité et leur variabilité (Bari *et al.*, 2010).

Confirmant les rapports précédents, il a été démontré que le spectre d'activité antimicrobienne varie selon le Gram des bactéries où les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles (A ao lu *et al.*, 2007; Derwich *et al.*, 2010). La résistance plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). En effet, la paroi des bactéries à Gram positif est riche en protéines tandis que chez les souches Gram négatif, elle est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS). Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé. Alors que les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à 50 000 Da (Inouye *et al.*, 2001; Bagamboula *et al.*, 2004; Upadhyay *et al.*, 2010). Cela semble avoir une nette corrélation avec nos résultats qui note une sensibilité plus prononcée de *S.aureus* en enregistrant les diamètres d'inhibition les plus importants.

### II.2.2. Détermination des CMI et CMBs sur milieu solide

Afin de déterminer l'efficacité des extraits, la détermination des CMI et CMBs (tableau XIV) s'avère primordiale pour les extraits qui se sont révélés actifs dans le test des disques. La détermination de ces deux paramètres a mis en évidence des niveaux d'activité antibactérienne variables entre les souches testées, entre les variétés et entre l'extrait d'olives fraîches et confites pour une même variété.

**Tableau XIV:** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits méthanoliques des différentes variétés d'olive avant et après élaboration.

Variétés d'olive	Etat des olives	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>SARM</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K.Pneumoniae</i>
		<i>CMI/CMB (mg/ml)</i>							
<i>Gordal</i>	F	2,40/2,40	9,60/10,00	5,20/6,40	NT	13,20/14,80	6,40/7,60	3,60/3,60	10,00/10,00
	C	6,40/6,40	9,60/10,80	6,80/9,60	NT	15,20/15,20	8,80/8,80	9,20/10,00	11,60/13,20
<i>Azzeradj de Tazmalt</i>	F	6,80/6,80	10,80/12,00	6,80/6,80	NT	15,60/16,00	5,60/5,60	4,40/4,40	NT
	C	15,20/15,20	18,00	18,00	NT	17,20/17,20	18,00	14,40/15,60	18,00
<i>Azzeradj de Seddouk</i>	F	3,60/3,60	6,80/7,20	4,00/5,20	NT	13,20/14,00	4,40/4,80	3,60/3,60	7,20/8,80
	C	14,00/14,00	18,00/18,00	14,80/16,40	NT	15,20/16,00	14,80/14,80	14,80/14,80	14,8/16,40
<i>Teffahi</i>	F	2,80/3,20	9,60/10,80	4,80/4,80	NT	15,20/15,20	6,80/6,80	6,80/6,80	10,80/12,00
	C	15,60/15,60	18,00	18,00	NT	18,00	18,00	18,00	18,00
<i>Bouchouk</i>	F	2,80/3,20	8,00/8,40	NT	NT	6,80/8,40	4,40/4,40	4,40/6,00	7,20/8,00
	C	8,40/8,40	11,60/13,20	9,20/9,60	NT	9,20/9,20	8,40/8,80	8,80/8,80	7,60/9,60
<i>Grosse du Hamma</i>	F	4,40/4,40	7,20/7,20	4,40/4,80	NT	13,20/16,80	5,20/6,80	5,20/6,40	9,60/10,80
	C	18,00	18,00	18,00	NT	18,00	18,00	18,00	NT
<i>Vasilicada</i>	F	4,40/4,40	7,60/12,00	6,80/6,80	NT	8,40/8,40	3,20/3,20	3,20/3,20	NT
	C	6,00/6,40	8,40/8,40	6,80/7,20	NT	15,60/15,60	8,80/8,80	8,80/10,80	NT
<i>Manzanilla</i>	F	2,00/2,40	6,80/6,80	3,20/3,20	NT	14,40/14,40	5,60/6,00	5,20/6,80	7,60/10,00
	C	8,80/8,80	15,60/15,60	8,80/9,20	NT	15,60/15,60	6,80/7,20	6,80/7,20	NT
<i>Sevilla</i>	F	6,80 /7,60	9,60/11,20	6,80/7,60	NT	6,00/7,20	4,40/4,40	4,40/4,40	7,20/15,00
	C	7,20/7,20	9,60/10,00	6,80/6,80	NT	18,00	18,00	18,00	18,00
<i>Sigoise</i>	F	3,60/3,60	8,00/9,60	3,60/4,40	NT	14,00/15,60	6,40/7,20	6,40/7,60	9,60/15,60
	C	7,60/7,60	9,20/9,60	7,60/7,60	NT	17,20/17,20	7,20/9,20	8,00/8,80	NT
<i>Sigoise commerciale</i>	C	4,40/4,40	9,60/9,60	7,60/7,60	NT	17,20/17,20	6,80/8,00	7,60/7,60	9,60/11,60
<i>Sevilla commerciale</i>	C	6,40/6,40	9,60/10,80	6,80/9,60	NT	15,20/18,00	6,80/8,80	6,80/9,20	8,00/9,20

CMI/CMB : valeur de la CMI/valeur de la CMB; \* NT: non testé.

Concernant la souche *S. aureus*, l'extrait d'olives fraîches des variétés *Manzanilla* est le plus actif à l'égard de cette souche, il enregistre des CMI et CMBs les plus faibles (2 et 2,4 mg/ml, respectivement). Tandis que l'extrait des variétés *Sevilla* et *Azzeradj de Tazmalt* révèlent les valeurs les plus élevées, soit une CMI de 6,8mg/ml et une CMB de 7,6 et 6,8mg/ml, respectivement. Après élaboration, les valeurs de CMI et CMBs sont plus élevées, car elles dépassent 18 mg/ml pour la variété *Grosse du Hamma* alors qu'elles se limitent à 6 mg/ml pour la variété *Vasilicada*.

Concernant la souche *B. subtilis*, on note une moindre efficacité des extraits par rapport à *S. aureus*. Les résultats révèlent une même CMI pour les extraits des olives fraîches des variétés *Azzeradj de Seddouk* et *Manzanilla* qui est de l'ordre de 6,8 mg/ml avec une CMB de 7,2 et 6,8mg/ml, respectivement. Tandis que les CMI et CMBs les plus élevées sont obtenues pour l'extrait de la variété *Azzeradj de Tazmalt* à savoir 10,8 et 12 mg/ml, respectivement. Après élaboration, ces valeurs oscillent entre 8,4 (*Vasilicada*) et 15,6 mg/ml (*Manzanilla*) à l'exception des variétés *Azzeradj de Tazmalt*, *Teffahi* et *Grosse du Hamma* dont les concentrations inhibitrices vis-à-vis de cette souche ne sont pas révélées à la plus grande concentration testée (18mg/ml).

Quant à *L. innocua*, l'extrait des olives fraîches de la variété *Manzanilla* montre les CMI et CMB les plus faibles (3,2 mg/ml). Tandis que les valeurs les plus élevées pour ces deux grandeurs sont celles obtenues pour *Sevilla*, *Azzeradj de Tazmalt* et *Vasilicada* (6,80mg/ml). Après élaboration, les valeurs de ces paramètres varient entre 6,8mg/ml (*Sevilla*, *Gordal* et *Vasilicada*) et 14,8mg/ml (*Azzeradj de Seddouk*), sauf pour les extraits des variétés *Azzeradj de Tazmalt*, *Teffahi* et *Grosse du Hamma* dont les concentrations inhibitrices vis-à-vis de cette souche ne sont pas révélées à la plus grande concentration testée (18mg/ml).

Concernant *P.aeruginosa* et *A. baumannii*, les valeurs de CMI et CMBs les plus faibles des olives fraîches sont celles enregistrées pour la variété *Vasilicada* (3,2mg/ml). Tandis que les valeurs les plus élevées pour ces deux grandeurs sont celles obtenues pour la variété *Teffahi* (6,8mg/ml). Après élaboration, les valeurs de ces paramètres varient entre 6,8 (*Manzanilla*) et 14,8mg/ml (*Azzeradj de Seddouk*), sauf pour les extraits des variétés *Sevilla*, *Teffahi* et *Grosse du Hamma* dont les concentrations inhibitrices vis-à-vis de ces souches ne sont pas révélées à la plus grande concentration testée (18 mg/ml).

D'après les résultats obtenus, il ressort que l'extrait des olives fraîches de la variété *Sevilla* enregistre les valeurs les plus faibles de CMI (6 mg/ml) et CMB (15,8 mg/ml) vis-à-vis de *E.coli*. Alors que la variété *Azzeradj de Tazmalt* enregistre les valeurs les plus élevées en CMI (15,2mg/ml) et CMB (16mg/ml). Cependant après élaboration, les valeurs de ces deux grandeurs varient de 9,2 (*Bouchouk*) à 17,2 mg/ml (*Azzeradj de Tazmalt*), sauf pour les extraits des variétés *Sevilla*, *Teffahi* et *Grosse du Hamma* dont les concentrations inhibitrices vis-à-vis de cette souche ne sont pas révélées à la plus grande concentration testée (18 mg/ml).

Pour *K. pneumoniae*, les extraits des olives fraîches des variétés *Sevilla*, *Azzeradj de Tazmalt* et *Bouchouk* montrent les valeurs les plus faibles de CMI (7,2 mg/ml) et CMBs (15; 8,8 et 8mg/ml, respectivement). Tandis que la valeur la plus élevée de CMI est notée pour *Teffahi* (10,8 mg/ml). Après élaboration, les valeurs de ces paramètres varient de 7,6 mg/ml (*Manzanilla*) à 14,8 mg/ml (*Azzeradj de Seddouk*), sauf pour les extraits des variétés *Sevilla*, *Teffahi*, *Azzeradj de Tazmalt* et *Grosse du Hamma* dont les concentrations inhibitrices vis-à-vis de cette souche ne sont pas révélées à la plus grande concentration testée (18mg/ml).

La comparaison des valeurs de CMI et CMB des olives confites préparées au laboratoire et celles des échantillons commerciaux pour les mêmes variétés (*Sigoise*, *Sevilla*), révèle que l'extrait phénolique des olives commerciales de la variété *Sigoise* présente de CMI et CMB comparables à celles obtenues pour nos olives élaborées vis-à-vis de *B. subtilis*, *L. innocua* et *E.coli*. Tandis que les valeurs de CMI et CMB enregistrées vis-à-vis de *S. aureus*, *P.aeruginosa* et *A. baumannii* sont inférieures à celles obtenues pour les olives élaborées au laboratoire. L'extrait des olives commerciales de la variété *Sevilla* présente de CMI et CMB supérieures à celles obtenues pour les olives élaborées au laboratoire vis-à-vis de *L. innocua* et *K. Pneumoniae*. Alors que les valeurs de CMI et CMB enregistrées vis-à-vis de *S. aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* et *A. baumannii* sont inférieures à celles obtenues pour les olives élaborées au laboratoire.

Les valeurs du rapport CMB/CMI des extraits testés sont comprises entre 0 et 2,08 (annexe 5). Ces valeurs demeurent largement inférieures à 4, limite établie par Canillac et Mourey, (2001) pour la catégorie des extraits à pouvoir bactéricide. Par conséquent, l'extrait phénolique du fruit d'*Olea europaea* est qualifié d'avoir un pouvoir bactéricide vis-à-vis les souches testées.

Les valeurs des CMI's enregistrées dans cette étude demeurent largement inférieures à celles rapportées par Sousa *et al.*, (2006), pour la variété *Alcaparra* (qui oscillent entre 10 et 50 mg/ml). Cette variation pourrait être à l'origine du facteur variétal et aux conditions climatiques et agronomiques dont sont issus les oliviers. Comme décrit par Aranda *et al.* (2003), ces facteurs influent les voies de la biosynthèse des plantes et par conséquent sur les proportions relatives de leurs principaux composés. Ce qui conduit à l'existence de chémotypes différents, représentatifs des extraits de différentes origines.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les extraits d'olives fraîches sont plus actifs vis-à-vis de l'ensemble des souches testées en présentant les valeurs de CMI's et CMB's les plus faibles. Ceci est corrélée aux constatations ultérieures concernant les pertes considérable en composés phénoliques enregistrées pour les olives confites. En outre, il apparaît que la souche *S. aureus* est l'espèce la plus sensible aux extraits phénoliques d'olives en enregistrant les valeurs de CMI's et CMB's les plus faibles. Tandis que la souche *E. coli* est l'espèce la plus résistante aux extraits phénoliques d'olives, elle enregistre les valeurs de CMI's et CMB's les plus élevées. Ces constatations se concordent avec l'ordre de résistance des souches établi par Sousa *et al.*, (2006) qui est évoqué dans l'ordre suivant: *E. coli* > *K. pneumoniae* > *B. subtilis* > *S. aureus*. Les résultats obtenus affirment la résistance de la souche *E. coli* même aux composés phénoliques des olives fraîches riches en oleuropeine. En effet, Tassou et Nychas, (1994) ont déjà confirmé la résistance d'*E.coli* envers l'oleuropéine purifiée due à sa capacité d'hydrolyser ce composé, ce qui provoque une baisse de l'activité antimicrobienne (Brainte *et al.*, 2000). Selon d'autres auteurs, la capacité de former un biofilm est une autre stratégie adoptée par certaines souches comme *P. aeruginosa* pour lutter contre les molécules bioactives (Abi-Aya *et al.*, 2011).

En fin et en comparaison avec les CMI's d'extrait méthanolique de la plante médicinale *Rhamnus alaternus* (*E.coli*, *S.aureus* et *E. faecalis* (6 mg/ml)) (Ben ammar *et al.*, 2008) et celles des grains de la plante aromatique *Foeniculum vulgare* (*S. aureus* (20 mg/ml), *E. coli* et *P. aeruginosa* (> 45 mg/ml)) (A ao lu *et al.*, 2007), l'extrait méthanolique du fruit d'*Olea europaea* s'avère une source prometteuse d'agent antibactériens.

# *Conclusion*

## Conclusion et perspectives

Le présent travail est entrepris dont le but d'étudier l'activité antibactérienne des extraits phénoliques des olives et afin d'évaluer l'effet du procédé d'élaboration selon le style espagnol sur l'activité antibactérienne des olives de table vertes.

Les résultats montrent que les différents paramètres analytiques sont fortement influencés par le facteur variétal et le procédé d'élaboration, car des différences significatives ont été révélées. La caractérisation quantitative des extraits phénoliques d'olives a révélé un contenu appréciable en polyphénols totaux dont la fraction *ortho*-diphénolique représente entre 26% (*Teffahi*) et 48% (*Bouchouk*). La variété *Azzeradj de Seddouk* se distingue des autres variétés par des teneurs les plus élevées en polyphénols, *ortho*-diphénols et flavonoïdes. Les résultats montrent que le contenu phénolique est fortement influencé par le procédé d'élaboration qui engendre des pertes dont les plus importantes sont estimées à 96% (polyphénols totaux), 98,11% (*ortho*-diphénols) et 93,44% (flavonoïdes) notées pour la variété *Azzeradj de Seddouk*. Les extraits des olives commerciales montrent des teneurs en ces composés relativement similaires à celles obtenues pour les mêmes variétés d'olives élaborées.

L'analyse qualitative des composés phénoliques des olives fraîches par HPLC montre un profil phénolique similaire en terme qualitatif caractérisé par la dominance de l'oleuropeine et verbascoside. Le procédé d'élaboration engendre des pertes de l'ordre de 100% en oleuropeine, verbascoside, ligstroside et la quercetine 3- galactoside, traduisant l'absence totale de ces composés dans les olives confites, sauf pour la variété *Sigoise* qui préserve des teneurs plus au moins importantes en ces composés. Le profil phénolique des olives confites se caractérise par la dominance de l'hydroxytyrosol et la présence de l'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'olives par la méthode de diffusion révèle que tous les extraits testés exercent un effet inhibiteur significatif sur la croissance des souches testées, avec des zones d'inhibition variables. Toutefois, aucun extrait n'a exercé un effet positif vis-à-vis de *SARM* ce qui permet de qualifier cette souche d'être résistante aux molécules bioactives constitutives des olives vertes. Aussi, les extraits d'olives fraîches étudiées présentent une activité antibactérienne, particulièrement intéressante contre *S.aureus*, *L. innocua*, *P.aeruginosa* et *A. baumannii*. Par ailleurs, les plus faibles concentrations minimales inhibitrices et bactéricides sont obtenues avec l'extrait de la

variété *Manzanilla* vis-à-vis de *S.aureus* et avec l'extrait de la variété *Vasilicada* vis-à-vis des souches *P.aeruginosa* et *A. baumannii*. Après élaboration l'efficacité de ces extraits diminue significativement en enregistrant des CMI et CMBs plus élevés. Les extraits des olives commerciales et ceux de nos olives élaborées des mêmes variétés (*Sevilla*, *Sigoise*) montrent des activités antibactériennes variables selon la souche testée.

Au terme de cette étude, il est à noter que l'extrait d'olives fraîches de la variété *Azzeradj de Seddouk* constitue une source naturelle prometteuse en divers composés phénoliques doués d'une activité antibactérienne importante. Cet extrait serait à recommander pour l'exploitation de nouvelles sources naturelles bioactives et leur adoption comme une alternative aux molécules synthétiques. Cependant, et malgré l'importance des pertes engendrées par le procédé d'élaboration en ces composés bioactifs, les olives de table montrent une activité antimicrobienne appréciable, ce qui confirme l'intérêt de leur consommation dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces résultats restent partiels et d'autres travaux s'imposent car les approches restent globales, il serait alors intéressant de :

- Approfondir l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits d'olives en faisant appel aux tests *in vivo* pour une meilleure évaluation de cette activité biologique.
- Etudier l'activité antifongique de ces extraits.
- Purifier les polyphénols constitutifs de l'extrait d'olives et déterminer leurs activités antimicrobienne séparément et combinés pour faire ressortir l'effet synergique entre ces molécules.
- Procéder à l'optimisation des différentes étapes du procédé d'élaboration du style espagnol afin de réduire les pertes en composés phénoliques.
- Développer une nouvelle formulation à base d'extrait d'olive servant d'alternative aux molécules thérapeutiques et agents conservateurs synthétiques utilisés tant dans le domaine pharmaceutique que agroalimentaire.

# *Références bibliographiques*

A

- Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F.Z., Lazzouni, H.A., and Rebiahi, S.A., (2011).** Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 1 (1): pp. 33-36.
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., and Gálvez, A. (2011).** Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented *Aloreña* green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 487–496.
- Agaoglu, S., Dostbil, N., and Alemdar, S., (2007).** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, pp.53-57.
- Ajila, C.M., & Brar, S.K., (2012).** Chapter 16: Role of Dietary Antioxidants in Cancer, In: Nutrition, Diet and Cancer, Shankar, S. et Srivastava, R.K. (eds.), *Springer Science & Business Media B.V.* pp. 384-404.
- Allalout, A., Krichène, D., Methenni, K., Taamalli, A., Daoud, D., and Zarrouk M. (2011).** Behavior of super-intensive spanish and greek olive cultivars grown in northern Tunisia. *Journal of Food Biochemistry*, 35:27-43.
- Alvarez, D.M.E., Sánchez, A., Lamarque, A.L. (2003).** Naturally black olives: comparison of three processes for fermenting cv. ‘Farga’ olives. *Olivae* 97, 47–51.
- Alves, M., Gonçalves, T., and Quintas, C. (2012).** Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives’ fermentations. *Food Control* 23, 363–368.
- Amiot, M.J., Fleuriot, A. and Macheix, J. J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during maturation. *Phytochemistry*, 28:67-69.
- Amouretti, C. et Comet, G. (2000).** Le livre de l'olivier. Edisud, 191.
- Andrewes, P., Busch, J.L.H.C., Joode T., Groenewegen, A., Alexandre, H. (2003).** Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:1415-1420.
- Apak, R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Esin Çelik S., Bekta o lu B., Berker K.I. & Özyurt D. (2007).** Review: Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C. M., and Moschetti, G. (2010).** Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol.* 27, 162–170.

**Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., and Moschetti, G. (2012).** Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiol.* 30, 8–16.

**Aranda, M.P., Villa, V.M., Trejo, L. (2003).** El Portal Latino Alzheimer's project model program for Latino caregivers of Alzheimer's disease-affected people. *Social Work*, 48(2), 259-272.

**Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z. (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282–291. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005.

**Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2008).** Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 189–196. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018.

**Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Segovia-Bravo, K.A., García-García, P., Durán-Quintana, M.C., Romero, C., Rodríguez-Gómez, F. & Garrido-Fernández, A. (2009).** Instability profile of fresh packed “seasoned” Manzanilla-Alorenza table olives. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie - Food Science and Technology*, 42, 1629–1639.

**Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P. (2012).** Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 42–49. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003.

**Arslan, D. & Özcan, M.-M. (2011).** Phenolic profile and antioxidant activity of olive fruits of the Turkish variety “Sarıulak” from different locations. *Grasas y Aceites*, 62, 453-461.

**Aziz NH, Farag SE, Mousa LA et Abo-Zaid MA. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. Vol. 93. (1998). pp. 43-54.

## B

**Babar, A. M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, 12: 607-621.

**Baccouri, B., Ben Temime, S., Taamalli, W., Daoud, D., Msallem, M., and Zarrouk, M. (2007).** Analytical characteristics of virgin olive oil from two new varieties obtained by controlled crossing on Meski variety. *Journal of Food and Lipids*, 14:19-34.

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

- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., and Debevere, J., (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21: pp. 33-42.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin JC., Pinkas M., Luycky M., & Gazin M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Drug Research*, 16.
- Balatsouras, G. (1997).** Chapitre 8: méthodes d'élaboration des olives de table. In : Encyclopédie de l'olivier, conseil oléicole international (Ed.). Edition COI. pp. 297-341.
- Bari, M.A., Islam, W., Khan, A.R., and Mandal, A., (2010).** Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, 12: pp. 386-390.
- Bastoni, L., Bianco, A., Piccionni, F. & Ucella, N. (2001).** Biophenolic profil in olives by nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 73, 145-151.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2011).** Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 89–96. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013
- Bautista-Gallego, J., Arroyo López, F. N., Romero, G.V., Rodríguez-Gómez, F., García García, P. & Garrido Fernández, A. (2011a).** Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation, *Food Microbiology*, 28, 1316-25.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., and Cocolin, L. (2013).** Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res. Int.* 50, 135–142. doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.004.
- Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L et al. (2008).** Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.*31: 61-80.
- Bendini A., Bonoli M., Cerroni L., Bigguzi B., Lercker G. et Toschi T.G. (2003).** Liquid liquid and solide-phase extractions of phenols from virgin olives oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 985:425-433.
- Bendini, A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca ,A.M., SeguraCarretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. et 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*, 12:1679-1719.
- Benlarbi, F. (2004).** Caractérisation des lipides et des phénols de quelques groupes d'oliviers d'Algérie. Mémoire de magister. Laboratoire des sciences fondamentales. Université de Laghouat, p 70-86-88.

- Ben Othman, N., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. & Hamdi, M. (2009).** Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662–669.
- Besnard, G., Baradat, P. et Bervillé, A. (2001).** Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 102:251-258.
- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., and Ouoba, L. I. I. (2010).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian *Bella di Cerignola* table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. *J. Food Sci.* 75, 536–544.
- Bianchi . (1999).** Extraction Systems and olive oil. *OCL*, 6: 49 - 55.
- Billerbeck V.-G., Roques C., Vanière P., Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*. 3 (10) : 248-251.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. Vol. 51. (1999). pp. 971 4.
- Bisset, S. (2011).** Activité antioxydante et inhibitrice vis-à-vis de l'élastase d'extrait des polyphénols d'olive (*Olea europaea* L.). Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas Sétif.
- Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A. & Andrikopoulos, N.K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market, *Food Chemistry* 94: 558-564.
- Borzillo, A., Iannotta, N. & Uccella, N. (2000).** Oinotria table olives: quality evaluation during ripening and processing by biomolecular components. *European Food Research and Technology*, 212, 113–121.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., and Kechaou, N. (2009).** Composition on the total phenol contents and the color of flesh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 412-419.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. & Hammami, M. (2014).** Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 169–178.
- Brainte, R., Francesco, LC., Ferdinando, F., Maurizio, P., Roberto, N. (2000).** Hydrolysis of Oleuropein by recombinant  $\beta$ -glycosidases from hyperthermophilic *Archea sulfolobus* immobilised on chitosan matrix. *J. Biotechnol.* Vol. 71. pp. 275-286.
- Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., Nucci, R. (2002).** Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 93,109–119.

**Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A.-H. & Garrido, A. (1995).** Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2702-2706

**Brenes, M., De Castro, A., (1998).** Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *J. Sci. Food Agric.*77, 353-358.

**Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions. *Biochem. J.* 330 : 1173-1178.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie -Plantes médicinales-3<sup>ème</sup> Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

## 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.

**Canillac N., and Mourey A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.*18: 261– 268.

**Cavusoglu, A. et Oktar, A. (1994).** Les effets des facteurs agronomiques et destockage avant la mouture sur la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 52 :18-24.

**Cawthorne, A., Celentano, L. P., D'Ancona, F., Bella, A., Massari, M., Anniballi, F. (2005).** Botulism and preserved green olives. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 781–782. doi: 10.3201/eid1105.041088.

**Cerretani, L., Salvador, M., Bendini, A., Fregapane, G. (2008).** Relationship between sensory evaluation performed by Italian and Spanish official panels and volatile and phenolic profiles of virgin olive oil. *Chemosensory Perception*, 1: 258-267.

**Chambers, H. F. (1997)** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.

**Chammen N, Kachouri M, Mejri M, Peres C, Boudabous A and Hamdi M. (2005).** Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. *Biores Technol*, 96, 1311-1316.

**Chanchal, D. & Swarnlata, S. (2009).** Herbal Photoprotective Formulations and their evaluation. *The Open Natural Products Journal*, 2, 71-76.

**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.

**Cimato A., Cantini C., Sani G. et Marranci M. (1997).** Il germoplasma dell'olivo in Toscana Regione. Toscana-CNR-A.R.S.I.A.

**Clodoveo, M., Delcuratolo, D., Gomes, T., and Colelli, G. (2007).** Effet de différentes températures et atmosphères de stockage sur Coratina huile d'olive qualité. *Food Chemistry*, 102: 571-576.

**COI, (2004).** Trade Standard Applying to Table Olives. International Olive Oil Council. COI/OT/NC No. 1, Dezembro de 2004.

**Conde, C., Delrot, S. & Gerós, H. (2008).** Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1545-62.

**Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2012).** Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Front. Microbiol.* 3:248. doi: 10.3389/fmicb.2012.00248

**Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006).** Yeast ecology in Frech cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130–135. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016.

**Covas, M.I., De la torre, K., Farre-Albaladejo, M. (2006).** Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Rad Biol Med*, 40:608-616.

**Cowan, M. M. (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.

## D

**Dacosta, Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

**Daglia, M. (2011).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23,1-8.

**De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S. L., and Lavermicocca, P. (2010).** Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei*IMPC2.1 in an industrial plant. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 6–13.

**De Castro, A., Montano, A., Casado, F. J., Sanchez, A. H., and Rejano, L. (2002).** Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19, 637–644. doi: 10.1006/fmic.2002.0466.

**De Faveri D, Aliakbarian B, Avogadro M, Perego P, Converti A. (2008).** Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: effect of different enzyme activities and levels. *Biochemical Engineering Journal*, V.41, pp.149-156.

**De Lorenzo, C., González, M., Iglesias, G., Lázaro, E., Valiente, E., Blázquez, N. (2000).** La aceituna de Campo Real. Madrid, Spain: Consejería de Medio Ambiente. Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2013). Review: Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33, 1-10.

**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.

**Derwich E., Benziane Z., Boukir A. (2010).** Antibacterial activity and chemical composition of the leaf essential oil of *Mentha retundifolia* from Morocco. *EJEAFChe, E-J. Envir., Agric. & Food Chem.*, 9(1), 19-28.

**Diaz R, Faus G, Blasco M, Blasco J and Molto E. (2000).** The application of a fast algorithm for the classification of olives by machine vision. *Food Research International*, 33, 305-309.

**Diaz R, Gil L, Serrano C, Blasco M, Molto E and Blasco J. (2004).** Comparison of three algorithms in the classification of table olives by means of computer vision. *J. Food Eng.*, 61, 101-107.

**Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. and Gobbetti, M. (2013).** Review: Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33, 1-10.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocher, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.

**Doganay, M. (2003).** Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(3), 173-175.

**Domínguez-Manzano, J., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Garrido Fernández, A., and Jiménez-Díaz, R. (2012).** Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 230–238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.011.

## E

**El Antari A., El Moudni H., Ajana H. et Cert A. (2003).** Etude de la composition lipidique de deux compartiments du fruit d'olive (pulpe et amande) de six variétés d'oliviers cultivées au Maroc. *Olivae*, 98 :20-28.

**El Hazzat, N., Iraqi, R., Bouya, D. & Bouseta, A. (2012).** Evolution des composés odorants clés au cours de la maturation de l'olive et du procédé de fermentation. In: "Microbial

Biotechnology for Development", Microbiona (Eds.). Second Edition of the International Congress. pp. 88.

**Ercolini, D., Villani, F., Aponte, M., and Mauriello, G. (2006).** Fluorescence in situ hybridization detection of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 291–296.

**Ellstrand, NC. (2003).** Dangerous liaisons, When cultivated plants mate with their wild relatives. In: schneider SS, ed. synthesis in ecology and evolution. baltimore; London: The Johns Hopkins University Press.

**Essawi T. and Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70: 343-349.

**Esti, M., Cinquanta, L. and La Notte, E. (1998).** Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46:32-35.

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

### *F*

**Franzetti, L., Scarpellini, M., Vecchio, A., and Planeta, D. (2011).** Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Ann. Microbiol.* 61, 843–851.

### *G*

**Galanakis, C.M. (2011).** Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 175-184.

**García-García, P., Brenes-Balbuena, M., Hornero-Mandez, D., Garcia-Borrego, A. & Garido Fernandez, A. (2000).** Content of biogenic amines in table olives. *Journal of Food Protection*, 63, 111-6.

**Garrido-Fernández, A., Fernandez-Diez, M. J., and Adams, M. R (1997).** *Table Olives: Production and Processing*. London: Chapman & Hall.

**Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Peres, C., Markaoui, M., and Asehraou, A. (2011).** Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas Aceites* 62, 84–89.

**Gee, J.M., Johnson, I.T. (2001).** Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry.* 8 : 1-182.

**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) : 68126817. 92.

**Gomez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., and Segura-Carretero, A. (2008).** Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 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.

**Goulas, V., Charisiadis, P., Gerathanassis, I.P. and Manganaris, G.A. (2012).** Classification, Biotransformation and Antioxidant Activity of Olive Fruit Biophenols: A Review. *Current Bioactive Compounds*, 8, 232-239.

**Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652p.

**Gutierrez-Rosales, F., Riaos, J.J., Gomez-Rey, M.L. (2003).** Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:6021-6025.

## *H*

**Heperkan, D., Dazkir, G. S., Kansu, D. Z., and Güler, F. K. (2009).** Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. *Toxin Rev.* 28, 180–186. doi: 10.1080/15569540903084982.

**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.

## *I*

**Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa. (2011).** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126: 1821-1835.

**Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., (2001).** *Microbiol. Immunol.*, 43, pp.201–208. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

**Issaoui, M., Dabbou, S., Mechri, B., Nakbi, A., Chehab, H. & Hammami, M. (2011).** Fatty acid profile, sugar composition, and antioxidant compounds of table olives as affected by different treatments, *European Food Research and Technology*, 232, 867-876.

## *J*

**Jalava, K., Selby, K., Pihlajasaari, A., Kolho, E., Dahlsten, E., Forss, N., et al. (2011).** Two cases of food-borne botulism in Finland caused by conserved olives, October 2011. *Euro Surveill.* 16, 1–3.

**Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006).** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.

## K

**Kahouli, I. (2010).** Effets antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Olea Europea L.*) dans l'huile de Canola chauffée. Thèse de doctorat, Université Laval – Quebec, pp.32-46.

**Kappel V.D., Costa G.M., 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.

**Kayel H., Mtiba H., Khelif M. et Cossentini M. (1994).** Light catalytic effect on olive oil oxidation. Summary in the proceeding of Technical Meeting of Working Groups 1 and 4, Plant Material and Oil Technology and Quality. Cordoba (Spain), 14-16.

**Kiai, H. & Hafidi, A. (2014).** Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie- Food Science and Technology*, 57, 663-670.

**Kim J. Marshall MR. Wei C. (1995).** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43. pp. 2839-2845.

**Korukluoglu M, Sahan Y, Yigit A, Ozer ET, Gucer S. (2010).** Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea L.* leaf extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34: 383-396.

**Kountouri, A.M., Mylona, A., Kaliora, A.C., Andrikopoulos, N.K. (2007).** Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*, 14, 659–667.

## L

**Landete, J.M., Rodríguez, H., Curiel, J.A., de las Rivas, B., de Felipe F.L. & Muñoz, R. (2010).** Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy V.R. et Watson R.R. (Eds.). ISBN: 978-0-12-374420-3. pp: 387-396.

**Lanza, B., Di Serio, M.G., Iannucci, E., Russi, F. & Marfisi, P. (2010).** Nutritional, textural and sensorial characterisation of Italian table olives (*Olea europaea L. cv. 'Intosso d'Abruzzo'*), *International Journal of Food Science and Technology* 45: 67-74.

**Lee, OH et Lee, BY. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biores. Technol.* Vol. 101. pp. 3751–3754.

**Léger, CL. (2008).** Les polyphénols de l'olive de table et de l'huile d'olive vierge, 2 formes de consommation de l'olive-drupe – Propriétés antioxydantes et rôles biologiques. 1ères Journées Scientifiques du Génie des Procédés Appliqué à l'Agro Alimentaire. Inra Marseille(France).

**León, L., Beltrán, G., Aguilera MP., Rallo, L., Barranco D. and De La Rosa, R. (2011).** Oil composition of advanced selections from an olive breeding program. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113:870-875.

**Leonardis A. et Macciola V. (2002).** Catalytic effect of the Cu (II) and (III) cyclohexanecarboxylates on olive oil oxidation measured by rancimat. *European Journal of Lipids and Science*, 156160.

**Lopez-lopez, A., Garcia-Garcia, P., Duran-Quintana, M.C. and Garrido-Fernandez, A. (2004).** Physicochemical and Microbiological Profile of Packed Table Olives. *Journal of Food Protection*, 67 (10), pp: 2320-2325.

**López, A., Montaña, A. & Garrido, A. (2005).** Provitamin A carotenoids in table olives according to processing styles, cultivars, and commercial presentations. *European Food Research Technology*, 221, 406–411.

**López-López, A., Cortés-Delgado, A. & Garrido-Fernández, A. (2011).** Chemometric characterisation of the fats released during the conditioning processes of table olives. *Food Chemistry*, 126, 1620–1628.

**Lopez, A., Garcia, P. & Garrido, A. (2008).** Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition. *Food Chemistry*, 106, 369–378.

**Luh, B.S., and Martin, M.H. (1996).** "Olives," in *Processing Fruits: Science and Technology: Biology, Principles and Applications*, eds L. P. Somogyi, D. M. Barrett, H. S. Ramaswamy, Y. H. Hui, and S. Steven (Washington, DC: CRC Press), 479.

## M

**Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand C. (2006).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p. 4-5.

**Maestro-Durán, R., Leon Cabello, R. & Ruiz Gutierrez, V. (1994).** Compuestos fenólicos del olivo (*Olea Europaea*). *Grasas y Aceites*, 45, 265-269.

**Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Pereira, J. A. (2011).** Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 450–457.

**Markin D, Duek L et Berdicevsky I. (2003).** In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*. Vol. 46. pp. 132-136.

- Marsilio, V., and Lanza, B. (1998).** Characterization of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *J. Sci. Food Agric.* 76, 520–524.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B. (2001).** Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chem.* 74, 55–60.
- Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B. and Felicioni, M. (2005).** Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea L. cv Ascolana tenera*) processing. *Journal of Science Food and Agriculture*, 85, 1084–1090.
- Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M., and Oliveira, B.P.P. (2007).** Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs.Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry*, 102:406-414.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M. and Robards, K. (2001).** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-84.
- Medina E, de Castro A, Romero C et Brenes M. (2006).** Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54. pp. 4954-4961.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., Garcia, A., de Castro, A. (2007).** Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem* 55:9817–9823.
- Medina, E., Gori, C., Servili, M., de Castro, A., Romero, C., Brenes, M. (2010)** Main variables affecting the lactic acid fermentation of table olives. *Int J Food Sci Technol* 45:1291–1296.
- Mena, K.D., and Gerba, C.P. (2009).** Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 201, 71-115. doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6-3.
- Miller, G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Mombiela, F. (2012).** The Mediterranean diet for sustainable regional development, mediterranea CIHEAM & Presses de Sciences PO. Paris. ISBN 978-2-7246-1248-6. pp. 266-278.
- Montaño, A., Javier Casado, F., de Castro, A., Sánchez A.H. & Rejano, L. (2005).** Influence of processing, storage time, and pasteurisation upon the tocopherol and amino acid contents of treated green table olives. *European Food Research Technologie*, 220, 255–260.
- Mousa Y. M., Gerasopoulos D., Metzidakis I. et Kiritsakis A. (1996).** Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of ‘Mastoides’ olives. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 71: 345-350.

N

**Nataro J. P and Kaper J. B. (1998).** Diarrheogenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* **11** : 142-201.

O

**Obied, H.K., Paul, D., Prenzler, P.D., Ryan D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S. et 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. et Korel F. (2008).** Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113:401-410.

**Obied, H.K., Prenzler, P.D., Omar, S.H., Ismael, R., Servili, M., Esposito, S., Taticchi, A., Selvaggini, R. & Urbani, S. (2012).** Chapter 6: Pharmacology of Olive Biophenols. In: *Advances in Molecular Toxicology*, Elsevier B.V. Volume 6. ISSN 1872-0854. pp. 196-218.

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

**Osman, M., Metzidakis, I., Gerasopoulos D., and Kiritsakis A. (1994).** Qualitative changes of olive oil from fruits collected from trees grown at two altitudes. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 71:187–190.

P

**Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C. A. (1999).** The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* 30 : 62-153.

**Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., Jiang, Y (2004).** Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 627–632.

**Pasqualone, A., Delevicchio, L.N., Lacolla, G., Piarulli, L., Simeone, R., and Cucci, G. (2014).** Effect of composted sewage sludge on durum wheat : productivity , phenolic compounds, antioxidant activity, and technological quality. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 12: 276-280.

**Patumi, M., Andria, R., Marsilio, G., Fontanazza, G. (2002).** Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea L.*, cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, 77:27-34.

**Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valenta, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L. & Bento, A. (2006).** Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds,

Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8425-8431.

**Pereira, A.P., Pereira J.A., Bento, A. & Estevinho M.L. (2008).** Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2895–2902.

**Perry, A., Rasmussen, H. & Johnson, E.J. (2009).** Xanthophylls (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 9-15.

**Piscopo, A., De Bruno, A., Zappia, A. & Poiana, M. (2014).** Antioxidant activity of dried green olives (Carolea cv.). *Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie- Food Science and Technology*, 58, 49–54.

**Poiana, M. & Romeo, F.V. (2006).** Changes in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas y Aceites*, 57, 402-408.

## **R**

**Raj NK, Spiral RM, Chaluvadi MR, Krishna DR. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*, 33: 2-16.

**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 4

**Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., and Caggia, C. (2004).** *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 9–14. 5-62.

**Randazzo, C. L., Ribbera, A., Pitino, I., Romeo, F. V., and Caggia, C. (2012).** Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol.* 32, 87–96. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.013.

**Ranalli, A., De Mattia, G., Ferrante, M. L. and Giansante, L. (1997).** Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Sost. Grasse*, LXXIII, 501508.

**Rejano Navarro L. y Sánchez Gómez AH. (2004).** Recolección mecanizada de la aceituna de mesa. Técnicas para la reducción del molestado y estudio de medios líquidos de transporte. *Tierra y Vida. ASAJA Sevilla*, Junio, 36-41.

**Rejano, L., Montana, A., Casado, F. J., Sanchez, A. H., and De Castro, A. (2010).** “Table olives: varieties and variations,” in *Olives and Olive Oil in Health and Disease*, eds V. R. Preedy and R. R. Watson (Singapore: Academic Press is an imprint of Elsevier), 5–15.

**Rodríguez, H., Curiel J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M. and Muñoz, R. (2009).** Review Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79–90.

**Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2010).** Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiol.* 27, 604–612.

**Romero, C., Brenes, M., Garcia, P. & Garrido, A. (2002).** Hydroxytyrosol 4-a-D glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3835–3839

**Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., Garcia, P., Garcia, A., Garrido, A. (2004).** Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agr. Food Chem.* 52, 479–484.

**Romeo, F.-V., De Luca, S., Piscopo, A., Perri, E. & Poiana, M. (2009).** Effects of post-fermentation processing on the stabilisation of naturally fermented green table olives (cv Nocellara etnea). *Food Chemistry*, 116, 873–878.

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

**Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T. & Antolovich, M., (1999).** Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*, 855, 529–537.

## S

**Sahan, Y., Cansev, A. & Gulen, H. (2013).** Effect of Processing Techniques on Antioxidative Enzyme Activities, Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds, and Fatty Acids of Table Olives. *Food Science & Biotechnology*, 22, 613-620.

**Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S. & Kallel, H. (2008).** - Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea L.*): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, 108, 833–839.

**Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., and Sharma P. (2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.

**Sanchez Casas, JJ., De Miguel Gordillo ,C.et Marin Exposito, J. (1999).** La qualité de l’huile d’olive provenant de variétés en Estrémadure en fonction de la composition et la maturation de l’olive. *Olivae*, 75 : 31-6.

**Sarker, S D., Latif, Z and Gray, A I. (2005).** Natural Product Isolation. *In:* Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 1-23.

**Servili, M., Montedoro, G.F., Pannelli, G. et Famiani, F. (1990).** Influenza delle variabili pedologiche, tecnologiche e varietali sulla qualità degli oli vergini di oliva. Atti del Convegno “Problematiche qualitative dell’olio di oliva”. Sassari, 231-245.

**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., Selvaggina, R., Esposito, S., Taticchia, A., Montedoro, G.-F., 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 A*, 1054, 113–127.

**Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposito, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G. F., and Corsetti, A. (2006).** The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (cv. *Itrana* and *Leccino*): a pilot-scale application. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3869–3875.

**Singleton, V. I., Othofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999)** . Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299:152-178.

**Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calheta, R., Andrade, P.B., Vlentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. & Pereira, J.A. (2006).** Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “Alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8533-8538.

**Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A. & Pereira, J.A. (2008).** Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie*, 41, 739–745.

## T

**Tamendjari, A., Angerosa, F., and Bellal, M. M. (2004).** Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of Chemlal olives. *Journal Food Science*, 3: 343-354.

**Tamendjari, A., Angerosa, F., Mettouchi, S. and Belial, 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.

**Tamer, C.E., ncedayi, B., Yildiz, B., & opur, Ö.U. (2012).** The use of vacuum impregnation for the debittering green olives. *Food and Bioprocess Technology. An International Journal*, Springer Science & Business Media (communication), 5p.

**Tasioula-Margari, M., Okogeri, O. (2001).** *Journal of Food Science*, 66 (4): 530-534. Tena N., Lazzez A., Aparicio-Ruiz R. et García-González D.L. 2007. Volatile compounds characterizing Tunisian Chemlali and Chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7852-7858.

**Tassou, CC et Nychas, GJE. (1994).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in food model system. *J. Food Prot.* Vol. 57. pp. 120-124-132.

**Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, K.Z. (2002).** Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiol.* 19, 605–615.

**Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Nychas, G.J. E. (2010).** “Microbial colonization of naturally fermented olives,” in *Olives and Olive Oil in Health and Disease*, eds V. R. Preedy and R. R. Watson (Singapore: Academic Press is an imprint of Elsevier), 397–406.

**Tena, N., Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R., and García-González, D.L. (2007).** Volatile compounds characterizing Tunisian Chemlali and Chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7852-7858.

**Thabaut, A. and Durosoir, J.L. (1979).** L'Antibiogramme : Méthodes classiques et Méthodes automatisées. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 9: 490-495.

**Therios, I. (2009).** Olives, crop production science in horticulture 18. Edition CABI. ISBN 978-1-84593-458-3. pp. 27-278.

**Tovar, M.J., Paz Romero, M., Girona, J. and Moltiva, M.J. (2002).** L-Phenylalanine ammonialyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea*\_L cv Arbiquina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82:892-898.

**Tunçel, 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., Beltran, G., Jimenez, A., Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J. M. and Del Rio, C. (2005).** Variedades de olivo en Espana. Consejeri´a de Agricultura y Pesca, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentacio´, Mundi-Prensa S.L, 361-364.

**Ucella, N. (2001).** Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 328-339.

**Upadhyay, R.K., Dwivedi, P., and Ahmad, S., (2010).** Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian Journal of Medical Sciences* 2 (3): pp.152-158.

**Uyla er, V. & Yildiz, G. (2013).** Fatty Acid Profile and Mineral Content of Commercial Table Olives from Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41, 518-523.

## V

**Vega Macías VA, Rejano Navarro L, Guzmán Díaz JP, Navarro García C, Sánchez Gómez AH y Díaz Montero JM. (2005).** Recolección mecanizada de la aceituna de verdeo. *Agricultura. Revista Agropecuaria*. Año LXXIV. Número 874. Mayo, 376-384.

**Veillet, S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre tradition et innovation. Thèse de Doctorat spécialité Chimie, *Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*.5-30.

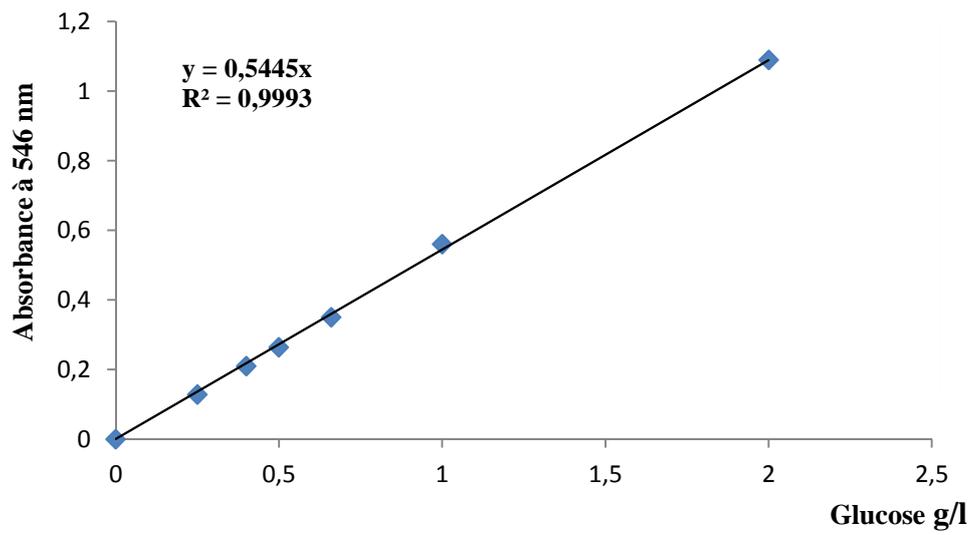
**W**

**Wendakoon, CN et Sakaguchi, M. (1995)** .Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. *J. Food Prot.* Vol. 58. pp. 280-283.

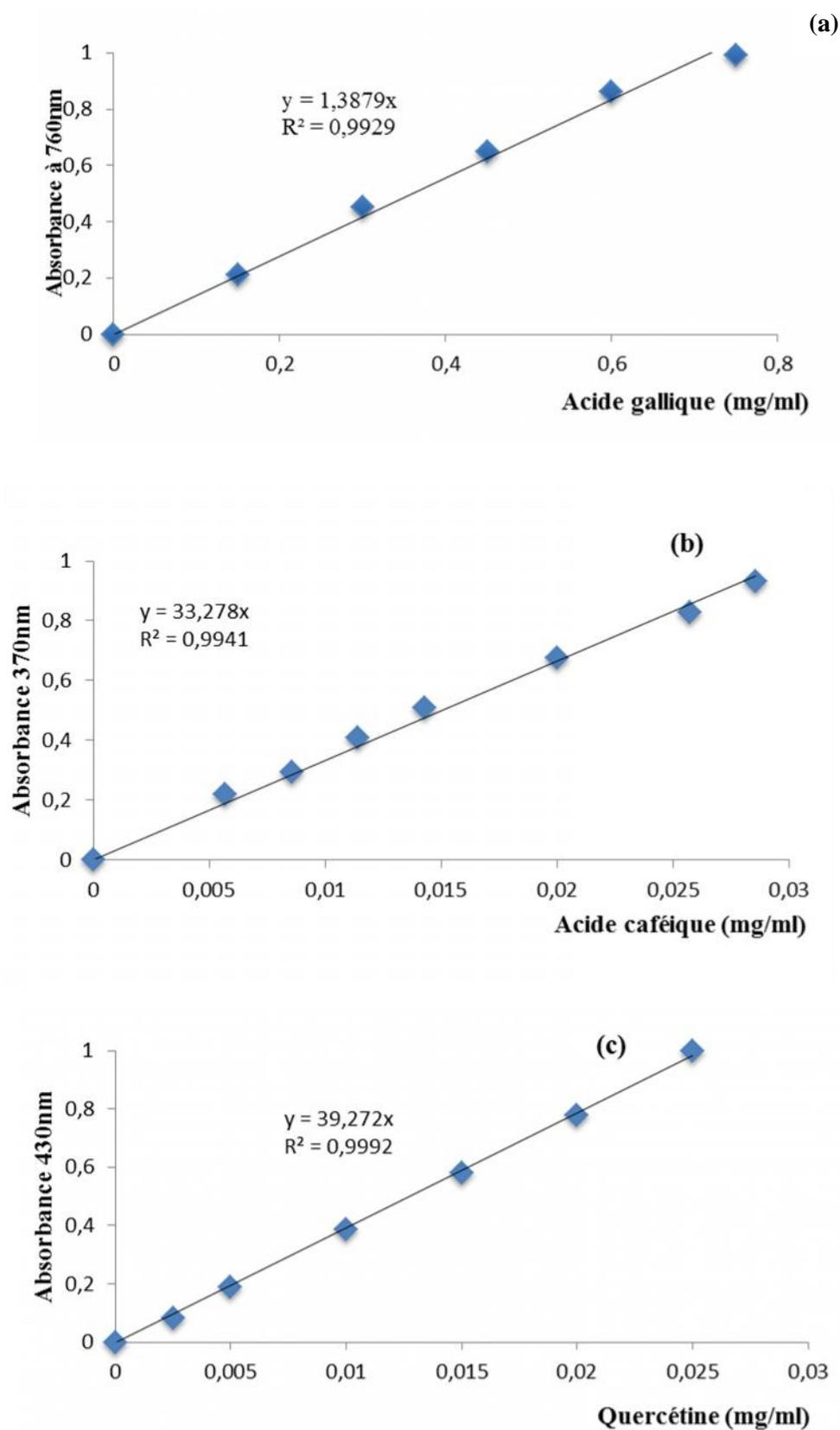
**Willför, S.M., Smeds, A.I. and Holmbom, B.R. (2006).** Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112: 64-77.

# *Annexes*

Annexe01



**Figure 01:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.

Annexe 02

**Figure 02:** Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques (a), *ortho*-diphénols (b) et des flavonoïdes (c).

**Annexe 03**

(a)

**Tableau I : Composition des milieux de culture.**

<b>milieu de culture 1</b>	<b>Composition 1</b>	<b>PH1</b>
<b>Gélose Mueller Hinton</b>	Extrait de viande.....2g, Hydrolysate acide de caséine.....17,5g, Amidon.....1,5g, Agar.....10g, Eau distillée.....1litre	7,4
<b>Gélose Chapman</b>	Extrait de viande .....1g, Chlorure de sodium.....75g, Peptone .....10g Agar.....15g, Mannitol .....10g, Rouge de phénol .....0.025g, Eau distillée .....1litre	7,4
<b>Gélose Hektoen</b>	Peptone pepsique de vian..... 12,0 g, Extrait autolytique de levure ..... 3,0 g, Lactos..... 12,0 g, Saccharose ..... 12,0 g, Salicine..... 2,0 g, Sels biliaires ..... 9,0 g, Chlorure de sodium..... 5,0 g, Thiosulfate de sodium ..... 5,0 g, Citrate ferrique ammoniacal ..... 1,5 g, Bleu de bromothymol ..... 65 mg, Fuchsine acide ..... 40 mg, Agar ..... 13,5 g, Eau distillée ..... 1litre	7,6
<b>Bouillon nutritif</b>	Extrait de viande.....5g, Peptone trypsique..... 10g, NaCl..... 5g, Eau distillée.....1litre	7,2

(b)

**Tableau II: Gamme de concentration réalisée pour la détermination des CMI.**

<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>0,40</b>	<b>0,80</b>	<b>1,20</b>	<b>1,60</b>	<b>2,00</b>	<b>2,40</b>	<b>2,80</b>	<b>3,20</b>	<b>3,60</b>	<b>4,00</b>	<b>4,40</b>	<b>4,80</b>	<b>5,20</b>	<b>5,60</b>	<b>6,00</b>
<b>Volume de l'extrait (ml)</b>	0,16	0,32	0,48	0,64	0,80	0,96	1,12	1,28	1,44	1,60	1,76	1,92	2,08	2,24	2,40
<b>Volume de MH (ml)</b>	9,84	9,68	9,52	9,36	9,20	9,04	8,88	8,72	8,56	8,40	8,24	8,08	7,92	7,76	7,60
<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>6,40</b>	<b>6,80</b>	<b>7,20</b>	<b>7,60</b>	<b>8,00</b>	<b>8,40</b>	<b>8,80</b>	<b>9,20</b>	<b>9,60</b>	<b>10,00</b>	<b>10,40</b>	<b>10,80</b>	<b>11,20</b>	<b>11,60</b>	<b>12,00</b>
<b>Volume de l'extrait (ml)</b>	2,56	2,72	2,88	3,04	3,20	3,36	3,52	3,68	3,84	4,00	4,16	4,32	4,48	4,64	4,80
<b>Volume de MH (ml)</b>	7,44	7,28	7,12	6,96	6,80	6,64	6,48	6,32	6,16	6,00	5,84	5,68	5,52	5,36	5,20
<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>12,40</b>	<b>12,80</b>	<b>13,20</b>	<b>13,60</b>	<b>14,00</b>	<b>14,40</b>	<b>14,80</b>	<b>15,20</b>	<b>15,60</b>	<b>16,00</b>	<b>16,40</b>	<b>16,80</b>	<b>17,20</b>	<b>17,60</b>	<b>18,00</b>
<b>Volume de l'extrait (ml)</b>	4,96	5,12	5,28	5,44	5,60	5,76	5,92	6,08	6,24	6,40	6,56	6,72	6,88	7,04	7,20
<b>Volume de MH (ml)</b>	5,04	4,88	4,72	4,56	4,40	4,24	4,08	3,92	3,76	3,60	3,44	3,28	3,12	2,96	2,80

MH : Mueller Hinton.

*Annexe 04*

*Annexe 04*

**Tableau III :** Coefficients de corrélation des diamètres d'inhibitions et les composés phénoliques.

<b>Composés phénoliques</b>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Polyphénols COL	<b>0,85</b>	0,30	0,09	0,17	0,42	-0,35	<b>0,63</b>
O-diphénols	<b>0,79</b>	0,29	-0,03	-0,08	<b>0,52</b>	-0,46	<b>0,61</b>
Oleuropeine	<b>0,67</b>	0,26	0,35	0,26	0,09	-0,04	0,46
Oleuropeine -der	<b>0,50</b>	0,25	0,39	-0,04	-0,05	0,24	0,42
Hydroxytyrosol	0,34	0,24	0,31	0,28	0,25	<b>0,53</b>	0,16
Hydroxytyrosol-Glu	0,43	0,17	0,13	0,14	0,35	0,31	0,23
Verbascoside	<b>0,58</b>	0,12	0,10	0,27	0,09	0,00	0,29
Verbascoside-der	<b>0,58</b>	0,19	0,21	0,33	0,13	0,12	0,21
Quercetine 3- Galactoside	<b>0,61</b>	0,16	0,30	0,38	0,00	-0,18	0,33
Tyrosol	0,36	0,17	0,19	0,35	-0,16	0,12	0,31
Ligstroside	<b>0,64</b>	0,16	0,25	0,03	0,45	-0,29	0,36
Acide benzoique/acide cinnamique-der	-0,51	-0,08	0,08	-0,18	-0,35	0,17	-0,08
Acide Benzoique -der	-0,29	-0,24	-0,11	-0,11	-0,41	0,44	0,10
Hydroxytyrosol- acide elenolique	<b>0,58</b>	0,25	0,30	0,15	0,33	-0,03	0,25
Acide caffeique-der	<b>0,52</b>	0,20	-0,05	-0,09	-0,09	-0,19	<b>0,57</b>
Flavonoides	<b>0,57</b>	0,20	0,46	0,39	0,32	-0,16	<b>0,50</b>

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

Annexe 05**Tableau IV** : Rapports CMB/CMI des échantillons d'olive.

Variétés d'olive	Etat des olives	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K.Pneumoniae</i>
					<i>CMB/CMI</i>			
<i>Gordal</i>	F	0	1,04	1,23	1,12	1,18	0	0
	C	0	1,12	1,41	0	0	1,08	1,13
<i>Azzeradj de Tazmalt</i>	F	0	1,11	0	1,02	0	0	NT
	C	0	--	--	0	--	1,08	--
<i>Azzeradj de Seddouk</i>	F	0	1,05	1,3	1,06	1,09	0	1,22
	C	0	0	1,1	1,05	0	0	1,1
<i>Teffahi</i>	F	1,21	1,12	0	00	0	0	1,11
	C	0	--	--	--	--	--	--
<i>Boucok</i>	F	1,21	1,05	NT	1,23	0	1,36	1,11
	C	0	1,13	1,04	0	1,04	0	1,26
<i>Grosse du Hamma</i>	F	0	0	1,09	1,27	1,3	1,23	1,12
	C	--	-	--	--	--	--	NT
<i>Vasilicada</i>	F	0	1,51	0	0	0	0	NT
	C	1,06	0	1,05	0	0	1,22	NT
<i>Manzanilla</i>	F	1,2	0	0	0	1,07	1,3	1,31
	C	0	0	1,04	0	1,05	1,05	NT
<i>Sevilla</i>	F	1,11	1,16	1,11	1,2	0	0	2,08
	C	0	1,04	0	--	--	--	--
<i>Sigoise</i>	F	0	1,2	1,22	1,12	1,12	1,18	1,64
	C	0	1,04	0	0	1,27	1,1	NT
<i>Sigoise commerciale</i>	C	0	0	0	0	1,17	0	1,2
<i>Sevilla commerciale</i>	C	0	1,12	1,41	1,18	1,29	1,35	1,12

NT : non testé



## Résumé

Cette présente étude a pour objectif d'étudier l'effet du procédé d'élaboration (style espagnol) sur l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits phénoliques des olives vertes (*Olea europaea L.*) de quelques variétés locales et étrangères introduites. Les analyses chimiques ont porté sur la détermination des teneurs en sucres réducteurs et en composés phénoliques. L'activité antibactérienne vis-à-vis de huit souches bactériennes pathogènes est évaluée par les méthodes de diffusion sur gélose et la microdilution (CMI et CMB). Les résultats ont montré une influence significative de la variété et le procédé d'élaboration sur les différents paramètres analytiques. Les olives vertes se caractérisent par une composition chimique riche en polyphénols avec des quantités notables en *ortho*-diphénols et flavonoïdes qui sont fortement réduites après élaboration. L'analyse de la composition en polyphénols des olives fraîches par HPLC montre un profil qualitativement similaire avec la dominance de l'oleuropeine et verbascoside. Cependant, cette analyse révèle un bouleversement du profil phénolique entre les olives fraîches et confites. Les extraits phénoliques de différentes variétés d'olive ont montré, pour la plus part, une forte activité antimicrobienne avec un effet bactéricide à l'égard des souches bactériennes testées, dont *S.aureus* se révèle l'espèce la plus sensible. Toutefois, aucun extrait n'a exercé un effet positif vis-à-vis de la souche *SARM*. Cette efficacité antimicrobienne est négativement influencée par le procédé d'élaboration mais avec des degrés différents selon la variété et la souche testée. Les résultats montrent que les olives constituent une source prometteuse en composés phénoliques doués d'activité biologique, ce qui confirme l'intérêt de leur consommation pour la lutte contre les maladies infectieuses. En effet, les extraits phénoliques des olives seraient à recommander pour l'exploitation de nouvelles sources naturelles bioactives et leur adoption comme une alternative aux molécules synthétiques tant dans le domaine pharmaceutique que agroalimentaire.

**Mots clés:** Olive, élaboration, extrait phénolique, activité antibactérienne, antibiogramme, CMI.

## Abstract

This study aims to investigate the effect of Spanish style green olive processing on antibacterial activity *in vitro* of phenolic extracts of green olives (*Olea europaea L.*) of some local and introduced foreign varieties. Chemical analysis focused on reducing sugars and phenolic compounds contents. Antibacterial activity against eight pathogens bacterial strains were performed by agar diffusion method and microdilution (MIC and MBC). The results showed the influence of the variety and the preparation technology on different analytical parameters. It appeared that the green olives were characterized by a rich chemical composition in polyphenols with notable quantities of *ortho*-diphenols and flavonoids that were greatly reduced after preparation. The analyses of phenolic composition by HPLC showed that all extracts present the same phenolic composition profile with high amount of oleuropeine and verbascoside. Nevertheless, this profile was significantly modified after processing. All testified phenolic extracts showed for the most part, a strong antimicrobial activity with bactericidal effect against tested bacterial strains, with *S. aureus* as the most sensitive species. However, no extract showed a positive effect against *SARM* strain. Nevertheless this antimicrobial efficiency was negatively influenced by the elaboration. The results revealed that the olives were a promising source of phenolic compounds, which confirms the interest of their consumption for the fight against infectious diseases. Indeed, phenolic extracts of olives are recommended for the exploitation of new bioactive natural sources and their use as an alternative to synthetic molecules.

**Keywords:** Olive, elaboration, phenolic extract, HPLC, antibacterial activity, MIC.

هذه الدراسة تهدف الى دراسة نشاط مضاد البكتيريا لمستخلصات الفينوليك الخاصة بازيتوت الخضراء لبعض الاصناف المحلية و الخارجية و التطرق الى تقييم تاثير طريقة تحضير الزيتون على مركباته الكيميائية أنشطته البيولوجية. الإستراتيجية المعتمدة في دراستنا من جهة هي تحديد الخصائص الكيميائية للزيتون (الحموضة السكريات المرجعة و المستخلصات الفينولية). و من جهة اخرى تقييم نشاطها المضاد للبكتيريا ضد ثماني بكتيريا. أظهر تأثير النوع و طريقة التحضير على مختلف المعايير التحليلية. من هذه النتائج الزيتون الاخضر تتميز بتركيبه كيميائية ثرية بالفينوليك و بكمية معتبرة من اورثوديفينول و الفلافونويد ينخفض تركيزهما بعد عملية التحضير. نتائج التحليل HPLC تبين ان مختلف اصناف الزيتون على نفس العناصر الفينولية التي تتميز بارتفاع معدل الاولوغيبيين و الفغياسكوزيد. بعد تحضير الزيتون يتبين هذه التركيبية تتغير تبين المايكرو بيولوجي هذه المستخلصات الفينولية تتمتع بنشاط مضاد البكتيريا جد فعال الا على البكتيريا SARM تظهر حساسية اتجاه هذه المركبات. تظهر النتائج ان عملية معالجة الزيتون تؤدي الى انخفاض محسوس في فعالية هذه الأخيرة استنادا الى النتائج المتحصل عليه يتعين علينا نعتبر مستخلصات الزيتون مورد طبيعي غني بمركبات ذات فعالية بيولوجيا يمكن لاستعمالها كبدل طبيعي للمواد الحافظة و الأدوية الكيميائية .

: زيتون, معالجة, المستخلصات الفينولية, HPLC, CMI, للبكتيري