

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N° \_\_\_\_\_/SNV/2014

## THÈSE

Présentée par

**LARIBI Rahima**

Pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat en Sciences**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: Biochimie**

## THÈME

**Les composés phénoliques de quelques variétés de  
l'huile d'olive algérienne: identification et propriétés**

Soutenue publiquement le 30/04/2015

### DEVANT LE JURY

Président	<b>BAGHIANI Abderrahmane</b>	Pr.	<b>UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>TAMENDJARI Abderezak</b>	Pr.	<b>Univ. Bejaia</b>
Co-directeur	<b>ARRAR Lekhmici</b>	Pr.	<b>UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>BELLAL Mohand Mouloud</b>	Pr.	<b>ENSA Alger</b>
	<b>BENABDESSELAM Fadila</b>	Pr.	<b>Univ. Bejaia</b>

# Remerciements

*En premier lieu, je remercie Allah pour tous les biens qu'il m'a procurés et parmi eux l'achèvement de ce travail.*

*Je remercie vivement mon encadreur le professeur TAMENDJARI A. pour les orientations et les conseils qu'il n'a pas manqués de me prodiguer durant la réalisation de ce travail, pour sa patience et sa compréhension. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon respect. Merci de m'avoir accompagné et assisté durant tous mes travaux de recherche. Alors, au moment où s'achève ce travail, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma très grande reconnaissance.*

*Mes remerciements les plus vifs sont adressés à mon co-encadreur le professeur ARRAR L. pour m'avoir ouvert les portes pour une nouvelle inscription à l'université de Sétif, pour sa patience et ses qualités scientifiques et humaines.*

*Mes profonds respects et remerciements vont au président Mr BAGHIANI A., professeur à l'université FERHAT ABAS de Sétif, pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.*

*Mes remerciements chaleureux vont à Mr BELLAL M. M., professeur à l'ENSA d'Alger, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes reconnaissances vont à Mme BENABDESSELAM F., professeur à l'université A. MIRA de Bejaia, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et mes respects.*

*Mes remerciements vont particulièrement au docteur ROVELLINI P. et aux membres de son laboratoire, au niveau de 'Stazione sperimentale per le industrie degli oli e dei grassi' de Milano en Italie, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée et leur grande collaboration.*

*Je remercie vivement Mrs SAHNOUNE, BEGDOUCHE, IGUEROUDA et BACHIR BEY pour leurs aides et orientations concernant l'analyse statistique.*

*Je tiens à remercier spécialement les professeurs LOUAILECHE H. et ATMANI D. pour leurs encouragements.*

*J'exprime ma gratitude aux directeurs et personnels de L'ITAFV de Takarietz et de la ferme Pilote A/MIRA de Tazmalt. Je les remercie pour leur collaboration dans l'étape d'échantillonnage de ce travail. Je remercie infiniment Melle KECIRI S. et Mr SEBAI Z. pour leur entière disponibilité et leur aide précieuse.*

*Je n'oublierai pas de remercier toute l'équipe qui a travaillé avec moi : AIDLI A. DEFLAOU L. et LAINCER F., leurs travaux étaient un grand support pour cette thèse. Merci à vous toutes. Je remercie aussi BOUCHEFFA S., pour l'aide qu'elle m'a apportée.*

*Je ne saurai remercier assez mon mari qui m'a été d'une grande aide sur tous les plans.*

*Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicaces



À La mémoire de mon père.

À l'être le plus cher, qui a tant sacrifié  
pour moi, quelle troude ici ma  
reconnaissance et ma gratitude, à toi ma  
chère et aimable Maman.

À mon cher et aimable mari Hocine.

À mes deux enfants : Asma et Ibrahim.

À mes sœurs : Fadila, Djidji, Roukia  
et Cherifa.

À mes beaux frères, mes neveux et mes  
nièces.

À toute la famille Laribi.

À toute la famille Lehouche.

À tous mes frères et sœurs.

## RESUME

Le premier aspect traité dans ce travail consiste à déterminer l'évolution des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge durant le processus de maturation des olives par méthode colorimétrique et par HPLC. Quatre variétés (*Boughenfous*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* et *Takesrit*) ont été étudiées. Les résultats obtenus montrent que la maturation et la variété sont deux facteurs qui influencent significativement la quantité et la qualité des composés phénoliques de l'huile d'olive. Au cours de la maturation, toutes les variétés ont enregistré une diminution de la fraction phénolique et qui varie en fonction de la variété. *Chemlal* a enregistré la plus basse diminution. Le deuxième volet de cette étude concerne la caractérisation du profil en composés phénoliques par HPLC d'une dizaine de variétés de l'huile d'olive vierge (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* et *Tabelout*) et la détermination de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles. Les résultats montrent que la variété *Neb Djemel* se distingue par les teneurs les plus élevées en polyphénols et *ortho*-diphénols suivie des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*. L'analyse par HPLC de la composition en polyphénols des échantillons d'huiles d'olive nous révèle une composition qualitative similaire en composés phénoliques individuels, mais différente d'un point de vue quantitatif, ce qui nous a permis de faire une distinction variétale. Les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* se montrent très performantes avec une bonne activité réductrice, les meilleurs pouvoirs antiradicaux (DPPH, ABTS<sup>+</sup>) des extraits phénoliques et les plus faibles IC<sub>50</sub> du radical ABTS<sup>+</sup>. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive révèle encore que les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* sont les plus actives sur toutes les souches bactériennes testées. Les extraits des huiles étudiées présentent une activité antibactérienne, particulièrement, intéressante contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres de zone d'inhibition les plus élevés et des (CMI) et (CMB) les plus faibles. Les résultats de ce travail montrent clairement que l'huile d'olive vierge algérienne est une source de composés phénoliques doués d'activité antioxydante et antibactérienne.

**Mots clés:** Huile d'olive, composés phénoliques, HPLC, variété, maturation, activité antioxydante, activité antibactérienne.

## ملخص

تطرق المحور الأول من هذا العمل إلى تحديد تطور المركبات الفينولية لزيت الزيتون البكر أثناء مراحل نضج الزيتون بطرق تلويينية و ب HPLC. تمت دراسة أربعة أصناف (بوغنفوس ، بلانكات قالمة، شمال و تكسريت). أظهرت النتائج المحصل عليها أن مرحلة النضج و صنف الزيتون هما عاملان يؤثران جدا على كمية و نوعية المركبات الفينولية لزيت الزيتون. أثناء مراحل النضج سجلت كل الأصناف انخفاضا في الجزئية الفينولية وهذا يتغير حسب الصنف. سجل صنف شمال أصغر نسبة نقصان من هذه المركبات. اهتم المحور الثاني لهذه الدراسة بتحديد نوعية المركبات الفينولية بطريقة HPLC لعشرة أصناف من زيت الزيتون البكر (اغنفاس، اكرمة، بلونكات قالمة، بوشوك صومام، بوريشة، شمال، شمال تازمالت، فركاني، ليملي، نب جمل وطابلوط)، وتحديد الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية للزيوت. أظهرت النتائج أن صنف نب جمل يتميز بأعلى كمية من المركبات الفينولية و الأرتوديفينولية، يتبعها صنف بوريشة و بلنكات قالمة. بينت نتائج التحليل بطريقة HPLC لعينات زيت الزيتون نفس التركيبة النوعية فيما يخص المركبات الفينولية الأحادية و لكن تختلف من حيث الكميات. هذا ما سمح لنا بالتمييز بين مختلف الأصناف. يتميز صنف بوريشة وبلانكات قالمة على باقي الأصناف بامتلاكها لأحسن نشاط إرجاعي وأكبر قدرة مضادة للجذور في طريقتي DPPH , ABTS، للمستخلصات الميثانولية و يملك أيضا أصغر  $IC_{50}$  لجذر ABTS. إن تقدير النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية للزيوت تظهر أن صنف بوريشة و بلانكات قالمة هما الأنشط ضد جميع البكتيريا المجربة وعموما تملك جميع المستخلصات نشاطا مضادا للبكتيريا وخاصة ضد *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* مع ظهور أكبر اقطار لمنطق تثبيط نمو البكتيريا و أصغر CMI و CMB. تظهر النتائج المحصل عليها في هذا العمل بوضوح أن زيت الزيتون البكر الجزائري يعتبر مصدرا للمركبات الفينولية المتميزة بنشاط مضاد للأكسدة، ونشاط مضاد للبكتيريا.

**كلمات مفتاحية:** زيت الزيتون، المركبات الفينولية، HPLC، الصنف، نضج، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا.

## ABSTRACT

The first aspect of this work consists to estimate the evolution of olive oil phenolic compounds during the olive ripening process by colorimetric and HPLC methods. Four varieties (*Boughenfous*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* and *Takesrit*) were investigated. The results showed that both maturation and variety significantly influence the quantity and the quality of olive oil phenolic compounds. During the maturation, all varieties registered a decrease of phenolic fraction and the decrease differed according to variety. *Chemlal* had the least important decrease. The second section of this study concerns the characterization of phenolic profile by HPLC of tenth virgin olive oil varieties (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* and *Tabelout*) and the determination of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of oil. *Neb Djemel* variety is distinguished by the highest levels in polyphenols and *ortho*-diphenols followed by *Bouricha* and *Blanquette de Guelma*. The analysis of the methanolic extracts of oil samples by HPLC reveals a similar qualitative composition of individual phenolic components but a different quantitative composition, which allowed establishing a varietal distinction. *Bouricha* and *Blanquette de Guelma* varieties are very efficient with a good reducing power, the best antiradical activities (DPPH, ABTS<sup>•+</sup>) of phenolic extracts and least IC<sub>50</sub> of ABTS<sup>•+</sup> radical. The methanolic extracts of *Bouricha* and *Blanquette de Guelma* showed the best antibacterial activities on all bacterial strains used. The oil extracts used in the present study exhibit an interesting antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with the highest diameter of inhibition zone and the least CMI and CMB. The results of this work show clearly that Algerian virgin olive oil is a source of phenolic compounds endowed with antioxidant and antibacterial activities.

**Key words:** Olive oil, phenolic compounds, HPLC, variety, antioxidant activity, antibacterial activity.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

---

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### Chapitre I: Huile d'olive

1.1	Définition.....	4
1.2	Les catégories de l'huile d'olive.....	4
1.3	La composition chimique de l'huile d'olive.....	5
1.3.1	La fraction saponifiable .....	5
1.3.2	La fraction insaponifiable .....	6
1.3.2.1	Les stérols .....	6
1.3.2.2	Les composés aromatiques .....	7
1.3.2.3	Les tocophérols .....	7
1.3.2.4	Les pigments.....	8
1.3.2.5	Les hydrocarbures .....	9
1.3.2.6	Les composés phénoliques .....	9

### Chapitre II: Composés phénoliques de l'huile d'olive

2.1	La classification et la structure chimique.....	11
2.1.1	Les acides phénoliques.....	11
2.1.2	Les sécoïridoïdes.....	12
2.1.3	Les alcools phénoliques.....	14
2.1.4	Les flavonoïdes.....	14
2.1.5	Les lignanes.....	15
2.1.6	Les hydroxy-isochromanes.....	16

## Chapitre III: Facteurs influençant les composés phénoliques de l'huile d'olive

3.1	Les facteurs agronomiques et environnementaux .....	17
3.1.1	La variété.....	17
3.1.2	La maturation des olives.....	18
3.1.3	L'irrigation.....	20
3.1.4	Le climat et la saison de récolte .....	20
3.1.5	L'origine géographique.....	22
3.1.6	L'infestation par les ravageurs.....	23
3.2	Les facteurs technologiques.....	23
3.2.1	Le système d'extraction de l'huile.....	23
3.2.2	Le stockage de l'huile d'olive.....	26

---

---

## PARTIE EXPERIMENTALE

---

---

### Chapitre I: Evolution des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge durant la maturation des olives

1.1	<b>Matériel et méthodes</b>	28
1.1.1	Matériel végétal.....	28
1.1.2	Extraction de l'huile d'olive.....	28
1.1.3	Extraction en phase solide (SPE) des composés phénoliques.....	28
1.1.4	Détermination spectrophotométrique des composés phénoliques totaux.....	29
1.1.5	Détermination spectrophotométrique des <i>ortho</i> -diphénols.....	29
1.1.6	Détermination des composés phénoliques par HPLC.....	29
1.2	<b>Résultats et discussion</b>	30
1.2.1	Teneurs en polyphénols totaux et <i>ortho</i> -diphénols.....	30
1.2.2	Profil HPLC des biophénols.....	31
1.2.2.1	Teneurs en polyphénols totaux, tyrosol et hydroxytyrosol.....	31
1.2.2.2	Profil des différentes classes des composés phénoliques.....	33

## Chapitre II: Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques de l'huile d'olive vierge

<b>2.1</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>37</b>
<b>2.1.1</b>	Matériel végétal.....	<b>37</b>
<b>2.1.2</b>	Indice de maturité.....	<b>37</b>
<b>2.1.3</b>	Extraction des composés phénoliques.....	<b>38</b>
<b>2.1.4</b>	Dosage spectrophotométrique des composés phénoliques totaux.....	<b>38</b>
<b>2.1.5</b>	Dosage spectrophotométrique des <i>ortho</i> -diphénols.....	<b>39</b>
<b>2.1.6</b>	Détermination des composés phénoliques des huiles d'olive par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	<b>39</b>
<b>2.1.7</b>	Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques.....	<b>39</b>
<b>2.1.7.1</b>	Pouvoir réducteur.....	<b>39</b>
<b>2.1.7.2</b>	Activité scavenger sur le radical DPPH .....	<b>40</b>
<b>2.1.7.3</b>	Activité scavenger sur le radical ABTS <sup>•+</sup> .....	<b>41</b>
<b>2.1.7.4</b>	Détermination de l'activité scavenger sur peroxyde d'hydrogène.....	<b>41</b>
<b>2.1.8</b>	Détermination de l'activité antibactérienne.....	<b>42</b>
<b>2.1.8.1</b>	Les souches bactériennes.....	<b>42</b>
<b>2.1.8.2</b>	Standardisation des inocula bactériens.....	<b>42</b>
<b>2.1.8.3</b>	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques.....	<b>43</b>
<b>2.1.8.4</b>	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sur milieu solide.....	<b>44</b>
<b>2.1.8.5</b>	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence de l'extrait de la variété <i>Bouricha</i> .....	<b>45</b>
<b>2.1.9</b>	Etude statistique.....	<b>45</b>
<b>2.2</b>	<b>Résultats et discussion</b>	<b>47</b>
<b>2.2.1</b>	Indice de maturité .....	<b>47</b>
<b>2.2.2</b>	Dosage des polyphénols totaux.....	<b>48</b>
<b>2.2.3</b>	Dosage des <i>ortho</i> -diphénols.....	<b>50</b>
<b>2.2.4</b>	Détermination des phénols des huiles d'olives par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	<b>51</b>
<b>2.2.4.1</b>	Les sécoïridoïdes: dérivés d'oleuropéine et de ligstroside.....	<b>52</b>
<b>2.2.4.2</b>	Les lignanes.....	<b>53</b>

<b>2.2.4.3</b>	Les flavonoïdes.....	<b>54</b>
<b>2.2.4.4</b>	Les polyphénols oxydés.....	<b>55</b>
<b>2.2.5</b>	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques.....	<b>57</b>
<b>2.2.5.1</b>	Pouvoir réducteur.....	<b>57</b>
<b>2.2.5.2</b>	Activité scavenger sur le radical DPPH.....	<b>58</b>
<b>2.2.5.3</b>	Activité scavenger sur le radical ABTS <sup>+</sup> .....	<b>60</b>
<b>2.2.2.4</b>	Activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène.....	<b>62</b>
<b>2.2.6</b>	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	<b>64</b>
<b>2.2.6.1</b>	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques par diffusion sur milieu gélosé.....	<b>64</b>
<b>2.2.6.2</b>	Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs.....	<b>70</b>
<b>2.2.6.3</b>	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) .....	<b>73</b>
<b>2.2.6.4</b>	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence de l'extrait de la variété <i>Bouricha</i> .....	<b>75</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>		<b>77</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>81</b>

## **Annexes**

### **Publications**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ABTS** : Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**ANOVA** : Analysis of variance

**ATCC** : American type culture collection

**CLIP** : Collection de l'institut Pasteur

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**COI** : Conseil oléicole international

**3,4-DHPEA** : Hydroxytyrosol

**3,4-DHPEA-AC** : Hydroxytyrosolacétate

**3,4-DHPEA-EA** : Oleuropéine aglycone

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

**DPPH** : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

**DO** : Densité optique

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

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

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50 %

**HPLC** : High performance liquid chromatography

**LMA** : Laboratoire de microbiologie appliquée

**PAL** : L-phénylalanine ammonia lyase

**PCA** : plate count agar

***p*-HPEA** : Tyrosol

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

***p*-HPEA-EDA** : Décarboxyméthyl ligstroside aglycone

**UFC**: Unités formant colonies

**UV** : Ultraviolet

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
<b>Figure 1</b>	Structures chimiques des principaux alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive.....	<b>14</b>
<b>Figure 2</b>	Structures chimiques des lignanes présents dans l'huile d'olive.....	<b>15</b>
<b>Figure 3</b>	Structures chimiques des hydroxy-isochromanes présents dans l'huile d'olive.....	<b>16</b>
<b>Figure 4</b>	Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence et en absence de l'extrait de la variété <i>Bouricha</i> .....	<b>46</b>
<b>Figure 5</b>	Pouvoir réducteur des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives	<b>57</b>
<b>Figure 6</b>	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.....	<b>59</b>
<b>Figure 7</b>	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS <sup>+</sup> des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.....	<b>60</b>
<b>Figure 8</b>	Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.....	<b>63</b>
<b>Figure 9</b>	Activité des extraits vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .....	<b>65</b>
<b>Figure 10</b>	L'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété <i>Bouricha</i> .....	<b>76</b>

## FIGURES EN ANNEXE

<u>Annexe</u>	<u>Titre</u>
<b>Annexe 1</b>	<b>Figure 1</b> : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux (a) et des <i>ortho</i> - diphénols (b).
<b>Annexe 2</b>	<b>Figure 2</b> : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm correspondant à des biophénols typiques présents dans une huile d'olive vierge extra.
<b>Annexe 3</b>	<b>Figure 3</b> : Chromatogramme HPLC des composés phénoliques de l'huile d'olive de la variété <i>Chemlal</i> au stade de maturation vert.
<b>Annexe 4</b>	<b>Figure 4</b> : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux (c) et des <i>ortho</i> - diphénols (d). <b>Figure 5</b> : Courbe d'équivalence pour le pouvoir réducteur.
<b>Annexe 7</b>	<b>Figure 6</b> : Chromatogramme HPLC des composés phénoliques de l'huile d'olive de la variété <i>Blanquette de Guelma</i> .

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
<b>Tableau I</b>	Les différentes catégories d'huile d'olive vierge et leurs critères de qualité.....	<b>4</b>
<b>Tableau II</b>	Composition de l'huile d'olive en acides gras.....	<b>6</b>
<b>Tableau III</b>	Structures chimiques des acides phénoliques présents dans l'huile d'olive.....	<b>13</b>
<b>Tableau IV</b>	Structures chimiques des sécoïridoïdes présents dans l'huile d'olive.....	<b>14</b>
<b>Tableau V</b>	Structures chimiques des flavonoïdes présents dans l'huile d'olive.....	<b>15</b>
<b>Tableau VI</b>	Evolution des teneurs en polyphénols totaux et <i>ortho</i> -diphénols au cours de la maturation de différentes variétés de l'huile d'olive vierge..	<b>30</b>
<b>Tableau VII</b>	Evolution des concentrations (mg/Kg) en polyphénols totaux, hydroxytyrosol et tyrosol des différentes variétés de l'huile d'olive vierge, par HPLC.....	<b>32</b>
<b>Tableau VIII</b>	Teneurs en biophenols majeurs de l'huile d'olive par HPLC, par rapport à la variété et au stade de maturation des olives.....	<b>36</b>
<b>Tableau IX</b>	Les souches bactériennes testées et leurs origines.....	<b>42</b>
<b>Tableau X</b>	Dates de récolte et indice de maturité des différentes variétés d'olives...	<b>47</b>
<b>Tableau XI</b>	Teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives par méthode colorimétrique.....	<b>49</b>
<b>Tableau XII</b>	Teneurs en <i>ortho</i> -diphénols des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives étudiées.....	<b>51</b>
<b>Tableau XIII</b>	Teneurs des composés phénoliques individuels, polyphénols totaux et polyphénols oxydés des huiles d'olives déterminées par HPLC.....	<b>56</b>
<b>Tableau XIV</b>	Détermination des IC <sub>50</sub> sur le radical ABTS <sup>+</sup> des différents extraits des échantillons d'huiles d'olives.....	<b>61</b>
<b>Tableau XV</b>	Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .....	<b>65</b>
<b>Tableau XVI</b>	Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de <i>B. subtilis</i> .....	<b>66</b>
<b>Tableau XVII</b>	Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> .....	<b>67</b>
<b>Tableau XVIII</b>	Activité antibactérienne de quelques composés phénoliques purs.....	<b>72</b>
<b>Tableau XIX</b>	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits méthanoliques de variétés d'huile d'olive et de quelques standards.....	<b>73</b>

## **TABLEAUX EN ANNEXES**

<b><u>Annexe</u></b>	<b><u>Titre</u></b>
<b>Annexe 2</b>	<b>Tableau I</b> : Identification des pics des biophénols de l'huile d'olive vierge par HPLC-MS.
<b>Annexe 5</b>	<b>Tableau II</b> : Gamme de concentrations réalisée pour la détermination de la CMI et CMB.
<b>Annexe 6</b>	<b>Tableau III</b> : Matrice des corrélations.
<b>Annexe 8</b>	<b>Tableau IV</b> : Activité antibactérienne (diamètre de zone d'inhibition en mm) des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive.
<b>Annexe 9</b>	<b>Tableau V</b> : Coefficients de corrélation à une concentration d'extrait de 1 mg/disque.

## **INTRODUCTION GENERALE**

---

## INTRODUCTION GENERALE

Le régime alimentaire méditerranéen est associé avec une faible incidence de maladies cardiovasculaires, d'athérosclérose, de maladies neurodégénératives et de certains types de cancer. Les bienfaits sur la santé de ce régime ont été partiellement associés à la consommation de l'huile d'olive vierge par les populations méditerranéennes (Cicerale *et al.*, 2010). Les effets bénéfiques de l'huile d'olives vierge ont été attribués à sa teneur élevée en acides gras monoinsaturés, particulièrement l'acide oléique, et ses composés mineurs tels que les composés phénoliques, les tocophérols et les caroténoïdes (Visioli et Galli, 1998).

Au cours de ces dernières années, l'intérêt porté sur les composés phénoliques de l'huile d'olive a augmenté à cause de leurs activités biologiques potentielles, jouant ainsi un rôle important dans la santé humaine. Ils constituent une large classe de métabolites secondaires, qui sont des dérivés d'oleuropéine et de ligstroside (Bravo, 1998; Ryan *et al.*, 2002a). Ils contribuent aussi à la flaveur, à la stabilité et à la valeur nutritionnelle de l'huile (Perrin, 1992).

Plusieurs études ont démontré la capacité antioxydante des polyphénols de l'huile d'olive (Visioli *et al.*, 2002; Servili *et al.*, 2009). En plus de l'inhibition de la peroxydation des lipides, les composés phénoliques piègent les radicaux libres et par conséquent protègent le corps humain (Cicerale *et al.*, 2009).

En outre, beaucoup de travaux de recherche ont montré que les polyphénols de l'huile d'olive ont une haute activité antimicrobienne contre un large spectre d'espèces pathogènes (Medina *et al.*, 2006; Karaosmanoglu *et al.*, 2010). L'oleuropéine (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2004) et l'hydroxytyrosol (Bisignano *et al.*, 1999) inhibent ou ralentissent la croissance de plusieurs bactéries. La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. De nombreux cas de bactéries multirésistantes sont rapportés en Algérie (Bouzenoune *et al.*, 2009), pour cela le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ce phénomène.

La teneur de l'huile d'olive en composés phénoliques dépend de plusieurs facteurs, comme la variété, les conditions climatiques, le degré de maturation des olives et la technologie d'extraction de l'huile (Servili *et al.*, 2004). Nombreux travaux de recherche sont consacrés à l'étude de l'influence des ces différents facteurs sur la fraction phénolique de

l'huile d'olives. D'autres études se sont focalisées sur la détermination du profil en composés phénoliques de l'huile d'olive vierge par différentes techniques d'analyse, notamment par HPLC (Montedoro *et al.*, 1992; Rovellini *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 2000; Bendini *et al.*, 2003; De La Torre-Carbot *et al.*, 2005; Rovellini, 2008; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011). Un autre volet de recherche très important sur les polyphénols de l'huile d'olive concerne l'étude de leurs différentes propriétés biologiques.

La culture de l'olivier revêt une importance non négligeable pour l'Algérie. Elle couvre plus de 200.000 ha et représente 49% du verger arboricole national. Cette oléiculture est localisée principalement en Kabylie et dans la région oranaise. Le nombre d'arbres plantés est estimé à 32 millions, avec une production moyenne, de 39800 tonnes (soit 1,4% de la production mondiale) de 2003 à 2009 (COI, 2009). L'oléiculture algérienne est caractérisée par une large gamme de variétés dont une collection (36 variétés) existe au niveau de l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne de la wilaya de Bejaia. Cette wilaya est considérée comme le premier bassin oléicole national, avec plus de 50000 hectares de vergers et 4 millions d'arbres. Les variétés les plus répandues dans cette willaya sont *Chemlal*, *Limli*, *Azeradj* et *Takesrit*.

Malgré la vocation oléicole de l'Algérie et la richesse de son patrimoine oléicole, les travaux de recherche dans ce domaine restent limités, par rapport à la Tunisie et au Maroc. Cette étude sur les composés phénoliques des huiles d'olives algériennes en termes de caractérisation et de détermination des propriétés biologiques s'inscrit parmi les premiers travaux dans ce domaine.

L'objectif général de ce travail consiste à identifier la fraction phénolique des huiles d'olives algériennes et à déterminer leurs éventuelles propriétés antioxydantes, en utilisant différentes techniques (DPPH, ABTS et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et antimicrobiennes. Nous avons également étudié l'influence de deux paramètres à savoir la variété et le stade de maturation des olives sur les composés phénoliques de l'huile d'olive.

Cette présente thèse est subdivisée en deux parties : la synthèse bibliographique et l'étude expérimentale. La partie bibliographique comporte trois chapitres :

- ✚ Le premier chapitre traite l'huile d'olive;
- ✚ Le deuxième est consacré à l'étude des composés phénoliques de l'huile d'olive;
- ✚ Le troisième traite les facteurs influençant les composés phénoliques de l'huile d'olive.

La partie expérimentale, quant à elle, est subdivisée en deux chapitres :

- ✚ Le premier porte sur l'étude de l'évolution des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge durant la maturation des olives de quatre variétés (*Boughenfous*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* et *Takesrit*) récoltées durant la campagne oléicole 2006/2007;
- ✚ Le deuxième est consacré à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une dizaine de variété de l'huile d'olive vierge (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* et *Tabelout*) récoltées durant la campagne 2008/2009.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## CHAPITRE I : HUILE D'OLIVE

### 1.1. Définition

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

### 1.2. Les catégories de l'huile d'olives vierge

L'huile d'olive vierge comprend diverses appellations: vierge extra, vierge ou vierge fine, vierge courante et vierge lampante (Perrin, 1992). L'appartenance à une catégorie est définie en fonction de l'évaluation de quelques paramètres de qualité de l'huile d'olive à savoir: l'acidité, l'indice de peroxyde, l'absorbance dans l'UV et les caractéristiques organoleptiques (Christopoulou *et al.*, 1995; Fedeli, 1999).

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

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

Huile Paramètre	Huile d'olive vierge extra	Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge courante	Huile d'olive vierge lampante
<b>Caractéristiques organoleptiques</b>				
-Fruité	Me >0	Me >0	Me = 0	-
-Défaut	Me = 0	0 < Me < 2,5	2,5 < Me < 6,0	Me > 6,0
<b>Acidité libre (% d'acide oléique)</b>	≤ 0,8	≤ 2	≤ 3,3	> 3,3
<b>Indice de peroxyde (még O<sub>2</sub>/Kg)</b>	≤ 20	≤ 20	≤ 20	Non limité
<b>Extinction spécifique (UV)</b>				
-K <sub>232</sub>	≤ 2,5	≤ 2,6	-	-
-K <sub>270</sub>	≤ 0,22	≤ 0,25	≤ 0,3	-

- Me : Médiane

### 1.3. La composition de l'huile d'olive

La composition chimique de l'huile d'olive (*Olea europaea L.*) dépend largement de la variété du fruit, des conditions agronomiques, du degré de maturité, des procédés d'extraction et des conditions de stockage (Cichelli et Pertesana, 2004).

Les constituants de l'huile d'olive sont souvent classés en deux catégories : la fraction saponifiable et la fraction insaponifiable.

#### 1.3.1. La fraction saponifiable

La fraction saponifiable est constituée d'acides gras et de leurs dérivés (acylglycérols, phosphatides). Elle représente environ 99% de l'huile et lui confère la plupart de ses caractéristiques physiques, chimiques et métaboliques (Ryan *et al.*, 1998).

##### a) Les glycérides

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

##### b) Les acides gras

La composition en acides gras totaux est un paramètre de qualité et d'authenticité des huiles d'olives. Cette composition est très variable et dépend de la variété, du climat et de la région de production, de l'année et la période de récolte ainsi que des techniques d'extraction et des conditions de stockage (Zarrouk *et al.*, 1996; Ait Yacine *et al.*, 2002). Comparée à d'autres huiles végétales, l'huile d'olive est caractérisée par sa richesse en acides gras monoinsaturés et présente de faibles teneurs en acides gras saturés (Ajana *et al.*, 1998; Salas *et al.*, 2000; Keceli et Gordon, 2001).

De toutes les huiles végétales, l'huile d'olive est celle qui présente le plus fort rapport acides gras monoinsaturés/acides gras polyinsaturés. Cette particularité confère à l'huile d'olive une plus grande stabilité à l'auto-oxydation (Perrin, 1992; Baccouri *et al.*, 2008).

L'huile d'olive présente un profil en acides gras (tableau II) dominé par l'acide oléique (C18: 1) présent en grande quantité (55 à 83 %) et renferme des teneurs moindres en acide linoléique (C18: 2), en acide palmitique (C16: 0) et en acide stéarique (C18: 0). Les acides

palmitoléique (C16 :1), linoléique (C18 :3) et arachidique (C20 :0) sont présents en faibles quantités (Ryan *et al.*, 1998).

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

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

### 1.3.2. La fraction insaponifiable

Cette fraction, dénommée constituants mineurs, représente environ 2 % de la composition totale de l'huile d'olive et comptent plus de 230 composés différents (Visioli et Galli, 1998).

#### 1.3.2.1. Les stérols

Les stérols représentent les constituants majeurs de la fraction insaponifiable de l'huile d'olive (20%) et sont présents sous forme libre et estérifiée avec les acides gras (Phillips *et al.*, 2002). Les principaux stérols de l'huile d'olive sont le  $\beta$ -sitostérol (75% à 90%), le  $\Delta$ -5-avenastérol et le campesterol. D'autres stérols sont également présents à l'état de traces, à savoir : le cholestérol, le  $\Delta$ -7-stigmastérol, le  $\Delta$ -7-avenastérol et le campestanol (Boskou *et al.*, 2006).

Les teneurs en stérols de l'huile d'olive varient de 1000 à 3000 mg/Kg (Ryan *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 2007). Ces teneurs varient en fonction de la variété, de la maturité des olives (Ajana *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2007) et de l'origine géographique des olives (Ben Temime *et al.*, 2008).

Les stérols de l'huile d'olive, en particulier, le  $\beta$ -sitostérol et le  $\Delta$ -5-avenastérol, sont doués de propriétés antioxydantes ( Ben Tekaya et Hassouna, 2005).

Plusieurs travaux ont signalé que la composition de la fraction stérolique constitue un paramètre important dans la détection d'adultérations des huiles (Phillips *et al.*, 2002; Velasco et Dobargane, 2002; García-González *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2007)

### 1.3.2.2. Les composés aromatiques

Plus de cent composés contribuent à l'arôme délicat et unique de l'huile d'olive. Ces composés proviennent des fruits et ils sont incorporés à l'huile durant le broyage et le malaxage des olives (Salas *et al.*, 2000; Angerosa *et al.*, 2001). Ils sont constitués d'un mélange de composés volatils tels que les hydrocarbures, les aldéhydes, les alcools, les cétones, les furanes et les esters, qui sont des molécules de faible poids moléculaire (Vichi *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2006).

Ils sont principalement générés par la voie de lipoxigénase par oxydation des acides gras polyinsaturés (les acides linoléique et linoléique), ce qui conduit à la formation des principaux aldéhydes en C<sub>6</sub>, des alcools et des esters dans l'huile d'olive (Sánchez et Harwood, 2002). D'autres composés volatils se forment durant le métabolisme des acides gras et des acides aminés (désamination) aboutissant à la production des acides acétique et propionique, d'aldéhydes, d'alcools et d'esters (Luna *et al.*, 2006).

La teneur en composés volatils dépend étroitement de l'activité des enzymes de la voie de la lipoxigénase et varie selon le cultivar, le degré de maturité des olives, le stockage des olives, l'opération de lavage, le temps et la température du malaxage, les conditions climatiques et l'état sanitaire des olives (Miliauskas *et al.*, 2004; Runcio *et al.*, 2008).

### 1.3.2.3. Les tocophérols

Les tocophérols se présentent sous quatre formes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) qui se différencient entre elles par le nombre et la position des groupements méthyles fixés sur le noyau aromatique (Soulier et Farines, 1992). Les tocophérols de l'huile d'olive se trouvent libres ou estérifiés, l' $\alpha$

tocophérol, doté de la plus forte activité antioxydante, représentent plus de 95 % des tocophérols totaux (Ryan *et al.*, 1998).

Ils contribuent à la stabilité oxydative et aux qualités nutritionnelles de l'huile d'olive (Ryan *et al.*, 1998 ; Gimeno *et al.*, 2002). En effet, ils exercent une activité antioxydante par rupture de la chaîne radicalaire lors des étapes de propagation de l'oxydation lipidique, comme ils peuvent prévenir l'action de l'oxygène singulet, initiateur de la peroxydation des lipides (Psomiadou et Tsimidou, 2002a; Ben Tekaya et Hassouna, 2005).

Les teneurs en tocophérols, généralement rapportées pour une huile d'olive d'une bonne qualité, varient de 100 à 300 mg/Kg (Perrin 1992; Allalout *et al.*, 2009). Ces teneurs varient en fonction de plusieurs facteurs dont la variété de l'olive et sa maturité ainsi que les conditions et la durée de la conservation de l'huile (Assmann et Wahrburg, 1999; Gimeno *et al.*, 2002).

#### **1.3.2.4. Les pigments**

La couleur de l'huile d'olive est un paramètre de qualité qui dépend de sa composition en pigments (Roca et Minguez-Mosquera, 2001; Beltran *et al.*, 2005). Ils sont responsables de la couleur verdâtre à jaune de l'huile d'olive (Cichelli et Pertesana, 2004).

Deux groupes de pigments sont identifiés dans l'huile d'olive, ceux qui sont présents naturellement dans le fruit d'olive : chlorophylle a et b, lutéine,  $\beta$ -carotène, anthéroxanthine, violaxanthine et neoxantine et ceux qui se forment durant le processus d'extraction de l'huile d'olive : phéophytine a et b, lutéoxanthine, auroxanthine et mutatoxanthine (Minguez-Mosquera *et al.*, 1990; Gandul-Rojas et Minguez-Mosquera, 1996a; Criado *et al.*, 2007).

##### **a) Les chlorophylles**

Les chlorophylles représentent un groupe de tetrapyroles à magnésium, leurs teneurs varient de 0 à 20 ppm et elles sont responsables de la nuance verdâtre de l'huile d'olive (Gandul-Rojas et Minguez Mosquera, 1996a).

Les chlorophylles a et b sont naturellement présentes dans les olives fraîches; les phéophytines a et b présentent 40 à 80% des chlorophylles totaux de l'huile et sont formées durant les étapes de broyage et le malaxage suite à la libération d'acides (Minguez-Mosquera *et al.*, 1990; Criado *et al.*, 2007). En effet, au cours de l'extraction de l'huile, la libération d'acides provoque une perte en chlorophylles a et b, par transformation en phéophytines a et b suite à la perte du  $Mg^{+2}$  (Minguez-Mosquera *et al.*, 1990).

En présence de lumière, les chlorophylles et les phéophytines ont une activité pro-oxydante, en induisant à la formation de l'oxygène singulet qui promeut la première phase du processus d'auto-oxydation (Minguez-Mosquera *et al.*, 1990; Cichelli et Pertesana, 2004).

Au cours de la maturation des olives, la teneur en chlorophylles diminue suite à leur dégradation par les lipooxygénases, les peroxydases ou les chlorophyllases (Gandul-Rojas et Minguez-Mosquera, 1996b). Selon Garcia *et al.* (1996), ces pigments sont remplacés par les anthocyanes.

### **b) Les caroténoïdes**

Les principaux caroténoïdes dans l'huile d'olive sont la lutéine, le  $\beta$ -carotène et les xanthophylles suivantes : néoxanthine, violaxanthine, lutéoxanthine, anthéroxanthine, mutatoxanthine et beta-cryptoxanthine (Ryan *et al.*, 1998; Mateos et García-Mesa, 2006). Leur teneur dans l'huile d'olive dépend de la variété, du degré de maturité, des conditions environnementales, du procédé d'extraction et des conditions de stockage (Criado *et al.*, 2004; Giuffrida *et al.*, 2007). Cette teneur oscille entre 1 à 100 ppm, avec une prédominance de la lutéine et du  $\beta$ -carotène (Minguez-Mosquera *et al.*, 1991; Psomiadou et Tsimidou, 2001).

Les caroténoïdes possèdent une activité antioxydante (Soulie et Farines, 1992; Salvador *et al.*, 2001; Giuffrida *et al.*, 2007). Ils exercent un effet inhibiteur sur la photooxydation en désactivant l'oxygène singulet induit par les pigments chlorophylliens (Perrin, 1992; Kiritsakis et Osman, 1995).

#### **1.3.2.5. Les hydrocarbures**

Deux hydrocarbures sont présents en quantité considérable dans l'huile d'olive : le  $\beta$ -carotène et le squalène. Ce dernier est un terpène insaturé (isoprénoïde) et constitue le composé majoritaire des hydrocarbures (plus de 90%). Sa teneur varie de 200 à 7500 mg/Kg d'huile (Perrin, 1992).

Le squalène, précurseur de synthèses des stérols, est caractérisé par une stabilité élevée sous des conditions d'autooxydation et contribue ainsi à la stabilité de l'huile après exposition à la lumière (Psomiadou et Tsimidou, 2002b).

#### **1.3.2.6. Les composés phénoliques**

L'huile d'olive renferme plus de 30 composés phénoliques (Visioli et Galli, 1994; Tuck et Hayball, 2002). Ce sont des substances naturelles qui confèrent à l'huile d'olive des

propriétés organoleptiques et contribuent à la bonne stabilité de l'huile à l'auto-oxydation (Perrin, 1992; Ollivier *et al.*, 2004; Tura *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques de l'huile d'olive appartiennent à diverses familles : acides et alcools phénoliques, sécoïridoïdes, lignanes, flavonoïdes, etc. (Ninfali *et al.*, 2001). Ils sont soit liés, etherfiés ou estérifiés avec les glycosides (Perrin, 1992; Dhifi *et al.*, 2006) soit à l'état libre suite à des réactions d'oxydation et d'hydrolyse au sein de ces composés au cours de la maturation du fruit, ou lors du processus de l'extraction (Vazquez-Roncero, 1978; Tsimidou, 1998; Dhifi *et al.*, 2006).

## CHAPITRE II: COMPOSES PHENOLIQUES DE L'HUILE D'OLIVE

L'huile d'olive est quasiment la seule huile contenant des quantités notables de substances phénoliques naturelles, ces composés confèrent à l'huile son goût si particulier, à la fois amère et fruité (Perrin, 1992). Ces composés appartiennent à diverses familles (Ollivier *et al.*, 2004) et ils constituent un mélange complexe de composés avec différentes structures chimiques (Boskou, 2009). Selon Bendini *et al.* (2007), les dérivés de l'oleuropéine sont majoritaires dans les huiles d'olive vierges.

### 2.1. La classification et la structure chimique

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances à noyau benzénique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles. Leur classification est basée sur le nombre et la nature des substituants (Tsimidou, 1998). L'huile d'olive vierge comporte plusieurs classes de composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les alcool phénoliques, les hydroxyisochromanes, les flavonoïdes, les sécoïridoïdes et les lignanes (Servili *et al.*, 2004).

#### 2.1.1. Les acides phénoliques

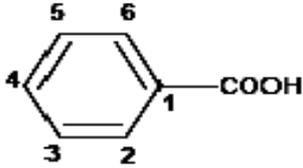
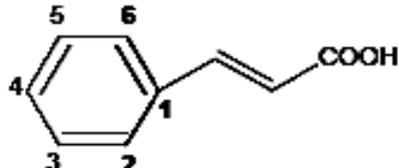
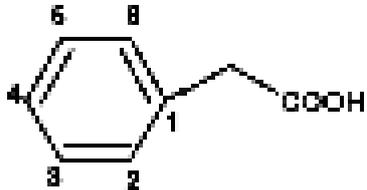
C'est le premier groupe de composés phénoliques qui a été identifié dans l'huile d'olive vierge par Montedoro en 1972 et Vasquez-Roncero en 1978 (Servili *et al.*, 2004). Selon Bendini *et al.* (2007), plusieurs acides phénoliques (tableau III) ont été identifiés et quantifiés dans l'huile d'olive vierge avec de faibles teneurs (< 1 mg/Kg). Ils présentent deux structures de base : hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique.

- Dérivés hydroxybenzoïques dont la structure de base est C6-C1, ils incluent l'acide benzoïque, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechique, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide gentisique et l'acide syringique (Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006).

- Dérivés hydroxycinnamiques dont la structure de base C6-C3, ils incluent l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-coumarique, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide sinapique (Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006).

A côté de ces deux structures de base, Carrasco-Pancorbo *et al.* (2005a) ont décrit d'autres composés : l'hydroxyphénylacétiques (C6-C2) tels que l'acide 4-hydroxyphénylacétique et l'acide homovanillique; le DOPAC (acide 3,4-dihydrophénylacétique) et le 4-(acétoxy-ethyl)-1,2-dihydroxybenzène.

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

Composé	Substituant	Structure
<i>Dérivés hydroxybenzoïques</i>		
- Acide 3-hydroxybenzoïque - Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque - Acide 3,4-dihydroxybenzoïque - Acide gentisique - Acide gallique - Acide vanillique - Acide syringique	- 3-OH - 4-OH - 3,4-OH - 2,5-OH - 3,4,5-OH - 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH - 3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	
<i>Dérivés hydroxycinnamiques</i>		
- Acide <i>p</i> -coumarique - Acide <i>o</i> -coumarique - Acide caféique - Acide ferulique - Acide sinapique	- 4-OH - 2-OH - 3,4-OH - 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH - 3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	
<i>Autres acides phénoliques</i>		
- <i>p</i> -hydroxyphénylacétique - 3,4-dihydroxyphénylacétique - 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique	- 4-OH - 3,4-OH - 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	

### 2.1.2. Les sécoïridoïdes

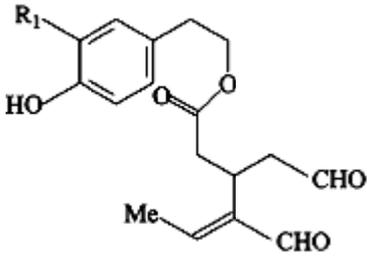
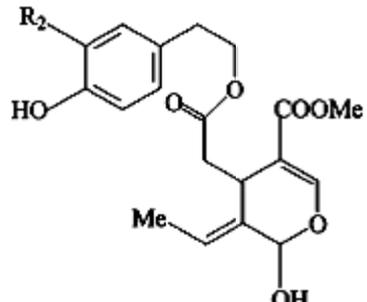
Ce sont des composés abondants dans les *Oleaceae* et ils sont caractérisés par la présence de l'acide élénolique dans ses formes glucosidique ou aglyconique dans leur structure moléculaire. En particulier, ils sont formés d'un alcool phényléthyl (hydroxytyrosol ou tyrosol), de l'acide élénolique et, éventuellement, d'un résidu glucosidique. L'oleuropéine est un ester d'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et du glucoside de l'acide élénolique (EA) (Amiot *et al.*, 1986; Montedoro *et al.*, 1993).

Les sécoïridoïdes de l'huile d'olive vierge dans les formes aglyconiques résultent des glycosides des fruits d'olives par hydrolyse réalisée par la  $\beta$ -glucosidase endogène durant le broyage et le malaxage (Tsimidou, 1998).

Les sécoïridoïdes sont les composés phénoliques prévalents dans l'huile d'olive vierge, ils dérivent de l'oleuropéine, du démethyloleuropéine et du ligstroside, les plus abondants sont la forme dialdéhydrique de l'acide décarboxyméthyl élénolique lié à l'hydroxytyrosol et au tyrosol (*p*-HPEA) nommés respectivement 3,4-DHPEA-EDA et *p*-HPEA-EDA et l'isomère de l'oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA) (tableau IV). Ces composés ont été identifiés pour la première fois en 1992 et leurs structures chimiques ont été assignées en 1993 par Montedero et collaborateurs (Servili *et al.*, 2004).

Les aglycones de l'oleuropéine et du ligstrosides ainsi que leurs formes dialdehydiques ont été détectés comme phénols mineurs de l'huile d'olive vierge. Ces composés sont des structures intermédiaires de transformation biochimique des sécoïridoïdes glucosides du fruit d'olive tels que l'oleuropéine, le démethyloleuropéine et le ligstroside vers des dérivés aglycones finals correspondant au 3,4-DHPEA-EDA à partir de l'oleuropéine et du démethyloleuropéine et au *p*-HPEA-EDA à partir du ligstroside, respectivement (Servili *et al.*, 2004).

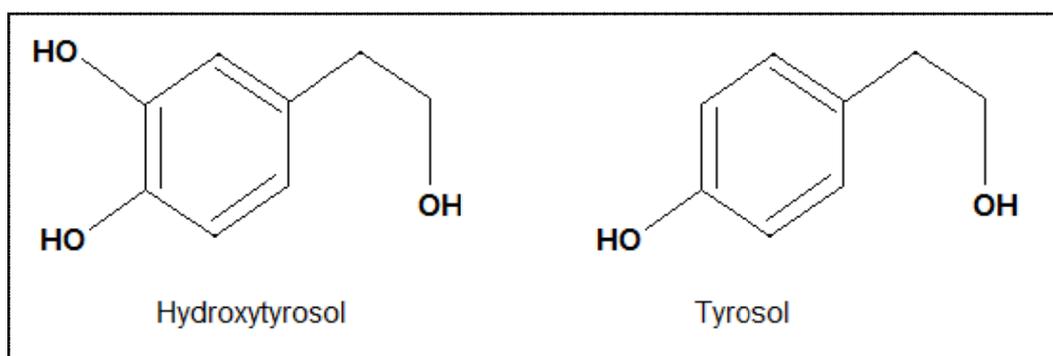
**Tableau IV** : Structures chimiques des sécoïridoïdes présents dans l'huile d'olive  
(Servili *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006).

Composé	Substituant	Structure
- Forme dialdehydique du décarboxyméthyl oleuropéine aglycone ou (3,4-DHPEA-EDA)  - Forme dialdehydique du décarboxyméthyl ligstroside aglycone ou ( <i>p</i> -HPEA-EDA)	R <sub>1</sub> -OH  R <sub>1</sub> -H	
- Oleuropéine aglycone ou (3,4 DHPEA-EA)  - Ligstroside aglycone ou ( <i>p</i> -HPEA-EA)	R <sub>2</sub> -OH  R <sub>2</sub> -H	

### 2.1.3. Les alcools phénoliques

Les principaux alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive sont l'hydroxytyrosol « (3,4-dihydroxyphényl)éthanol ou (3,4-DHPEA) » et le tyrosol « (*p*-hydroxyphényl)éthanol ou (*p*-HPEA) » (figure 1); leur concentration est généralement basse dans les huiles d'olive fraîches mais augmente durant le stockage de l'huile (Montedoro *et al.*, 1992). Cette augmentation est due au mécanisme d'hydrolyse des sécoïridoïdes qui entraîne la libération de l'hydroxytyrosol et du tyrosol (Tsimidou, 1998).

Bianco *et al.* (1998) ont identifié la forme glucosidique de l'hydroxytyrosol dans l'huile d'olive vierge. La forme acétate de l'hydroxytyrosol (Brenes *et al.*, 1999) et du tyrosol (Matéos *et al.*, 2001) ont été aussi identifiées dans l'huile d'olive vierge.



**Figure 1:** Structures chimiques des principaux alcools phénoliques présents dans l'huile d'olive (Pirisi *et al.*, 2000).

### 2.1.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes aglycones sont subdivisés en flavones, flavonols, flavanones et flavanols dépendant de la présence d'un carbone carbonylé en C-4, un groupement OH en C-3, une liaison saturée entre C-2 et C-3 et une combinaison non carbonylée en C-4 avec un groupement OH en C-3, respectivement (Bendini *et al.*, 2007).

La lutéoline et l'apigénine (tableau V) sont des flavones qui ont été décrits dans les huiles d'olive italienne par Rovellini *et al.* (1997). Ce sont, respectivement, des dérivées de la rutine ou de la lutéoline 7-glucoside et de l'apigénine glucoside (Brenes *et al.*, 1999). Leurs positions dans le chromatogramme des extraits phénoliques de l'huile d'olive ainsi que leur quantification ont été réalisés pour la première fois pour les huiles espagnoles par Brenes *et al.* (1999).

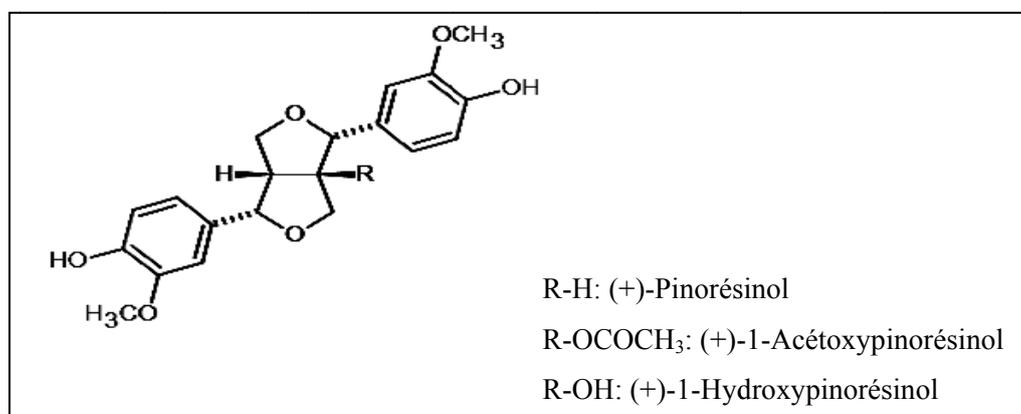
En 2004, Carrasco-Pancorbo et collaborateurs ont identifié un flavonol dans l'huile d'olive vierge espagnole et qui est nommé la (+)-taxifoline.

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

Composé	Substituant	Structure
- Apigénine - Lutéoline	R-H R-OH	
- (+)-Taxifoline		

### 2.1.5. Les lignanes

C'est le dernier groupe de phénols identifié dans l'huile d'olive vierge. Brenes *et al.* (2000) et Owen *et al.* (2000) ont isolé et caractérisé le (+)-1-acétoxypinorésinol, le (+) pinorésinol et le (+)-1-hydroxypinorésinol (figure 2) comme les lignanes les plus fréquents dans les huiles d'olive vierges.



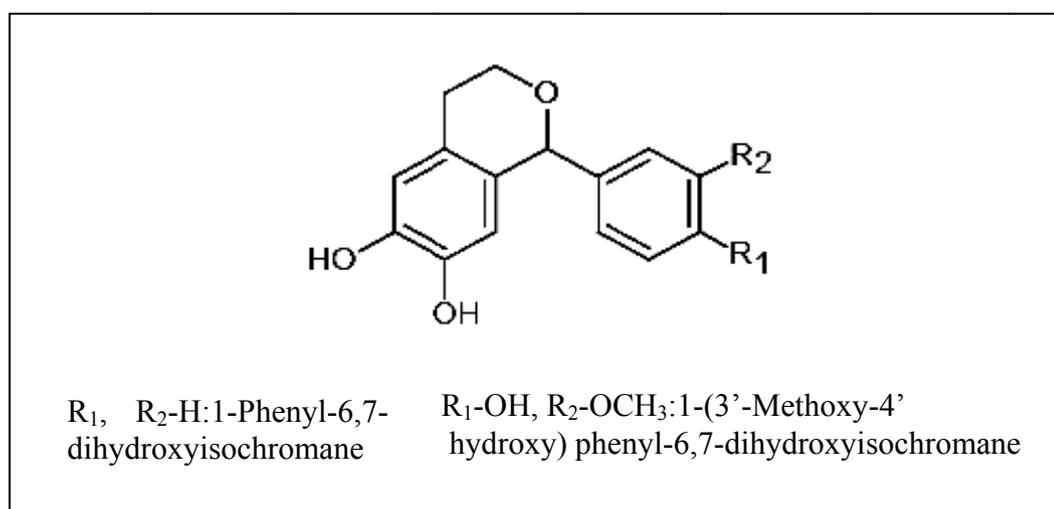
**Figure 2 :** Structures chimiques des lignanes présents dans l'huile d'olive (Bendini *et al.*, 2007).

Selon Owen *et al.* (2000), la quantité de lignanes dans l'huile d'olive vierge peut être supérieure à 100 mg/Kg avec plusieurs variations entre les huiles.

### 2.1.6. Les hydroxy-isochromanes

C'est grâce aux travaux de Bianco *et al.* (2001) qu'une nouvelle classe de composés phénoliques de l'huile d'olive vierge a été trouvée. Il s'agit des hydroxy-isochromanes : le 1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane et le 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane (figure 3). Selon ces auteurs, ces deux composés dérivent des réactions de condensation de l'hydroxytyrosol avec le benzaldehyde et la vanilline respectivement. Les teneurs en ces composés dans l'huile d'olive vierge sont très basses et extrêmement variables, allant de 8 à 1400 ng/Kg pour le 1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane et de 20 à 390 ng/Kg pour le 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochromane.

En fait, durant l'étape de malaxage de l'extraction de l'huile d'olive, les processus hydrolytiques à travers l'activité des glycosidases et des estérases augmentent la quantité de l'hydroxytyrosol et des composés carbonyliques, favorisant ainsi la présence de tous les composés nécessaires à la formation des dérivés isochromanes (Bianco *et al.*, 2001).



**Figure 3** : Structures chimiques des hydroxy-isochromanes présents dans l'huile d'olive (Bianco *et al.*, 2001).

## CHAPITRE III : FACTEURS INFLUENÇANT LES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'HUILE D'OLIVE

La composition qualitative et quantitative des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge est fortement influencée par les aspects agronomiques et environnementaux (variété, maturation climat...) et par les conditions technologiques de production (Tovar *et al.*, 2001; Servili *et al.*, 2004; Fregapane et Salvador, 2013).

Plusieurs études sont menées dans l'objectif de déterminer dans quelle mesure ces différents facteurs influent sur les quantités et les profils des différents composés phénoliques de l'huile d'olive.

### 3.1. Les facteurs agronomiques et environnementaux

#### 3.1.1. La variété

La composition phénolique du fruit d'olive est qualitativement affectée par le cultivar (Brenes *et al.*, 2002; Briante *et al.*, 2002; Gómez-Alonso *et al.*, 2002; Pinelli *et al.*, 2003). Amiot *et al.* (1986) ont noté qu'il ya une corrélation inverse entre la teneur en oleuropéine et la taille des olives et inversement pour le verbascoside. Ces mêmes auteurs ont signalé la présence du démethyloleuropéine dans certaines variétés d'olives d'où la suggestion d'utiliser certaines composés phénoliques comme des marqueurs de l'origine génétique du fruit d'olive.

La variété de l'olive est l'un des principaux facteurs qui détermine la teneur et le profil en composés phénoliques de l'huile d'olive vierge (Fregapane et Salvador, 2013). Plusieurs travaux de recherche ont signalé que la composition en polyphénols de l'huile d'olive est largement influencée par le cultivar (Brenes *et al.*, 1999; Cerretani *et al.*, 2004; Ocakoglu *et al.*, 2009; Vekari *et al.*, 2010). Cette composition constitue une propriété intrinsèque de la variété permettant la caractérisation variétale des huiles d'olives (Inglese, 1994; Cortesi *et al.*, 2000; Gómez-Alonso *et al.*, 2002 ).

Une forte activité enzymatique de la L-phénylalanine ammonia lyase (PAL) est associée à l'accumulation des composés phénoliques dans les olives et par conséquent dans l'huile (Tovar *et al.*, 2002). D'après Artajo Medina (2006), une corrélation positive est observée entre l'activité enzymatique de la L-phénylalanine ammonia lyase (PAL) et le taux de polyphénols présents dans la pulpe des olives. La concentration en polyphénols totaux dans l'huile d'olive est alors conditionnée par cette enzyme qui joue un rôle important dans la

désamination de la phénylalanine et sa conversion en acide trans-cinnamique impliqué dans la synthèse des composés phénoliques.

Selon le travail mené par Dhifi *et al.* (2006) sur quatre variétés d'huiles d'olive tunisiennes cultivées dans la même parcelle expérimentale, la teneur en polyphénols totaux peut constituer un paramètre de distinction entre les quatre variétés. La différenciation variétale est également relevée au niveau des teneurs en polyphénols individuels : Brenes *et al.* (2002) ont noté des différences significatives dans la teneur en 1-acetoxypinorésinol entre les variétés espagnoles *Empeltre* (94,2 mg/kg) et *Picual* (1,9 mg/kg). Ces auteurs ont suggéré que la quantité de lignanes peut être utilisée comme un marqueur variétal et ils ont rapporté une méthode d'authentification de l'huile d'olive vierge produite à partir d'olives de la variété *Picual*. Cette méthode est basée sur la très faible teneur en (+)-1-acetoxypinorésinol dans les huiles.

Gómez-Rico *et al.* (2008) ont réalisé une étude sur six variétés espagnoles appartenant à une même oliveraie, ils ont noté que les dérivés sécoïridoïdes de l'hydroxytyrosol et du tyrosol étaient la fraction phénolique majeure dans toutes les variétés étudiées, mais leur distribution varie dans les différentes variétés étudiées. Pour *Arbequina*, *Cornicabra*, *Picolimòn* et *Picual*, les dérivés sécoïridoïdes d'hydroxytyrosol étaient les complexes de phénols les plus importants, spécialement le 3,4-DHPEA-EDA, tandis que pour *Morisca* et *Picudo*, les dérivés sécoïridoïdes du tyrosol constituaient les composés majeurs avec principalement le *p*-HPEA-EDA.

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

Plusieurs auteurs ont suggéré que le profil en phénols peut être utilisé pour classer les huiles d'olive vierges en fonction de la variété du fruit (Brenes *et al.*, 1999; Mateos *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2001; Gómez-Alonso *et al.*, 2002). En effet, Gómez-Alonso *et al.* (2002) ont proposé une classification variétale par le profil HPLC des composés phénoliques des principales variétés commerciales d'huile d'olive espagnole à savoir : *Cornicabra*, *Arbequina*, *Picual* et *Hojiblanca*.

### 3.1.2. La maturation des olives

Le période de récolte appropriée est un facteur clé dans la détermination de la balance entre la quantité et la qualité de l'huile d'olive (Dağdelen *et al.*, 2013).

L'effet négatif de la maturation du fruit d'olive sur la concentration des composés phénoliques de l'huile d'olive est particulièrement clair (Servili *et al.*, 2004). Brenes *et al.* (1999) ont noté que les olives surmaturées donnaient des huiles avec les teneurs les plus basses en composés phénoliques. Plusieurs auteurs ont signalé que la teneur de l'huile d'olive en composés phénoliques diminue fortement au cours de la maturation des olives (Gimeno *et al.*, 2002; Rotondi et Magli, 2004; Gómez-Rico *et al.*, 2008; Bengana *et al.*, 2013).

En effet, au cours de la maturation des olives, l'activité de l'enzyme PAL diminue (Tovar *et al.*, 2002) et l'activité des estérases et des glucosidases augmente (Ryan *et al.*, 2002a; Baccouri *et al.*, 2008) entraînant ainsi une réduction des taux de polyphénols totaux. D'après Ortega-Garcia et Peragon (2009), cette réduction peut être aussi expliquée par l'oxydation de composés phénoliques par la polyphénoloxydase.

La teneur en phénols individuels montre aussi une certaine variation au cours de la maturation :

- La teneur en oleuropéine diminue au cours de la maturation suite à son hydrolyse par des estérases engendrant ainsi l'accumulation de démethyloleuropéine (Amiot *et al.*, 1989; Caponio *et al.*, 2001; Visioli *et al.*, 2002; Rovellini et Cortesi, 2003). Ce dernier diminue fortement dans les olives surmaturées (Amiot *et al.*, 1989);

- L'oleuropéine et sa forme aglycone diminuent avec la progression de la maturation (Caponio *et al.*, 2001), ainsi que le décarboxyméthyl oleuropéine aglycone (Bengana *et al.*, 2013);

- La concentration en hydroxytyrosol et tyrosol augmente, tandis que la concentration en glucosides aglycones diminue avec la maturation (Brenes *et al.* 1999 ; Ryan *et al.*, 1999a). Dağdelen *et al.* (2013) ont signalé l'augmentation de la teneur en hydroxytyrosol jusqu'au mois d'octobre puis suivi d'une diminution. Par contre, Jiménez *et al.* (2013) ont enregistré une diminution progressive de la teneur en hydroxytyrosol au cours de la maturation pour la variété espagnole *Picudo*;

- Il ya une augmentation progressive de la teneur en lutéoline au cours de la maturation (Brenes *et al.*, 1999; Ryan *et al.* 1999a; Dağdelen *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2013);

- Il ya une diminution de la forme dialdéhydrique des aglycones du ligstroside et une augmentation du tyrosol (Dugo *et al.*, 2004).

Selon Boskou (2000), les olives saines récoltées lorsque la couleur de l'épiderme change du vert pâle au marron foncé, qui sont rapidement transportées au moulin, broyées et pressées immédiatement avec un matériel propre à une température inférieure à 30°C conduisent à une huile d'olive de haute qualité et riche en composés phénoliques.

### 3.1.3. L'irrigation

Plusieurs études ont signalé que la fraction phénolique de l'huile d'olive est affectée significativement par le régime d'irrigation appliqué aux oliviers et que le stress hydrique induit l'augmentation des teneurs en composés phénoliques des huiles (Patumi *et al.*, 1999; Motilva *et al.*, 2000; Tovar *et al.*, 2001; El Antari *et al.*, 2002; Rotondi et Magli, 2004; Aganchich *et al.*, 2008; Baccouri *et al.*, 2009). En effet, l'activité de L-phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est plus grande sous des conditions de stress hydrique (Patumi *et al.*, 1999; Tovar *et al.*, 2002).

Le stress hydrique n'influence pas seulement la teneur totale en polyphénols, mais également leur profil et par conséquent les propriétés organoleptiques et la stabilité oxydative de l'huile d'olive (Tovar *et al.*, 2001).

Tovar *et al.* (2001) ont soumis de jeunes oliviers (6 ans) de la variété espagnole *Arbequina* à des stratégies d'irrigation linéaire. Les résultats trouvés montrent la complexité des processus biochimiques qui contrôlent la formation des composés phénoliques de l'olive ; les composés secoïridoïdes (3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA- EDA et le 3,4-DHPEA-EA) ont subi une diminution linéaire au cours de l'irrigation. Concernant les phénols simples, seulement la vanilline et le 3,4-DHPEA-AC ont été affectés par la quantité d'eau d'irrigation appliquée aux oliviers. La teneur de la vanilline dans les huiles augmente, par contre le 3,4-DHPEA-AC diminue avec l'augmentation de la quantité d'eau d'irrigation appliquée. Concernant les lignanes, leur teneur était plus basse dans les huiles issues des oliviers les moins irrigués.

Romero *et al.* (2002) ont noté que la concentration des lignanes, de l'acide vanillique et de la vanilline augmente dans les huiles issues des oliviers les plus irrigués. Cependant, les dérivés secoïridoïdes augmentent dans les huiles issues d'oliviers ayant subi le plus un stress hydrique.

### 3.1.4. Le climat et la saison de récolte

Le climat a un impact majeur sur la teneur en composés phénoliques de l'huile d'olive (Butinar *et al.*, 2006). Selon Cimato *et al.* (1992) cités par Visioli et Galli (1998), les olives se

développant dans des climats plus chauds, malgré une maturation plus rapide, produisent des huiles qui sont plus riches en phénols. Tovar *et al.* (2002) ont signalé que l'activité de la PAL augmente dans des conditions arides. L'influence des conditions climatiques et de la saison de récolte sur les composés phénoliques de l'huile d'olive a été étudiée par plusieurs auteurs (Romero *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2003; Morello *et al.*, 2006; Ocakoglu *et al.*, 2009; Ilyasoglu *et al.*, 2010).

Salvador *et al.* (2003) ont signalé l'absence de différence significative de la teneur en composés phénoliques totaux à travers cinq saisons de récolte pour la variété espagnole *Cornicabra*. Par contre, plusieurs auteurs ont noté l'influence de la saison de récolte et des conditions climatiques sur la fraction phénolique des huiles d'olive.

Selon Ilyasoglu *et al.* (2010), la saison de récolte peut affecter la composition chimique de l'huile d'olive, spécialement les antioxydants. Cet effet peut être attribué aux conditions climatiques spécialement la pluie et la température approximatives durant la croissance et la maturation des fruits d'olives. Ces auteurs ont signalé des différences significatives concernant la teneur en phénols totaux de deux variétés turques *Ayvalik* et *Memecik* au cours de deux saisons de récolte consécutives. Les teneurs en phénols totaux les plus élevées étaient enregistrées pendant l'année qui semblait avoir les plus faibles pluies totales. Ce phénomène a été aussi signalé par Vekiari *et al.* (2010) pour les variétés grecques *Throumbolia* et *Koroneiki* qui ont enregistré des teneurs qui varient de 500 à 1000 mg/Kg. L'huile de la variété turque *Sariulak* issue de la région de Karaman caractérisé par les plus faibles pluies avait montré la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (Arslan *et al.*, 2013).

Au cours d'une étude sur quatre saisons de récolte consécutives, Romero *et al.* (2003) ont signalé que le profile phénolique de l'huile d'olive est influencé principalement par les taux de pluie. Morello *et al.* (2006) ont indiqué que les principales différences entre les saisons de récolte concernent les dérivés sécoïridoïdes, la vanilline, le tyrosol, l'apigénine, la lutéoline et les lignanes. Ils ont noté une baisse du taux du 3,4-DHPEA-EDA pour la variété *Arbequina* suite à l'abaissement des températures (-5 °C) ce qui a induit une congélation du fruit d'olive provoquant ainsi la rupture de sa paroi. La destruction des tissus favoriserait l'oxydation des composés phénoliques. Quant à Ocakoglu *et al.* (2009), en travaillant sur six variétés d'huile d'olive turques et sur deux saison de récolte consécutives, ont observé que le profile phénolique des huiles d'olives dépend largement de la saison de récolte : ils ont noté que la présence ou l'absence de la vanilline et l'acide syringique constituait un élément de discrimination important entre les deux saisons de récolte.

### 3.1.5. L'origine géographique

La région de production du cultivar affecte significativement la concentration en phénols totaux de l'huile d'olive des variétés espagnoles *Cornicabra* (Salvador *et al.*, 2003) et *Arbequina* (Criado *et al.*, 2004), des variétés italiennes *Frantoio* et *Leccino* (Ranalli *et al.*, 1997), de la variété tunisienne *Chetoui* (Ben Temime *et al.*, 2006) et des variétés turques (Ocakoglu *et al.*, 2009; Arslan *et al.*, 2013). D'autres travaux de recherche ont montré que le profile en composés phénoliques se trouve aussi affecté par l'origine géographique de la variété de l'huile d'olive (Garcia *et al.*, 2002; Ocakoglu *et al.*, 2009; Arslan *et al.*, 2013).

Issaoui *et al.* (2010) ont travaillé sur deux variétés tunisiennes *Chemlali* et *Chetoui* dans deux région différentes ; le nord et le sud de la Tunisie, ils ont noté :

- l'effet de la région géographique de culture sur les phénols totaux était clairement observé à cause des différents comportements exhibés par chaque variété.
- les cultures du nord produisaient des huiles avec une teneur plus élevée en phénols totaux en comparaison avec les huiles issues du sud de la Tunisie.
- les cultures du nord avaient la concentration la plus élevée en *o*-diphénols ; d'où les variétés implantées à une altitude plus élevée produisaient des phénols en quantités plus grandes que celles implantées à une altitude plus basse.

Des réponses différentes aux conditions environnementales ont été enregistrées pour deux variétés d'olive italiennes (*Frantoio* et *Leccino*) implantées dans deux régions d'Espagne. *Frantoio* produisait des huiles plus riches en polyphénols dans la région de Cabra, par contre, *Leccino* avait montré des teneurs plus élevées en phénols dans la région de Mengibar. Les deux variétés ont enregistrées des teneurs en polyphénols plus élevées en Espagne par rapport à leur pays d'origine qui est l'Italie (Aguilera *et al.*, 2005).

Plusieurs travaux de recherches ont utilisé principalement le profile HPLC des composés phénoliques dans l'étude des huiles d'olive vierges en fonction du cultivar et de l'origine géographique (Andjelkovic *et al.*, 2008; Allalout *et al.*, 2009). Lerma-Garí *et al.* (2009) ont établi une classification des huiles d'olive vierges de trois pays différents (Italie, Espagne et Croatie) selon leur origine géographique.

Certains acides phénoliques: l'acide trans-cinnamique, l'acide sinapique, l'acide caféique, le DOPAC peuvent être considérés comme des marqueurs de l'origine géographique ou de variétés du fruit d'olive (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2004).

### 3.1.6. L'infestation par les ravageurs

L'état sanitaire des olives revêt une grande importance concernant les caractéristiques quantitatives des composés phénoliques de l'huile d'olive (Michaelakis, 1992; Çavusoglo et Oktar, 1994). L'un des principaux ravageurs des olives dans le bassin méditerranéen est la mouche de l'olive (*Bactrocera olea*) (El Riachy *et al.*, 2011). Cette insecte a une influence négative sur les paramètres de qualité de l'huile d'olive ainsi que sa compositions (Cimato, 1990; Angerosa *et al.*, 1992; Evangelisti *et al.*, 1994; Tamendjari *et al.*, 2004).

Concernant la fraction phénoliques des huiles d'olive, une diminution progressive de la teneur en composés phénoliques a été observée avec l'augmentation du pourcentage d'attaque des olives (Angerosa *et al.*, 1992; Delirio *et al.*, 1995; Gómez-Caravaca *et al.*, 2008; Tamendjari *et al.*, 2009). Selon Tamendjari *et al.* (2004), cet effet est dû à l'augmentation de l'activité de la polyphénoloxydase causée par le dommage des tissus par les larves et par la présence des trous de sortie qui exposent la pulpe de l'olive à l'oxygène.

En général, les échantillons fortement attaqués par la mouche de l'olive montraient des teneurs en composés phénoliques particulièrement basses ; par exemple, les huiles obtenues à partir d'olive avec un pourcentage d'attaque supérieur à 30% montraient toujours des teneurs en phénols inférieurs à 80 mg/Kg d'huile d'olive (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008). Ces auteurs ont relevé une diminution des teneurs en polyphénols et en *ortho*-diphenols, en particulier les dérivés secoïridoïdes, dans les cas de forte attaque par ce ravageur. D'après Tamendjari *et al.* (2009), un taux d'attaque de 100% entraîne des pertes de l'ordre de 66,9% pour la variété algérienne *Chemlal*. Evangelisti *et al.* (1994) ont noté une diminution des composés phénoliques simples tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol avec l'évolution de l'attaque.

## 3.2. Les facteurs technologiques

### 3.2.1. Le système d'extraction de l'huile

La présence des composés phénoliques dans l'huile d'olive est fortement reliée aux enzymes endogènes variées du fruit de l'olive, qui sont libérées dans la pâte d'olive durant le broyage et le malaxage (Catalano et Caponio, 1996; Caponio *et al.*, 1999; El riachy *et al.*, 2011) . Leur concentration dans l'huile est fortement affectée par les conditions d'extraction. Le broyage et le malaxage sont les points cruciaux les plus importants du processus mécanique d'extraction de l'huile d'olive (Catalano et Caponio, 1996; Caponio *et al.*, 1999; Fregapane et Salvador, 2013). C'est pendant ces phases que les changements les plus importants de la composition phénolique de l'huile d'olive vierge se produisent (Catalano et

Caponio, 1996) grâce aux différents processus enzymatiques et oxydatifs (Cortesi *et al.*, 2000).

### **a) Broyage**

Le broyage vise à faire éclater la drupe gorgée d'huile, à permettre le concassage du noyau et l'écrasement de l'amande, ceci au moyen de broyeurs à meules ou de broyeurs métalliques (Di Giovacchino, 1991).

Plusieurs auteurs ont signalé que le broyage mécanique à marteau est plus efficace dans l'extraction des composés phénoliques que le broyage à meule (Velasco et Dobarganes, 2002; Caponio, 2003; Veillet *et al.*, 2009).

Les sécoïridoïdes aglycones tels que le 3,4-DHPEA-EDA, le *p*-HPEA-EDA, le *p*-HPEA-EA et le 3,4-DHPEA-EA prennent naissance durant le broyage des olives par l'hydrolyse de l'oleuropéine, du démethyloleuropéine et du ligstroside par la  $\beta$ -glucosidase endogène (Bianco *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2002a; Servili *et al.*, 2004; Gómez-Rico *et al.*, 2009).

### **b) Malaxage**

Aussitôt après le broyage des olives, il est procédé à l'opération de malaxage, qui consiste en un brassage lent et continu de la pâte d'olive pour favoriser la réunion des gouttelettes d'huile avec la formation de gouttes plus grosses et parfaire le broyage (Di-Giovacchino, 1991).

Durant le malaxage de la pâte d'olive, il ya augmentation des quantités de l'hydroxytyrosol et des composés carbonyliques suite au processus hydrolytiques causés par les glycosidases et les estérases, ce qui est en faveur de la formation des dérivés isochromanes (Bianco *et al.*, 2001).

L'application de différentes températures durant le malaxage engendre une augmentation des polyphénols de l'huile d'olive (Tsimidou, 1998; Angerosa *et al.*, 2001; Velasco et Dobarganes, 2002; Ranalli *et al.*, 2005). En effet, l'utilisation des échangeurs de chaleur pendant le malaxage de la pâte d'olive améliore la quantité de composés phénoliques dans les huiles (Amirante *et al.*, 2006). Ranalli *et al.* (2001) ont signalé que l'augmentation de la concentration en phénols était plus significative lorsque la température de la pâte d'olive augmente de 25 à 30°C.

Gómez-Rico *et al.* (2009) ont montré que la concentration du dérivé du tyrosol (*p*-HPEA-EDA) augmente avec l'augmentation du temps et de la température de malaxage. Par contre, les concentrations de verbascosides et de flavonoïdes (comme la rutine, la lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside) ne changeaient pas significativement.

Par contre, certains auteurs ont signalé que l'accroissement de la température durant l'opération de malaxage au delà de 25 °C conduit à la diminution de la teneur en sécoïridoïdes (Angerosa *et al.*, 2001). La diminution des composés phénoliques a été aussi observée par une augmentation de la température de malaxage au delà de 30°C (Ranalli *et al.*, 2003).

Dans une étude récente, Taticchi *et al.* (2013) ont noté la présence d'une relation positive entre la température de malaxage (20, 25 et 35°C) et la concentration en composés phénoliques, notamment les dérivés sécoïridoïdes aglycones des huiles d'olive de quatre variétés italiennes. Ces auteurs ont signalé que la peroxydase et la polyphénoloxydase des olives montraient un optimum d'activité à 37°C et 50°C respectivement.

La réduction de la concentration en O<sub>2</sub> dans les pâtes d'olive conduit aussi à une augmentation de la concentration en composés phénoliques des huiles (Servili *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2002; Servili *et al.*, 2004; Taticchi *et al.*, 2013). Les travaux de Parenti *et al.* (2006) ont rapporté que la teneur en composés phénoliques des huiles d'olive vierges obtenues après malaxage en chambre fermée est deux fois supérieure à celle obtenue par un malaxage en chambre ouverte. En effet, les réactions oxydatives catalysées par des oxydoréductases endogènes telles que la polyphénoloxydase et la peroxydase peuvent promouvoir l'oxydation des composés phénoliques durant le malaxage ce qui entraîne leur réduction dans les huiles (Bianco *et al.*, 2001; Servili *et al.*, 2003; Migliorini *et al.*, 2006).

L'utilisation de nouvelles technologies, tel que le processus de dénoyautage, en excluant le noyau d'olive avant malaxage, peut améliorer la concentration phénolique de l'huile (Servili *et al.*, 1999; Amirante *et al.*, 2006). Ceci est dû à la diminution de l'activité de peroxydase qui est hautement concentrée dans le noyau de l'olive (Amirante *et al.*, 2006).

### c) Extraction de l'huile

Le système d'extraction joue un rôle clé dans la composition phénolique de l'huile d'olive (Servili *et al.*, 2004; El riachy *et al.*, 2011). Le système de pression a montré une concentration en polyphénols plus élevée par rapport au système de centrifugation traditionnel qui additionne une grande quantité d'eau aux pâtes d'olive, ce qui modifie la distribution des polyphénols entre l'huile et l'eau, améliorant ainsi leur libération dans la phase aqueuse (Di

Giovacchino *et al.*, 1994). La quantité d'eau tiède ajoutée est estimée à 40% jusqu'à 60% du poids de la pâte (Gimeno *et al.*, 2002). La création de nouveau système de centrifugation à trois phases, à basse addition d'eau, ou à deux phases, sans ajout d'eau, a permis d'améliorer les quantités de composés phénoliques des huiles d'olive (Servili *et al.*, 2004).

En effet, l'huile d'olive obtenue à partir d'un système continu d'extraction par centrifugation traditionnelle à trois phases se trouve appauvri en polyphénols par rapport au système continu d'extraction avec centrifugation à deux phases et des différences significatives ont été relevées par plusieurs auteurs (De Stefano *et al.*, 1999; Gómez-Alonso *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2003). Cortesi *et al.* (2000) ont signalé une différence moyenne des teneurs en composés phénoliques entre les deux systèmes de plus de 30%. Concernant les composés phénoliques individuels, Gómez-Alonso *et al.* (2002) ont noté des différences concernant le 3,4- DHPEA-EDA, le *p*-HPEA-EDA et les aglycones d'oleuropéine et de ligstroside.

### 3.2.2. Le stockage de l'huile d'olive

Des changements importants de la composition phénoliques des huiles d'olives vierges au cours du stockage ont été observés par plusieurs auteurs. Brenes *et al.* (2001) ont observé une réduction de 15 % à 20 % du taux des polyphénols totaux dans des huiles conservées pendant une année à 30°C dans des bouteilles en verre fumé. Cette diminution en polyphenols est due à deux mécanismes concomitants qui se produisent durant la conservation: l'hydrolyse et l'autoxydation (Cinquanta *et al.*, 1997; Psomiadou et Tsimidou, 2002a; Cortesi et Rovellini, 2004). Selon Morello *et al.* (2004), des diminutions considérables sont notées au niveau des dérivés secoïridoïdes tel que le 3, 4-DHPEA-AC après une période de stockage, par contre, les lignanes sont les composés phénoliques les plus stables. Brenes *et al.* (2001) ont aussi signalé que la concentration en lignanes, le 1-acétoxy-pinorésinol et le pinorésinol reste constante durant le stockage de l'huile. Par ailleurs, Cortesi et Rovellini (2004) ont noté une diminution des formes naturelles des diphenols parallèlement à une augmentation des formes oxydées au cours du stockage de l'huile d'olive pendant 16 mois à l'obscurité.

Les conditions de stockage inadéquats, température et lumière influencent le processus de dégradation des biophénols en des phénols simples. En effet, plusieurs auteurs ont signalé une élévation des taux de tyrosol et d'hydroxytyrosol dans les premiers mois de stockage de l'huile (Cinquanta *et al.*, 1997; Brenes *et al.*, 2001; Butinar *et al.*, 2006; Gomez-Alonso *et al.*, 2007). Ce phénomène est dû à l'hydrolyse des secoïridoïdes aglycones (Morello *et al.*, 2004;

Ben Tekaya et Hassouna, 2005). Butinar *et al.* (2006) ont relevé une élévation des taux de tyrosol et d'hydroxytyrosol dans les premiers mois de stockage qui était suivi d'une diminution graduelle des taux de l'hydroxytyrosol qui est probablement dû à son activité antioxydante.

Les basses températures de stockage (5°C) retardaient la disparition des composés phénoliques par rapport à des températures ambiantes de 12°C (Maestro *et al.*, 1993). De même l'obscurité réduit considérablement le taux de perte des composés phénoliques de l'huile d'olive (Okogeri et Tasioula-Margari, 2002).

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

# CHAPITRE I : EVOLUTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'HUILE D'OLIVE VIERGE DURANT LA MATURATION DES OLIVES

## 1.1. Matériel et méthodes

### 1.1.1. Matériel végétal

#### ➤ Récolte et triage des olives

Cette étude a été réalisée durant la saison de récolte 2006/2007. Quatre variétés d'olives ont été utilisées dans ce travail, à savoir : *Chemlal*, *Boughenfous*, *Blanquette de Guelma* et *Takesrit*. La variété *Chemlal*, la plus répandue en Algérie (50% du verger oléicole) a été récoltée à partir de la ferme pilote Abderrahmane Mira située dans la région de Tazmalt (Bejaia), les trois autres variétés sont originaires de la pépinière de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de vigne (ITAFV) de Takarietz, daïra de Sidi Aich (Bejaia).

La récolte a été réalisée à la main, ensuite les olives ont été immédiatement transportées au laboratoire de l'ITAFV où un triage des olives a été effectué en fonction de la couleur de l'épiderme des fruits d'olive, à savoir : vert, tacheté, violet et noir.

### 1.1.2. Extraction de l'huile d'olive

Les échantillons de l'huile d'olive ont été obtenus en utilisant un oléodoseur de laboratoire de marque Levi-Deleo-Lerogsame, constitué d'un broyeur, d'un malaxeur et d'une centrifugeuse. Les olives sont broyées, ensuite la pâte est malaxée pendant 30 mn avec addition de 50 ml d'eau tiède à 920 g de pâte après 15 mn. Après une centrifugation verticale, les huiles sont collectées et mises à décantation. Les échantillons d'huiles sont conditionnés dans des flacons en verre fumé étiquetés et remplis à pleine. Ils sont conservés à 4°C en attendant d'être analysés.

### 1.1.3. Extraction en phase solide (SPE) des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est effectuée en phase solide selon la méthode de Favati *et al.* (1994) à l'aide d'une colonne d'octadecyl C18. 1g de l'huile est dissout dans 10 ml de n-hexane, ensuite, on introduit l'échantillon dans la colonne, préalablement activée avec 6 ml de méthanol et 10 ml d'hexane. L'élution est réalisée comme suit : trois fois 5ml de n-hexane pour retirer la phase apolaire et 2 fois 4 ml de méthanol pour éluer la phase polaire contenant les composés phénoliques. La solution méthanolique est utilisée pour doser les composés phénoliques totaux et les *ortho*-diphénols.

#### 1.1.4. Détermination spectrophotométrique des composés phénoliques totaux

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

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

Les concentrations en polyphénols totaux des extraits méthanoliques d'huile d'olive sont exprimées en milligrammes d'équivalent d'acide gallique /Kg d'huile (mg d'E.A.G./Kg) en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe 1). Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.

#### 1.1.5. Détermination spectrophotométrique des *ortho*-diphénols

La méthode est basée sur la formation d'un complexe jaune entre les *ortho*-diphénols et les ions molybdates. La concentration en *ortho*-diphénols des extraits méthanoliques est déterminée suivant la méthode de Mateos *et al.* (2001). Un volume de 0,5 ml d'extrait méthanolique est additionné de 5 ml du mélange méthanol/eau (1:1), 4 ml d'extrait méthanolique sont additionnés de 1 ml de la solution de molybdate de sodium dihydraté à 5% dans l'éthanol-eau (V/V), le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 1 min, puis mis à l'obscurité pendant 15 min et enfin filtré. L'absorbance est mesurée à 370 nm.

Les concentrations en *ortho*-diphénols des échantillons sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 1) réalisée avec l'acide caféique comme standard et les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide caféique /Kg d'huile (mg d'E.A.C./Kg). Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.

#### 1.1.6. Détermination des composés phénoliques par HPLC : NGD C89-2007

##### ➤ Principe

La méthode se base sur une extraction des composés phénoliques mineurs polaires de nature phénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique, suivie de leur dosage par HPLC au moyen d'un révélateur UV à 280 nm. L'étalon interne est constitué d'acide syringique.

La teneur correspondant aux dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques est exprimée en mg/Kg de tyrosol.

➤ **Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)** : à gradient ternaire (eau 0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (V/V), méthanol, acetonitril), muni d'une colonne (4,6 mm \* 25 cm) à phase inverse C18, de type Spherisorb ODS-2, 5 µm, 100 Å, équipé d'un révélateur spectrophotométrique UV à 280 nm et d'un intégrateur. Le mode opératoire ainsi que les informations relatives à cette méthode sont présentés en annexe 2.

## 1.2. Résultats et discussion

### 1.2.1. Teneurs en polyphénols totaux et *ortho*-diphénols

Comme l'illustre le tableau VI, les teneurs en composés phénoliques totaux diminuent en allant du stade vert au stade noir pour les variétés *Chemlal* et *Boughenfous* et en allant du stade tacheté au stade noir pour les variétés *Takesrit* et *Blanquette*. Ceci démontre que la progression de la maturation des olives engendre une diminution de la teneur totale en composés phénoliques des huiles d'olives vierges. L'huile de la variété *Chemlal* a les valeurs les plus élevées pour tous les stades considérés. A l'exception du stade noir, l'huile obtenue à partir de la variété *Takesrit* présente les plus basses teneurs en composés phénoliques. Nous avons uniquement les variétés *Boughenfous* et *Takesrit* au stade noir qui ont enregistré des valeurs inférieures à 100 mg/Kg.

**Tableau VI** : Evolution des teneurs en polyphénols totaux et *ortho*-diphénols au cours de la maturation de différentes variétés de l'huile d'olive vierge.

Détermination	Stade de maturation	Variété			
		<i>Chemlal</i>	<i>Boughenfous</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Takesrit</i>
Polyphénols totaux (mg /Kg)	Vert	628,72 ± 2,91	514,39 ± 4,77	ND	ND
	Tacheté	553,41 ± 4,32	293,36 ± 1,68	444,17 ± 14,90	268,33 ± 0,97
	Violet	447,14 ± 4,60	130,23 ± 1,60	381,17 ± 2,20	193,23 ± 0,36
	Noir	410,87 ± 4,23	77,63 ± 2,29	121,54 ± 8,27	82,08 ± 4,80
<i>Ortho</i> -diphénols (mg /Kg)	Vert	56,36 ± 1,82	16,45 ± 0,63	ND	ND
	Tacheté	61,71 ± 0,46	48,17 ± 0,30	60,19 ± 0,62	32,62 ± 0,17
	Violet	9,18 ± 2,14	4,94 ± 0,46	57,36 ± 0,63	16,25 ± 0,69
	Noir	13,93 ± 0,79	11,91 ± 0,46	14,94 ± 0,46	4,44 ± 0,34

ND : non déterminé.

Concernant les teneurs en *ortho*-diphénols, c'est les huiles issues d'olives au stade tacheté qui enregistrent les teneurs maximales (tableau VI). Pour les variétés *Chemlal* et *Boughenfous*, on note après l'augmentation, une diminution des *ortho*-diphénols en allant du stade tacheté au stade noir. Au contraire, les résultats montrent une diminution graduelle des teneurs en *ortho*-diphénols durant la maturation des olives des variétés *Blanquette* et *Takesrit*. Yousfi *et al.* (2006) ont rapporté une diminution des teneurs en *ortho*-diphénols des huiles au cours de la maturation des olives des variétés *Arbequina* et *Picual*.

La diminution des teneurs en polyphénols totaux et *ortho*-diphénols de l'huile d'olive vierge avec la progression de la maturation des olives a été aussi mentionnée par Cerretani *et al.* (2004) pour la variété italienne *Nostrana di Brisighella*. Dans la même étude, ces auteurs ont noté une augmentation des *ortho*-diphénols dans l'avant dernier stade pour la variété *Ghiacciolo*, avec un indice de maturation de 4,03.

### 1.2.2. Profil HPLC des biophénols

Le chromatogramme HPLC des composés phénoliques de l'huile d'olive de la variété *Chemlal* au stade de maturation vert est représenté en annexe 3.

#### 1.2.2.1. Teneurs en polyphénols totaux, tyrosol et hydroxytyrosol

Les résultats obtenus dans cette étude, concernant les profils HPLC des biophénols de l'huile d'olive des différentes variétés, confirment que cette fraction est largement influencée par la variété et le degré de maturation.

Pour les résultats en composés phénoliques totaux (tableau VII), on observe que la variété *Chemlal* présente les plus grandes teneurs pour tous les stades de maturation. Concernant le stade tacheté, la variété *Takesrit* enregistre la plus faible quantité. Pour les stades violet et noir, les plus faibles valeurs sont notées pour la variété *Boughenfous*.

Cependant, il y a une diminution de la quantité de polyphénols durant la maturation pour toutes les variétés. Le point le plus important est la vitesse de diminution. En passant du premier stade au stade noir, la diminution la plus importante est celle de la variété *Boughenfous* (84,08%) suivie de la variété *Blanquette* (77,37%), ensuite la variété *Takesrit* (62,99%) et en dernier, on trouve la variété *Chemlal* (41,99%). Les résultats obtenus montrent que la vitesse de variation des teneurs en polyphénols de l'huile d'olive au cours de la maturation peut être aussi reliée à la variété.

La diminution des polyphénols totaux des huiles durant la maturation des olives peut être expliquée par :

- la diminution de l'activité enzymatique de L-phénylalanine ammonia-lyase, qui est responsable de la synthèse des composés phénoliques (Tovar *et al.*, 2002);
- l'augmentation de l'activité hydrolytique des enzymes (estérase et glucosidase) (Ryan *et al.*, 2002b);
- l'oxydation des composés phénoliques par la peroxydase (Gandul-Rojas et Minguez-Mosquera, 1996b) et la polyphénoloxydase (Soler-Rivas *et al.*, 2000).

**Tableau VII:** Evolution des concentrations (mg/Kg) en polyphénols totaux, hydroxytyrosol et tyrosol des différentes variétés de l'huile d'olive vierge, par HPLC.

Variété	Stade de maturation	Polyphénols totaux (mg/Kg)	Teneur en hydroxytyrosol (mg/Kg)	Teneur en tyrosol (mg/Kg)
<i>Chemlal</i>	Vert	631	5	4
	Tacheté	598	6	7
	Violet	491	5	9
	Noir	366	3	8
<i>Blanquette</i>	Tacheté	473	7	9
	Violet	372	7	10
	Noir	107	3	6
<i>Takesrit</i>	Tacheté	254	1	14
	Violet	155	1	10
	Noir	94	0,6	8
<i>Boughenfous</i>	Vert	400	2	7
	Tacheté	298	1	12
	Violet	114	1	21
	Noir	46	0,3	9

L'hydroxytyrosol et le tyrosol sont les principaux phénols simples trouvés dans toutes les huiles d'olive vierges (Oliveras-Lopez *et al.*, 2007). Plusieurs auteurs ont déjà étudié diverses variétés et ils ont indiqué que la teneur en ces deux composés oscille entre 5% et 23% des biophénols totaux.

Dans notre étude, on observe la présence de l'hydroxytyrosol et du tyrosol dans toutes les variétés de l'huile d'olive vierge, mais leurs quantités sont moins importantes que celles indiquées par Oliveras-Lopez *et al.* (2007).

Comme le montre le tableau VII, l'hydroxytyrosol est présent à de faibles concentrations, il représente entre 0,34% et 2,80% des biophénols totaux. Concernant son évolution au cours de la maturation, les teneurs de l'hydroxytyrosol de la variété *Chemlal* au premier stade est de 5 mg/Kg, ensuite, il enregistre une légère augmentation en allant du stade

vert au stade tacheté. Cette augmentation est suivie par une diminution à travers les stades violet et noir.

Cependant, pour les variétés *Blanquette* et *Takesrit*, il n'y a pas de changement dans la concentration de l'hydroxytyrosol entre les stades tacheté et violet. Ensuite, il y a une diminution en allant du stade violet au stade noir qui est estimé à 57,14% et 40% respectivement pour les variétés *Blanquette* et *Takesrit*. Les huiles de la variété *Boughenfous* manifestent une diminution en allant du stade vert au stade tacheté qui est estimée à 50%, elle maintient la même concentration au stade violet, ensuite, on observe une diminution au stade noir.

Les résultats montrent également une basse concentration du tyrosol (tableau VII) mais qui est plus grande que l'hydroxytyrosol. Les teneurs se situent entre 0,64% et 19,56% des biophénols totaux. Concernant son évolution au cours de la maturation, on remarque deux types différents de comportement. Pour les variétés *Chemlal*, *Boughenfous* et *Blanquette*, la teneur en tyrosol augmente du premier stade jusqu'au stade violet et ensuite montre une diminution. Cependant, la variété *Takesrit* montre une diminution graduelle de la teneur en tyrosol au cours de la maturation. Ainsi, pour *Chemlal*, *Boughenfous* et *Blanquette*, le stade violet coïncide avec la plus grande quantité de tyrosol mais pour *Takesrit*, la teneur la plus élevée coïncide avec le stade tacheté. Les résultats obtenus ne sont pas en accord avec ceux trouvés par Cimato *et al.* (1990) qui ont rapporté que les teneurs en tyrosol et hydroxytyrosol augmentent lorsque les huiles sont extraites de fruit d'olives mûres. Ryan *et al.* (1999) ont rapporté que cette différence peut être due au facteur variétal.

#### **1.2.2.2. Profil des différentes classes des composés phénoliques**

Les données montrées dans le tableau VIII illustrent les résultats obtenus pour les profils en biophénols des échantillons d'huile d'olive à différents stades de maturation des olives. Comme on peut le constater, il existe des différences claires entre les différents échantillons d'huile d'olive vierge.

##### **➤ Les dérivés sécoïridoïdes**

Les dérivés d'oleuropéine sont les principaux composés retrouvés dans les variétés *Chemlal* et *Blanquette*. L'huile extraite à partir de la variété *Takesrit* présente la teneur la plus élevée en acides sécoïridoïdes. Ces derniers étant constitués par les acides élénolique et décarboxyméthyl-élénolique (Rovellini, 2008). Pour ces trois variétés, les teneurs en dérivés

ligstrosides viennent en deuxième position. Pour l'huile extraite de la variété *Boughenfous*, il y a une prédominance des dérivés ligstrosides, suivis des acides sécoïridoïdes.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les dérivés secoïridoïdes de l'oleuropéine et de ligstroside sont souvent, les principaux composés phénoliques de l'huile d'olive fraîche (Brenes *et al.*, 2000; Romani *et al.*, 2001; Pinelli *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.*, 2005).

A partir des données du tableau VIII, on peut voir que la progression de la maturation engendre une diminution de la quantité de dérivés d'oleuropéine dans toutes les variétés étudiées. On note seulement une augmentation de ces composés de 16,66% et qui est enregistrée entre le stade violet et le stade noir de la variété *Boughenfous*. La variété *Chemlal* présente la concentration la plus importante en dérivés d'oleuropéine pour tous les stades de maturation et donc cette classe de biophénols est la plus présentée dans cette variété par rapport aux autres composés phénoliques. Concernant le niveau de diminution des dérivés d'oleuropéine entre les stades vert et noir, on note la diminution la plus importante pour la variété *Boughenfous* (91,35%) et la diminution la plus basse est notée pour la variété *Chemlal* (44,97%).

Pour les dérivés ligstrosides, on a noté leur diminution au cours de la maturation à l'exception de la variété *Boughenfous*, où une légère augmentation de 1,42% est notée entre les huiles extraites à partir d'olives vertes et les olives tachetées. A nouveau, la variété *Chemlal* possède les teneurs les plus importantes en ces composés, à l'exception du stade tacheté, les trois autres stades ont enregistré un niveau élevé en dérivés ligstrosides. En passant du premier stade au stade noir, les résultats montrent que la maturation induit la diminution des niveaux de dérivés ligstrosides de 81,51%, et 68,06%, 63,73% et 53,95% respectivement pour les huiles des variétés *Boughenfous*, *Blanquette*, *Takesrit* et *Chemlal*.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Baccouri *et al.* (2008) concernant la diminution des teneurs en sécoïridoïdes (aglycone de l'oleuropéine et de ligstroside) au cours du processus de maturation.

### ➤ Les flavonoïdes

Nos résultats indiquent un faible taux de flavonoïdes, estimée entre 2 à 16% des biophénols totaux, ceci confirme que cette classe présente des constituants mineurs de la fraction phénolique de l'huile d'olive, mais avec la même importance sur le plan santé comme rapporté par plusieurs travaux de recherche (Mulinacci *et al.*, 2005; Oliveras-Lopez *et al.*, 2007; Rovellini, 2008).

La lutéoline et l'apigénine sont habituellement présents dans l'huile d'olive vierge en très petite quantité (moins de 2 à 3%) des polyphénols totaux (Mulinacci *et al.*, 2005). En général, les flavonoïdes sont les moins présentés des biophénols analysés. La plus grande valeur est de 31 mg/Kg pour les variétés *Chemlal* et *Boughenfous*. Cette classe de biophénols a enregistré des évolutions différentes au cours de la maturation : *Boughenfous* a enregistré une diminution, par contre, *Chemlal* a enregistré une augmentation. D'autre part, on trouve une augmentation suivie d'une diminution de ces composés pour les variétés *Takesrit* et *Blanquette*. Cette dernière possède la plus faible valeur (4 mg/Kg) au stade noir mais *Takesrit* totalise le pourcentage le plus élevé en flavonoïdes par rapport aux biophénols totaux (15,95% au stade noir).

#### ➤ Les lignanes

Les lignanes, classe des composés phénoliques, sont trouvés à des concentrations notables par rapport au total des polyphénols et l'huile de la variété *Chemlal* a enregistré la teneur la plus importante pour tous les stades et qui est d'environ 13% des biophénols totaux. Pour cette classe, *Chemlal*, *Takesrit* et *Blanquette* ont enregistré une diminution progressive au cours de la maturation, le niveau de diminution est respectivement de 41,17%, 76,47% et 90%. *Boughenfous*, qui présente la diminution la plus importante des lignanes (90,90%), a montré une diminution du stade vert au stade violet suivi d'une augmentation évaluée à 33,33% entre le stade violet et le stade noir.

#### ➤ Les autres composés

Pour les acides sécoïridoïdes, à l'exception de la variété *Chemlal*, les trois autres variétés avaient montré une diminution progressive au cours de la maturation. La plus petite diminution (37,89%) est enregistrée par *Takesrit*, mais la plus grande diminution (92,10%) est notée pour la variété *Boughenfous*.

Concernant la classe des biophénols oxydés, les résultats montrent une diminution de ces composés avec la progression de la maturation pour toutes les variétés. La teneur la plus importante est notée pour la variété *Chemlal* pour tous les stades. Par rapport aux biophénols totaux, *Takesrit* avait totalisé le pourcentage le plus important pour tous les stades de maturation. Pour les niveaux de diminution entre le premier et le dernier stade, on a noté 23,21%, 54,28%, 72,00% et 77,14% respectivement pour les variétés *Chemlal*, *Takesrit*, *Boughenfous* et *Blanquette*.

**Tableau VIII:** Teneurs en biophenols majeurs de l'huile d'olive par HPLC, par rapport à la variété et au stade de maturation des olives.

<b>Variété</b>	<b>Stade de maturation</b>	<b>Dérivés d'oleuropéine (mg/Kg)</b>	<b>Dérivés de ligstroside (mg/Kg)</b>	<b>Lignanes (mg/Kg)</b>	<b>Flavonoïdes (mg/Kg)</b>	<b>Acides sécoïridoïdes (mg/Kg)</b>	<b>Biophénols oxydés (mg/Kg)</b>
<i>Chemlal</i>	Vert	249	215	85	20	80	56
	Tacheté	240	191	74	29	112	56
	Violet	203	147	60	29	77	45
	Noir	137	99	50	31	117	43
<i>Boughenfous</i>	Vert	81	211	44	31	76	25
	Tacheté	25	214	17	6,4	57	12
	Violet	6	87	3	3,6	22	8
	Noir	7	39	4	5,2	6	7
<i>Takesrit</i>	Tacheté	72	91	34	13	95	35
	Violet	40	63	15	16	83	16
	Noir	16	33	8	15	59	16
<i>Blanquette</i>	Tacheté	262	119	30	14	47	35
	Violet	204	74	27	18	30	33
	Noir	31	38	3	4	21	8

## CHAPITRE II : ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS PHENOLIQUES DE L'HUILE D'OLIVE VIERGE

### 2.1. Matériel et méthodes

#### 2.1.1. Matériel végétal

Les échantillons d'olive de onze variétés ont été récoltés à la main durant la saison de récolte 2008/2009. Dix variétés (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* et *Tabelout*) ont été récoltées à partir de la ferme pilote de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV), situé à Takarietz, daïra de Sidi Aich, wilaya de Bejaia. La onzième variété a été récoltée à partir de la ferme pilote Abderahmane Mira de Tazmalt, daïra d'Akbou, wilaya de Bejaia. Après la cueillette, les olives ont été nettoyées de toutes impuretés et ensuite transportées au laboratoire.

Après avoir déterminé l'indice de maturation, les olives nettoyées ont subi l'extraction afin de récupérer l'huile. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un oléodoseur de laboratoire (Levi-Deleo-Lerogsame), muni d'un séparateur centrifuge. Une quantité d'eau tiède (30°C) à raison de 50 ml pour 920 g de pâte d'olive est ajoutée pour faciliter l'extraction. Les huiles sont recueillies dans des flacons en verre fumé, remplis, étiquetés et conservés à une température de 4°C en attendant d'être analysées.

#### 2.1.2. Indice de maturité

La détermination de l'indice de maturité est réalisée selon la méthode d'Uceda et Frias (1975) en se basant sur la couleur du fruit (épiderme et pulpe). Sur cent fruits choisis au hasard sur un lot d'un kilogramme, l'indice de maturité est déterminé par la notation visuelle selon une échelle de coloration de 0 à 7 variant d'un épiderme vert intense jusqu'à un épiderme noir et une pulpe entièrement violette.

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

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

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

- 0 : épiderme vert intense;
- 1 : épiderme vert jaunissant;
- 2 : épiderme vert avec taches rougeâtres;
- 3 : épiderme rougeâtre à violet;
- 4 : épiderme noir à pulpe blanche;
- 5 : épiderme noir et pulpe violette sur moins de la moitié de la pulpe;
- 6 : épiderme noir et pulpe violette sur plus de la moitié de la pulpe;
- 7 : épiderme noir et pulpe entièrement violette.

### 2.1.3. Extraction des composés phénoliques

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

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

### 2.1.4. Dosage spectrophotométrique des composés phénoliques totaux

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

La concentration en composés phénoliques des extraits de l'huile est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe 4) obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. Les concentrations en polyphénols totaux des extraits méthanoliques d'huile d'olive sont exprimées en mg d'E.A.G./Kg.

### 2.1.5. Dosage spectrophotométrique des *ortho*-diphénols

La concentration en *ortho*-diphénols des extraits méthanoliques des échantillons d'huile est déterminée suivant la méthode de Bendini *et al.* (2003). Elle est basée sur la formation de complexe jaune, entre les *ortho*-diphénols et les ions molybdate, qui absorbent au voisinage de 370 nm (Ollivier *et al.*, 2004).

Un volume de 0,5 ml d'extrait méthanolique est additionné de 5 ml du mélange méthanol/eau (1 :1), 4 ml du mélange est additionné à une solution de molybdate de sodium dihydraté à 5% dans l'éthanol-eau (V/V), le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 1min, puis mis à l'obscurité pendant 15min et ensuite il est filtré. L'absorbance est mesurée à 370 nm. Trois essais ont été effectués

Les teneurs en *ortho*-diphénols des échantillons sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 4) réalisée avec de l'acide caféique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg d'E.A.C./Kg d'huile d'olive.

### 2.1.6. Détermination des composés phénoliques des huiles d'olive par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) : NGD C89-2007

La méthode se base sur une extraction des composés mineurs polaires de nature phénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique « méthanol/ eau (80/ 20) » suivie de leur dosage par HPLC au moyen d'un révélateur UV à 280 nm. L'étalon interne est l'acide syringique. Les informations relatives à cette méthode sont données en annexe 2.

### 2.1.7. Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques

#### 2.1.7.1. Pouvoir réducteur

Ce pouvoir mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) en fer ferreux  $Fe^{2+}$  ( $FeCl_2$ ) en présence d'un agent chromogène ferricyanure de potassium  $K_3 [Fe (CN)_6]$ . Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (Chou *et al.*, 2003).

Le protocole de Lugasi *et al.* (2003) est utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques. Un volume de 1 ml d'extrait méthanolique est additionné à 2,5 ml de

tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml ferricyanure de potassium  $K_3 [Fe (CN)_6]$  à 1%. Après incubation à 50°C pendant 20 min, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10 % sont ajoutés au mélange puis, centrifugé pendant 10 min à 1500 tours/min. 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1 %. L'absorbance est mesurée à 700 nm après 10 min de réaction. La quantité d'antioxydants ayant un pouvoir réducteur est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 4) réalisée avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg d'E.A.G./Kg.

### 2.1.7.2. Activité scavenger sur le radical DPPH

La technique au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est largement employée pour évaluer l'activité antioxydante. Elle est rapide et facile à mettre en œuvre comparée à d'autres méthodes, elle s'effectue à température ambiante se qui permet de préserver les molécules testées de l'éventuelle dégradation thermique (Keceli et Gordon, 2001).

Le DPPH est un radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (Molyneux, 2004; Villano *et al.*, 2007).

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

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

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

- Ac : Absorbance du contrôle.

- Ae : Absorbance de l'échantillon.

### 2.1.7.3. Activité scavenger sur le radical ABTS<sup>·+</sup>

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

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

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>·+</sup> selon la formule suivante :

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

Ac : Absorbance du contrôle.

Ae : Absorbance de l'échantillon.

Le graphique de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration a permis de déterminer les IC<sub>50</sub> (concentration correspondant à 50% d'inhibition).

### 2.1.7.4. Détermination de l'activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène

La capacité des extraits méthanoliques d'huiles à piéger le peroxyde d'hydrogène est mesurée selon le protocole rapporté par Benkeblia (2005), basée sur la méthode de Rush *et al.* (1989) dont le principe consiste en un suivi de la décroissance de la concentration de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par spectrophotométrie.

Un volume de 2 ml d'extrait méthanolique est ajouté à 1,2 ml d'une solution de peroxyde d'hydrogène (40 mM) préparée dans un tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4). La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déterminée spectrophotométriquement par la mesure de son absorbance à 230 nm (coefficient d'extinction molaire = 81 (M.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)). L'absorbance des échantillons est mesurée à

230 nm après un temps de réaction de 10 min. Le pouvoir antioxydant est exprimé en % d'inhibition du peroxyde d'hydrogène selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition d'H}_2\text{O}_2 = [(A_t - A_e) / A_t] * 100$$

$A_t$  : Absorbance du témoin (2 ml de méthanol (95 %) et 1,2 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ;

$A_e$  : Absorbance de l'échantillon.

## 2.1.8. Détermination de l'activité antibactérienne

### 2.1.8.1. Les souches bactériennes

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

**Tableau IX** : Les souches bactériennes testées et leurs origines.

Bactéries à Gram positif		Bactéries à Gram négatif	
- <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>ATCC 6538 (SAIDAL-Antibiotical)</b>	- <i>Escherichia coli</i>	Nalidixic Acid Resistant (NAR) (LMA)
- <i>Listeria innocua</i>	<b>CLIP 74915</b>	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>E47 (LMA)</b>
- <i>Bacillus subtilis</i>	<b>ATCC 6633 (SAIDAL Antibiotical)</b>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>ATCC 27853 (Institut Pasteur d'Alger)</b>

### 2.1.8.2. Standardisation des inocula bactériens

Selon Garrabé *et al.* (1998), 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. C'est pour cette raison que la standardisation de l'inoculum bactérien est un facteur déterminant de la qualité des résultats de l'antibiogramme.

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

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

### 2.1.8.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques

#### ✓ Diffusion sur milieu gélosé :

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

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

- A partir d'une culture pure et fraîche de 24 heures, des colonies isolées sont raclées puis mises dans 9 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, les inocula sont ajustés jusqu'à obtenir une densité optique (DO) de 0,50 aux longueurs d'ondes déjà déterminées.
- Un écouvillon stérile trempé dans une suspension bactérienne à  $10^7$ UFC/ml sert à ensemencer des géloses Mueller-Hinton coulées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre avec une épaisseur d'au moins 4 mm.
- Des disques de papier stérile de 6 mm de diamètre sont disposés à distance égale les uns des autres et de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibition sur la gélose. Une légère pression sera exercée sur chaque disque afin d'obtenir une bonne adhérence.

- Chaque disque est imprégné à l'aide d'une pipette Eppendorf d'une quantité de 20µl d'une solution d'extrait préparé dans du méthanol/eau (80/20) aux dilutions suivantes (solution mère (SM), 1/2, 1/4, 1/8 correspondant respectivement à 1, 0,5, 0,25, 0,12 mg/disque). Des disques imprégnés de 20µl de méthanol/eau (80/20) sans extraits sont utilisés comme témoins négatifs et des standards d'acide gallique, quercétine, acide cinnamique et d'acide caféique ont été également testés.
- Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, les boîtes sont par la suite mises à incuber pendant 24 h à la température de croissance du germe cible. Les diamètres des zones d'inhibition seront alors mesurés à l'aide d'un « pied à coulisse ».

#### **2.1.8.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sur milieu solide**

**Définition** : La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration de d'extrait qui inhibe en 18 heures la croissance visible d'un inoculum bactérien (Thabaut et Durosoir, 1979),

**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.

**Mode opératoire** : Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits méthanoliques ont été déterminées selon la méthode décrite par Tunçel et Nergiz (1993).

##### **a) Préparation des boîtes**

- Une solution mère de l'extrait à 5 mg/ml a été préparée.
- A partir de cette solution mère et une gélose Mueller Hinton en surfusion, on prépare des concentrations croissantes en extrait méthanolique (0,3 à 2 mg/ml) (tableau II: annexe 5).
- Après homogénéisation, le milieu (Mueller Hinton + extrait méthanolique) est coulé sur boîte puis séché pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C.

##### **b) Ensemencement**

L'ensemencement est effectué en surface, sous forme de spot de 1µl de suspension bactérienne ( $10^7$  cellules/ml), soit  $10^4$  UFC/spot, un témoin sans extraits a été réalisé et des

standards d'acide cinnamique, d'acide caféique, d'acide gallique et de quercétine ont été également testés. La lecture du résultat a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C. Les valeurs de CMI sont déterminées comme étant la plus petite concentration d'extrait déposé avec absence visible de croissance à chaque temps de lecture.

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

#### **2.1.8.5. Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait de la variété *Bouricha***

Dans le but de déterminer le pouvoir de l'extrait méthanolique à inhiber la croissance de *S. aureus*, nous avons suivi l'évolution de la croissance de ce dernier en présence et en absence de l'extrait de la variété *Bouricha*, le protocole suivi est celui décrit par Sousa *et al.* (2006) (figure 4).

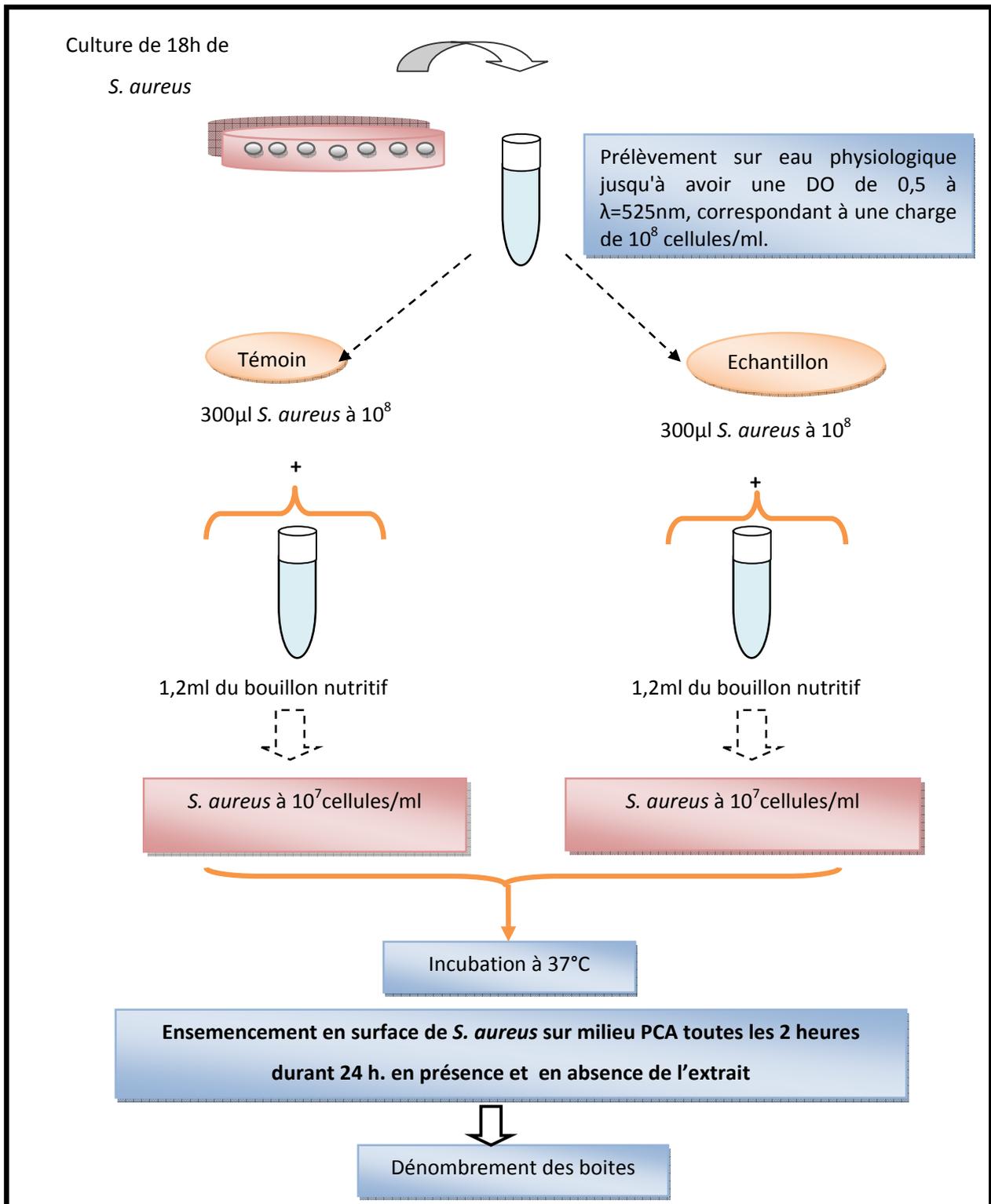
Un volume de 1,2 ml du bouillon nutritif stérile est additionné avec 1,5 ml d'extrait méthanolique à une concentration de 50 mg/ml, la suspension est ensemencée avec 300 µl d'une culture *S. aureus* ( $10^8$  cellules/ml) pour atteindre un taux de  $10^7$  cellules/ml dans la solution finale. Un tube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

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

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

#### **2.1.9. Etude statistique**

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



**Figure 4** : Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence et en absence de l'extrait de la variété *Bouricha* (Sousa *et al.*, 2006).

## 2.2. Résultats et discussion

### 2.2.1. Indice de maturité

Les indices de maturité des olives des différentes variétés ainsi que les dates de récolte sont reportés dans le tableau X. Les résultats obtenus montrent des valeurs qui varient entre 3,38 pour la variété *Aghenfas* et 6,79 pour la variété *Tabelout*. Notons que cette dernière a été récoltée à une époque tardive (03/01/2009) par rapport aux autres variétés.

L'analyse statistique montre la présence de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les variétés. Néanmoins, aucune différence significative existe entre : *Aghenfas*, *Bouricha* et *Limli* ; *Akerma*, *Bouchouk Soummam* et *Neb Djemel* ; *Akerma*, *Blanquette de Guelma* et *Ferkani* et entre *Bouricha*, *Chemlal Tazmalt* et *Limli*.

**Tableau X** : Dates de récolte et indice de maturité des différentes variétés d'olives.

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

\* Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart type (n = 3),

\* les valeurs suivies par les mêmes lettres dans une même colonne ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,05$ ).

A partir des résultats, on observe l'absence de différences significatives entre les variétés séparées par des intervalles de récolte : une journée (*Blanquette de Guelma* et *Ferkani*), de cinq jours (*Bouricha* et *Limli*), de vingt deux jours (*Aghenfas* et *Bouricha*) et plus d'un mois (*Bouricha* et *Chemlal Tazmalt* ; *Limli* et *Chemlal Tazmalt*). D'un autre coté, on a relevé une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les variétés *Aghenfas* et *Neb Djemel* qui sont récoltées dans la même journée.

Toutes ces constatations nous mènent à conclure que l'indice de maturité est étroitement lié à la variété, suite à des facteurs génétiques. En effet, certaines variétés entrent en maturation plus vite que d'autres et de ce fait, on distingue des variétés à maturation précoce, c'est le cas de la variété marocaine *Manzanilla* (El Antari *et al.*, 2003) et des variétés à maturation tardive comme la variété espagnole *Arbequina* (Yousfi *et al.*, 2006) .

D'autres facteurs peuvent également influencer l'indice de maturité dont la charge de l'olivier. Selon El Antari *et al.* (2000), la charge des arbres en fruits engendre une compétition entre les fruits dont résultent les faibles valeurs d'indice de maturité au moment de la récolte. Concernant notre travail, nous avons remarqué que l'olivier à partir duquel nous avons échantillonné au début du mois de janvier la variété *Chemlal Tazmalt* était très chargé, ceci pourrait expliquer en partie le résultat de l'indice de maturité (4,01) qui était très proche des indices de variétés récoltées pendant le début du mois de novembre (*Limli et Bouricha*).

### 2.2.2. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats relatifs à la teneur en composés phénoliques totaux des onze variétés d'huiles d'olives sont regroupés dans le tableau XI. En général, les teneurs sont comprises entre 115,73 mg/Kg pour la variété *Chemlal Tazmalt* et 420,95 mg/Kg pour la variété *Neb Djemel*.

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

- Variétés à faibles teneurs en polyphénols totaux (50 - 200 mg/Kg) : on distingue quatre variétés : *Aghenfas*, *Akerma*, *Chemlal Tazmalt* et *Limli*;
- Variétés à teneurs moyennes en polyphénols totaux (200 - 500 mg/Kg) : les sept variétés restantes appartiennent à ce groupe : *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Neb Djemel* et *Tabelout*.

L'analyse statistique des données montre la présence de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les variétés, néanmoins, aucune différence significative n'est notée entre *Aghenfas* et *Bouchouk Soummam*; *Akerma* et *Limli*; *Blanquette de Guelma* et *Bouricha*; *Chemlal Tazmalt* et *Limli*, ni entre *Ferkani* et *Tabelout*.

D'après nos résultats, il ressort que le cultivar est un facteur important qui influence la composition quantitative en polyphénols totaux de l'huile d'olive, tel que déjà observé par plusieurs auteurs : Dugo *et al.* (2004), Haddada *et al.* (2007), Zarrouk *et al.* (2008) et

Ocakoglu *et al.* (2009). La concentration en polyphénols totaux dépend du système enzymatique spécifique pour chaque variété. D'après Artajo (2006), une corrélation positive est observée entre l'activité enzymatique de la L-phénylalanine ammonia lyase (PAL) et le taux de polyphénols présents dans l'huile d'olive. Il est bien connu que la teneur en composés phénoliques n'est pas seulement liée à la variété, mais c'est le résultats d'une interaction complexe entre plusieurs facteurs, à savoir l'indice de maturité des olives (Rovellini et Cortesi, 2003), la saison, la région, les conditions climatiques (Salvador *et al.*, 2003), l'état sanitaire des olives (Tamendjari *et al.*, 2004), le système d'extraction de l'huile (De Stefano *et al.*, 1999) et les conditions d'extraction (Vekiari et Koutsaftakis, 2002).

**Tableau XI** : Teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives par méthode colorimétrique.

Variété	Teneur en composés phénoliques totaux (mg/Kg)
<i>Aghenfas</i>	161,78 ± 6,24 <sup>c</sup>
<i>Akerma</i>	130,92 ± 7,68 <sup>b</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	365,24 ± 8,40 <sup>f</sup>
<i>Bouchouk Soummam</i>	152,17 ± 7,23 <sup>c</sup>
<i>Bouricha</i>	369,79 ± 6,88 <sup>f</sup>
<i>Chemlal</i>	234,38 ± 6,42 <sup>d</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	115,73 ± 4,35 <sup>a</sup>
<i>Ferkani</i>	243,23 ± 2,87 <sup>e</sup>
<i>Limli</i>	123,43 ± 0,79 <sup>ab</sup>
<i>Neb Djemel</i>	420,95 ± 2,02 <sup>g</sup>
<i>Tabelout</i>	239,79 ± 1,69 <sup>e</sup>

\* Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart type (n = 3),

\* les valeurs suivies par les mêmes lettres dans une même colonne ne présentent aucune différence significative (p<0,05).

La variété *Chemlal Tazmalt* présente la teneur la plus faible en polyphénols et qui représente à peu près la moitié de la teneur de la variété *Chemlal*, cela est peut être dû en partie à l'origine géographique associé au régime d'irrigation. Les variétés *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, contiennent des teneurs appréciables en composés phénoliques, s'avèrent intéressantes pour de nouvelles plantations ou d'éventuels coupages avec des huiles pauvres en composés phénoliques.

D'après Tovar *et al.* (2002), au cours de la maturation, l'activité de l'enzyme PAL diminue et l'activité des estérases et des glucosidases augmente (Ben Youssef *et al.*, 2010), entraînant ainsi une réduction des taux des polyphénols totaux, on estime alors que les variétés *Chemlal*, *Ferkani* et *Tabelout* devraient contenir des teneurs assez appréciables en composés phénoliques à des indices de maturité moins avancés ou inférieurs à 5 d'où la nécessité de réaliser la récolte à une période plus avancée pour obtenir des huiles plus riches en composés phénoliques.

Les teneurs en polyphénols totaux enregistrées pour nos variétés d'huiles sont relativement proches de celles des variétés italiennes étudiées par Tura *et al.* (2007) et Baiano *et al.* (2009), pour lesquelles les teneurs oscillent entre 115 à 377 mg/Kg et entre 133,68 à 322,18 mg/Kg respectivement. Ocakoglu *et al.* (2009) ont signalé des teneurs qui oscillent entre 75,46 et 333,37 mg/Kg pour des variétés turques. Nos variétés sont beaucoup plus riches en polyphénols totaux que les variétés tunisiennes (*Chetoui*, *Chemlali*, *Meski* et *Sayali* : 18,2 à 162,8 mg/Kg) et les variétés espagnoles (entre 37,2 et 93,2 mg/Kg) analysées respectivement par Dhifi *et al.* (2006) et Ceci et Carelli (2007).

### 2.2.3. Dosage des *ortho*-diphénols

Les teneurs en *ortho*-diphénols sont représentées dans le tableau XII. Les valeurs fluctuent entre 29,67 mg/Kg (*Neb Djemel*) et 5,68 mg/Kg (*Limli*). Des différences significatives sont relevées ( $p < 0,05$ ) entre les variétés d'huiles étudiées sauf entre les huiles des variétés *Akerma* et *Bouchouk Sommam*, entre *Bouricha* et *Chemlal* et entre *Ferkani* et *Tabelout*.

Un coefficient de corrélation significatif est relevé entre le taux de polyphénols totaux et *ortho*-diphénols ( $r=0,88$  : annexe 6). Nos résultats sont en accord avec ceux de Di Giovacchino *et al.* (2001) et ceux de Cerretani *et al.* (2006) qui ont enregistré un coefficient de corrélation de 0,88 et 0,82 respectivement. Certains auteurs ont rapporté qu'une huile d'olive ayant une teneur élevée en composés phénoliques totaux présente un taux élevé en *ortho*-diphénols (Evangelisti *et al.*, 1997; Blekas *et al.*, 2002). Un travail de Zarrouk *et al.* (2008), parmi trois variétés tunisiennes étudiées, la variété *Zalmati* la plus riche en composés phénoliques contenait la quantité la plus faible en *ortho*-diphénols. Ces différentes constatations pourraient être expliquées par la variation des systèmes enzymatiques présents dans chaque variété.

**Tableau XII** : Teneurs en *ortho*-diphénols des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives étudiées.

Variété	Teneur en <i>ortho</i> -diphénols (mg/Kg)
<i>Aghenfas</i>	13,15 ± 0,00 <sup>d</sup>
<i>Akerma</i>	10,07 ± 0,00 <sup>c</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	23,37 ± 0,59 <sup>g</sup>
<i>Bouchouk Soummam</i>	10,92 ± 0,00 <sup>c</sup>
<i>Bouricha</i>	15,65 ± 0,86 <sup>e</sup>
<i>Chemlal</i>	15,49 ± 0,18 <sup>e</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	7,54 ± 0,00 <sup>b</sup>
<i>Ferkani</i>	19,30 ± 0,00 <sup>f</sup>
<i>Limli</i>	5,68 ± 0,00 <sup>a</sup>
<i>Neb Djemel</i>	29,67 ± 0,73 <sup>h</sup>
<i>Tabelout</i>	19,36 ± 0,97 <sup>f</sup>

\* Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart type (n = 3),

\* les valeurs suivies par les mêmes lettres dans une même colonne ne présentent aucune différence significative (p<0,05).

Les teneurs en *ortho*-diphénols des variétés étudiées sont relativement proches des variétés espagnoles *Picual*, *Hojiblanca* et *Arbequina* dont les teneurs varient entre 3,99 mg/Kg et 18,92 mg/Kg (Gutiérrez *et al.*, 2002), mais largement inférieures à celles enregistrées par Cerretani *et al.* (2004) pour des variétés italiennes (127 à 228 mg/Kg) et à celles des variétés tunisiennes rapportées par Zarrouk *et al.* (2008) qui sont de l'ordre de 188,12 à 213,62 mg/Kg. Salvador *et al.* (2003) ont obtenu des teneurs plus faibles (1,5 et 10,4 mg/Kg), en étudiant la variété espagnole *Cornicabra* sur 5 saisons de récolte.

#### 2.2.4. Détermination des biophénols des huiles d'olives par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

L'analyse des chromatogrammes (annexe 7) des extraits phénoliques des huiles étudiées montre une composition qualitative en composés phénoliques similaire pour l'ensemble des échantillons, mais différente d'un point de vue quantitatif (tableau XIII). Nous avons relevé les classes suivantes :

- Les sécoïridoïdes : dérivés d'oleuropéine et de ligstroside;
- Les lignanes;
- Les flavonoïdes.

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

#### 2.2.4.1. Les sécoïridoïdes: dérivés d'oleuropéine et de ligstroside

En comparant aux taux des polyphénols totaux, pour toutes les variétés étudiées, les sécoïridoïdes représentent la classe majoritaire des polyphénols totaux, leurs distributions varient d'une variété à une autre ce qui est en accord avec les résultats de De La Torre-Carbot *et al.* (2005), Gómez-Rico *et al.* (2008) et ceux de Dabbou *et al.* (2009). C'est la variété *Neb Djemel* qui enregistre le pourcentage le plus élevé 83,61% et le pourcentage minimal est obtenu pour l'huile de la variété *Chemlal Tazmalt* (43,19%). Des coefficients de corrélation positifs et significatifs ( $p < 0,05$ ) sont enregistrés (annexe 6) entre le taux des polyphénols totaux et les dérivés d'oleuropéine et de ligstroside (0,95 et 0,97 respectivement).

Les variétés *Neb Djemel* et *Bouricha* se caractérisent par les teneurs les plus élevées en dérivés d'oleuropéine (276 et 235 mg/Kg respectivement) et dérivés de ligstroside (173 et 150 mg/Kg respectivement), suivie des variétés *Chemlal*, *Ferkani*, *Blanquette de Guelma* et *Tabelout* dont les teneurs oscillent entre 119 et 103 mg/Kg (dérivés d'oleuropéine) et entre 91 et 124 mg/Kg (dérivés de ligstroside). Pour les autres variétés, les teneurs sont inférieures à 100 mg/Kg (36 à 82 mg/kg pour les dérivés d'oleuropéine et 26 à 62 mg/Kg pour les dérivés de ligstroside).

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

##### ➤ L'hydroxytyrosol et le tyrosol

L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et le tyrosol (*p*-HPEA) sont les principaux alcools phénoliques présents dans les huiles des variétés étudiées ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Servili *et al.* (2004) et Ocakoglu *et al.* (2009). Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs en tyrosol plus élevées que celles en hydroxytyrosol, les valeurs oscillent entre 2 et 28 mg/Kg pour le tyrosol et entre 0,5 et 5 mg/Kg pour

l'hydroxytyrosol. Les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* enregistrent les valeurs les plus élevées en tyrosol (28 et 26 mg/Kg respectivement) et en hydroxytyrosol (5 mg/Kg), tandis que les plus faibles valeurs en tyrosol et hydroxytyrosol sont enregistrées respectivement par les variétés *Bouchouk Soummam* (2 mg/Kg) et *Aghenfas* (0,5 mg/Kg).

Il est important de signaler que malgré que la variété *Limli* se révèle pauvre en polyphénols totaux, elle enregistre un taux plus élevé en tyrosol par rapport à la variété *Neb Djemel* qui est considérée comme étant la variété la plus riche en polyphénols totaux. Cette remarque a été aussi signalée par Dabbou *et al.* (2009) sur la variété *Ascolana Tenera* introduite en Tunisie.

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

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

#### **2.2.4.2. Les lignanes**

Qualitativement parlant, pour toutes les huiles analysées, les lignanes viennent en 2<sup>ème</sup> position après les sécoïridoïdes à l'exception des huiles des variétés *Aghenfas*, *Akerma*, *Bouchouk Sommam* et *Neb Djemel* dont le taux des flavonoïdes sont supérieurs à ceux des lignanes, les mêmes résultats sont observés par García-Villalba *et al.* (2010) sur les variétés espagnoles où la variété *Picual* enregistre des teneurs plus élevées en flavonoïdes par rapport aux lignanes, alors que pour la variété *Arbequina*, ils ont relevé des teneurs plus importantes en lignanes. Les pourcentages en lignanes de nos huiles varient entre 3,91% (*Neb Djemel*) et 15,95% (*Chemlal Tazmalt*) par rapport aux polyphénols totaux.

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en lignanes, la variété *Bouricha* se caractérise par la teneur la plus élevée (51 mg/Kg) suivie des variétés *Ferkani* et *Chemlal Tazmalt* avec des teneurs respectives de 42 et 41 mg/Kg, la valeur la plus faible est relevée pour la variété *Bouchouk Soummam* (12 mg/Kg), le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 16 et 38 mg/Kg.

Bien que la variété *Neb Djemel* se révèle être riche en polyphénols totaux (537 mg/Kg), elle ne renferme que 21 mg/Kg en lignanes par contre la variété *Chemlal Tazmalt* qui est moins riche en polyphénols totaux (257 mg/Kg) montre une teneur en lignanes de 41 mg/Kg. En plus du facteur variété, ceci peut être attribué à l'origine géographique comme il a été signalé par Tovar *et al.* (2001).

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* (2004) sur la variété espagnole *Arbequina* cultivée à Tarragona et Jaén dont les teneurs sont de 65 mg/Kg et 61 mg/Kg respectivement, et largement inférieurs à ceux des variétés étudiées par Brenes *et al.* (2001) dont les teneurs sont supérieures à 100 mg/Kg. Cependant, nos variétés présentent des teneurs supérieures à celles des variétés *Picual* et *Hojiblanca* étudiées par García-Villalba *et al.* (2010) et à celles des variétés tunisiennes étudiées par Haddada *et al.* (2008) dont les teneurs oscillent entre 3,15 et 9,35 mg/Kg.

#### 2.2.4.3. Les flavonoïdes

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en flavonoïdes, les variétés *Akerma* et *Aghenfas* se caractérisent par les teneurs les plus élevées (49 et 44 mg/Kg respectivement), alors que les variétés *Limli*, *Tabelout* et *Ferkani* enregistrent les teneurs les plus faibles (10, 13 et 14 mg/Kg respectivement). Les teneurs du reste des variétés oscillent entre 18 et 41 mg/Kg. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* (2004) et Ilyasoglu *et al.* (2010).

Les flavonoïdes représentent 26,03% des polyphénols totaux pour la variété *Aghenfas* alors qu'elle enregistre la teneur la plus faible en polyphénols totaux, tandis que les variétés *Blanquette de Guelma* et *Tabelout* enregistrent les taux les plus faibles en flavonoïdes (4,18% et 4,11%) avec des teneurs appréciables en polyphénols totaux. Un coefficient de corrélation négatif ( $r = -0,28$ ) est enregistré entre les polyphénols totaux et flavonoïdes (annexe 6).

D'après les résultats obtenus, l'apigénine et la lutéoline sont présents dans toutes les huiles analysées, avec une prédominance de la lutéoline à l'exception de la variété *Tabelout*. Les variétés étudiées par Andjelkovic *et al.* (2009) et García-Villalba *et al.* (2010) présentent

un taux plus élevé en lutéoline alors que les variétés turques récoltées en 2006 révèlent une dominance de l'apigénine (Ocakoglu *et al.*, 2009). La variété *Akerma* se caractérise par la teneur la plus élevée en lutéoline (38 mg/Kg), cette teneur est proche de celles des variétés françaises obtenues par Andjelkovic *et al.* (2008). Concernant l'apigénine, c'est la variété *Chemlal Tazmalt* qui enregistre la teneur la plus importante (14 mg/Kg) avec aussi une teneur assez élevée en lutéoline (20 mg/Kg). On observe également que les variétés *Limli* et *Tabelout* se distinguent par les teneurs les plus faibles en apigénine (3 mg/Kg) et lutéoline (6 mg/Kg) respectivement, ces teneurs sont proches de celles rapportées par Andjelkovic *et al.* (2009). Pour le reste des variétés, les valeurs varient entre 7 et 32 mg/Kg pour la lutéoline et 4 et 13 mg/Kg pour l'apigénine.

D'après Brenes *et al.* (1999), la concentration de la lutéoline diminue avec la maturation du fruit d'olive, par contre, celle de l'apigénine ne subit aucun changement ce qui pourrait expliquer les faibles teneurs en lutéoline chez la variété *Tabelout* qui présente un indice de maturité élevé (6,97).

#### **2.2.4.4. Les polyphénols oxydés**

Il y a plusieurs années, un intérêt croissant a été porté sur les formes oxydées des polyphénols de l'huile d'olive car elles sont en relation avec la détermination des états de la fraîcheur et de vieillissement de l'huile d'olive (Rovellini et Cortesi, 2002). Le rapport entre ces composés et leurs formes naturelles est considéré clé pour le jugement de la bonne qualité de l'huile (Rovellini, 2008).

Concernant les résultats obtenus, on a noté la quantité la plus élevée pour la variété *Chemlal Tazmalt* (67 mg/Kg) avec le pourcentage le plus élevé (26,07%), alors que les teneurs les plus faibles sont enregistrées par les variétés *Ferkani* et *Aghenfas* (12 et 14 mg/Kg respectivement). La variété *Neb Djemel* s'avère intéressante car, en plus de sa teneur élevée en polyphénols totaux (537 mg/Kg), elle présente une faible teneur en polyphénols oxydés (19 mg/Kg), qui est équivalente à 3,53% des polyphénols totaux.

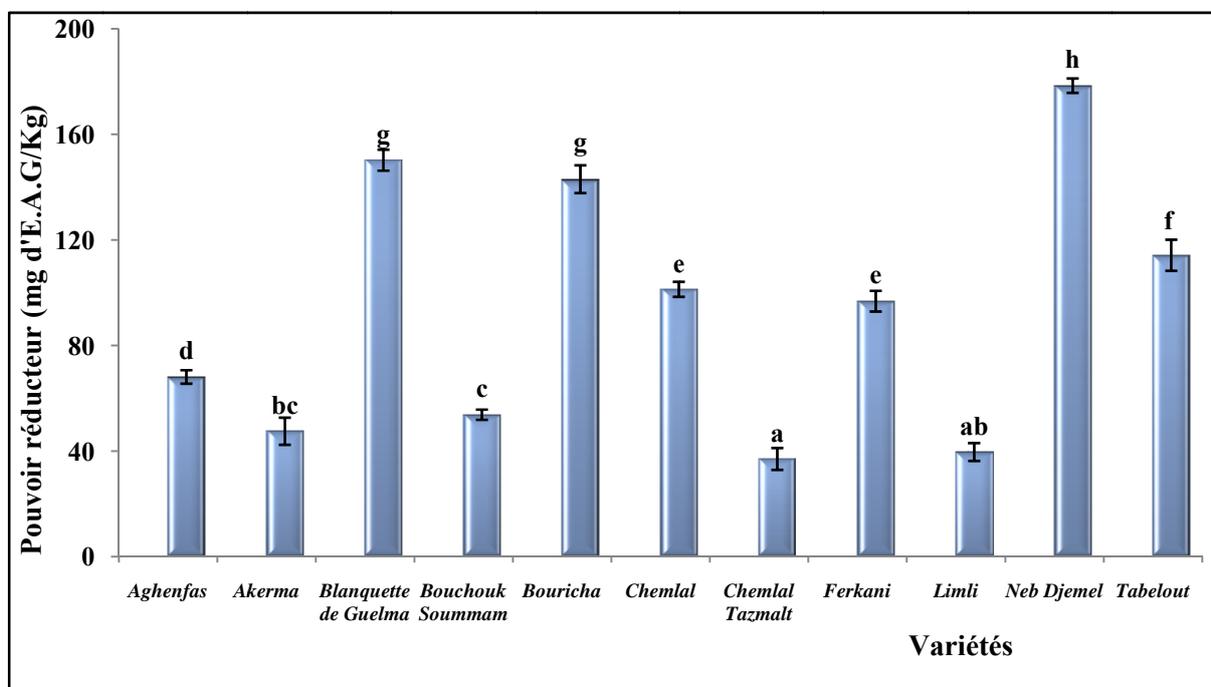
**Tableau XIII :** Teneurs des composés phénoliques individuels, polyphénols totaux et polyphénols oxydés des huiles d'olives déterminées par HPLC.

	<i>Aghenfas</i>	<i>Akerma</i>	<i>Blanquette de Guelma</i>	<i>Bouchouk Soummam</i>	<i>Bouricha</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Chemlal Tazmalt</i>	<i>Ferkani</i>	<i>Limli</i>	<i>Neb Djemel</i>	<i>Tabelout</i>
<b>Dérivés d'oleuropéine (mg/Kg)</b>	50	36	203	82	235	133	61	119	60	276	120
➤ <b>Hydroxytyrosol</b>	0,5	0,9	5	2	5	3	2	1	3	4	4
<b>Dérivés de ligstroside (mg/Kg)</b>	26	44	115	32	150	101	50	91	62	173	124
➤ <b>Tyrosol</b>	3	4	28	2	26	3	3	4	26	5	11
<b>Flavonoïdes (mg/Kg)</b>	44	49	18	41	25	23	34	14	10	33	13
➤ <b>Apigénine</b>	12	11	6	12	7	8	14	4	3	13	7
➤ <b>Lutéoline</b>	32	38	12	29	18	15	20	10	7	20	6
<b>Lignanes (mg/Kg)</b>	16	38	33	12	51	38	41	42	25	21	29
<b>Polyphénols oxydés (mg/Kg)</b>	14	15	51	18	55	54	67	13	42	19	22
<b>Polyphénols totaux (HPLC) (mg/Kg)</b>	169	207	430	197	522	354	257	287	208	537	316

## 2.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques

### 2.2..5.1. Pouvoir réducteur

Les résultats relatifs au pouvoir réducteur des différents extraits méthanoliques sont représentés dans la figure 5. Les meilleures activités réductrices sont exercées par les extraits d'huiles issues des variétés *Neb Djemel*, *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* avec des valeurs respectives de 178,48, 150,28 et 143,07 mg E.A.G./Kg, tandis que les extraits des variétés *Limli* et *Chemlal Tazmalt* exercent les plus faibles pouvoirs réducteurs qui sont respectivement de 39,71 et 37,06 mg E.A.G./Kg. Les autres extraits des variétés montrent des valeurs qui oscillent entre 47,58 et 114,25 mg E.A.G./Kg.



**Figure 5 :** Pouvoir réducteur des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.

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

\* les barres verticales représentent les écarts types.

Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont relevées entre les variétés sauf entre *Limli* et *Chemlal Tazmalt*, entre *Limli* et *Akerma*, entre *Akerma* et *Bouchouk Soummam*, entre *Chemlal* et *Ferkani* et entre *Blanquette de Guelma* et *Bouricha*. Ces différences peuvent être attribuées aux variations quantitatives des composés phénoliques, en effet, les extraits d'huiles riches en composés phénoliques totaux et en *ortho*-diphénols présentent les meilleurs pouvoirs réducteurs. Des coefficients de corrélation significatifs ( $p < 0,05$ ) sont obtenus entre

le pouvoir réducteur et les teneurs en polyphénols totaux ( $r = 0,98$ ) ainsi qu'avec les teneurs en *ortho*-diphénols ( $r = 0,92$ ) (annexe 6). Sur le plan qualitatif des composés phénoliques, un coefficient de corrélation significatif ( $p < 0,05$ ) est obtenu entre le pouvoir réducteur et les teneurs en hydroxytyrosol ( $r = 0,72$ ), tandis que un coefficient de corrélation de  $r = 0,31$  est noté entre le pouvoir réducteur et les teneurs en tyrosol. D'après Bouaziz *et al.* (2004), les composés ayant une structure moléculaire possédant plusieurs groupements hydroxyles augmentent l'activité antioxydante. Les *ortho*-diphénols de l'huile d'olive possèdent une activité antioxydante plus forte que les phénols monohydroxylés comme le tyrosol et les ligstrosides aglycones (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2006).

### 2.2.5.2. Activité scavenger sur le radical DPPH

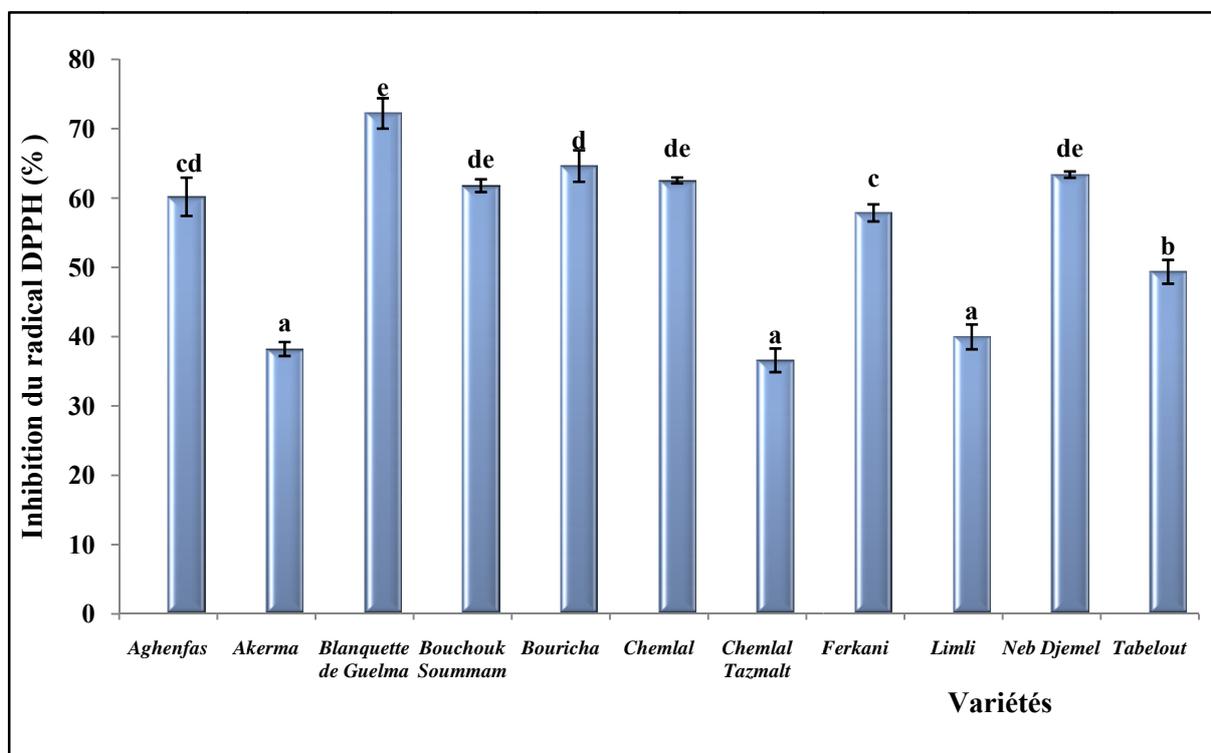
Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 6. L'extrait phénolique de la variété *Blanquette de Guelma* exerce le meilleur pourcentage d'inhibition du radical DPPH (72,20%). Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) existent entre les extraits d'huiles des variétés étudiées, par exemple la variété *Tabelout* présente des différences significatives ( $p < 0,05$ ) avec les dix variétés étudiées. Néanmoins, aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'est relevée entre les trois variétés ayant enregistré les plus faibles taux d'inhibition du radical DPPH, à savoir, *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt* avec des taux d'inhibition respectifs de 39,96%, 38,20% et 36,57%.

L'ensemble des résultats obtenus sont proches à ceux rapportés par Nakbi *et al.* (2010) pour les variétés tunisiennes ou ils avaient enregistré des valeurs de 78,56% et 37,23% respectivement pour les variétés *Chetoui* et *Chemlali*.

Une corrélation significative ( $p < 0,05$ ) est observée entre l'activité scavenger sur le radical DPPH et la teneur en *ortho*-diphénols ( $r = 0,67$ ) et en composés phénoliques totaux ( $r = 0,72$ ) (annexe 6). Ce dernier est proche de celui obtenu par Samaniego Sanchez *et al.* (2007) et qui est de 0,79, mais inférieur à la valeur signalé (0,98) par Gorinstein *et al.* (2003).

Les différentes activités scavenger de nos extraits peuvent être reliées à la composition et au profil en composés phénoliques des variétés, particulièrement les *ortho*-diphénols. Les dérivés de l'oleuropéine sont les principaux composés trouvés dans huit variétés étudiées. Leurs propriétés antioxydantes peuvent être reliées à la donation d'hydrogène et leur habilité à améliorer la stabilité du radical en formant une liaison hydrogène intra moléculaire entre l'hydrogène libre et leur radical phénoxy. La présence d'un second groupement hydroxyl en

position *ortho* améliore significativement leur pouvoir à agir comme un antioxydant telle que citée par plusieurs auteurs (Visioli et Galli, 1998; Ollivier *et al.*, 2004; Servili *et al.*, 2009).



**Figure 6 :** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.

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

A travers les résultats, on note également que les variétés *Bouchouk Soummam* et *Aghenfas* présentent des pourcentages d'inhibition du radical DPPH plus élevés (61,77 et 60,15% respectivement) que les variétés *Ferkani* (57,84%) et *Tabelout* (49,34%) malgré que ces dernières soient plus riches en polyphénols totaux. Ceci pourrait être en relation avec les teneurs en flavonoïdes car les variétés *Bouchouk Soummam* et *Aghenfas* sont plus riches en flavonoïdes, elles contiennent respectivement 41 et 44 mg/Kg correspondant à 26,03 et 23,71% des polyphénols totaux, tandis que les variétés *Ferkani* et *Tabelout* contiennent respectivement 13 et 14 mg/Kg correspondant à 4,87 et 4,11% des polyphénols totaux.

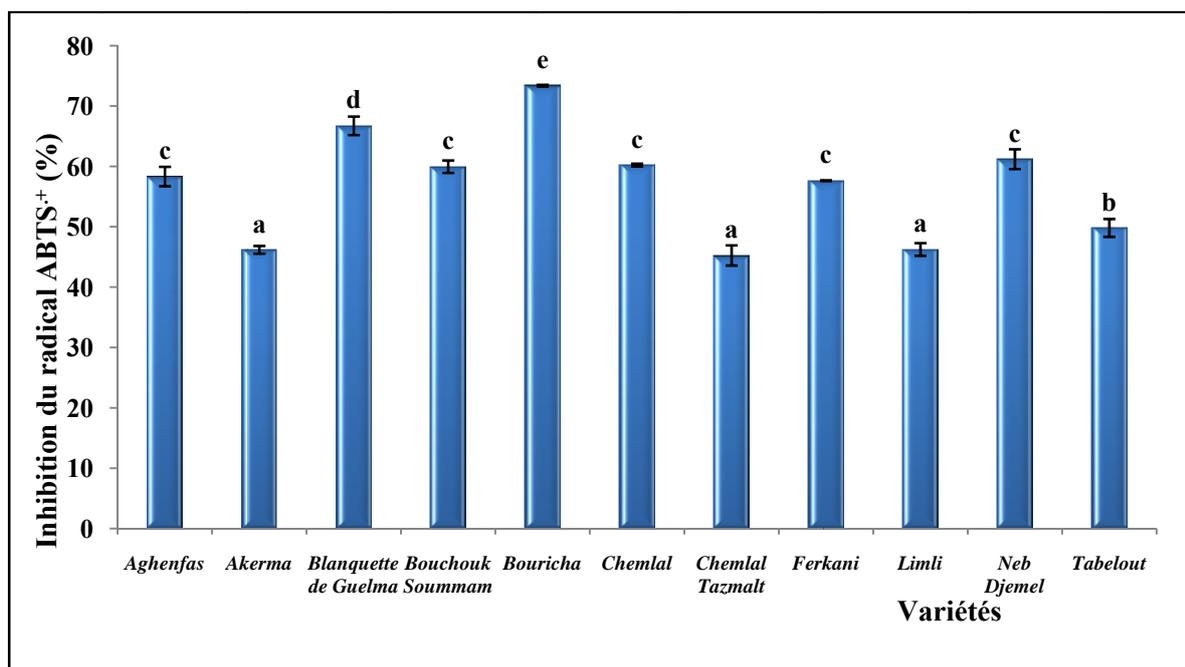
De plus, mis à part la variété *Tabelout*, la teneur en lutéoline est plus importante dans toutes les variétés par rapport à l'apigénine, notamment, pour les variétés *Akerma*, *Aghenfas* et *Bouchouk Soummam*. Selon plusieurs travaux, la présence d'un groupement catéchol (la structure *ortho*-diphénolique) sur l'un des ses cycles lui confèrent une activité antiradicalaire

puls importante par rapport à l'apigénine (Pannala *et al.*, 2001; Bouaziz *et al.*, 2004; Majewska *et al.*, 2011).

Concernant la variété *Akerma*, elle a enregistré une teneur élevée en flavonoïdes soit 49 mg/Kg (23,71% des polyphénols totaux) mais elle présente une activité antiradicalaire très faible par rapport aux autres variétés. Ceci pourrait être attribué au fait que cette variété contient une faible teneur en dérivés d'oleuropéine (36 mg/Kg qui correspond à 4,16% des polyphénols totaux) et élevées en lignanes correspondant à 18,35% des polyphénols totaux. D'après Carrasco-Pancorbo *et al.* (2006), la présence du groupement  $\text{COOCH}_3$  dans la molécule 1-acetoxypinorésinol ainsi que la *o*-méthylation ( $-\text{OCH}_3$ ) du groupement hydroxyle des cycles benzoïques diminuent leur activité antioxydante.

### 2.2.5.3. Activité scavenger sur le radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

Les résultats du pouvoir antiradicalaire des extraits méthanoliques, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  sont illustrés dans la figure 7.



**Figure 7:** Pourcentages d'inhibition du radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.

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

\* les barres verticales représentent les écarts types.

Il apparaît clairement que tous les extraits d'huiles d'olive analysés possèdent la capacité de piéger le radical  $ABTS^+$  et ce pouvoir diffère significativement ( $p < 0,05$ ) entre les variétés, toutefois, aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'est observée entre les extraits : *Akerma*, *Chemlal Tazmalt* et *Limli*, *Aghenfas*, *Bouchouk Soummam*, *Chemlal*, *Ferkani* et *Neb Djemel*.

Les résultats sont aussi exprimés en termes d' $IC_{50}$  (tableau XIV), représentant la concentration nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical  $ABTS^+$  de 50%. La plus petite valeur d' $IC_{50}$  correspond à la plus grande activité antiradicalaire. L'étude statistique révèle des différences significatives entre les échantillons, néanmoins, aucune différence n'est observée entre les échantillons : *Aghenfas*, *Limli* et *Tabelout* ; *Bouchouk Soummam* et *Chemlal* ; *Neb Djemel* et *Chemlal* ; *Chemlal Tazmalt* et *Ferkani*.

**Tableau XIV:** Détermination des  $IC_{50}$  sur le radical  $ABTS^+$  des différents extraits des échantillons d'huiles d'olives.

Variété	$IC_{50}$ (mg/ml)
<i>Aghenfas</i>	0,28±0,01 <sup>e</sup>
<i>Akerma</i>	0,42±0,01 <sup>g</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	0,18±0,01 <sup>b</sup>
<i>Bouchouk Soummam</i>	0,27±0,007 <sup>d</sup>
<i>Bouricha</i>	0,12±0,017 <sup>a</sup>
<i>Chemlal</i>	0,26±0,006 <sup>cd</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	0,37±0,011 <sup>f</sup>
<i>Ferkani</i>	0,30±0,005 <sup>f</sup>
<i>Limli</i>	0,33±0,005 <sup>e</sup>
<i>Neb Djemel</i>	0,25±0,002 <sup>c</sup>
<i>Tabelout</i>	0,32±0,005 <sup>e</sup>

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

\*Les valeurs suivies par les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,05$ ).

La variété *Bouricha* enregistre le pourcentage d'inhibition le plus élevé du radical  $ABTS^+$  (73,38%) suivie de la variété *Blanquette de Guelma* (66,73%). Elles enregistrent, ainsi, les plus faibles valeurs d' $IC_{50}$  soit 0,12 mg/ml et 0,18 mg/ml respectivement, correspondant à une meilleure efficacité des extraits d'huiles dans la neutralisation du radical

ABTS<sup>+</sup>. Par contre, les extraits des variétés *Limli*, *Akerma* et *Chemlal Tazmalt* ont montré les plus basses activités antiradicalaires (46,25, 46,19 et 45,25 % respectivement) et les plus grandes valeurs d'IC<sub>50</sub> (0,33, 0,42 et 0,37 mg/ml respectivement).

On constate aussi que malgré une teneur plus importante en polyphénols totaux pour la variété *Neb Djemel* (420,95 mg/Kg), par rapport à la variété *Chemlal* (226,79 mg/Kg), leurs activités antiradicalaires sur l'ABTS<sup>+</sup> ne montrent aucune différence significative (61,21% et 60,23%, respectivement), ceci pourrait être dû au taux d'hydroxytyrosol qui représente 2,25% des dérivées d'oleuropéine pour la variété *Chemlal*, alors que chez la variété *Neb Djemel*, il est de 1,45%. D'après plusieurs travaux, l'hydroxytyrosol est l'*ortho*-diphenol le plus impliqué dans l'activité antioxydante (Lavelli, 2002; Tuck et Hayball, 2002).

Un coefficient de corrélation significatif ( $p < 0,05$ ) a été enregistré entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire sur l'ABTS<sup>+</sup> ( $r = 0,76$ ). Des coefficients de corrélation plus importants ont été obtenus par Samaniego Sanchez *et al.* (2007) et Karaosmanglu *et al.* (2010) qui sont respectivement de 0,89 et 0,90. Selon ces auteurs, les meilleurs coefficients de corrélation sont obtenus avec la méthode à l'ABTS.

#### 2.2.5.4. Activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène

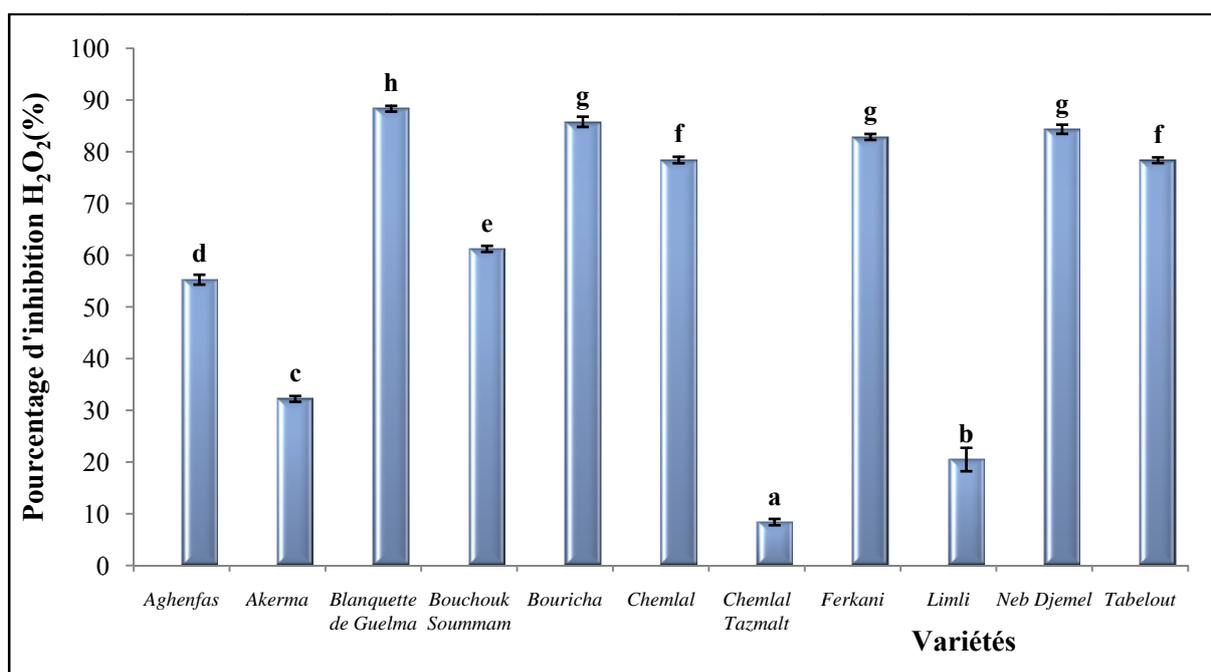
La figure 8 montre les taux d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des différents extraits méthanoliques d'huiles d'olive. D'après ces résultats, le taux d'inhibition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varie de 88,33% pour la variété *Blanquette de Guelma* à 8,4% pour la variété *Chemlal Tazmalt*.

L'analyse statistique révèle des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre la plupart des échantillons à l'exception des variétés *Bouricha*, *Ferkani* et *Neb Djemel* d'une part et entre *Chemlal* et *Tabelout* d'autre part.

Les six variétés ayant un taux de polyphénols totaux supérieur à 200 mg/Kg ont toutes enregistré des pourcentages d'inhibition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépassant 70%, à savoir : *Blanquette de Guelma*, *Bouricha*, *Neb Djemel*, *Ferkani*, *Chemlal* et *Tabelout*. Une corrélation significative ( $p < 0,05$ ) est notée entre les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène et les teneurs en polyphénols totaux ( $r = 0,81$ ).

L'extrait de la variété *Blanquette de Guelma* exerce une activité scavenger sur le peroxyde d'hydrogène supérieure à celui de la variété *Neb Djemel* qui présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (420 mg/kg), ceci pourrait être lié à la plus grande richesse de cette variété en lignanes, car les valeurs enregistrées sont de 33 et 21 mg/Kg respectivement. La variété *Ferkani* se distingue aussi par une activité importante (82,88%)

avec une teneur en composés phénoliques de 243 mg/Kg, ce résultat pourrait être en relation avec les teneurs appréciables de cette variété en dérivés d'oleuropéine (119 mg/Kg) et des lignanes (42 mg/Kg). Selon Owen *et al.* (2000), il existe une corrélation claire entre l'activité antioxydante des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge et la concentration en lignanes. D'après les travaux de Carrasco-Pancorbo *et al.* (2005c), l'activité antioxydante de (+)-pinorésinol est plus importante que les composés suivants : ligstroside aglycone, tyrosol et acide élénolique.



**Figure 8 :** Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits des différents échantillons d'huiles d'olives.

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

En fin, les variétés ayant enregistré les plus bas pourcentages d'inhibition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Limli* et *Chemlal Tazmalt*) présentent les plus basses teneurs en composés phénoliques d'une part et les taux les plus élevées en polyphénols oxydés, soit 20,2% des polyphénols totaux pour la variété *Limli* et 26,9% pour la variété *Chemlal Tazmalt*.

## 2.2.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

### 2.2.6.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques par diffusion sur milieu gélosé

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'extrait à tester, cette activité est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition (mm). Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne de diverses concentrations d'extraits méthanoliques pour l'ensemble des variétés d'huile d'olive sont regroupés dans le tableau IV en annexe 8. En général, on remarque que la plupart des extraits agissent surtout sur *S. aureus* et sur *B. subtilis*. Il est aussi à noter que l'activité est proportionnelle (en termes de diamètre d'inhibition) aux concentrations des extraits testés. L'extrait de la variété *Bouricha* montre une meilleure activité antibactérienne à l'égard des six souches testées. Nous avons noté aussi l'absence d'activité antibactérienne au tour des disques imprégnés par le solvant d'extraction (méthanol/eau : 80/20) et qui est considéré comme témoin (figure 9).

Selon Pereira *et al.* (2006), on distingue différents niveaux d'activité des extraits en se basant sur le diamètre (D) des zones d'inhibitions : aucune activité :  $D = 0$  mm, faible activité :  $2 \text{ mm} \leq D \leq 3 \text{ mm}$ , activité intermédiaire :  $4 \text{ mm} \leq D \leq 5 \text{ mm}$ , forte activité :  $6 \text{ mm} \leq D \leq 9 \text{ mm}$  et très forte activité :  $D > 9$ .

#### ➤ **Activité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus***

Les résultats obtenus (tableau XV) montrent le diamètre des zones d'inhibition des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives vis-à-vis de l'espèce *S. aureus*.

Les diamètres des zones d'inhibition varient de 1 mm (extrait de *Chemlal Tazmalt* à 0,25 mg/disque) à 26 mm (extrait de *Bouricha* 1 mg/disque). D'autre part, tous les extraits testés à différentes concentrations ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* mis à part les extraits des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* à la concentration de 0,12 mg/disque. L'activité antibactérienne est inversement proportionnelle à la concentration de l'extrait. Les meilleures activités (en termes de diamètre de la zone d'inhibition) ont été obtenues avec les extraits de la variété *Bouricha* (26 mm), suivie de la variété *Blanquette de Guelma* (21 mm) à une concentration de 1 mg/disque (figure 9). A cette concentration, des différences significatives sont relevées entre les échantillons ( $p < 0,05$ ), sauf entre les extraits des variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* et entre *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout*. Les extraits de ces deux dernières variétés sont moins performants avec des diamètres qui

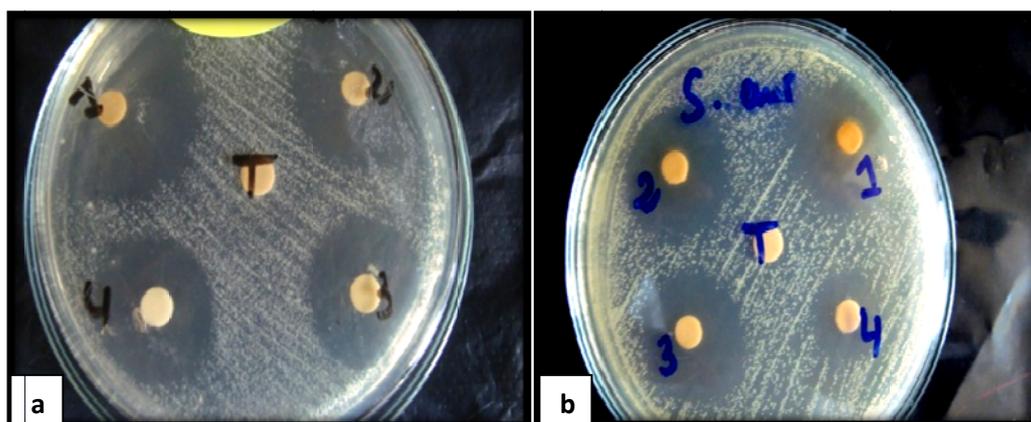
oscillent entre 4,33 et 5 mm respectivement, traduisant une activité intermédiaire de ces deux extraits vis-à-vis de *S. aureus*. Le reste des variétés présentent une forte activité vis-à-vis de *S. aureus* présentant ainsi des zones d'inhibition qui varient entre 10,33 et 19 mm pour une concentration de 1 mg/disque.

**Tableau XV** : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de *S. aureus*.

Variété	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) à différentes concentrations de l'extrait			
	1 mg/ disque	0,5 mg/ disque	0,25 mg/ disque	0,12 mg/ disque
<i>Aghenfas</i>	19,00±0,00 <sup>p</sup>	17,66±0,57 <sup>no</sup>	15,00±0,00 <sup>kl</sup>	13,00±0,00 <sup>hij</sup>
<i>Akerma</i>	18,00±0,00 <sup>nop</sup>	17,33±1,15 <sup>mn</sup>	14,33±1,15 <sup>gk</sup>	11,00±1,00 <sup>fg</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	21,33±0,57 <sup>q</sup>	17,33±0,57 <sup>mn</sup>	13,00±0,00 <sup>hij</sup>	08,33±0,57 <sup>de</sup>
<i>Bouchouk Soummam</i>	10,33±0,57 <sup>f</sup>	08,33±0,57 <sup>d</sup>	05,00±0,00 <sup>c</sup>	02,00±0,00 <sup>ab</sup>
<i>Bouricha</i>	26,00±0,00 <sup>s</sup>	22,66±0,47 <sup>r</sup>	20,33±0,47 <sup>q</sup>	17,00±0,00 <sup>mn</sup>
<i>Chemlal</i>	16,00±0,00 <sup>lm</sup>	12,00±1,00 <sup>gh</sup>	09,66±0,57 <sup>f</sup>	07,33±0,57 <sup>d</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	04,33±0,57 <sup>c</sup>	03,00±0,00 <sup>b</sup>	01,00±0,00 <sup>a</sup>	--
<i>Ferkani</i>	14,66±0,57 <sup>k</sup>	09,66±0,57 <sup>f</sup>	04,66±0,57 <sup>c</sup>	02,66±0,57 <sup>b</sup>
<i>Limli</i>	12,66±0,57 <sup>hi</sup>	07,66±0,57 <sup>d</sup>	05,66±0,57 <sup>c</sup>	02,66±0,57 <sup>b</sup>
<i>Neb Djemel</i>	19,00±0,00 <sup>p</sup>	17,33±0,57 <sup>mn</sup>	14,00±1,00 <sup>ijk</sup>	10,00±1,00 <sup>f</sup>
<i>Tabelout</i>	05,00±0,00 <sup>c</sup>	03,00±1,00 <sup>b</sup>	01,66±0,57 <sup>ab</sup>	--

\*--: Pas de zone d'inhibition observée.

\* Les valeurs suivies par la même lettre ne diffèrent pas significativement ( $p < 0,05$ ).



**Figure 9**: Activité des extraits vis-à-vis de *S. aureus* : **a)** extraits de la variété *Bouricha*, **b)** extraits de la variété *Blanquette de Guelma* à différentes concentrations, **1**: 1 mg/disque, **2**: 0,5 mg/disque, **3** : 0,25 mg/disque, **4**: 0,12 mg/disque. **T**: témoin « méthanol/eau (80/20) ».

A une concentration de 0,12 mg/disque, la souche de *S. aureus* révèle une résistance pour les extraits des variétés *Tabelout* et *Chemlal Tazmalt* et seules les extraits des variétés *Bouricha*, *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* ont maintenues une très forte activité ( $D > 9$  mm) à cette concentration minimale testée, alors que les extraits des variétés *Blanquette de Guelma* et *Chemlal* ont enregistré une forte activité antibactérienne ( $6 < D < 9$ ). Aucune différence significative n'est notée entre les extraits des variétés *Bouchouk Soummam*, *Ferkani* et *Limli* qui enregistrent de faibles activités vis-à-vis de cette souche à la concentration de 0,12 mg/disque.

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

Les résultats obtenus (tableau XVI) montrent un effet inhibiteur des extraits sur *B. subtilis* moins prononcé que celui enregistré sur *S. aureus* et des différences significatives ( $p < 0,05$ ) apparaissent entre certaines variétés. En effet, les diamètres enregistrés oscillent entre 11 mm à 2,33 mm pour la concentration maximale d'extrait (1 mg/disque). *B. subtilis* s'est montré résistante aux extraits des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* à toutes les concentrations testées et vis-à-vis des extraits des variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Limli* à partir de la concentration de 0,5 mg/disque. Par contre, cette résistance est apparue uniquement à la concentration de 0,12 mg/disque pour l'extrait de la variété *Bouchouk Soummam*.

**Tableau XVI** : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de *B. subtilis*.

Variété	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) à différentes concentrations de l'extrait			
	1 mg/disque	0,5 mg/disque	0,25 mg/disque	0,12 mg/disque
<i>Aghenfas</i>	4,00±1,00 <sup>d</sup>	2,66±0,57 <sup>c</sup>	--	--
<i>Akerma</i>	03,00±0,00 <sup>cd</sup>	01,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	--
<i>Blanquette de Guelma</i>	06,33±0,57 <sup>ij</sup>	05,33±0,57 <sup>fg</sup>	04,00±0,00 <sup>de</sup>	01,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>Bouchouk Soummam</i>	04,00±0,00 <sup>de</sup>	02,33±0,57 <sup>bc</sup>	01,00±0,00 <sup>ab</sup>	--
<i>Bouricha</i>	11,00±0,81 <sup>l</sup>	10,33±0,94 <sup>l</sup>	09,33±0,47 <sup>k</sup>	08,66±0,47 <sup>jk</sup>
<i>Chemlal</i>	06,00±0,00 <sup>gh</sup>	04,33±0,57 <sup>e</sup>	02,00±0,00 <sup>abc</sup>	01,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	--	--	--	--
<i>Ferkani</i>	06,66±0,57 <sup>h</sup>	04,66±0,57 <sup>ef</sup>	02,00±0,00 <sup>ab</sup>	01,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>Limli</i>	2,33±0,57 <sup>bc</sup>	01,00±0,00 <sup>ab</sup>	--	--
<i>Neb Djemel</i>	08,66±0,57 <sup>i</sup>	06,66±0,57 <sup>h</sup>	04,00±0,00 <sup>de</sup>	02,00±0,00 <sup>abc</sup>
<i>Tabelout</i>	--	--	--	--

\*--: Pas de zone d'inhibition observée.

\* Les valeurs suivies par la même lettre ne diffèrent pas significativement ( $p < 0,05$ ).

Les meilleures activités sont obtenues pour les extraits des variétés *Bouricha* (11 à 8,66 mm), suivie de *Neb Djemel* (8,66 à 2 mm). L'extrait de la variété *Bouricha* est le seul ayant enregistré une activité très forte ( $D > 9$ ) vis-à-vis de *B. subtilis* : 11, 10,33 et 9,33 mm respectivement pour les concentrations de 1, 0,5 et 0,25 mg/disque. Les diamètres des zones d'inhibition oscillent entre 6 et 1 mm pour les extraits des variétés *Ferkani*, *Blanquette de Guelma* et *Chemlal* à différentes concentrations testées.

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

Parmi les onze extraits méthanoliques testés, seuls ceux des variétés de *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* ont exercé un effet antibactérien sur *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* (tableau XVII).

Une forte activité inhibitrice a été noté pour l'extrait de *Bouricha* à différentes concentrations vis-à-vis des quatre souches testées. Pour *L. innocua*, les diamètres des zones d'inhibition oscillent entre 7,33 à 9,66 mm et certains résultats diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ), exerçant ainsi une forte activité sur cette souche. L'extrait de *Blanquette de Guelma* a montré une activité antibactérienne faible vis-à-vis de *L. innocua* uniquement à la concentration de 1 mg/disque avec un diamètre de 2,33 mm.

**Tableau XVII** : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques vis-à-vis de *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

Variété	Concentration (mg/disque)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits vis-à-vis à différentes souches			
		<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Bouricha</i>	1	09,66±0,47 <sup>c</sup>	08,66±0,94 <sup>d</sup>	09,00±0,00 <sup>d</sup>	10,66±0,47 <sup>e</sup>
	0,5	09,00±0,81 <sup>bc</sup>	07,66±0,94 <sup>d</sup>	07,66±0,47 <sup>c</sup>	08,00±0,81 <sup>d</sup>
	0,25	08,00±0,81 <sup>bc</sup>	07,00±0,00 <sup>c</sup>	07,00±0,00 <sup>b</sup>	07,00±0,00 <sup>cd</sup>
	0,12	07,33±0,47 <sup>b</sup>	06,00±0,81 <sup>b</sup>	06,00±0,00 <sup>a</sup>	06,00±0,00 <sup>c</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	1	2,33±0,57 <sup>a</sup>	02,00±1,00 <sup>ab</sup>	--	04,00±1,00 <sup>b</sup>
	0,5	--	00,66±0,57 <sup>a</sup>	--	03,33±0,57 <sup>b</sup>
	0,25	--	--	--	02,66±0,57 <sup>b</sup>
	0,12	--	--	--	00,66±0,57 <sup>a</sup>

\*--: Pas de zone d'inhibition observée.

\* Les valeurs suivies par la même lettre dans une même colonne ne diffèrent pas significativement ( $p < 0,05$ ).

Concernant *E. coli*, on a noté un diamètre maximal de 8,66 mm pour une concentration de 1 mg/disque et un minimal de 6 mm pour 0,12 mg/disque pour l'extrait de *Bouricha*, exerçant ainsi une forte activité antibactérienne. Par contre, l'extrait de *Blanquette de Guelma* présente un effet antibactérien faible vis-à-vis d'*E. coli* seulement aux concentrations de 1 et 0,5 mg/disque avec des diamètres respectifs de 2 et 0,66 mm.

*P. aeruginosa* a montré une résistance vis-à-vis de l'extrait de *Blanquette de Guelma* pour toutes les concentrations testées. Contrairement, l'extrait de *Bouricha* est efficace vis-à-vis de cette souche à toutes les concentrations utilisées, montrant des diamètres de zone d'inhibition qui varient de 9 à 6 mm avec des différences significatives ( $p < 0,05$ ) observées entre les différentes zones d'inhibition obtenues.

Pour les quatre souches testées, l'extrait de *Blanquette de Guelma* est plus efficace sur *K. pneumoniae*, avec une activité antibactérienne intermédiaire (4 mm) à une concentration de 1 mg/disque et aux concentrations inférieures, cette activité est faible (3,33 à 0,66 mm de diamètre). De même, l'extrait de *Bouricha* a enregistré une très forte activité antibactérienne avec un diamètre de 10,66 mm à une concentration de 1 mg/disque. Cette activité diminue progressivement pour atteindre un diamètre de 6 mm à la concentration minimale testée.

#### ➤ **Variation de l'activité antibactérienne avec les composés phénoliques des huiles d'olive**

L'activité antibactérienne enregistrée est due aux composés phénoliques présents dans les différents extraits méthanoliques des huiles d'olive. En effet, plusieurs travaux de recherche ont signalé le rôle incontestable des composés phénoliques de l'huile d'olive dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007; Karaosmanglu *et al.*, 2010; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011; Cicerale *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2013).

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté la présence de différences et parfois significatives ( $p < 0,05$ ) dans les diamètres des zones d'inhibition en fonction de l'extrait méthanolique testé. Cette variabilité peut être due à la sensibilité des microorganismes aux différents composés phénoliques présents dans ces extraits. En utilisant des extraits phénoliques purs d'hydroxytyrosol, Obied *et al.* (2007) ont observé des diamètres d'inhibition de 20 mm sur *S. aureus* avec des concentrations de 0,3 mg/disque. De même, des CMI allant de 3,9-31,25 µg/ml ont été rapportées par Bisignano *et al.* (1999), indiquant la grande sensibilité de cette souche vis-à-vis de l'hydroxytyrosol, nos résultats sont en accord

concernant la sensibilité élevée de *S. aureus* vis-à-vis des extraits *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* qui enregistrent les taux les plus élevés en hydroxytyrosol.

De plus, les teneurs élevées en flavonoïdes notamment la lutéoline pour les extraits *Aghenfas* et *Akerma* peuvent expliquer leurs fortes activités sur les souches *S. aureus* et *B. subtilis* par rapport aux extraits des variétés *Chemlal*, *Neb Djemel* et *Ferkani* malgré l'écart observé des teneurs en polyphénols totaux. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sousa *et al.* (2006) concernant la sensibilité des souches *B. cereus*, *B. subtilis* et *S. aureus* à l'égard d'extraits méthanoliques de l'olive de table « *Alcaparra* » qui se sont avérés riches en lutéoline. Xu et Lee (2001) ont également rapporté l'activité de la lutéoline à l'égard de staphylocoque résistant à la méthiciline, qui présente des zones d'inhibition de 10,5 mm à 11,5 mm à une charge de 0,05 mg/disque. Plusieurs autres composés phénoliques présents dans l'huile d'olive ayant une activité antibactérienne sont recensés ; le décarboxyméthyleuropeïne aglycone, le ligstroside aglycone et le tyrosol (Medina *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007), l'acide hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique (Korukluoglu *et al.*, 2009).

Les activités antibactériennes observées peuvent également résulter d'une synergie entre les composés phénoliques présents dans l'extrait méthanolique. Lee et Lee (2010), en testant l'activité des extraits de feuille d'olivier ainsi que des composés phénoliques purs sur différentes souches Gram positif et négatif, ont constaté que l'extrait brut présente une meilleure activité que les composés phénoliques purs (oleuropeïne, rutine, vanilline, acide caféique) d'où la supposition d'une certaine synergie entre ces composés. Cette synergie peut expliquer la faible corrélation obtenue entre l'activité antibactérienne (diamètre des zones d'inhibition) et les teneurs polyphénols individuels (annexe 9).

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

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

### 2.2.6.2. Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs

L'activité antibactérienne de quelques composés phénoliques purs a été testée sur les six souches de bactéries et les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont rapportés dans le tableau XVIII. Les composés phénoliques testés sont : l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide cinnamique et la quercétine aux concentrations de 1, 0,5, 0,25 et 0,12 mg/disque.

Les résultats obtenus montrent un effet antibactérien uniquement pour l'acide caféique et l'acide gallique et cette activité diminue graduellement avec la diminution de la concentration. Une résistance à toutes les concentrations utilisées a été observée concernant l'acide cinnamique et la quercétine vis-à-vis des six souches bactériennes.

L'acide gallique présente la meilleure activité antibactérienne avec des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes concentrations pour chaque souche. *S. aureus*, *B. subtilis* et *K. pneumoniae* sont sensibles à l'acide gallique pour toutes les concentrations testées avec des diamètres de zones d'inhibition qui oscillent respectivement de 14 à 6 mm, de 11 à 5,66 mm et de 10 à 4 mm. Il est donc clair que la souche la plus sensible est *S. aureus*, suivie de *B. subtilis* et ensuite *K. pneumoniae*. Concernant *L. innocua*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, l'acide gallique n'est efficace qu'aux concentrations de 1 et 0,5 mg/disque, avec des zones d'inhibition maximales respectives de 8,66, 8 et 6 mm.

Concernant l'acide caféique, *L. innocua* et *P. aeruginosa* se sont montrées résistantes aux concentrations testées. Cet acide a montré un effet inhibiteur à toutes les concentrations testées vis-à-vis de *S. aureus* et *B. subtilis*. Cette dernière souche est plus sensible avec un diamètre de zone d'inhibition maximal de 16 mm et des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différents diamètres sont relevées, suivie de *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 10 mm pour une concentration de 1 mg/disque. *E. coli* et *K. pneumonia* sont moins sensibles avec un diamètre maximal de 7 mm et minimal de 4 mm. *K. pneumonia* s'est montrée résistante à partir d'une concentration de 0,25 mg/disque, par contre *E. coli* est résistante seulement à la concentration de 0,12 mg/disque.

La sensibilité des souches *S. aureus* et *E. coli* vis-à-vis de l'acide gallique et de l'acide caféique a été signalée par King *et al.* (2008). Rodriguez-Vaquero et ses collaborateurs

(2007) ont testé une concentration de 50 mg/ml de l'acide gallique et de l'acide caféique vis-à-vis des souches d'*E. coli* et *K. pneumonia* avec un inoculum de  $2 \times 10^9$ , ils ont trouvé des diamètres de zone d'inhibition largement inférieurs (2 à 3 mm).

Contrairement à nos résultats, les travaux de Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007) et King *et al.* (2008) ont signalé l'effet antibactérien de la quercétine vis-à-vis de *S. aureus*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, par contre, aucune activité n'est détectée vis-à-vis de *L. monocytogenes* (King *et al.*, 2008) et *P. aeruginosa* (Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007).

Tableau XVIII : Activité antibactérienne de quelques composés phénoliques purs.

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

\*--: Pas de zone d'inhibition observée.

\* Les valeurs suivies par la même lettre dans une même colonne ne diffèrent pas significativement ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.6.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Le tableau XIX regroupe les résultats relatifs aux CMI et CMB des différents extraits méthanoliques et des deux standards testés (acide gallique et acide caféique). Les souches testées sont celles qui se sont révélées sensibles avec le test des disques (présence de zone d'inhibition). Globalement, l'activité antibactérienne de *Bouricha* est plus importante par rapport aux autres extraits avec un spectre antibactérien plus large et à des doses plus faibles.

**Tableau XIX:** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits méthanoliques de variétés d'huile d'olive et de quelques standards.

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

/ : non testé.

Par ailleurs, la détermination des CMI et CMB relatives aux extraits actifs a mis en évidence des niveaux d'activité antibactérienne variables selon l'extrait utilisé et la souche testée. Ainsi, l'extrait de la variété *Bouricha* s'avère être plus actif sur *S. aureus*, elle enregistre les CMI et CMB les plus faibles (0,6 et 0,8 mg/ml respectivement). Tandis que l'extrait des variétés *Chemlal Tazmalt* et *Tabelout* révèlent les valeurs les plus élevées, soit une CMI de 1,6 et 1,8 mg/ml respectivement et une CMB de 1,8 mg/ml pour *Chemlal Tazmalt* et >2 pour *Tabelout*, traduisant ainsi une faible activité antibactérienne. Quant au

reste des extraits, une CMI de 0,9 mg/ml est notée pour les variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* et 1,2 mg/ml pour les variétés *Limli*, *Chemlal* et *Bouchouk Soummam*.

Concernant la souche *B. subtilis*, on note une moindre efficacité de nos extraits par rapport à *S. aureus*, aucun des extraits testés n'a dévoilé un effet bactéricide à l'égard de cette souche à la plus grande concentration testée (2 mg/ml), à l'exception de l'extrait de la variété *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, pour lesquelles des CMB de 1,7 mg/ml et 2 mg/ml sont notées. Certains extraits révèlent la même CMI à l'égard de *B. subtilis* qui est d'ordre de 1,2 mg/ml pour les extraits de *Ferkani*, *Blanquette de Guelma*, *Bouricha* et *Chemlal* et *Neb Djemel*, tandis que la CMI la plus élevée est obtenue pour l'extrait de la variété *Bouchouk Soummam*. L'espèce *P. aeruginosa* testée uniquement pour l'extrait de la variété *Bouricha* montre une valeur de CMI égale à 1mg/ml et une CMB de 1,1 mg/ml, ce qui indique la bonne activité de cet extrait.

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

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

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

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

#### **2.2.6.4. Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait de la variété *Bouricha***

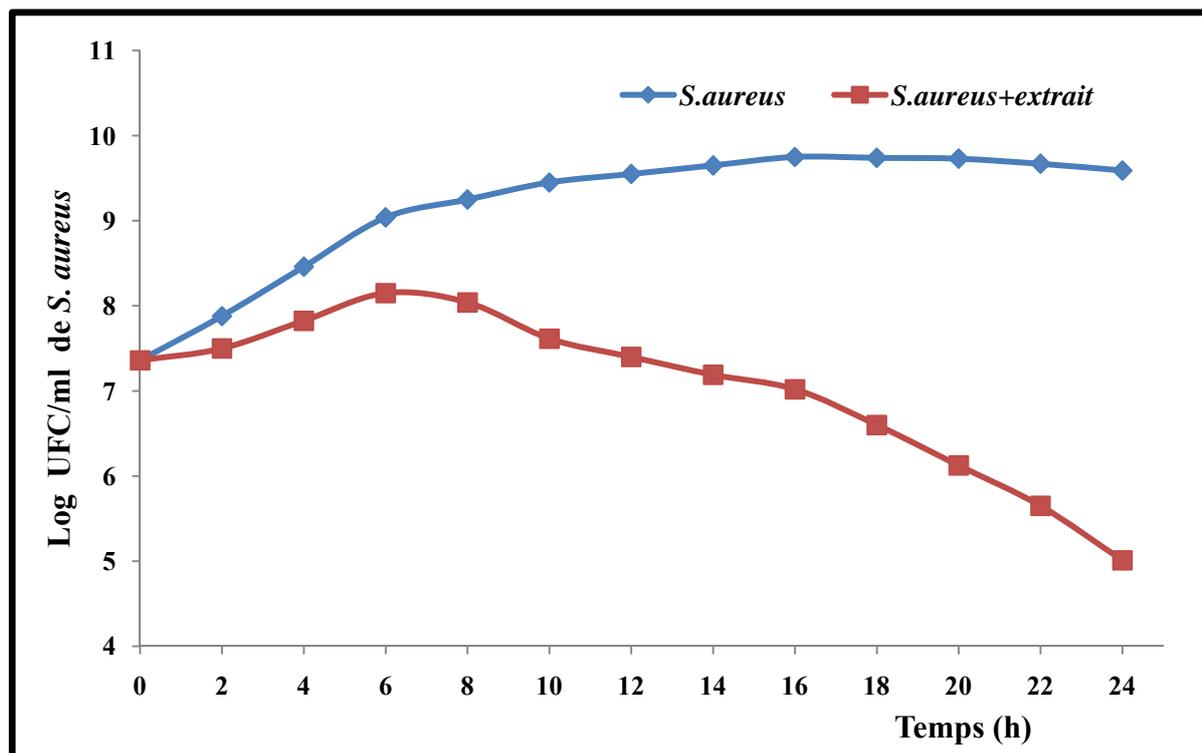
L'extrait méthanolique ayant donné le meilleur effet inhibiteur vis-à-vis de la souche de *S. aureus* a été retenu afin de mettre en évidence le taux d'inhibition de cette souche en présence de l'extrait pendant 24h.

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

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

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

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



**Figure 10:** L'évolution de la croissance de *S. aureus* en présence et en absence de l'extrait méthanolique de la variété *Bouricha*.

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

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

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

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail s'inspirent de la valorisation de l'huile d'olive du patrimoine oléicole algérien à travers l'identification de la fraction phénolique des huiles d'olives par rapport à la variété et au stade de maturation des olives et l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une dizaine de variétés d'huile d'olive.

Concernant les résultats relatifs à l'influence du stade de maturation des olives sur les composés phénoliques des huiles, nous avons pu retenir les remarques suivantes :

- La variété et le stade de maturation des olives sont des facteurs qui influencent significativement sur la teneur et le profil des polyphénols de l'huile d'olive ;
- Sur la totalité des variétés d'huiles d'olives étudiées (*Chemlal*, *Boughenfous*, *Blanquette* et *Takesrit*), nous avons enregistré une diminution progressive des teneurs en polyphénols totaux au cours de la maturation ;
- Les pourcentages de diminution des polyphénols des huiles au cours de la maturation sont différents d'une variété à une autre : la variété *Chemlal* a enregistré le pourcentage de diminution le plus faible (41,68%) et la variété *Boughenfous* le pourcentage le plus élevé (84,08%) ;
- Il y a une prédominance des dérivés d'oleuropéine pour les variétés *Chemlal* et *Blanquette*, mais nous avons observé la prédominance des dérivés ligstrosides pour la variété *Boughenfous*. Les quatre variétés étudiées ont des teneurs appréciables en lignanes. Ces derniers avec les flavonoïdes sont bien représentés dans la variété *Takesrit*;
- Pour le profil en biophénols au cours de la maturation, la diminution concerne surtout les sécoïridoïdes (dérivés d'oleuropéine et de ligstroside) et les lignanes, par contre, nous avons noté pour les variétés *Chemlal* et *Takesrit*, une augmentation des flavonoïdes au cours de la maturation.

Dans l'ensemble, les stades vert et vert tacheté coïncident avec la teneur la plus importante en biophénols, mais pour des raisons organoleptiques (attribut d'amertume), la récolte des olives doit être réalisée au stade violet, qui est caractérisé par des teneurs appréciables en biophénols.

En ce qui concerne le volet de la caractérisation d'une dizaine de variétés d'huiles d'olive en composés phénoliques, les résultats obtenus nous permettent de faire une distinction variétale. En effet, le dosage des polyphénols totaux et des *ortho*-diphénols montre que leurs teneurs varient en fonction de la variété considérée. La variété *Neb Djemel* se distingue des autres variétés par les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et *ortho*-diphénols, suivie des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*.

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

Concernant les activités biologiques des extraits méthanoliques des variétés d'huiles d'olive testées, l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive varie considérablement en fonction de la nature et de la concentration en composés phénoliques qui sont eux même fonction de la variété.

Les meilleures activités réductrices ont été enregistrées par les variétés *Neb Djemel*, *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* à savoir 178,48, 150,28 et 143,07 mg E.A.G./Kg, respectivement. Les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*, reffermant les taux les plus élevés en hydroxytyrosol, se montrent très performantes avec les meilleurs pouvoirs antiradicalaires (DPPH et ABTS<sup>+</sup>) des extraits phénoliques, avec les plus faibles IC<sub>50</sub> du radical ABTS<sup>+</sup> (0,12 et 0,18 mg/ml, respectivement). Des activités scavengers sur le peroxyde d'hydrogène supérieures à 80% ont été enregistrées par les extraits des variétés *Ferkani*, *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*. Les variétés *Limli*, *Chemlal Tazmalt* et *Akerma* se distinguent par les plus faibles activités antioxydantes, ceci pourrait être dû à leurs plus faibles teneurs en polyphénols totaux. De plus, les variétés *Limli* et

*Chemlal Tazmalt* ont enregistré les taux les plus élevées en polyphénols oxydés soit 20,2% des polyphénols totaux pour la variété *Limli* et 26,9% pour la variété *Chemlal Tazmalt*.

Des coefficients de corrélation significatifs ont été établis entre les différentes activités antioxydantes des extraits étudiées et les teneurs en polyphénols totaux et en *ortho*-diphénols: le pouvoir réducteur ( $r=0,98$  et  $0,92$ , respectivement), l'activité scavenger du radical DPPH ( $r=0,72$  et  $0,67$ , respectivement) et du radical ABTS<sup>+</sup> ( $r=0,76$  et  $0,55$ , respectivement) et l'inhibition du peroxyde d'hydrogène ( $r=0,81$  et  $0,82$ , respectivement), ce qui nous laisse suggérer l'importante implication des polyphénols dans l'activité antioxydante.

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

L'effet antibactérien a également été étudié en milieu liquide, le suivi de la croissance de *S. aureus* a montré que ce dernier est remarquablement inhibé en présence de 6,25 mg/ml d'extrait de la variété *Bouricha*. Une diminution de 4 unités logarithmiques par rapport au témoin a été observée au bout de 24h de culture.

Au terme de cette étude, il apparait évident que l'étude la fraction phénolique peut fournir un outil précieux dans la caractérisation variétale des huiles d'olive. Nous avons bien constaté que les huiles d'olive vierges algériennes peuvent constituer une source importante en divers composés phénoliques doués d'une activité biologique, ce qui confirme l'intérêt de la consommation des huiles d'olive des variétés algériennes, dans la lutte contre le stress oxydant et les maladies infectieuses. Cependant, et malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux s'imposent car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits. Aussi, il serait intéressant de :

- ✚ Etaler le travail de la caractérisation de la fraction phénolique à l'ensemble des variétés du verger oléicole algérien;

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

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aganchich B., El Antari A., Wahbi S., Tahi H., Wakrim R. and Serraj R. (2008). Fruit and oil quality of mature olive trees under partial rootzone drying in field conditions. *Grasas y Aceites*, 59 (3): 225-233.
- Aguilera M.P., Beltrán G., Ortega D., Fernandez A., Jiménez A. and Uceda M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89: 387-391.
- Ajana H., El Antari A. and Hafidi A. (1998). Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar. *Grasas y Aceites*, 49 (5-6): 405-410.
- Ait Yacine Z., Serhrouchni M. and Hilali S. (2002). Evolution de la composition acide de l'huile d'olive à différents stades de la maturité des olives. Cas du périmètre du Tadla-Maroc. *Olivae*, 94: 51-53.
- Allalout A., Krichène D., Methenni K., Taamalli A., Oueslati I., Daoud D. and Zarrouk M. (2009). Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120: 77-83.
- Al-Younis K.N. and Abdullah Z.M. (2008). Isolation and antibacterial evaluation of plant extracts from some medicinal plants in Kurdistan region. *Journal of Dohuk University*, 12 (1): 250-255.
- Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S. and Chaouch, A. (2008). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, 6: 342-347.
- Amiot M. J., Fleuriet A. and Macheix J.J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 823-826.
- Amiot M. J., Fleuriet A. and Macheix J.J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during maturation. *Phytochemistry*, 28: 67-69.
- Amirante P., Maria Lisa Clodoveo M.L., Dugo G., Leone A. and Tamborrino A. (2006). Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: Influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality. *Food Chemistry*, 98: 797-805.
- Andjelkovic M., Acun S., Van Hoed V., Verhe R. and Van Camp J. (2009). Chemical composition of Turkish olive oil-Ayvalik. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86: 135-140.
- Andjelkovic M., Van C.J., Pedra M., Renders K., Socaciu C. and Verhé R. (2008). Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13): 5181-5187.

- Angerosa, F., Di Giacinto, L. and Solinas M. (1992). Influence of *Dacus oleae* infestation on flavor of oils extracted from attacked olive fruits, by HPLC and HRGC analyses of volatile compounds. *Grasas Aceites*, 43 (3): 134-142.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. and Vito R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72: 19-28.
- Arslan D., Karabekir Y. and Schreiner M. (2013). Variation of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of *Sariulak* olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, 54: 1897-1906.
- Artajo L.S., Romero M.P., Suarez M. and Motilva M.J. (2007). Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*, 225: 617-625.
- Artajo Medina L.S. (2006). Phenolic compounds: Their role during olive oil extraction and in flaxseed-transfer and antioxidant function. Partie de thèse de doctorat Technologie des aliments. Université de Llieda, Espagne, 160-179.
- Assmann G. and Wahrburg U. (1999). Effets des composants mineurs de l'huile d'olive sur la santé. Institut de recherche sur l'athérosclérose, Université de Mûnstre, Allemagne, 1-8.
- Baccouri O., Guerfel M., Baccouri B., Cerretani L., Bendini A., Lercker G., Zarrouk M. and Ben Miled D. D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109:743-754.
- Baccouri O., Guerfel M., Bonol-Carbognin M., Cerretani L., Bendini A., Zarrouk M. and Daoud D. (2009). Influence of irrigation and site of cultivation on qualitative and sensory characteristics of a Tunisian minor olive variety (cv. *Marsaline*). *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 86 (3): 173-180.
- Baiano A., Gambacorta G., Terracone C., Previtali M.A., Lamacchia C. and La Notte E. (2009). Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science*, 74 (2): 177-183.
- Beltran G., Paz Aguilera M., Del Rio C., Sanchez S. and Martinez L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of *Hojiblanca* virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89: 207-215.
- Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Bigguzi B., Lercker G. and Toschi T.G. (2003). Liquidliquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olives oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*, 985: 425-433.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaco A.M., Segura-Cerretano A., Fernandez-Gutierrez A. and Lercker G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils; a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12 (8): 1679-1719.

- Bengana M., Bahouche A., Lozano-Sánchez J., Amir Y., Youyou A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. (2013). Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of *Chemlal* extra-virgin olive oil. *Food Research International*, 54: 1868-1875.
- Benkeblia N. (2005). Free-Radical scavenging capacity and antioxydant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 48: 753-759.
- Ben Tekaya I. and Hassouna M. (2005). Etude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 12 (5-6) : 447-453.
- Ben Temime S., Manai H., Methenni K., Baccouri B., Abaza L., Daoud D., Sanchez Casas J., Bueno E.O. and Zarrouk M. (2008). Sterolic composition of *Chetoui* virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, 110: 368-374.
- Ben Temime S., Taamalli W., Baccouri B., Abaza L., Daoud D., and Zarrouk M. (2006). Changes in olive oil quality of *Chetoui* variety according to the origin of plantation. *Journal of Food Lipids*, 13: 88-99.
- Ben Youssef N., Zarrouk W., Carrasco-Pancorbo A., Ouni Y., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Daoud D. and Zarrouk M. (2010). Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of *chetoui* virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 199-204.
- Bianco A., Coccioli F., Guiso M. and Marra C. (2001). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: Hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*, 77: 405-411.
- Bianco A.D., Muzzalupo L., Romeo G., Scarpati M.L., Soriero A. and Uccella N. (1998). Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chemistry*, 63: 461-464.
- Bianco A. D., Muzzalupo L., Piperno A., Romeo G. and Uccella N. (1999). Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3531-3534.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N. and Saija A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 971-974.
- Blekas G., Psomiadou E., Tsimidou M., and Boskou, D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 340-346.
- Boskou D. (2000). Olive oil In Mediterranean Diets. *World Review. Nutrition Diets* Simopoulos A. and Visioli F., Eds., Karger Press, Basel, pp 56-77.
- Boskou D., Blekas G. and Tsimidou M. (2006). Olive oil composition In olive oil: Chemistry and Technology, Boskou, D., Ed. The American Oil Chemists' Society Press, pp 41-72.

- Boskou D. (2009). Phenolic compounds in olives and olive oil In Olive oil: minor constituents and health. Ed. CRC press. pp 11-44.
- Bouaziz M., Chamkha M. and Sayadi S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52 (17): 5476-5481.
- Bouzenoune F., Boudersa F., Bensaad A., Harkat F. and Siad N. (2009). Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et maladies infectieuses*, 39: 142-143.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 28: 25-30.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.
- Brenes M., Garcia A., Garcia P. and Garrido A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5609-5614.
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Rios J.J. and Garrido A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9): 3535-3540.
- Brenes M., Garcia A., Rios J.J., Garcia, P. and Garrido A. (2002). Use of 1 acetoxypinoresinol to authenticate *Picual* olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 615-625.
- Brenes M., Hidalgo F.J., García A., Ríos J.J., García P., Zamora R. and Garrido A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 77(7): 715-720.
- Briante R., Patumi M., Limongelli S., Febbraio F., Vaccaro C., Di Salle A., La Cara F. and Nucci R. (2002). Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162: 791-798.
- Bubonja-Sonje A., Giacometti J., Abram M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127: 1821-827.
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M. and Lipnik-Štangelj M. (2006). Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of Slovene Istria. *Annales, Ser. Hist.nat.*, 16 (2) : 201-208.
- 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.
- Caponio F., Alloggio V. and Gomes T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64: 203-209.

- Caponio, F., Gomes, T. and Pasqualone A. (2001). Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *European Food Research and Technology*, 212: 329-333.
- Caponio F., Gomes T., Summo C. and Pasqualone A. (2003). Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 201-206.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini, A., Segura-Carretero A., Del Carlo M., Gallina-Toschi T., Lercker G., Compagnone D. and Fernandez-Gutierrez A. (2005c). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8918-8925.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina-Toschi T. and Fernandez-Gutierrez. (2005b). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28: 837-858.
- Carrasco-Pancorbo A., Cruces-Blanco C., Segura-Carretero A. and Fernandez-Gutierrez A. (2004). Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (22): 6687-6693.
- Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A. and Fernandez-Gutierrez A. (2006). Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21): 7984-7991.
- Carrasco-Pancorbo A., Segura-Carretero A. and Fernandez- Gutierrez A. (2005a). Co-electroosmotic capillary electrophoresis determination of phenolic acids in commercial olive oil. *Journal of Separation Science*, 28: 925-934.
- Catalano P. and Caponio F. (1996). Machines for olive paste preparation producing quality virgin olive oil. *Fett /Lipid*, 98: 408-412.
- Çavusoglo A. and Oktar A. (1994). Les effets des facteurs agronomiques et des conditions de stockage avant la mouture sur la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 52: 18-24.
- Ceci L. N. and Carelli A. A. (2007). Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 84: 1125-1136.
- Cerretani L., Bendini A., Del Caro A., Piga A., Vacca V., Caboni M.F. and Toschi T.G. (2006). Preliminary characterization of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *European Food Research and Technology*, 222: 354-361.
- Cerretani L., Bendini A., Rotondi A., Mari M., Lercker G. and Gallina Toschi T. (2004). Evaluation of the oxidative stability and organoleptic properties of extra-virgin olive oils in relation to olive ripening degree. *Progress in Nutrition*, 6 (1): 50-56.
- Chou S.T., Chao W.W. and Chung Y.C. (2003). Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus radiatus L. var. Aurea*). *Journal of Food Science*, 68(1): 21-25.

- Christopoulou E., Lazaraki M. and Alexiou F. (1995). La qualité de l'huile d'olive vierge grecque : critères chimiques et organoleptiques. *Olivae*, 56: 54-59.
- 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(3): 218-236.
- Cicerale S., Lucas L. J and Keast R. S. J. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Science*, 11: 458-479.
- Cicerale S., Lucas L. J. and Keast R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 129-135.
- Cichelli A. and Pertesana G. P. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oil: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography*, 1046: 141-146.
- Cimato A. 1990. Effect of agronomic factors on virgin olive oil quality. *Olivae*, 31: 20-31.
- Cimato A., Mattei A. and Osti M. (1990). Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Horticulturae*. 286: 453-456.
- Cinquanta L., Esti M. and La Notte E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (10): 1259-1264.
- COI. (2003). Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. *Conseil Oléicole International*.
- COI. (2009). Production de l'huile d'olive. *Conseil Oléicole International*.
- Cortesi N. and Rovellini P. (2004). L'état d'oxydation de l'huile d'olive vierge : effet des antioxydants naturels. *Olivae*, 101: 27-33.
- Cortesi N., Rovellini P. and Fedeli E. (2000). Cultivars, technologie et qualité des huiles d'olive. *Olivae*, 81: 26-35.
- Criado M. N., Morello J. R., Motilva M. J. and Romero M. P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the *Arbequina* variety in Spain. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 81: 633-640.
- Criado M.N., Motilva M.J., Goni M. and Romero M.P. (2007). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from *Arbequina* and *Farga* cultivars. *Food Chemistry*, 100: 748-755.
- Dabbou S., Issaoui M., Servili M., Taticchi A., Sifi S., Montedoro G.F. and Hammami M. (2009). Characterisation of virgin olive oils from European olive cultivars introduced in Tunisia. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 111: 392-401.
- Dağdelen A., Tümen G., Özcan M. M. and Dündar E. (2013). Phenolic profiles of olive fruits (*Olea europaea L.*) and oils from *Ayvalik*, *Domat* and *Gemlik* varieties at different ripening stages. *Food Chemistry*, 136: 41-45.

- De La Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A. I., Lamuela-Raventós R. M. and López-Sabater M. C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11): 4331-4340.
- Delirio G., Lentini A., Vacca V. and Serra G. (1995). Influenza delle 'infestazione di *Bactrocera oleae* ( Gmel) sulla produzione e sulle caratteristiche qualitaivi delle olio di oliva. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 72: 5-9.
- Denis F., Ploy N-C., Martin C. and Bingen E. (2007). Instauration et surveillance d'un traitement d'antibiotique In Bactériologie médicale: techniques usuelles. Ed.: Masson, pp 543-554.
- De Stefano G., Piacquadio P., Servili M., Di Giovacchino L. and Sciancalepore V. (1999). Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. *Fett/Lipid*, 101 (9): 328-332.
- Dhifi W., Ben Khedher M., Elyes Kechouk M. and Marzouk B. (2006). Etude qualitative et quantitative des arômes et des polyphénols de quelques huiles d'olive de Tunisie. *Olivae*, 105: 36-40.
- Di Giovacchino L. (1991). L'extraction de l'huile des olives par les systèmes de la pression, de la centrifugation et de la percolation : incidence des techniques d'extraction sur les rendements en huile. *Olivae*, 21 (10): 15-37.
- Di Giovacchino L., Costantini N., Serraiocco A., Surricchio G. and Basti C. (2001). Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 279-285.
- Di Giovacchino L., Solinas M. and Miccoli M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 71: 1189-1194.
- Dugo G., Lo Turco V., Pollicino D., Mavrogeni E. and Pipitone F. (2004). Caractérisation d'huiles d'olive vierges siciliennes. Variation qualitative des huiles des fruits des cultivars « *Biancolilla* , *Nocellara del Belice* , *Cerasuola* , *Tonda Iblea* et *Crastu* » en fonction des techniques et de l'époque de récolte des olives. *Olivae*, 101: 44-52.
- El Antari A., El Moudni A. and Ajana H. (2003). Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. *Olivae*, 95: 26-31.
- El Antari A., El Moudni A., Boujnah M., Cert A. and Ajana H. (2002). Region and watering frequency effects on quality and acid composition evolution of Marroccan olive oil. *New Medit*, 1 (2): 55-59.
- El Antari A., Hilal A., Boulouha. and El Moudni A. (2000). Etude de l'influence de la variété, de l'environnement et des techniques culturales sur les caractéristiques des fruits et la composition chimiques de l'huile d'olive vierge extra au Maroc. *Olivae*, 80: 29-36.

- El Riachy M., Priego-Capote F., León L., Rallo L. and Luque de Castro M. D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 692-707.
- Evangelisti F., Zunin P., Calcagno C., Tiscorina E. and Petacchi R. (1994). *Dacus oleae* infestation and its consequences on the phenolic compounds of virgin olive oil. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74: 507-511.
- Evangelisti F., Zunin P., Tiscornia E., Petacchi R., Drava G. and Lanteri S. (1997). Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions: Study of polar compounds by chemometric methods. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 74 (8): 1017-1023.
- Favati F., Caporale G. and Bertuccioli M. (1994). Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 45 (1-2): 68-70.
- Fedeli E. (1999). Qualité (stockage, conservation et conditionnement de l'huile), réglementation et contrôle. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs applications en oléiculture et oléotechnique. Florence, 10, 11 et 12 mars 1999. *Conseil Oleicole International*, 1-20.
- Fregapane G. and Salvador M. S. (2013). Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor compounds. *Food Research International*, 54, 1907-1914.
- Furneri P.M., Piperno A., Saija A. and Bisignano G. (2004). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12): 4892-4894.
- Gandul-Rojas B. and Minguez-Mosquera I. (1996a). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of Science and Food Agriculture*, 72: 31-39.
- Gandul-Rojas B. and Minguez-Mosquera I. (1996b). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *Journal of Science and Food Agriculture*, 72: 291-294.
- Garrabé E., Cavallo J.D., Fabre R. and Hernandez E. (1998). AntibioGramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode «Presto ABG®». *Revue Française des Laboratoires*, 307: 65-69.
- García A., Brenes M., Martínez F., Alba J. García P. and Garrido A. (2001). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 78: 625-629.
- García A., Brenes M., Romero C., García P. and Garrido A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the *Picual* variety. *European Food Research and Technology*, 215: 407-412.

- García-González D. L., Viera M., Tena N. and Aparicio R. (2007). Evaluation of the methods based on triglycerides and sterols for the detection of hazelnut oil in olive oil. *Grasas y Aceites*, 58 (4): 344-350.
- García J.M., Sella S. and Perez-Camino C. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44: 3516-3520.
- García-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Oliveras-Ferraro C., Vázquez-Martín A., Menéndez J. A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 416-429.
- Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., De la Torre M.C. and López-Sabater M.C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78: 207-211.
- Giuffrida D., Salvo F., Salvo A., La Pera L. and Dugo G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. *Food chemistry*, 101 (2): 833-837.
- Gómez-Alonso S., Mancebo-Campos V., Salvador M. D. and Fregapane G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100: 36–42.
- Gómez-Alonso S., Salvador M.D. and Fregapane G. (2002). Phenolic compounds profile of *Cornicabra* virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23): 6812-6817.
- Gómez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Del Carlo M., Compagnone D. and Cechelli A. (2008). Effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56 (12): 4577-4583.
- Gómez-Rico A., Inarejos-García A. M., Salvador M. D. and Fregapane G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. *Cornicabra*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3587-3595.
- Gómez-Rico A., Fregapane G. and Salvador M.D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41: 433-440.
- Gorinstein S., Martín-Belloso O., Katrich E., Lojek A., Ciz M., Gligelmo-Miguel N., Haruenkit R., Park Y. S., Jung S.T. and Trakhtenberg S. (2003). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 154-159.

- Gutiérrez F., Villafranca M.J. and Castellano J.M. (2002). Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7): 669-676.
- Haddada F.M., Manai H., Oueslati I., Daoud D., Sanchez J., Osorio E. and Zarrouk M. (2007). Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10941-10946.
- Haddada F.M., Krichène D., Manai H., Oueslati I., Daoud D. and Zarrouk M. (2008). Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 905-913.
- Ilyasoglu H., Ozcelik B., Hoed V. V. and Verhe R. (2010). Characterization of Aegean olive oils by their minor compounds. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 87: 627-636.
- Inglese P. (1994). L'influence de la variété sur les caractéristiques qualitatives de l'huile d'olive. *Olivae*, 54 : 42-44.
- Issaoui M. Flamini G., Brahmi F., Dabbou S., Ben Hassine K., Taamali A., Chehab H., Ellouz M., Zarrouk M. and Hammami M. (2010). Effect of growing area conditions on differentiation between *Chemlali* and *Chetoui* olive oil. *Food Chemistry*. 119: 220-225.
- Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg E.A. (1973). Chimiothérapie antimicrobienne in Microbiologie médicale. Les Presses université de Laval. pp 136-162.
- Jiménez B., Sánchez-Ortiz A., Lorenzo M. L. and Rivas A. (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of *Picudo* olive oils. *Food Research International*, 54: 1860-1867.
- 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.
- Karaosmanglu H., Soyer F., Ozen B., Tokatli F. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of turkish extra virgin olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 8238-8245.
- Keceli T. and Gordon M.H. (2001). The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of Science and Food Agriculture*, 81: 1391-1396.
- King T., Dykes G. and Kristianti R. (2008). Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, 91(6): 1423-1429.
- Kiritsakis A. and Osman M. (1995). Effets du carotène et de l' $\alpha$ - tocophérol sur la stabilité photo- oxydative de l'huile d'olive. *Olivae*, 56: 25-28.

- Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer T.E. and Gücer S. (2009). Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. Leaf extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, DOI: 10.1111/j.1745-4549.
- Laribi R., Rovellini P., Deflaoui L., Aidli A., Mettouchi S., Arrar L. and Tamendjari A. (2009). Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 86 (3): 151-161.
- Lee O-H. and Lee B-Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754.
- Lavelli V. (2002). Comparison of the antioxidant activities of extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7704-7708.
- Lerma-García M.J., Lantano C. Chiavaro E., Cerratani L., Herrero-Martínez J.M. and Simó-Alfonso E. F. (2009). Classification of extra virgin olive oil according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Research International*, 42: 1446-1452.
- Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V. and Bíró L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (1-4): 119-125.
- Luna G., Morales M.T. and Aparicio R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food chemistry*, 98: 243-252.
- Maestro R., Garcia J.M. and Castellano J.M. (1993). Changes in polyphenol content of olives stored in modified atmospheres. *Hortscience*, 28: p 1.
- Majewska M., Skrzyckin M., Podsiad M. and Czczot H. (2011). Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an in vitro study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 68: 611-615.
- Masibo M. and He Q. (2009). In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2): 2073-80.
- Mateos R. and García-Mesa J.A. (2006). Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1247-1254.
- Mateos R., Espartero J. L., Trujillo M., Ríos J. J., León-Camacho, M., Alcudia F. and Cert A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49; 2185-2192.
- 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.
- Medina E., De Castro A., Romero C. and Brenes M. (2006). Phenolic compounds in olive oil and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (14): 4954-4961.

- Medina E., Romero C., Brenes M. and de Castro A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 70: 1194-1199.
- Michaelakis N. (1992). L'amélioration de la qualité de l'huile d'olive en Grèce : passé, présent et avenir. *Olivae*, 42: 22-30.
- Migliorini M., Mugelli M., Cherubini C., Viti P. and Zanoni B. (2006). Influence of O<sub>2</sub> on the quality of virgin olive oil during malaxation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2140-2146.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. and Van Beek T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237.
- Minguez-Mosquera M.I, Gandul-Rojas B., Garrido-Fernandez J., and Gallardo-Guerrero L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 67 (3): 192-196.
- Minguez-Mosquera M.I., Rejano L., Gandul B., Higinio A. and Carido J. (1991). Color pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 68: 332-336.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 26 (2): 211- 219.
- Montedoro G.F., Servili M. Baldioli M. and Miniati E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1571–1576.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E. and Macchioni, A. (1993). Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2228-2234.
- Morello J., Motilva M., Tovar M. and Romero M. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv. Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85: 357-364.
- Morello J.R., Romero M.P. and Motilva M.J. (2006). Influence of seasonal conditions on the composition and quality parameters of monovarietal virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 83 (8): 683-690.
- Motilva M. J., Tovar M. J., Romero M. P., Alegre A. and Girona J. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (*Arbequina* cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 2037-2043.

- Mulinacci N., Giaccherini C., Innocenti M., Romani A., Vincieri F. F, Marotta F. and Mattei A. (2005). Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 662-670.
- Nakbi A., Issaoui M., Dabbou S., Koubaa N., Echbili A., Hammami M. and Attia N. (2011). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23:711-715.
- Ninfali P., Aluigy G., Bacchiocca M. and Magniani M. (2001). Antioxydant capacity of extra-virgin olive oil. *American Journal Oil Chemist's Society*, 78 (3): 243-247.
- Norme Grassi e Derivati. (2007). NGD, edito da Stazione Sperimentale Oli e Grassi, Milano. NGD C89.
- Nychas G.J.E., Tassou S.C. and Board R.G. (1990). Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 217-220.
- Obied H. K., Bedgood D. R., Prenzler P.D. and Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1238-1248.
- Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B. and Korel F. (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113: 401-410.
- Okogeri O. and Tasioula-Margari M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1077-1080.
- Oliveras-Lopez M. J., Innocenti M., Giaccherini C., Ieri F., Romani A. and Mulinacci N. (2007). Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73: 726-732.
- Ollivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillol S., Guérère M. and Artaud J. (2004). Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 965 (2): 169-196.
- Ortega-Garcia F. and Peragon J. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. *Picual*, *Verdial*, *Arbequina*, and *Frantoio* during ripening. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(21): 10331-10340.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalter B. and Bartsch H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46: 976-988.
- Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J. and Rice-Evans C.A. (2001). Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282 (5): 1161-1168.

- Pardo J.E., Cuesta M.A. and Alvarruiz A. (2007). Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel"(Ciudad Real, Spain). *Food Chemistry*, 100: 977-984.
- Parenti A., Spugnoli P., Masella P., Calamai L. and Pantani L.O. (2006). Improving olive oil quality using CO<sub>2</sub> evolved from olive pastes during processing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 904-912.
- Patumi M., D'Andria R., Fontanazza G., Morelli G., Giorio P. and Sorrentino G. (1999). Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europaea* L.) under different irrigation regimes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74 (6): 729-737.
- Pereira J.A., Pereira A.P.G., Ferreira I.C.F.R., Valentao P., Andrade B.P., Seabra R., Estevinho L. and Bento A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (22): 8425-8431.
- Perrin J.L. (1992). Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Etude et recherche*, 4 : 25-31.
- Phillips K.M., Ruggio D. M., Toivo J. I., Swank M. A. and Simpkins A.H. (2002). Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15:123-142.
- Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F.F., Cimato A. and Romani A. (2003). Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*, 80: 331-336.
- Pirisi F.M., Cabras P., Falqui Cao C., Migliorini M. and Suggelli M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1191-1196.
- Psomiadou E. and Tsimidou M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 640-647.
- Psomiadou E. and Tsimidou M. (2002a). Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4): 716-721.
- Psomiadou E. and Tsimidou M. (2002b). Stability of Virgin Olive Oil. 2. Photo-oxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4): 722-727.
- Rahman A., Eun L.K. and Sun C.K. (2009). Antibacterial and antioxidant properties of *Ailanthus altissima* swingle leaf extract to reduce food-borne pathogens and spoiling bacteria. *Journal of Food Safety*, 29: 499-510.
- Ramírez-Tortosa M.C., Granados S. and Quiles J.L. (2006). Chemical composition, types and characteristics of olive oil In *Olive oil and health*. CABI Publishing, pp 45-62.
- Ranalli A., Contento S., Schiavone C. and Simone N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 228-238.

- Ranalli A., De Mattia G., Ferrante M.L., Giansante L. (1997). Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 74: 501-508.
- Ranalli A., Malfatti A., Lucera L., Contento S. and Sotiriou E. (2005). Effects of processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Research International*, 38: 873-878.
- Ranalli A., Pollastri L., Contento S., Iannucci E. and Lucera L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 105: 57-67.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-1237.
- Roca M. and Minguéz-Mosquera M.I. (2001). Changes in Chloroplast Pigments of Olive Varieties during Fruit Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 832-939.
- Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R. and Manca de Nadera M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.
- Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Galardi C., Vincieri F. F, Liberatore L. and Cichelli A. (2001). HPLC and HRGC analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia*, 53: 279-284.
- Romero M.P., Tovar M.J., Girona J. and Motilva M.J. (2002). Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea L. Cv. Arbequina*) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19): 5349-5354.
- Romero M.P., Tovar M.J., Ramo T. and Motilva M.J. (2003). Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "Les Garrigues". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80: 423-430.
- Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M. and De Castro A. (2007). In vitro activity of olive polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3): 680-686.
- Rotondi A. and Magli M. (2004). Ripening of olive var. *Correggiolo*: Modification of oxidative stability of oils during ripening and oil storage. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2 (3&4): 193-199.
- Rovellini P. (2008). Elenolic acid in virgin olive oil: liquid chromatography-mass spectrometry method. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 85: 21-31.
- Rovellini P. and Cortesi N. (2003). Détermination des composants phénoliques de différents cultivars au cours de la maturation des olives par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. *Olivae*, 95: 32-38.

- Rovellini P. and Cortesi N. (2002). Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79: 1-14.
- Rovellini P., Cortesi N. and Fedeli E. (1997). Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-ES-MS. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74: 273-279.
- Runcio A., Sorgona L., Mincione A., Santacaterina S. and Poiana M. (2008). Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and anthracnose attack. *Food Chemistry*, 106: 735-740.
- Ryan D., Antolovich M., Herlt T., Prenzler P. D., Lavee S. and Robards K. (2002b). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6716-6724.
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K. and Lavee S. (2002a). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176.
- Ryan D., Robardas K. and Lavee S. (1998). Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 72 : 26-38.
- Ryan D., Robards K. and Lavee, S. (1999a). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 265-274.
- Ryan D., Robards K. and Lavee S. (1999b). Determination of phenolic compounds in olives by reversed phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832: 87-96.
- Saitta M., Salvo F., DI Bella G., Dugo G. and Loredana LA Torre G. (2009). Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 112: 525-532.
- Samaniego-Sanchez C., Troncoso Gonzalez A.M., Garcia-Parrilla M.C., Quesada Granados J.J., Lopez Garcia de la Serrana H. and Lopez Martinez M.C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593:103-107.
- Salas J.J., Sanchez J., Ramli U.S., Manaf A.M., Williams M. and Harwood J.L. (2000). Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid Research*, 39: 151-180.
- Salvador M.D., Aranda F., Gómez-Alonso S. and Fregapane G. (2003). Influence of extraction system, production year and area on *Cornicabra* virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80: 359-366.
- Salvador M.D., Aranda F. and Fregapane G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73: 45-53.
- Selvaggini R., Servili M., Urbani S., Esposto S., Taticchi A. and Montedoro G.F. (2006). Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-

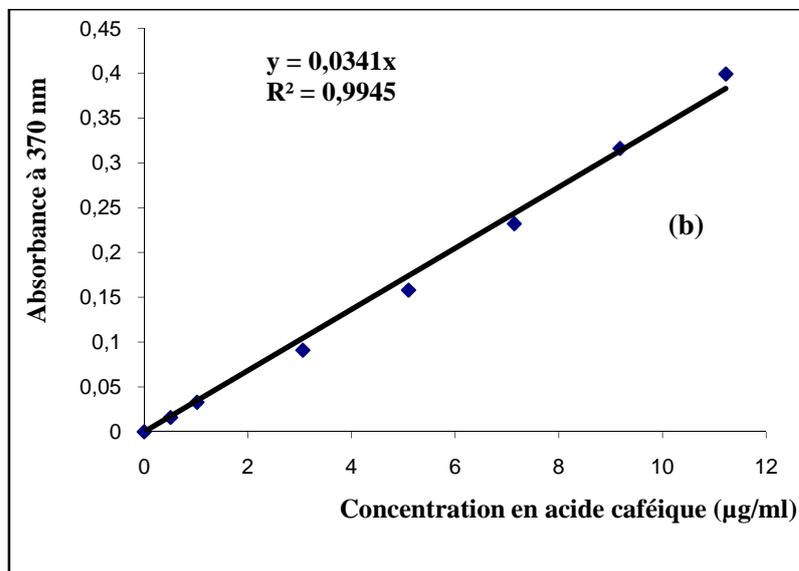
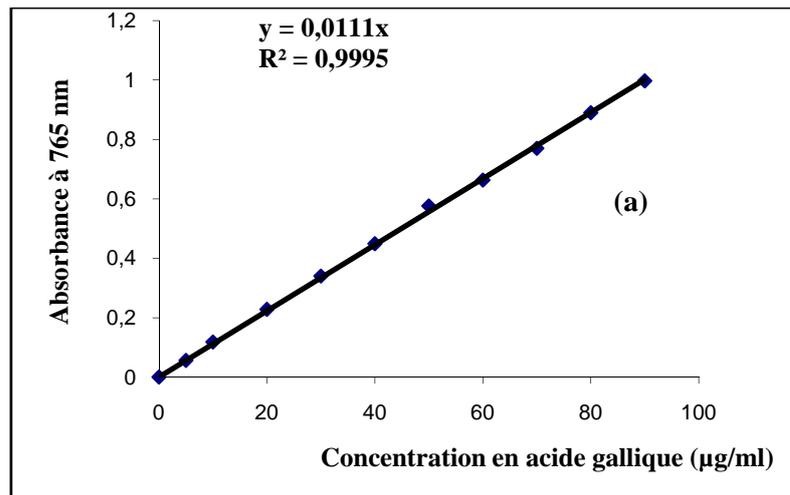
- performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54 (4): 2832-2838.
- Sánchez J. and Harwood J.L. (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 564-573.
- Servili M. 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., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro G. F., Metzidakis I. T. and Voyiatzis D. G. (1999). Phenolic composition of olive fruits and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during the oil mechanical extraction process. *Acta Horticulturae*, 474: 609-613.
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Mariotti F., Federici E. and Montedoro G.F. (1998). Effect of malaxation under N<sub>2</sub> flush on phenolic and volatile compounds of virgin olive oil. 13th International Symposium on Plant Lipids, Sevilla, Espagne, 307-310.
- Servili M., Esposto S., Fabiani R., Urbani S., Taticchi A., Mariucci F., Selvaggini R. and Montedoro G.F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and Organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17: 1-9.
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. and Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054: 113-127
- Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S. and Montedoro G. (2003). Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (27): 7980-7988.
- Shah Q. A., Bibi F. and Shah A. H. (2013). Anti-Microbial Effects of Olive Oil and Vinegar against *Salmonella* and *Escherichia coli*. *The Pacific Journal of Science and Technology*, 14 (2): 479-486.
- Soler-Rivas C., Espin C. J. and Wichers H. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1013-1023.
- Soulier J. and Farines M. (1992). L'insaponifiable In : Manuel des corps gras. Lavoisier, Ed. Technique et Documents, pp.95-112.
- Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Calhelha R., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R., Estevinho L., Bentoa A. and Pereira J.A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'Alcaparra'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 8533-8538.
- Taguri T., Tanaka T. and Kouno I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(12): 1965-1969.

- Tamendjari A., Angerosa F. and Bellal M. M. (2004). Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of *Chemlal* olives. *Italian Journal of Food Science*, 16 (3): 343-354.
- Tamendjari A., Angerosa F., Mettouchi S. and Bellal M.M. (2009). The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of *Chemlal* olive oil. *Grasas y Aceites*, 60: 507-513.
- Taticchi A., Esposito S., Veneziani G., Urbani S., Selvaggini R. and Servili M. (2013). The influence of malaxation temperature on activity of polyphenoloxidase and peroxidase on phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 136: 975-983.
- Thabaut A. and Durosoir J.L. (1979). L'Antibiogramme : méthodes classiques et méthodes automatisées. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 9: 490-495.
- Tovar M. J., Motilva M. J., and Paz Romero M. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) grown under linear Irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5502-5508.
- Tovar M.J., Romero M. P., Girona J. and Motilva M.J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science and Food Agriculture*, 82 (8): 892-898.
- Tsimidou M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 10 (2): 99-116.
- Tsimidou M., Papadopoulos G and Boskou D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chemistry*, 45:141-144.
- Tuck K.L. and Hayball P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 636-644.
- Tunçel G. and Nergiz C. (1993). Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 300-302.
- Tura D., Gigliotti C., Pedo S., Failla O., Bassi D. and Serraiocco A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112: 108-119.
- Vazquez-Roncero A. (1978). Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Revue Française des Corps Gras*, 78 (4): 21-26.
- Veillet S., Tomao V., Bornard I., Ruiz K. and Chemat F. (2009). Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: stone mill and hammer crusher. *Comptes Rendus de Chimie*, 12 (8): 895-904.
- Vekiari S. A. and Koutsaftakis A. (2002). The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. *Grasas y Aceites*, 53 (3): 304-308.

- Vekiari S. A., Oreopoulou V., Kourkoutas Y., Kamoun N., Msallem M., Psimouli V. and Arapoglou D. (2010). Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the *Throumbolia* and *Koroneiki* varieties from Southern Greece. *Grasas y Aceites*, 61 (3): 221-231.
- Velasco J. and Dobarganes C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104: 661-676.
- Vichi S., Castellote A.I., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S. and Lopez-Tamames E. (2003). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983: 19-33.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. and Garcia-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- Visioli F. and Galli C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55 (24): 1965-1971.
- Visioli F. and Galli C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4292-4296.
- Visioli F., Poli A. and Galli C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22 (1): 65-75.
- Xu H-X. and Lee S.F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy Research*, 15: 39-43.
- Yousfi K., M. Cert R. and Garcia J .M. (2006). Changes in phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *European Food Research Technology*, 223: 117-124.
- Zarrouk M., Marzouk B., Ben Miled Daoud D. and Chérif A. (1996). Accumulation de la matière grasse de l'olive et l'effet du sel sur sa composition. *Olivae*, 61: 41-45.
- Zarrouk W., Haddada F.M., Baccouri B., Oueslati I., Taamalli W., Fernandez Z., Lizzani-Cuvelier L., Daoud D. and Zarrouk M. (2008). Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 81-88.

## **ANNEXES**

---



**Figure 1** : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux (a) et des *ortho*-diphénols (b).

**Le mode opératoire ainsi que les informations relatives à la méthode de dosage des polyphénols de l'huile d'olive par HPLC (NGD C89-2007)**

➤ **Gradient ternaire linéaire d'élution** : eau à 0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (V/V) (A), méthanol (B), acetonitril (C). Les solvants d'élution doivent être dégazés. Le développement du gradient doit intervenir selon le schéma suivant :

**Gradient d'élution**

<b>Temps min</b>	<b>Flux ml/min</b>	<b>A %</b>	<b>B %</b>	<b>C %</b>
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

➤ **Solution des étalons externes d'étalonnage (tyrosol et acide syringique) :**

Peser exactement 0,030 g de tyrosol et 0,015 g d'acide syringique dans un ballon taré de 10 ml. Diluer jusqu'au volume avec la solution méthanol/eau 80/20 (V/V). Prélever 100 µl de la solution et la transférer dans un ballon taré de 10 ml. Diluer jusqu'au volume avec la solution méthanol/eau 80/20 (V/V). Les concentrations de la solution d'étalonnage externe sont : tyrosol 0,03 mg/ml, acide syringique 0,015 mg/ml.

➤ **Préparation de la solution étalon interne (acide syringique) :**

Peser exactement 0,015 g d'acide syringique dans un ballon taré de 10 ml et porter jusqu'au volume avec la solution méthanol/eau 80/20 (V/V). Prélever 1 ml de la solution, la transférer dans un ballon taré de 100 ml et porter jusqu'au volume avec la même solution de méthanol/eau 80/20 (V/V). La concentration finale est de 0,015 mg/ml.

**Mode opératoire**

- Préparer un entonnoir avec un filtre en papier et ajouter environ 20 g de sulfate de sodium. Verser environ 40 ml d'huile d'olive bien homogénéisée sur la phase absorbante de sulfate de sodium ;

- Peser exactement 2,0 g de l'huile d'olive anhydre dans une éprouvette munie d'un bouchon à vis de 10 ml ;
- Verser 1 ml de la solution d'étalon interne à l'échantillon préalablement pesé ;
- Fermer avec le bouchon à vis et agiter pendant exactement 30 secondes ;
- Ajouter 5 ml de la solution d'extraction constituée de méthanol/eau 80/20 (V/V).
- Agiter pendant 1 minute exactement ;
- Isoler dans le bain à ultrasons pendant 15 mn à température ambiante.
- Centrifuger à 5000 tours/min pendant 25min.
- Prélever une aliquote du surnageant et filtrer au moyen d'une seringue en plastique de 5 ml à l'aide d'un filtre PVDF de 0,45µm.

- Allumer le spectrophotomètre UV au moins 1 heure avant l'analyse.

La colonne chromatographique doit être conditionnée au moins 15 mn avec le solvant d'élution de composition initiale (eau 0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (V/V) /méthanol/acétonitril 96/2/2 (V/V/V)).

- Un premier essai chromatographique à « gradient vide » devrait toujours être réalisé au préalable (pour garantir l'absence de pics d'interférence de coélution), en injectant 20µl de méthanol/eau 80/20 (V/V) dans le système HPLC.

- Injecter 20 µl de la solution d'étalon externe et enregistrer le chromatogramme à 280 nm. Calculer les valeurs des facteurs de réponse RF relatifs à 1µg de tyrosol et à 1µg d'acide syringique.

- Calculer le rapport entre le facteur de réponse de l'acide syringique et le tyrosol, appelé  $RRF_{\text{syr/tyr}}$ .

- Injecter 20 µl de la solution finale de l'échantillon dans le système HPLC et enregistrer le chromatogramme à 280 nm.

- Réaliser deux déterminations indépendantes sur le même échantillon et vérifier que les résultats s'inscrivent dans les paramètres de précision de la méthode.

La figure 2 représente un chromatogramme typique des biophénols d'une huile d'olive vierge extra caractérisée par composant.

- Pour évaluer la teneur totale, on considérera des aires des différents pics.

### **Expression des résultats**

#### **➤ Calcul des facteurs de réponse des étalons externes (RF) :**

$RF_{1\mu\text{g}}$  (acide syringique) = aire acide syringique / µg acide syringique injecté.

$RF_{1\mu\text{g}}$  (tyrosol) = aire tyrosol / µg acide tyrosol injecté.

➤ **Calcul du rapport entre les deux facteurs de réponse (RRF) :**

$$RRF_{\text{syr/tyr}} = RF_{1\mu\text{g}}(\text{acide syringique}) / RF_{1\mu\text{g}}(\text{tyrosol})$$

La valeur de  $RRF_{\text{syr/tyr}}$  doit être constante et comprise dans un intervalle  $5,1 \pm 0,4$ . Elle permet d'exprimer le résultat final en tyrosol, en utilisant l'acide syringique comme étalon interne.

➤ **Calcul de la teneur en biophénols dans l'huile d'olive vierge :**

La teneur en biophénols (dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes, et des acides phénoliques) exprimés en mg/Kg est calculée en mesurant la somme des aires des pics chromatographiques correspondants (identifiés dans le tableau I), selon la formule suivante. Le résultat est exprimé sans décimale.

$$\text{mg/Kg} = \frac{(\sum A) \times 1000 \times RRF_{\text{syr/tyr}} \times (P \text{ ac.syr.})}{(A \text{ ac.syr.}) \times (P)}$$

**( $\sum A$ )** : est la somme des aires des pics des biophénols (hydroxytyrosol, tyrosol, dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques) enregistrés à 280 nm;

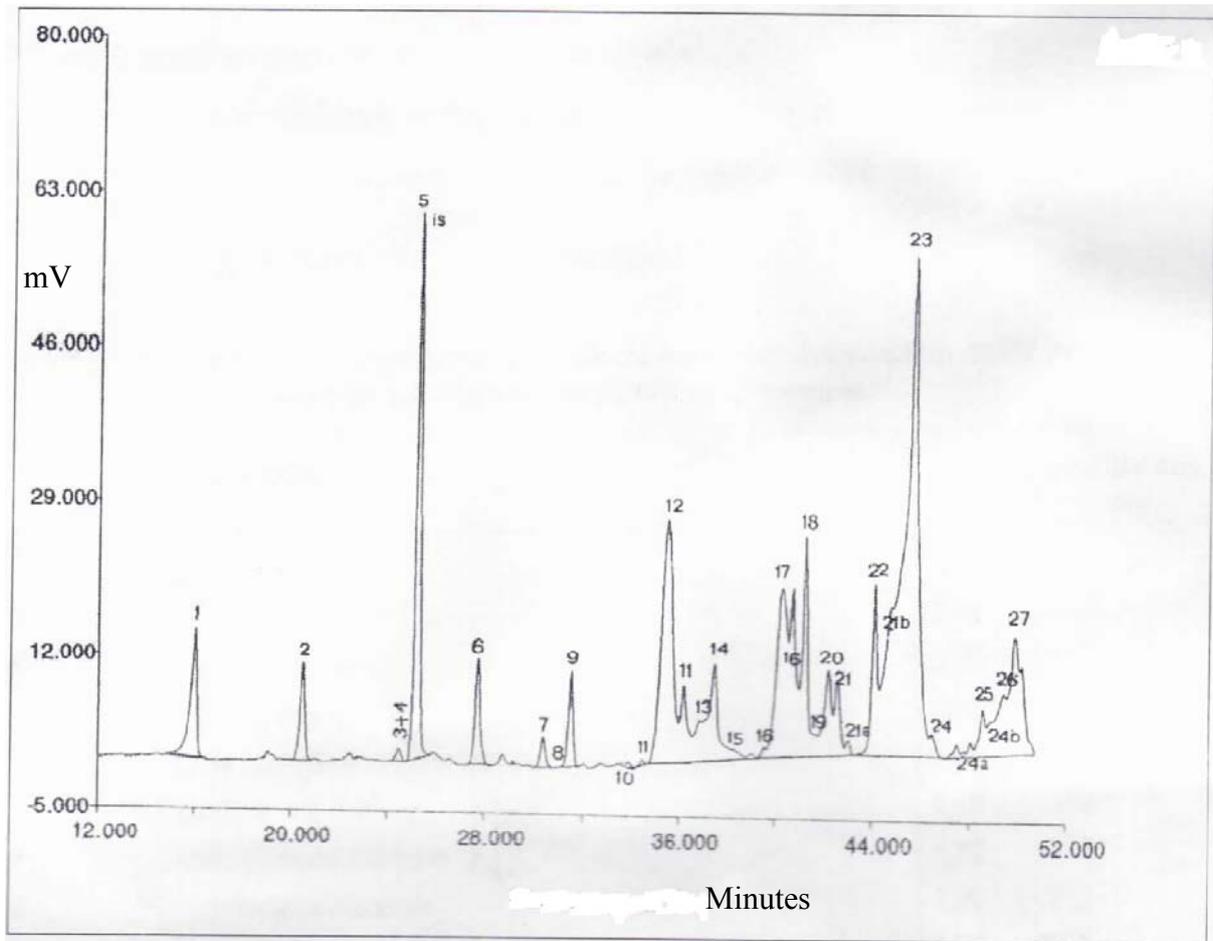
**A ac. syr** : est l'aire de l'étalon interne d'acide syringique enregistrés à 280 nm;

**1000** : est le facteur utilisé pour exprimer le résultat en mg/Kg;

**P** : est le poids en gramme d'huile utilisée;

**$RRF_{\text{syr/tyr}}$**  : est le coefficient de multiplication pour exprimer le résultat final en tyrosol;

**P ac.syr.** : est le poids en milligrammes d'acide syringique utilisé comme étalon interne dans 1 ml de solution ajouté à l'échantillon.



**Figure 2** : Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm correspondant à des biophénols typiques présents dans une huile d'olive vierge extra.

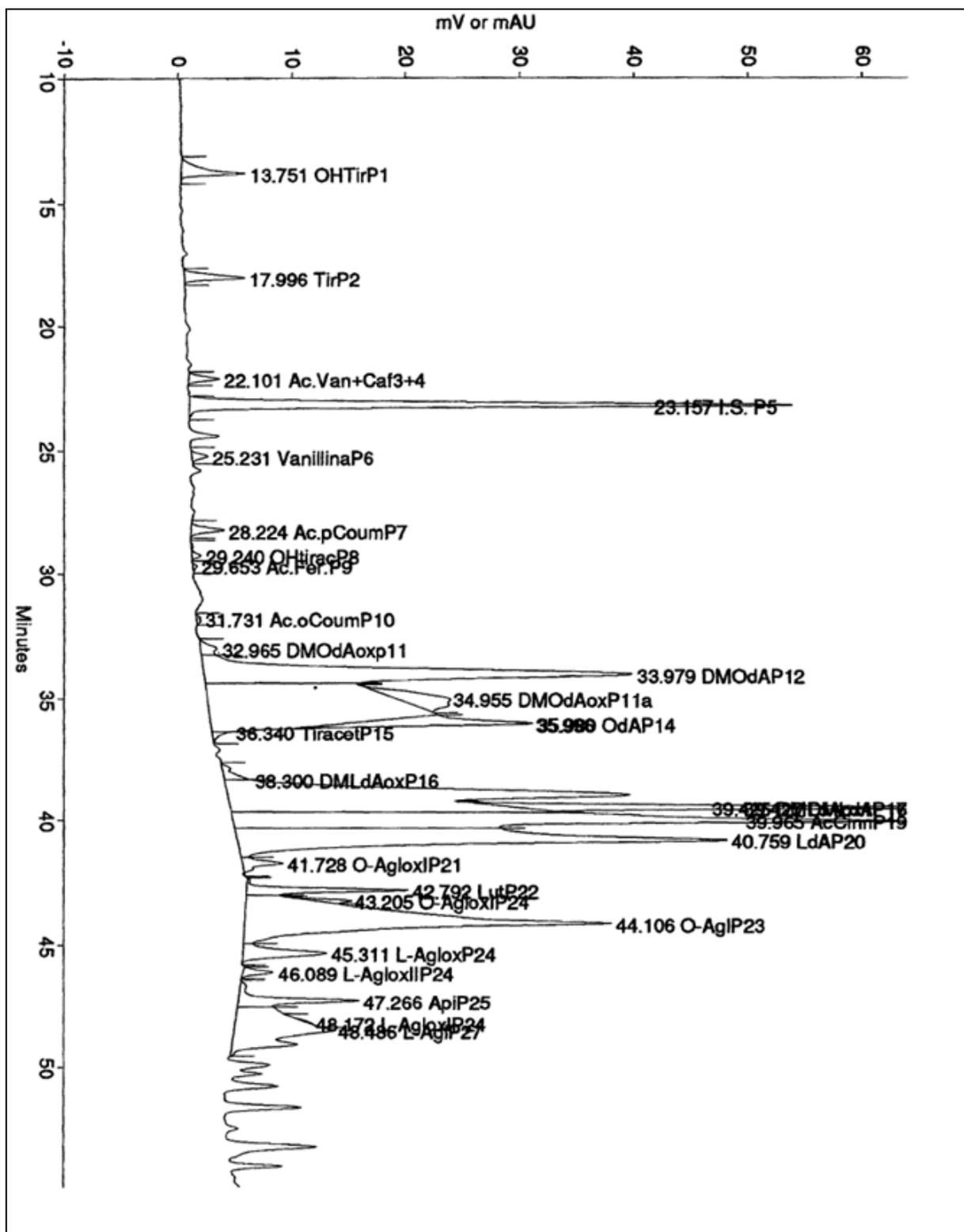
**Tableau I** : Identification des pics des biophénols de l'huile d'olive vierge par HPLC-MS.

Pic N°	Biophénols	RRT*	Max UV abs. nm
1	Hydroxytyrosol	0,62	230-280
2	Tyrosol	0,80	230-275
3	Acide vanillique	0,96	260
4	Acide caféique	0,99	325
5	Acide syringique (étalon interne)	<b>1,00</b>	280
6	Vanilline	1,10	310
7	Acide <i>para</i> -coumarique	1,12	310
8	Hydroxytyrosolacétate	1,20	232-285
9	Acide férulique	1,26	325
10	Acide <i>ortho</i> -coumarique	1,31	325
11 ; 11a	Décarboxyméthyleuropéine aglicone, forme dialdéhydrique oxydée	-	235-280
12	Décarboxyméthyleuropéine aglicone, forme dialdéhydrique	1,45	235-280
13	Oleuropéine	1,48	230-280
14	Oleuropéine aglicone, forme dialdéhydrique	1,52	235-280
15	Tyrosilacétate	1,54	230-280
16 ; 16a	Décarboxyméthyligstroside aglicone, forme dialdéhydrique oxydée	1,63	235-275
17	Décarboxyméthyligstroside aglicone, forme dialdéhydrique	1,65	235-275
18	Pinorésinol, 1 acétoxy-pinorésinol	1,69	232-280
19	Acide cinnamique	1,73	270
20	Ligstroside aglicone, forme dialdéhydrique	1,74	235-275
21;21a; 21b	Oleuropéine aglicone, forme aldéhidique et hydroxylique oxydée	-	235-280
22	Lutéoline	1,79	255-350
23	Oleuropéine aglicone, forme aldéhidique et hydroxylique	1,87	235-280
24 ; 24a; 24b	Ligstroside aglicone, forme aldéhidique et hydroxylique oxydée	-	235-275
25	Apigénine	1,98	230-270-340
26	Méthyl-lutéoline	-	255-350
27	Ligstroside aglicone, forme aldéhidique et hydroxylique	2,03	235-275

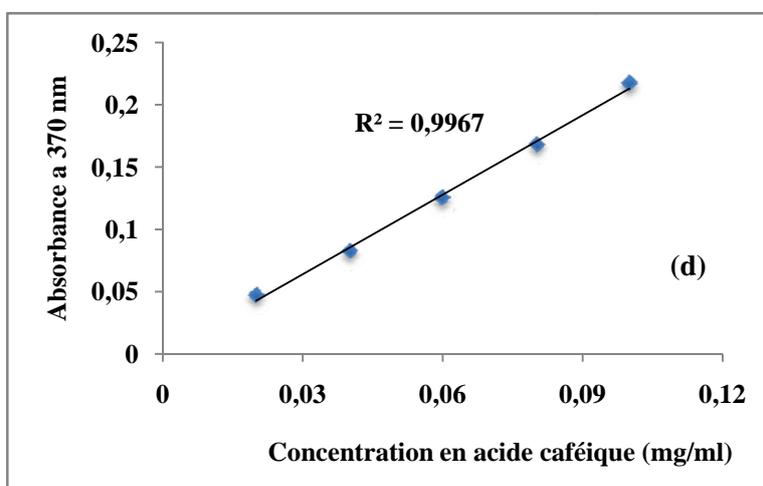
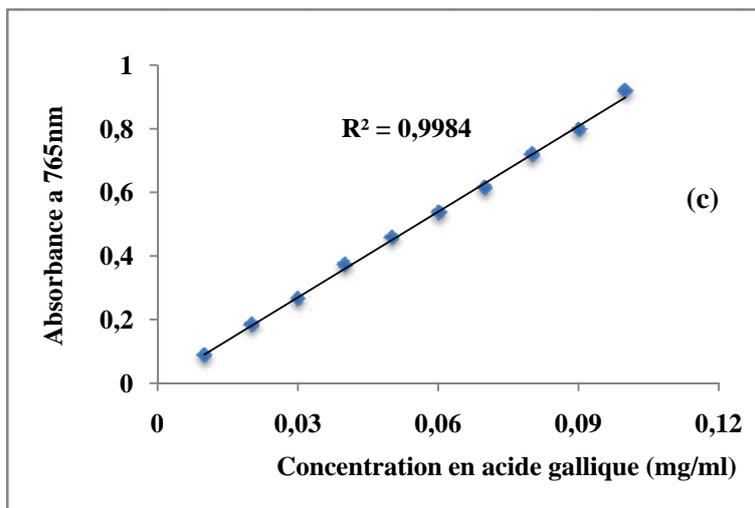
- max UV abs : les valeurs d'absorbance maximale en UV ;

- RRT : les temps de rétention correspondants ;

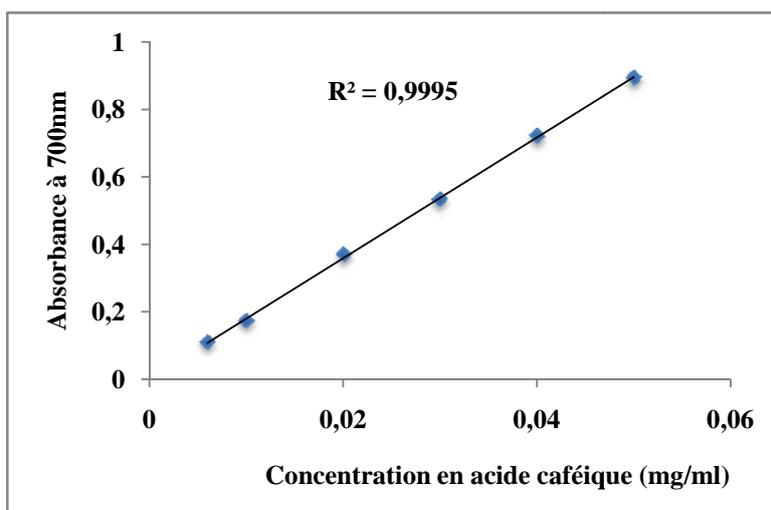
\*La valeur du temps de rétention correspondant est calculée par rapport au temps de rétention de l'acide syringique.



**Figure 3 :** Chromatogramme HPLC des composés phénoliques de l'huile d'olive de la variété *Chemlal* au stade de maturation vert.



**Figure 4** : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux (c) et des *ortho*-diphénols (d).



**Figure 5** : Courbe d'équivalence pour le pouvoir réducteur.

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

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

Tableau III : Matrice des corrélations.

	Polyphénols (HPLC)	Polyphénols totaux	O-diphénols	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Flavonoïdes	Lignanes	Dérivés d'oleuropéine	Dérivés de ligstroside
Polyphénols (HPLC)	1								
Polyphénols totaux	0,95	1							
O-diphénols	0,75	0,88	1						
Hydroxytyrosol	0,81	0,74	0,49	1					
Tyrosol	0,39	0,37	0,05	0,71	1				
Flavonoïdes	-0,28	-0,28	-0,21	-0,52	-0,57	1			
Lignanes	0,37	0,20	-0,03	0,22	0,26	-0,28	1		
Dérivés d'oleuropéine	0,95	0,91	0,79	0,80	0,37	-0,46	0,33	1	
Dérivés de ligstroside	0,97	0,98	0,82	0,78	0,37	0,28	0,19	0,93	1
Pouvoir réducteur	0,91	0,98	0,92	0,72	0,31	-0,29	0,15	0,92	0,95
Activité scavenger de DPPH	0,55	0,72	0,67	0,43	0,19	-0,10	-0,11	0,45	0,67
Activité scavenger de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,66	0,81	0,82	0,49	0,15	-0,30	0,07	0,69	0,74
Activité scavenger de l'ABTS	0,67	0,76	0,55	0,50	0,33	-0,08	0,14	0,53	0,74

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

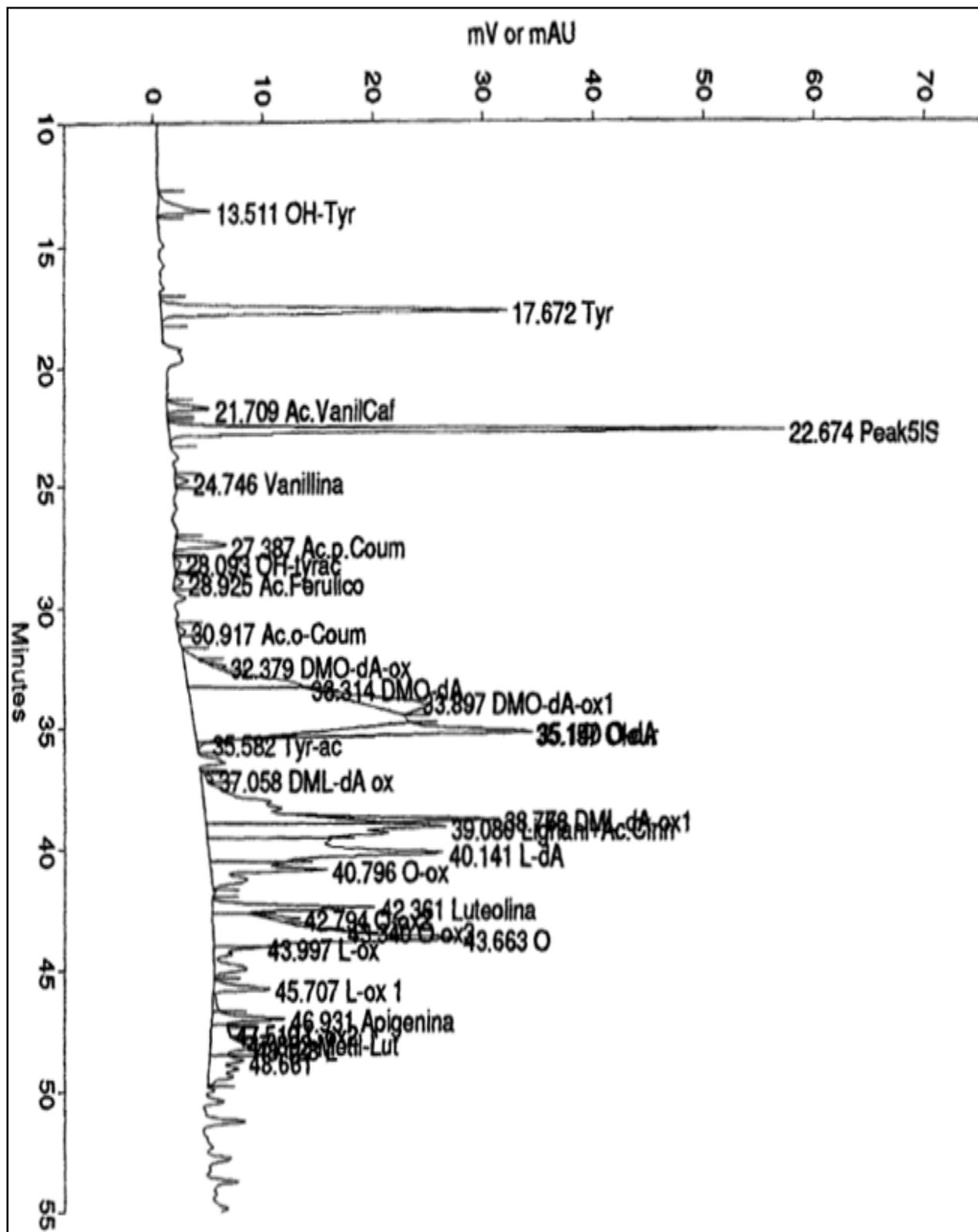


Figure 6 : Chromatogramme HPLC des composés phénoliques de l'huile d'olive de la variété *Blanquette de Guelma*.

**Tableau IV:** Activité antibactérienne (diamètre de zone d'inhibition en mm) des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive.

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

**Tableau IV:** Activité antibactérienne (diamètre de zone d'inhibition en mm) des extraits méthanoliques des différents échantillons d'huile d'olive (suite).

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

Tableau V: Coefficients de corrélation à une concentration d'extrait de 1 mg/disque.

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

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

## **PUBLICATIONS**

---

# Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars

R. LARIBI<sup>1\*</sup>, P. ROVELLINI<sup>2</sup>,  
L. DEFLAOU<sup>1</sup>, A. AIDLI<sup>1</sup>,  
S. METTOUCHI<sup>1</sup>, L. ARRAR<sup>3</sup>,  
A. TAMENDJARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FACULTY OF NATURE AND LIFE SCIENCES,  
LABORATORY OF APPLIED BIOCHEMISTRY,  
A/MIRA UNIVERSITY, BEJAJA, ALGERIA

<sup>2</sup>STAZIONE SPERIMENTALE PER LE  
INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI,  
MILAN, ITALY

<sup>3</sup>LABORATORY OF APPLIED BIOCHEMISTRY,  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FERHAT ABBAS  
UNIVERSITY, SETIF, ALGERIA

THE PRESENT STUDY WAS CARRIED OUT TO ESTIMATE THE EVOLUTION OF OLIVE OIL BIOPHENOLS DURING THE RIPENING PROCESS. THE WORK WAS FOCUSED ON FOUR ALGERIAN OLIVE VARIETIES (*CHEMLAL*, *BOUGHENFOUS*, *BLANQUETTE* and *TAKESRIT*). FOR THE ANALYSIS, COLORIMETRIC AND HPLC METHODS WERE USED. THE RESULTS SHOWED THAT BOTH MATURATION AND CULTIVARS INFLUENCED SIGNIFICANTLY THE QUANTITY AND THE QUALITY OF OLIVE OIL PHENOLIC FRACTION. DURING OLIVE MATURATION, ALL VARIETIES REGISTERED A DECREASE OF TOTAL BIOPHENOLS, HOWEVER IT IS VERY IMPORTANT TO UNDERLINE THAT THIS DECREASE DIFFERED IN THE AMOUNT FROM ONE CULTIVAR TO ANOTHER. *Cv. CHEMLAL* HAD THE LEAST IMPORTANT DIMINUTION.

**KEYWORDS:** OLIVE MATURATION, BIOPHENOLS, ALGERIAN OLIVE OIL

## EVOLUZIONE DEI COMPOSTI BIOFENOLICI IN OLI VERGINI DI OLIVA DURANTE LA MATURAZIONE DELLE OLIVE DI CULTIVARS ALGERINE

IL PRESENTE LAVORO È STATO CONDOTTO CON LO SCOPO DI VALUTARE L'EVOLUZIONE DEI BIOFENOLI NEGLI OLI DI OLIVA DURANTE IL PROCESSO DI MATURAZIONE. IL LAVORO È STATO FOCALIZZATO SU QUATTRO VARIETÀ ALGERINE (*CHEMLAL*, *BOUGHENFOUS*, *BLANQUETTE* e *TAKESRIT*). PER LE ANALISI SONO STATI UTILIZZATI SIA I METODI COLORIMETRICI CHE HPLC. I RISULTATI HANNO MOSTRATO CHE SIA LA MATURAZIONE, SIA LA CULTIVAR INFLUENZAVANO SIGNIFICATIVAMENTE LA QUANTITÀ E LA QUALITÀ DELLA FRAZIONE FENOLICA DEGLI OLI DI OLIVA. DURANTE LA MATURAZIONE DELLE OLIVE, TUTTE LE VARIETÀ SUBIVANO UN DECREMENTO DEI BIOFENOLI TOTALI, QUANTITATIVAMENTE DIFFERENTE DA UNA CULTIVAR ALL'ALTRA. LA *Cv. CHEMLAL* MOSTRAVA LA DIMINUZIONE MENO SIGNIFICATIVA.

**PAROLE CHIAVE:** MATURAZIONE DELLE OLIVE, BIOFENOLI, OLI DI OLIVA ALGERINI

\*) CORRESPONDING AUTHOR:

LARIBI RAHIMA, FACULTY OF NATURE AND LIFE SCIENCES,  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCES, A/MIRA UNIVERSITY,  
BEJAJA 06000, ALGERIA.

TEL. +213 34 21 43 33 A 35,  
FAX +213 34 21 60 98

E-MAIL: laribi.rahima@yahoo.fr

## 1. INTRODUCTION

Biophenols, present in virgin olive oil, constitute a wide class of secondary metabolites, derived from oleuropein and ligstroside, which have an important role in human health. In recent years the interest in phenolic compounds has increased, considering their potent biological activities [1, 2].

Olive oil is one of the food-stuffs which has attracted considerable attention as a source of biophenols [3-6]. They contribute to the flavor, stability and nutritional value of oil [7, 8].

The olive oil content of phenolic compounds depends on the cultivar, climatic conditions, degree of maturation and the technology used for oil extraction [9 - 12]. Maturation degree is one of the factors which are studied by several works, especially the influence on evolution of phenolic compounds either in olives [13 - 15], or in olive oil [15-19].

According to Uceda and Frias [20], there are four olive ripening stages which are, green, spotted, purple and black. During ripening, the concentration of biophenolic compounds progressively increases until it reaches a maximum at the 'spotted' and 'purple' pigmentation stage, after which it decreases [21-23].

Different studies focused on biophenolic compounds of virgin olive oil, were conducted in particular on the oxidized biophenols [24], secoiridoids acids [25], lignanes and flavonoids [26]. However, there has been only a little research on phenolic compounds of Algerian olive oil varieties. The aim of this work was to characterize the biophenol profile of Algerian olive oil varieties and to determine how the olive maturation influenced them.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Fruit harvest and sorting out of olives

The study was carried out during the 2006/2007 olive collection season. Olive fruit samples from four varieties (*Chemlal*, *Boughenfous*, *Blanquette de Guelma* and *Takesrit*) were manually collected from olive trees in two different locations. Olive fruits from *Chemlal* variety, the most widespread in Algeria (more than 50% of the olive groves), were harvested in the region of Tazmalt (Bejaia) in east-central Algeria. *Boughenfous*, *Blanquette* and *Takesrit* varieties were collected from an olive orchard maintained by ITAFV of Takarietz, located in Sidi Aich, Bejaia.

After harvest, olive fruits were immediately tran-

sported to the laboratory and then hand-picked at spotted, purple and black stages during ripening. For *Chemlal* and *Boughenfous* varieties, a supplementary green stage was designed.

### 2.2 Olive oil extraction

Virgin olive oil samples were obtained using a laboratory oil mill (Levi-Deleo-Lerogsame), consisting of three basic elements: a hammer crusher, thermobearer (mixer) and a pulp centrifuge. Olive fruits were milled in the hammer crusher, and then the olive paste was kneaded for 30 mn with warm water addition (50 ml was added to 920 g of paste). After the vertical centrifugation, the oil was collected and left to decant. The oil samples were stored in amber glass bottles at 4°C in darkness without headspace until analysis.

### 2.3 Solid phase extraction (SPE) of phenolic compounds for spectrophotometric determination

Extraction of phenols was performed by a solid-phase extraction (SPE) according to Favati *et al.* [27], using an octadecyl C18 cartridge (J.T. Backer, Milan, Italy). 1 g of olive oil was dissolved in n-hexane (10 ml) and deposited on cartridge previously washed with 2\*5 ml of MeOH and 2\*5 ml of n-hexane. The elution steps were: n-hexane (3\*5 ml) to remove lipophilic compounds, methanol (2\*4 ml) to remove the polar fraction. The methanolic solution was used to measure total phenolic compounds and *o*-diphenols.

### 2.4 Spectrophotometric determination of total phenols

The total phenol content of extract was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method at 765 nm, using gallic acid for external standard calibration curve. The analysis was repeated three times for each extract (n=3).

### 2.5 Spectrophotometric determination of *o*-diphenols

According to Mateos *et al.* [28], 0.5 ml of phenolic extract, obtained from olive oil by solid-liquid extraction, was dissolved in 5 ml of methanol (CH<sub>3</sub>OH)-water (1:1, v/v); a mixture of 4 ml of the solution and 1ml of a 5 % solution of sodium molybdate dihydrate in EtOH-water (1:1, v/v) was shaken vigorously. After 15 mn, the absorbance at 370 nm was measured using caffeic acid for the calibration curve with a glass cuvette. The analysis was repeated three times for each extract (n=3).

**Table I** – Total phenols and *o*-diphenols changes during maturation in different Algerian varieties of virgin olive oil

Determinations	Stages	Varieties			
		<i>Chemlal</i>	<i>Boughenfous</i>	<i>Blanquette</i>	<i>Takesrit</i>
Total phenols (mg/kg)	Green	628.72 ± 2.91	514.39 ± 4.77	ND	ND
	Spotted	553.41 ± 4.32	293.36 ± 1.68	444.17 ± 14.90	268.33 ± 0.97
	Purple	447.14 ± 4.60	130.23 ± 1.60	381.17 ± 2.20	193.23 ± 0.36
	Black	410.87 ± 4.23	77.63 ± 2.29	121.54 ± 8.27	82.08 ± 4.80
<i>o</i> -diphenols (mg/kg)	Green	56.36 ± 1.82	16.45 ± 0.63	ND	ND
	Spotted	61.71 ± 0.46	48.17 ± 0.30	60.19 ± 0.62	32.62 ± 0.17
	Purple	9.18 ± 2.14	4.94 ± 0.46	57.36 ± 0.63	16.25 ± 0.69
	Black	13.93 ± 0.79	11.91 ± 0.46	14.94 ± 0.46	4.44 ± 0.34

ND: not determined

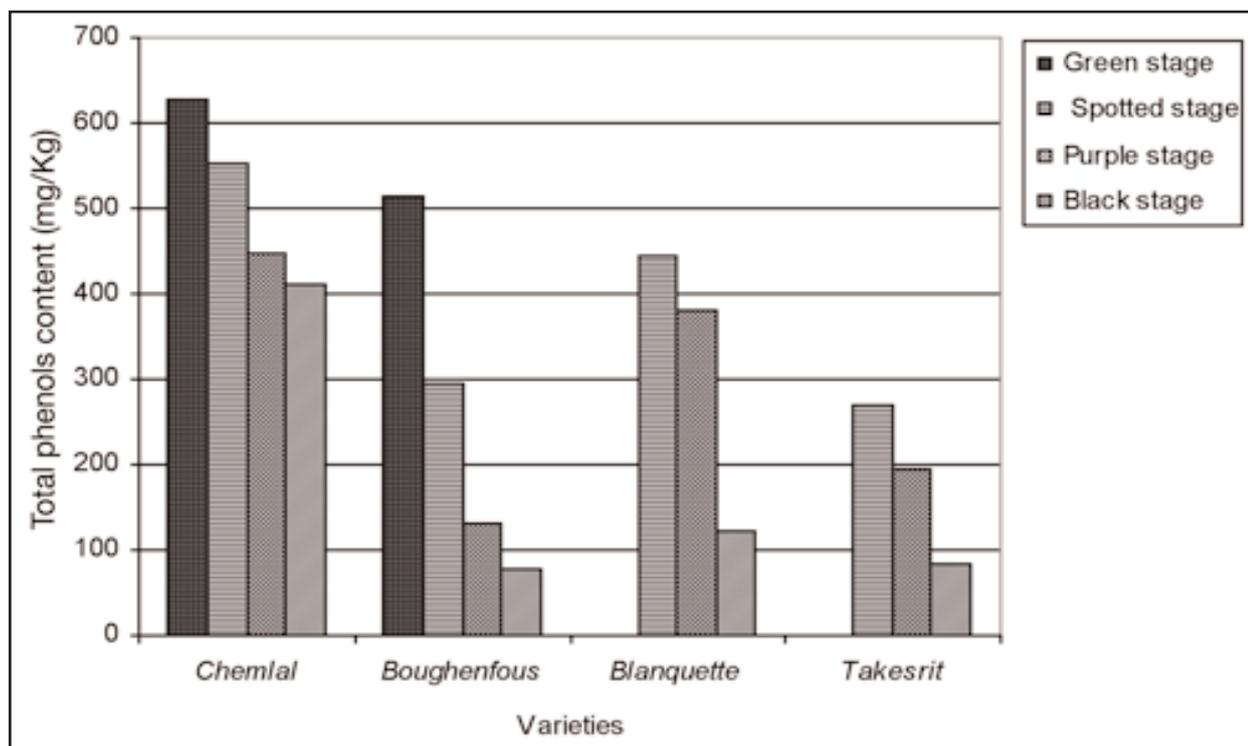
## 2.6 Chromatographic determination of phenolic compounds

A solution of internal standard (1 ml of 0.015 mg/ml of syringic acid in water/ MeOH (20:80 v/v) was added to the sample of anhydride virgin olive oil (2 g). The mixture was shaken by vortex (30 s). 5ml of extraction solution of water and MeOH (20:80 v/v) were added. The obtained mixture was agitated for 1mn, extracted for 15mn in an ultrasonic bath and then centrifuged at 5000 rpm for 25 mn [29].

The upper phase was filtered with a 0.45 µm PVDF syringe filter. 20 µl of the filtered solution were

analyzed by HPLC with UV detector at 280 nm.

The HPLC system used consisted of C18 Spherisorb ODS-2 reversed column (5 µm, 250 mm 4.6 mm). Elution was performed at a flow rate of 1 ml/mn following a gradient, composed of a mixture of water and orthophosphoric acid (99,8 : 0,2 v/v) (solvent A), MeOH (solvent B) and acetonitril (solvent C): from 96 % (A) – 2 % (B) - 2% (C) to 0% (A) - 50% (B) - 50% (C) in 60 mn. The last gradient was kept for 10 mn. The successively gradient was: from 0 % (A) – 50 % (B) – 50 % (C) to 96 % (A) – 2 % (B) - 2% (C) in 2 mn and then kept for 10 mn.



**Figure 1** - Evolution of total phenol content of Algerian virgin olive oil during ripening stages

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Total phenols and *ortho*-diphenols contents

As shown in Table I and Figure 1, the total phenols content in virgin olive oil decreased from the green to black stage for *Chemlal* and *Boughenfous* and from spotted to black stages for *Takesrit* and *Blanquette* varieties. This demonstrated that the maturation process generated a decreasing of phenol content in virgin olive oil. The *Chemlal* olive oil had the highest values for all the considered stages. On the other hand and with exception of the black stage, the olive oils obtained from *Takesrit* presented the lowest phenol content. Only *Boughenfous* and *Takesrit*, at the black stage, registered a content value which was less than 100 mg/kg. Examining the decreasing percentage of total phenols, we found that *Boughenfous* had the highest one (84.90 %), followed by *Blanquette* (72.63 %), then *Takesrit* (69.41 %) and *Chemlal* came in the last position (34.64 %).

The oils from the spotted stage registered the maximum score of *o*-diphenols for all varieties (Table I and Figure 2). For *Chemlal* and *Boughenfous* varieties, after an increase, we observed a decrease of *o*-diphenols content from spotted to black stages. In contrast,

the results showed a decreasing trend of *o*-diphenols content, during the ripening progress for *Blanquette* and *Takesrit* varieties. Yousfi *et al.* [30] had reported a decreasing of *o*-diphenols content of oil during maturation of *Arbequina* and *Picual* olive varieties.

The decrease of total phenols and *o*-diphenols contents of virgin olive oil with olive maturation progress has been already mentioned by Cerretani *et al.* [31] for *cv. Nostrana di Brisighella*. In the same study these authors had reported an increase of *o*-diphenol in the last but one stage, with a ripeness index value of 4.03, for *cv. Ghiacciolo*.

#### 3.2 HPLC profiles of biophenol

The results obtained in this study, concerning the HPLC profiles of biophenols [24] of Algerian olive oil varieties, evidenced that this fraction was largely influenced by the variety and the ripening degree.

For the total phenolic compounds content (Table II, Figure 3: **a** and **b**), we observed that *Chemlal* variety contained the greatest quantity for all maturation stages. Concerning the spotted stage, *Takesrit* variety registered the smallest quantity. For purple and black stages, the lowest values were noticed for *Boughenfous* variety.

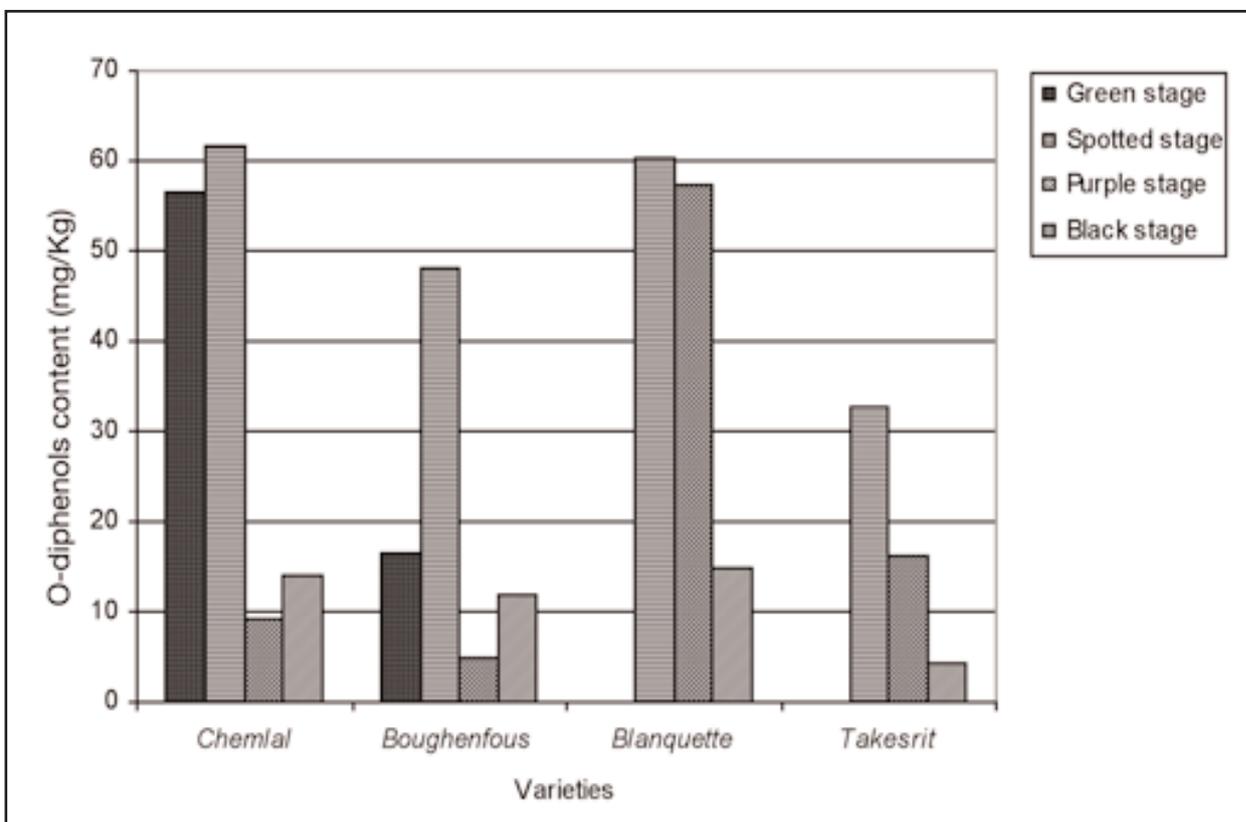


Figure 2 - Evolution of *o*-diphenols content of Algerian virgin olive oil during olive ripening stages

**Table II** - Evolution of total biophenols, hydroxytyrosol and tyrosol concentrations (mg/kg) with HPLC analysis, in different Algerian cultivar extra virgin olive oils

Varieties	Stages	Total biophenols (mg/kg)	Hydroxytyrosol (mg/kg)	Tyrosol (mg/kg)
<i>Chemlal</i>	Green	631	5	4
	Spotted	598	6	7
	Purple	491	5	9
	Black	366	3	8
<i>Blanquette</i>	Spotted	473	7	9
	Purple	372	7	10
	Black	107	3	6
<i>Takesrit</i>	Spotted	254	1	14
	Purple	155	1	10
	Black	94	0.6	8
<i>Boughenfous</i>	Green	400	2	7
	Spotted	298	1	12
	Purple	114	1	21
	Black	46	0.3	9

However, there was a decrease of the amount of phenols during maturation for all the varieties. The most important point was the decreasing rate. Passing from the first stage to black stage the most important decrease was for *Boughenfous* (84.08 %), followed by *Blanquette* (77.37 %), then *Takesrit* (62.99 %) and lastly, we found *Chemlal* (41.99 %). The results obtained show that the speed of variation of olive oil phenols through the olive maturation could also be linked to the variety.

The decreasing of total phenols of oil during the olive maturation can be explained by:

- decreasing of enzymatic activity of L-phenylalanine ammonia-lyase, which is responsible of phenolic compounds synthesis [32];
- increasing of hydrolytic activity of enzymes (esterase and glucosidase) [33];
- oxidation of phenolic compounds by peroxidase [34] and polyphenoloxidase (PPO) [35].

Hydroxytyrosol and tyrosol are the main simple phenols found in all the virgin olive oils [36]. Different authors have already studied a lot of olive varieties indicating that the content of these two compounds ranged between 5 % and 23 %, with regard to total biophenols.

In our study, we observed the presence of hydroxytyrosol and tyrosol in all virgin olive oil varieties, but their quantities were less important than

those indicated by Oliveras-Lopez et al. [36].

As shown in Table II and Figure 4, hydroxytyrosol was found at low concentration, it constituted between 0.34 % and 2.80 % of total biophenols. Concerning its evolution during maturation, hydroxytyrosol contents of *Chemlal* variety at initial harvest was 5 mg/kg, then showed a slight increase from green to spotted stages. This increase was followed by a decrease through purple and black stages.

However, in *Blanquette* and *Takesrit* varieties, no changes in hydroxytyrosol concentration were observed from spotted to purple stages. After that, there was a decrease from purple to black stages estimated at 57.14 % and 40 % respectively for *Blanquette* and *Takesrit*. *Boughenfous* oils exhibited a decrease from green to spotted stages, estimated at 50 %, it maintained the same concentration in purple stage and then demonstrated a decrease.

On the other hand, the data also indicated a low concentration of tyrosol (Table II and Figure 4) but greater than hydroxytyrosol. It ranged between 0.64 and 19.56 % with regard to total biophenols.

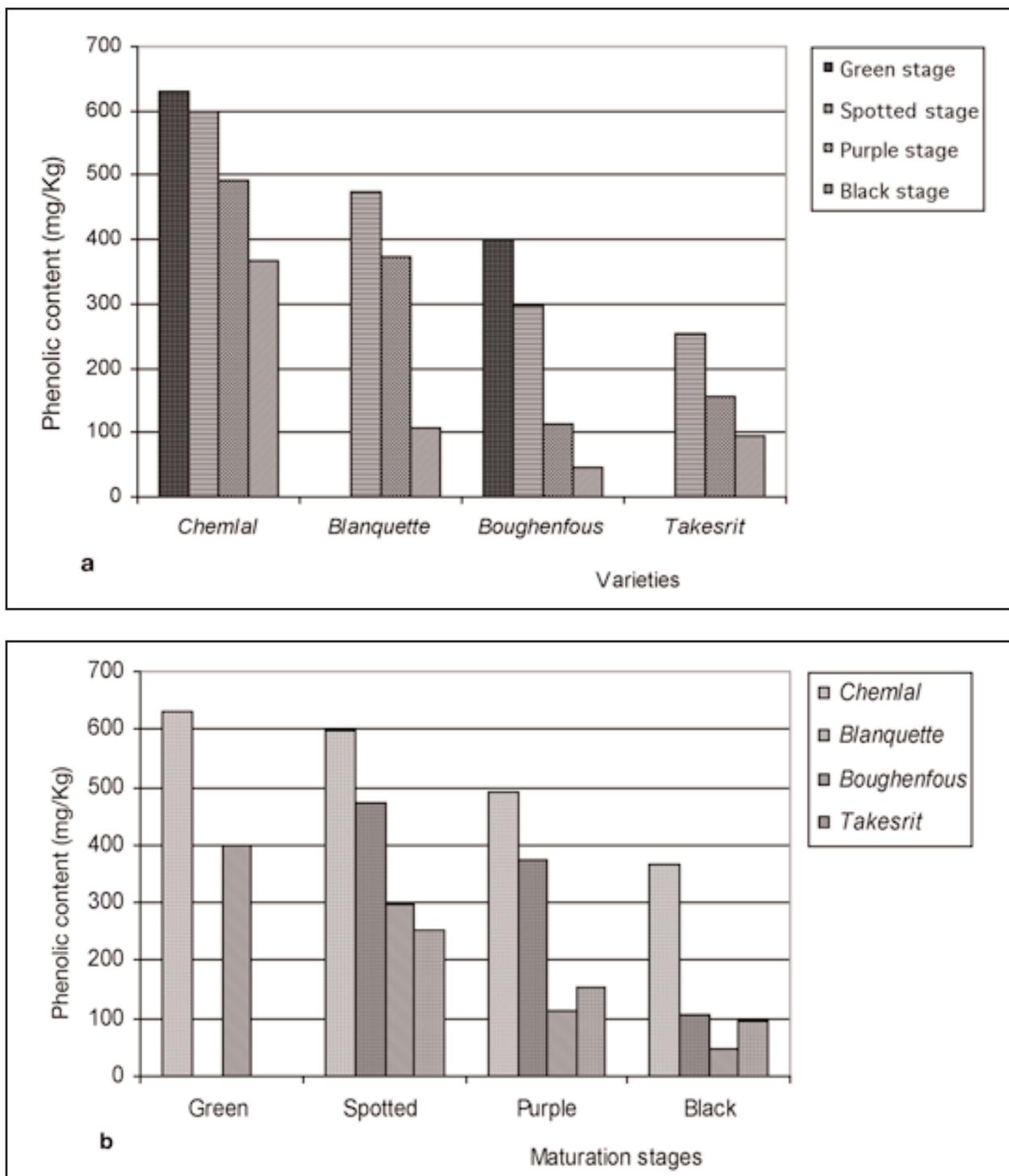
Concerning the evolution during the maturation process, there were two different types of behavior. For *Chemlal*, *Boughenfous* and *Blanquette* varieties, tyrosol content increased from the first stage to purple stage and then showed a decrease, whereas, *Takesrit* variety exhibited a gradual decrease in tyrosol content with maturation progress. So, for *Chemlal*, *Boughenfous* and *Blanquette*, the purple stage coincided with the greatest quantity of tyrosol but for *Takesrit*, it coincided with the spotted stage. The results obtained did not agree with Cimato et al. [37], who had reported that the content of tyrosol and hydroxytyrosol increased when the oil was extracted from more mature fruits. As reported by Ryan et al. [38], this difference might be due to the varietal factor.

The data shown in Table III illustrate the results obtained for biophenol profiles in Algerian virgin olive oil at different maturation stages. As can be seen, there exist highlighted differences between different virgin olive oil samples. Oleuropein derivatives were the main compounds found in *Chemlal* and *Blanquette* virgin olive oil varieties. The oil extracted from *Takesrit* variety presented the highest content of secoiridoid acids, consisting of elenolic and decarboxymethyl-elenolic acids [25]. For these three varieties, ligstroside derivatives contents came in second position. For the oil extracted from *Boughenfous* variety, there was a predominance of

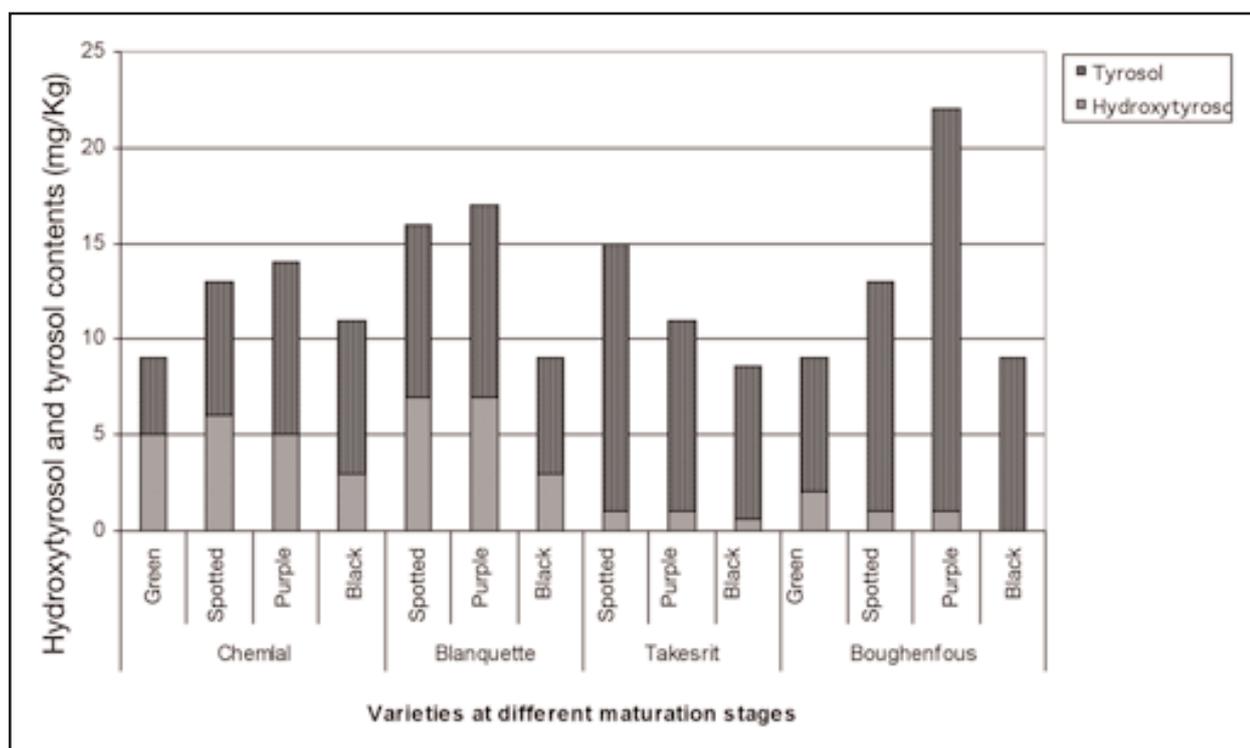
ligstroside derivatives, followed by secoiridoid acids. Several authors had reported that the secoiridoid derivatives of oleuropein and ligstroside are often the main phenolic compounds in fresh olive oil [39 - 42].

In Figure 5, it can be seen that the maturation progress spanned a decrease of oleuropein derivatives quantity in all studied varieties. We noted only

one increase of these compounds with 16.66 %, which was between the purple and black stages of *Boughenfous* variety. *Chemlal* variety contained the most important concentration of oleuropein derivatives for all stages and this class of biophenols were more present in this variety than the other analyzed biophenols. Concerning the level of decrease of



**Figure 3 (a and b)** - Comparison between the total biophenols content, analysed by HPLC, of four Algerian virgin olive oil varieties during different maturation stages



**Figure 4** - Comparison between the hydroxytyrosol and tyrosol contents, analysed by HPLC, of four Algerian virgin olive oil varieties during different ripening stages

oleuropein derivatives between green and black stages, we noted the most important diminution in *Boughenfous* variety (91.35 %) and the least decrease was reading in *Chemlal* variety (44.97 %).

For ligstroside derivatives, (Figure 5) there was a decrease during maturation progress except for *Boughenfous* variety where a slight increase of 1.42 % was found between oils extracted from green and spotted stages. Once again, *Chemlal* variety had the most important contents of these compounds, except at the spotted stage, the three others stages registered a high level of ligstroside derivatives. By passing from the first stage to the black stage, results showed that the maturation decreased the ligstroside derivatives levels by 81.51 %, 68.06 %, 63.73 % and 53.95 % respectively in *Boughenfous*, *Blanquette*, *Takesrit* and *Chemlal* olive oil varieties.

These results agree with those obtained by Baccouri et al. [43] concerning the decrease of secoiridoids (aglycon of oleuropein and ligstroside) contents during maturation process.

Our results indicated a small quantity of flavonoids between 2 % to 16 % with regard to the total biophenols, confirming this class as a minor constituent of olive oil phenolic fraction, but with the same

health significance as reported by several works [25, 36, 41, 42, 44]

Luteolin and apigenin are usually present in extra virgin olive oil in a very low amount (less than 2-3 % of the total polyphenols [42]. In general, the flavonoids were the least present compounds among the analyzed biophenol. The highest value was 31 mg/kg in *Chemlal* and *Boughenfous* varieties. This biophenol class registered different speed during maturation progress: *Boughenfous* recorded a diminution whereas *Chemlal* registered an increase. On the other hand, we found an increase followed by a decrease of these compounds for *Takesrit* and *Blanquette* varieties. This latter had the low level (4 mg/kg) at black stage but *Takesrit* totalized the most important percentage of flavonoids with regard to total biophenols (15.95 % at black stage).

The lignans, a class of phenolic compounds, were found in notable concentration with regard to the total polyphenol and *Chemlal* had raised the most important contents at all stages, about 13 % of the total biophenols.

For this class, in *Chemlal*, *Takesrit* and *Blanquette* there was a progressive decrease during maturation, the rate of diminution was respectively 41.17%, 76.47% and 90%. *Boughenfous*, which

**Table III** - Contents of major biophenol compounds of Algerian virgin olive oil (mg/kg), by HPLC analysis, with regard to cultivar and fruit ripening stages

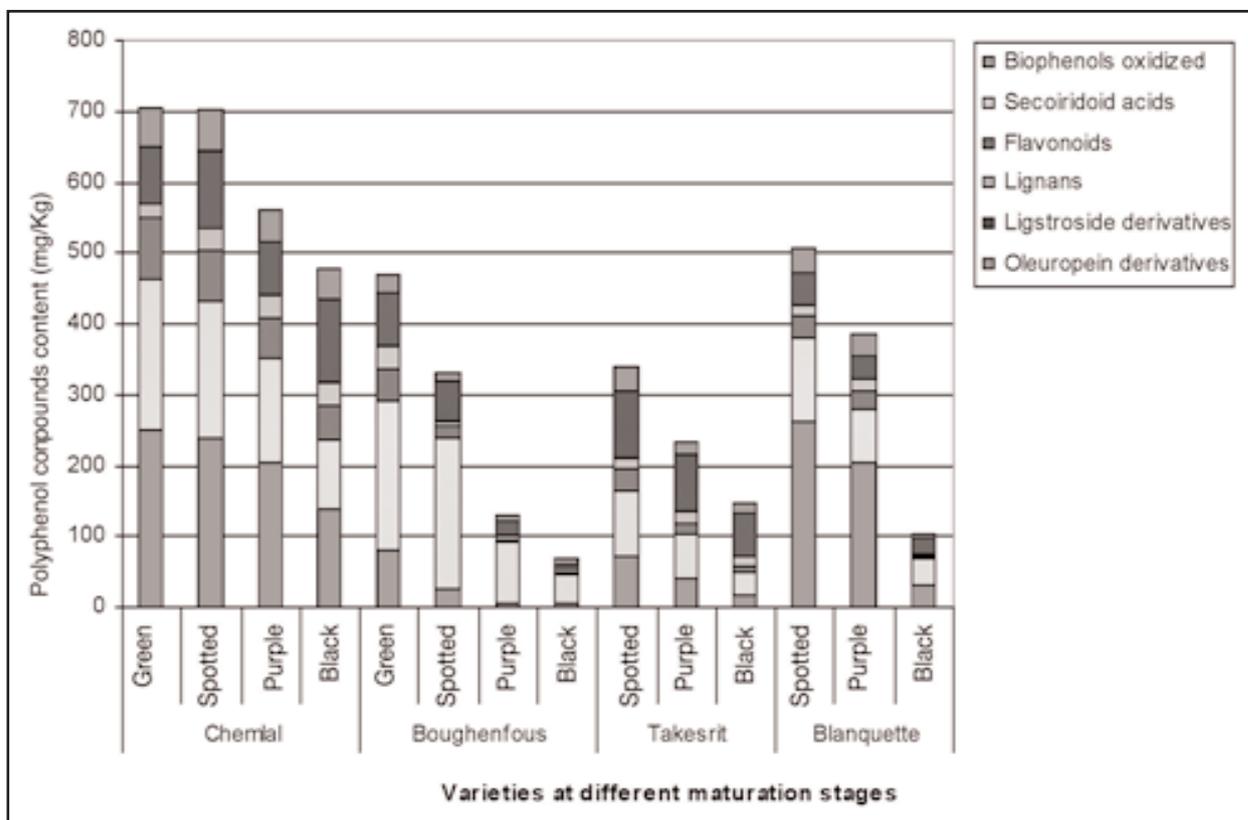
Varieties	Stages	Oleuropein derivatives (mg/kg)	Ligstroside derivatives (mg/kg)	Lignans (mg/kg)	Flavonoids (mg/kg)	Secoiridoid acids (mg/kg)	Biophenols oxidized (mg/kg)
<i>Chemlal</i>	Green	249	215	85	20	80	56
	Spotted	240	191	74	29	112	56
	Purple	203	147	60	29	77	45
	Black	137	99	50	31	117	43
<i>Boughenfous</i>	Green	81	211	44	31	76	25
	Spotted	25	214	17	6.4	57	12
	Purple	6	87	3	3.6	22	8
	Black	7	39	4	5.2	6	7
<i>Takesrit</i>	Spotted	72	91	34	13	95	35
	Purple	40	63	15	16	83	16
	Black	16	33	8	15	59	16
<i>Blanquette</i>	Spotted	262	119	30	14	47	35
	Purple	204	74	27	18	30	33
	Black	31	38	3	4	21	8

had the most important decrease of lignans (90.90 %), presented a decrease from green to purple stages followed by an increase evaluated to 33.33 % between purple and black stages.

For secoiridoid acids, with the exception of *Chemlal* variety, the three others varieties had a progressive decrease during maturation. The smallest

diminution (37.89 %) was provided by *Takesrit*, but the highest decrease (92.10 %) was in the *Boughenfous* variety.

Concerning the class of oxidized biophenol, the results showed a decrease of these compounds with the maturation progress for all varieties. The most important content was highlighted in *Chemlal*



**Figure 5** - Comparison of olive oil biophenols with regard to cultivar and fruit ripening stages of Algerian varieties

variety for all stages.

With regard to the total biophenols, *Takesrit* had totalized the most important percentages for all maturation stages. For the decreasing levels between the first and the last stages, we noted 23.21 %, 54.28 %, 72.00 % and 77.14 % respectively for *Chemlal*, *Takesrit*, *Boughenfous* and *Blanquette* varieties.

## CONCLUSION

This study, undertaken on Algerian virgin olive oils varieties has provided a new proof that both maturation and cultivars influence significantly the quantity and the quality of the olive oil phenolic fraction.

The results obtained show that cv. *Chemlal* contains the most important contents of total biophenols at all maturation stages. Cv. *Blanquette* presents the highest content of *o*-diphenols especially hydroxytyrosol, which may signify that this variety has a good stability to oxidation.

During olive maturation, there was a decrease of total biophenols in all varieties. Yet it is very important to underline that the levels of decrease are different from one cultivar to another. Cv. *Chemlal* had the least important diminution (41.68 %) and cv. *Boughenfous* had the most important one (84.08 %).

The maturation also influenced the biophenol profiles of oil. Generally, by passing from the first to the last stage, there is a decrease of the most important class of biophenols (oleuropein and ligstroside derivatives) for all studied varieties. Lignans and oxidized biophenols had also registered a decrease during maturation. For *Chemlal* and *Takesrit*, it should be underlined that there was an increase of flavonoids content during maturation.

There is a predominance of oleuropein derivatives for cvs. *Chemlal* and *Blanquette*, but we observed a predominance of ligstroside derivatives for cv. *Boughenfous*. The four studied varieties have an appreciable content of lignans. This latter class and flavonoids are well presented in cv. *Takesrit*.

These results suggest that the biophenol profiles could be used in varietal characterization.

On the whole, the green and spotted stages coincided with the most important content of biophenols, but for organoleptic reasons (bitterness attribute), the olive harvesting should be made at the purple stage, which is characterized by an appreciable content of biophenol.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the ITAFV Institute of Takarietz (Bejaia, Algeria).

## REFERENCES

- [1] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317-333 (1998)
- [2] D. Ryan, M. Antolovich, P. D. Prenzler, K. Robards, S. Lavee, Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europea* L. *Scientia Horticulturae* 92, 147-176 (2002)
- [3] D. Ryan, K. Robards, Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123, 31R-44R (1998)
- [4] A. D. Bianco, I. Muzzalupo, A. Piperno, G. Romeo, N. Uccella, Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruit. *J. Agric Food Chem.* 47, 3531-3534 (1999)
- [5] F. Paiva-Martins, M. H. Gordon, Isolation and characterization of the antioxidant component 3, 4-dihydroxyphenylethyl-4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4214-4219 (2001)
- [6] F. Visioli, C. Galli, G. Galli, D. Caruso, Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 677-684 (2002)
- [7] N. Cortesi, E. Fedeli, I composti polari di oli di oliva vergini Nota 1. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 60, 341-351 (1983)
- [8] J. L. Perrin, Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev. Franç. Corps Gras* 39, 25-32 (1992)
- [9] M. D. Solinas, L. Di Giovacchino, A. Cucurachi, I polifenoli delle olive e dell'olio di oliva. *Ann. Inst. Sper. Elaiot.* 5, 129 (1975)
- [10] G. Vlahov, Flavonoids in three olives (*Olea europea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric.* 58, 157-159 (1992)
- [11] M. Esti, L. Cinquanta, E. La Notte, Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agriculture and food Chemistry* 46, 32-35 (1998)
- [12] L. Di Giovacchino, S. Sestili, D. Di Vincenzo, Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 587-601 (2002)
- [13] D. Ryan, Changes in phenolic content of olive

- during maturation. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 265-274 (1999)
- [14] D. Ryan, P. D. Prenzler, S. Lavee, M. Antolovich, K. Robards, Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agri. Food Chem.* 51, 2532-2538 (2003)
- [15] A. Gomez-Rico, G. Fregapane, M.D. Salvador, Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oil. *Food Research International* 41, 433-440 (2008)
- [16] M. D. Salvador, F. Aranda. G. Fregapane, Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry* 73, 45-53 (2001)
- [17] J. R. Morellò, M. J. Motilva, M. J. Tovar, M. P. Romero, Changes in commercial virgin olive oil (*cv Arbequina*) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem.* 85, 357-364 (2004)
- [18] G. Beltran, Aguilera M.P, C. Del Rio, S. Sanchez, L. Martinez, Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of *hojiblanca* virgin olive oils. *Food Chemistry* 89, 207-215 (2005)
- [19] T. Gallina-Toschi, L. Cerretani, A. Bendini, M. Bonoli-Carbognin, G. Lercker, Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: an analytical approach by traditional and high resolution techniques. *Journal of Separation Science* 28 (9-10) 859-70 (2005).
- [20] M. Uceda, P. Frias, Epocas de recoleccion. Evolucion del contenido graso del fruto y de la composicion del aceite. *Proceedings of II Seminario Oleicolo Internacional Olive Oil Council.* Cordoba, Spain, 1975
- [21] H. Chimi, Y. Atouati, Determination of the optimal stage for harvesting Moroccan picholine olives by monitoring change in total polyphenols. *Olivae* 54, 56-60 (1994)
- [22] G. Montedoro, M. Bertuccioli, F. Anichini, Aroma analysis of virgin olive oil by head space volatiles and extraction techniques. In *flavour of food and beverages.* Chemistry and Technology, G. Charalambous, et G. Inglett, Academic Press, NY. 247-281 (1978)
- [23] E. Monteleone, G. Caporale, L. Lencioni, F. Favati, M. Bertuccioli, Optimization of virgin olive oil quality in relation to fruit ripening and storage. In *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*; Charalambous, G., Ed.; Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 397-418 (1995)
- [24] P. Rovellini, N. Cortesi, Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 78 (1/2) 1-14 (2002)
- [25] P. Rovellini, Elenolic acid in virgin olive oil: liquid chromatography-mass spectrometry method. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 85, 21-31 (2008)
- [26] P. Rovellini, N. Cortesi, E. Fedeli, Analysis of flavonids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-ES-MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, (Luglio), 74, 273-279 (1997)
- [27] F. Favati, G. Caporale, M. Bertuccioli, Rapid determination of phenol content in virgin olive oil. *Grasas y Aceites* 45, 68-70 (1994)
- [28] R. Mateos, J. L. Espartero, M. Trujillo, J.J. Rios, M Leon-Camacho, F. Alcludia, A. Cert, Determination of phenols, flavones, and lignanes in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultra-violet detection. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2185-2192 (2001)
- [29] *Norme Grassi e Derivati*, NGD, edito da Stazione Sperimentale Oli e Grassi, Milano. NGD C89-2007
- [30] K. Yousfi, R. M. Cert, J .M. Garcia, Changes in phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *European Food Research Technology* 223, 117-124 (2006)
- [31] L. Cerretani, A. Bendini, A. Rotondi, M. Mari, G. Lercker, T. Gallina Toschi, Evaluation of the oxidative stability and organoleptic properties of extra-virgin olive oils in relation to olive ripening degree. *Progress in Nutrition* 6 (1), 50-56 (2004)
- [32] M. J. Tovar, M. P. Romero, J. Girona, M. J. Moltiva, L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europea* L *cv Arbequina*) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science of Food and Agriculture* 82,

- 892-898 (2002)
- [33] D. Ryan, M. Antolovich, T. Herlt, P. D. Prenzler, S. Lavee, K. Robards, Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6716-6724 (2002)
- [34] B. Gandual-Rojas, M. I. Minguez-Mosquera, Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *Journal of Science and Food Agriculture* 72, 291-294 (2002)
- [35] C. Soler-Rivas, C. J. Espin, H. Wichers, Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1013-1023 (2000)
- [36] M. J. Oliveras-Lopez, M. Innocenti, C. Giaccherini, F. Ieri, A. Romani, N. Mulinacci, Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta* 73, 726-732 (2007)
- [37] A. Cimato, A. Mattei, M. Osti, Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hort.* 286, 453-456 (1990)
- [38] D. Ryan, K. Robards, S. Lavee, Determination of phenolic compounds in olives by reversed phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 832, 87-96 (1999)
- [39] M. Brenes, F.G. Hidalgo, A. Garcia, J. J. Rios, P. Garcia, R. Zamora, A. Garrido, Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 715-720 (2000)
- [40] A. Romani, P. Pinelli, N. Mulinacci, C. Galardi, F. F. Vincieri, L. Liberatore, A. Cichelli, HPLC and HRGC analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia* 53, 279-284 (2001)
- [41] P. Pinelli, C. Galardi, N. Mulinacci, F. F. Vincieri, A. Cimato, A. Romani, Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oil from Tuscany. *Food Chem.* 80, 331-336 (2003)
- [42] N. Mulinacci, C. Giaccherini, M. Innocenti, A. Romani, F. F. Vincieri, F. Marotta A. Mattei, Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. *J. Sci. Food Agric.* 85, 662-670 (2005)
- [43] O. Baccouri, M. Guerfel, B. Baccouri L. Cerretani, A. Bendini, G. Lercker, M. Zerrouk, D. D. Ben Miled, Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* 109, 743-754 (2008)
- [44] A. García, M. Brenes, C. Romero, P. García, A. Garrido, Study of phenolic compounds in virgin olive oil of the *Picual* variety. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 407-412 (2002)

Received March 22nd, 2009,  
accepted June 22nd 2009

# Caractérisation de dix variétés d'huile d'olive algérienne: étude du profil en composés phénoliques par HPLC

R. Laribi<sup>1\*</sup>  
F. Lancer<sup>1</sup>  
A. Tamendjari<sup>1</sup>  
S. Keciri<sup>3</sup>  
L. Arrar<sup>4</sup>  
S. Venturini<sup>2</sup>  
P. Rovellini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université A/Mira, Bejaia, Algérie.

<sup>2</sup>Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi Milano Italy

<sup>3</sup>Institut Technique de L'arboriculture Fruitière et de la Vigne, Takariet, Bejaia, Algérie

<sup>4</sup>Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biologie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie

*\*AUTEUR CORRESPONDANT*

*Lehouche Rahima née Laribi  
Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences  
Alimentaires  
Université A/ Mira,  
Bejaia 06000, Algérie.  
tel. +213 34 21 43 33 à 35  
fax +213 34 21 60 98  
e-mail: laribi.rahima@yahoo.fr*

La présente étude est effectuée pour une caractérisation physico-chimique de dix variétés d'huile d'olive algérienne. Les paramètres de qualité (acidité, indice de peroxyde,  $K_{232}$  et  $K_{270}$ ), la composition chimique des huiles en acides gras, le dosage des composés phénoliques totaux et *ortho*-diphénols ainsi que le profil en composés phénoliques par HPLC sont déterminés. Les résultats obtenus montrent que les dix variétés d'huile appartiennent à la catégorie d'huile d'olive vierge extra. Des variations cultivar-dépendantes ont été relevées concernant la composition en acides gras et en composés phénoliques.

**Mots clés:** Huile d'olive, caractérisation, variétés algériennes, qualité, composés phénoliques, HPLC

## **Studio del profilo dei composti fenolici mediante HPLC: caratterizzazione di dieci varietà di oli di oliva algerini**

Con il presente studio è stata effettuata una caratterizzazione fisico-chimica di dieci varietà di olio di oliva algerino.

In particolare sono stati determinati i parametri di qualità (acidità, numero di perossidi,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ), la composizione chimica degli acidi grassi, il dosaggio dei composti fenolici totali e degli orto-difenoli, oltre al profilo di tutti i composti fenolici ottenuto per HPLC.

I risultati ottenuti mostrano che le dieci varietà di olio appartengono alla categoria degli oli extra vergini di oliva.

Alcune differenze cultivar-dipendenti sono state individuate per quanto riguarda la composizione in acidi grassi e in composti fenolici.

**Parole chiave:** Olio di oliva, caratterizzazione, varietà algerine, qualità, composti fenolici, HPLC.

## 1. INTRODUCTION

La culture de l'olivier revêt une importance non négligeable pour l'Algérie. Elle couvre plus de 200.000 ha et représente 49% du verger arboricole. Cette oléiculture est localisée principalement en Kabylie et dans la région oranaise. Le nombre d'arbres plantés est estimé à 32 millions, avec une production moyenne, sur les cinq dernières campagnes (2003/2004 à 2008/2009) de 39800 tonnes (soit 1,4% de la production mondiale) [1]. L'oléiculture algérienne est caractérisée par une large gamme de variétés dont une collection (36 variétés) existe au niveau de l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne de la wilaya de Bejaia. Cette wilaya est considérée comme le premier bassin oléicole national, avec plus de 50000 hectares de vergers et 4 millions d'arbres. Les variétés les plus répandues dans cette wilaya sont *Chemlal*, *Limli*, *Azeradj* et *Takesrit* [2].

La caractérisation des variétés de l'huile d'olive est une préoccupation primordiale pour les pays producteurs notamment ceux du Bassin Méditerranéen. D'ailleurs, plusieurs travaux de recherches sont publiés dans ce domaine [3-11]. En Algérie, il existe plusieurs travaux de recherches traitant différents aspects sur l'huile d'olive [12-17]. Parmi ces travaux, peu d'entre eux ont étudié la fraction phénolique des huiles. Cette fraction est importante en raison de sa contribution aux propriétés nutritionnelles, sensorielles et à la stabilité de l'huile d'olive [18]. L'objectif de ce présent travail consiste en la caractérisation d'une dizaine de variétés algériennes à travers l'étude des paramètres de qualité d'une part et d'autre part la composition chimique des huiles en acides gras et en biophénols.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les échantillons d'olive de dix variétés ont été récoltés à la main durant la saison de récolte 2008/2009. Neuf variétés (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djmel* et *Tabelout*) ont été récoltées à partir d'une ferme pilote de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV), situé à Takarietz, daïra de Sidi Aich, wilaya de Bejaia, Algérie. La dixième variété a été récoltée à partir d'une ferme pilote située à Tazmalt (Bejaia). Les quantités d'olives récoltées sont d'environ 7 Kg pour chaque variété. Après la cueillette, les olives ont été nettoyées de toutes impuretés et ensuite transportées au laboratoire.

Après avoir déterminé l'indice de maturation des olives selon la méthode d'Uceda et Frias [19], les olives nettoyées ont subi l'extraction afin de récupérer l'huile. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un

oléodoseur de laboratoire (Levi-Deleo-Lerogsame). L'extraction consiste en un broyage des olives, un malaxage de la pâte et une séparation de l'huile par centrifugation. Une quantité d'eau tiède (30°C) à raison de 50 ml pour 920 g de pâte d'olive est ajoutée pour faciliter l'extraction. Les huiles sont recueillies dans des flacons en verre fumé, remplis, étiquetés et conservés à une température de 4°C en attendant d'être analysées.

### 2.2 LES INDICES DE QUALITÉ

L'acidité et l'indice de peroxyde sont déterminés suivant les protocoles de l'U.I.C.P.A [20]. Les absorbances dans UV à 232 nm et 270 nm sont déterminées suivant la méthode du Conseil Oléicole International [21]. Trois essais ont été effectués pour chaque paramètre.

### 2.3 COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Les esters méthyliques sont préparés suivant la méthode de la Commission Européenne [22]. Les esters méthyliques sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse de type Chrompack C 9002 équipé d'un détecteur FID. Une colonne capillaire DB 23 (60 m, 0,25 mm, 0,25 µm) a été utilisée. Le gradient de température suivant a été utilisé: de 130°C à 170°C (maintenu pendant 1 mn) à 6,5°C/mn, de 170°C à 215°C (maintenu pendant 12 mn) à 2,75°C/mn et de 215°C à 230°C (maintenu pendant 3 mn) à 40°C/mn. L'injecteur est du type split, avec un débit de 49,9 ml/mn et il est porté à une température de 270°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote à un débit de 45 ml/mn. La température du FID est de 250°C et le volume injecté est de 1 µl.

### 2.4 DOSAGE SPÉCTROPHOTOMÉTRIQUE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES TOTAUX

L'extraction des composés phénoliques est réalisée suivant le protocole de Tsimidou *et al.* [23] modifié. Cinquante grammes d'huile sont dissous dans 50 ml d'hexane, cette solution est introduite dans une ampoule à décanter et 30 ml du mélange méthanol/eau (80/20) sont ajoutés, le mélange est agité vigoureusement durant 5 min puis laissé décanter, la phase polaire (phase méthanolique) contenant les composés phénoliques est récupérée, tandis que la phase apolaire subit une 2<sup>ème</sup> et une 3<sup>ème</sup> extraction pour récupérer la fraction phénolique restante. Chaque fraction polaire récupérée subit un lavage avec 50 ml d'hexane. Les solutions sont concentrées sous vide à l'aide d'un rotavapor (K-IKA Labortechnik), à une température de 40°C, jusqu'à avoir des volumes d'extraits d'environ 2 ml. Le séchage des extraits est complété dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

L'estimation de la teneur en composés phénoli-

ques a été réalisée selon la méthode au Folin-Ciocalteu. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm. Trois essais ont été effectués. La concentration en composés phénoliques des extraits de l'huile est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

## 2.5 DOSAGE SPÉCTROPHOTOMÉTRIQUE DES ORTHO-DIPHÉNOLS

La concentration en *ortho*-diphénols des extraits méthanoliques des échantillons d'huile est déterminée suivant la méthode de Bendini *et al.* [24]. L'absorbance est mesurée à 370 nm. Les teneurs en *ortho*-diphénols des échantillons sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide caféique comme standard. Trois essais ont été effectués.

## 2.6 DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES HUILES D'OLIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

La méthode se base sur une extraction des composés mineurs polaires de nature phénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique «méthanol/eau (80/20)», suivie de leur dosage par HPLC au moyen d'un révélateur UV à 280 nm. L'étalon interne est l'acide syringique [25].

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

Les teneurs correspondantes aux polyphénols totaux, individuels et oxydés sont exprimées en mg/kg.

## 2.7 ANALYSE STATISTIQUE

Une étude statistique a été réalisée concernant l'indice de maturité, les paramètres de qualité et les dosages colorimétriques des composés phénoliques totaux et *ortho*-diphénols en appliquant une analyse de variance (ANOVA). Le test de Newman-Keuls est utilisé pour la comparaison intergroupe. Le logiciel utilisé est STATISTICA 5.5.

# 3. RESULTATS ET DISCUSSION

## 3.1 INDICE DE MATURITÉ

L'indice de maturité est un paramètre qui pourrait nous renseigner d'une façon globale sur la maturité des fruits. Les résultats obtenus (Tableau I) montrent des valeurs de l'indice de maturité qui varient entre 3,38 pour la variété *Aghenfas* et 6,79 pour la variété *Tabelout*. Cette variation peut être liée à la variation de la période de récolte étant donné que la variété *Tabelout* est récoltée à une époque tardi-

**Tableau I** - Valeurs de l'indice de maturité des olives des différentes variétés

Variété	Indice de maturité
<i>Aghenfas</i>	3,38±0,17 <sup>a</sup>
<i>Akerma</i>	4,73±0,08 <sup>d</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	4,85±0,01 <sup>d</sup>
<i>Bouricha</i>	3,88±0,17 <sup>ab</sup>
<i>Chemlal</i>	5,55±0,44 <sup>e</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	4,01±0,01 <sup>b</sup>
<i>Ferkani</i>	5,02±0,09 <sup>d</sup>
<i>Limli</i>	3,72±0,07 <sup>ab</sup>
<i>Neb Djemel</i>	4,40±0,06 <sup>c</sup>
<i>Tabelout</i>	6,79±0,12 <sup>f</sup>

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

ve par rapport aux variétés *Limli*, *Bouricha*, *Aghenfas* et *Neb Djemel*. L'analyse statistique permet de répartir nos variétés en groupes homogènes (*Aghenfas*, *Bouricha* et *Limli*), (*Akerma* et *Neb Djemel*) et (*Akerma*, *Blanquette de Guelma* et *Ferkani*). Bien que les variétés *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani* et *Tabelout* soient récoltées à la même période, elles enregistrent un écart significatif ( $p < 0,05$ ) de l'indice de maturité, ceci est probablement lié à l'effet variétal suite à des facteurs génétiques, certaines variétés entrent en maturation plus vite que d'autres. El Antari *et al.* [7] ont noté que la variété *Manzanilla* se distingue par sa vitesse élevée d'entrée en maturation.

## 3.2 LES INDICES DE QUALITÉ

Les valeurs d'acidité (Tableau II) sont très faibles et inférieures à la limite établie par le COI [26] qui est de 0,8% pour l'huile d'olive extra vierge. Les différences significatives relevées entre les variétés peuvent être liées à l'indice de maturité des olives. En effet, l'acidité augmente avec la maturité du fruit d'olive [27], suite à une augmentation de l'activité enzymatique spécialement l'enzyme lipolytique [28, 29].

Les huiles des variétés étudiées sont moins acides que les huiles des variétés tunisiennes analysées par Zarrouk *et al.* [30], pour lesquelles l'acidité libre est comprise entre 0,38 et 0,41% d'acide oléique, elles sont proches des huiles des variétés espagnols *Picual*, *Cornicabra*, *Manzanilla*, *Arbequina* et *Local* dont les valeurs sont comprises entre 0,10 et 0,25% [31] et des variétés d'huiles européennes introduites en Tunisie ainsi que la variété tunisienne *Chemlali* dont les teneurs varient entre 0,11 et 0,28% [32].

**Tableau II** - Les indices de qualité des différentes variétés d'huile d'olive

Indice Variété	Acidité (% d'acide oléique)	Indice de peroxyde (meq O <sub>2</sub> /Kg)	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>
<i>Aghenfas</i>	0,16 ± 0,00 <sup>d</sup>	4,75 ± 0,25 <sup>c</sup>	1,968 ± 0,008 <sup>d</sup>	0,155 ± 0,002 <sup>c</sup>
<i>Akerma</i>	0,08 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,75 ± 0,25 <sup>d</sup>	2,461 ± 0,017 <sup>i</sup>	0,146 ± 0,006 <sup>c</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	0,18 ± 0,008 <sup>e</sup>	8,25 ± 0,25 <sup>g</sup>	1,484 ± 0,000 <sup>b</sup>	0,206 ± 0,006 <sup>d</sup>
<i>Bouricha</i>	0,15 ± 0,00 <sup>d</sup>	4,25 ± 0,25 <sup>bc</sup>	2,205 ± 0,043 <sup>f</sup>	0,191 ± 0,003 <sup>c</sup>
<i>Chemlal</i>	0,11 ± 0,00 <sup>c</sup>	8,25 ± 0,25 <sup>g</sup>	2,443 ± 0,009 <sup>i</sup>	0,150 ± 0,005 <sup>c</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	0,05 ± 0,008 <sup>a</sup>	7,25 ± 0,25 <sup>e</sup>	1,882 ± 0,000 <sup>c</sup>	0,151 ± 0,002 <sup>c</sup>
<i>Ferkani</i>	0,11 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,25 ± 0,25 <sup>b</sup>	2,342 ± 0,011 <sup>g</sup>	0,125 ± 0,002 <sup>b</sup>
<i>Limli</i>	0,15 ± 0,00 <sup>d</sup>	8,75 ± 0,25 <sup>g</sup>	2,428 ± 0,000 <sup>h</sup>	0,143 ± 0,007 <sup>c</sup>
<i>Neb Djemel</i>	0,18 ± 0,008 <sup>e</sup>	7,75 ± 0,25 <sup>f</sup>	2,113 ± 0,000 <sup>e</sup>	0,165 ± 0,002 <sup>c</sup>
<i>Tabelout</i>	0,23 ± 0,00 <sup>f</sup>	3,25 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,155 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,107 ± 0,005 <sup>a</sup>

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

Concernant l'indice de peroxyde, les huiles analysées montrent des valeurs qui varient entre 3,25 meq O<sub>2</sub>/Kg pour la variété *Tabelout* et 8,75 meq O<sub>2</sub>/Kg pour la variété *Limli*. Les valeurs atteintes sont inférieures à la norme du COI [26] pour les huiles d'olives de catégorie extra-vierge (20 meq O<sub>2</sub>/Kg). Les huiles de nos variétés présentent des indices de peroxyde proches de ceux enregistrés pour les huiles des variétés tunisiennes *Chétoui*, *Jarboui*, *Ain Jarboua*, *Neb Jmel*, *Rekhami*, *Regregui* qui varient entre 2,63 et 7,90 meq d'O<sub>2</sub>/Kg [33], mais inférieures à certaines variétés turques (entre 7,37 et 16,08 meq d'O<sub>2</sub>/Kg) [34].

Concernant l'extinction spécifique dans l'UV, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont enregistrées entre les variétés (Tableau II) sauf entre les variétés *Akerma* et *Chemlal* pour le coefficient K<sub>232</sub> et entre les huiles *Aghenfas*, *Akerma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Limli* et *Neb Djemel*

pour le coefficient K<sub>270</sub>.

Les valeurs les plus élevées du coefficient K<sub>232</sub> sont relevées pour la variété *Akerma* (2,46) et *Chemlal* (2,44) et la valeur la plus basse pour la variété *Tabelout* (1,15). Quant au coefficient K<sub>270</sub>, les valeurs se situent entre 0,107 et 0,206. Les échantillons d'huile présentent tous des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>) inférieurs aux limites établies par le COI [26] pour une huile d'olive extra-vierge (K<sub>232</sub> ≤ 2,5 et K<sub>270</sub> ≤ 0,22).

Nos résultats des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>) sont proches de ceux enregistrés pour les variétés européennes introduites en Tunisie *Ascolana Tenera*, *Koroneiki* et *Picholine* qui varient entre 1,6 et 2,8 (pour le coefficient K<sub>232</sub>) et entre 0,1 et 0,2 (pour le coefficient K<sub>270</sub>) [35].

Les résultats d'analyses (acidité, indice de peroxyde et des coefficients d'extinction spécifique dans

**Tableau III** - Valeurs moyennes des acides gras totaux des différentes variétés d'huile d'olive (en % des acides gras totaux)

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

AGI : acides gras insaturés, AGS : acides gras saturés.

l'UV ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ) effectuées sur les huiles produites à partir des dix variétés étudiées s'inscrivent tous parfaitement dans les limites définies par le COI [26] pour une huile d'olive extra vierge, ce qui nous permet de classer les huiles issues de ces variétés dans cette catégorie. Ces résultats peuvent être expliqués en partie par les conditions appropriées de récolte et d'extraction des huiles.

### 3.3 COMPOSITION EN ACIDES GRAS

L'analyse de la composition des acides gras totaux (Tableau III) est qualitativement similaire entre les échantillons. Quantitativement, toutes les huiles des variétés étudiées présentent des teneurs en différents acides gras répondant aux normes établies par le COI [26] pour les huiles d'olives extraverges.

L'acide oléique est l'acide gras dominant de la composition des huiles d'olive. Toutes les variétés étudiées ont des proportions supérieures à 60%. Ces proportions peuvent distinguer entre les variétés, les valeurs les plus élevées sont enregistrées respectivement pour les variétés *Aghenfas* et *Tabelout* (72,13% et 70,97%) suivies des variétés *Akerma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli* et *Neb Djemel*, la plus faible valeur étant notée pour la variété *Blanquette de Guelma* (61%). Ces taux sont très proches de ceux obtenus pour des variétés marocaines [7], des variétés tunisiennes [36] et des variétés turques [37]; supérieurs aux teneurs des variétés *Chemlali* et *Chétoui* de Sousse et Sfax [38] et de la variété espagnole *Arbequina* [39] et inférieurs aux taux enregistrés par Pardo *et al.* [31] pour des variétés espagnoles. Les variétés *Aghenfas* et *Tabelout* se distinguent des autres variétés par les taux les plus faibles en acide linoléique soit 9,31 et 8,93% respectivement. Ces variétés se caractérisent ainsi par les rapports acide oléique/acide linoléique les plus élevés (7,75 et 7,95).

Des résultats similaires sont rapportés par Oueslati *et al.* [40] pour la variété tunisienne *Fakhari Douirat*. La variété *Blanquette de Guelma* présente le taux le plus élevé en acide linoléique (21,67%), elle se caractérise ainsi par le rapport acide oléique/acide linoléique le plus faible. Des résultats proches sont relevés pour la variété *Chétoui* cultivée à Sousse ville de la Tunisie [38]. Le rapport acide oléique/acide linoléique est utilisé comme paramètre de stabilité et plusieurs études ont montré qu'un rapport élevé engendre une stabilité oxydative importante [36].

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

Les taux d'acides gras saturés et insaturés nous permettent de distinguer entre les variétés. La variété *Blanquette de Guelma* présente un pourcentage en acides gras saturés de 15,65% et un total en acides gras insaturés de 86,18%. Tandis que les variétés *Limli*, *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Chemlal Tazmalt*, enregistrent respectivement, un total en acides gras saturés de 22%, 21,8%, 21,6% et 21,37% et un total en acides gras insaturés de 77,69%, 77,83%, 78,1% et 78,25%.

Des variations cultivar-dépendantes en profils d'acide gras des variétés d'huile d'olive sont relevées par plusieurs auteurs [3, 39, 41]. Bien que les variétés soient cultivées dans la même parcelle expérimentale mais elles conservent leur propre rythme de biosynthèse des lipides, la composition d'acide gras varie sensiblement d'un cultivar à un autre, selon leur patrimoine génétique.

### 3.4 LES POLYPHÉNOLS TOTAUX

Les teneurs en polyphénols totaux diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ) d'une variété à une autre (Tableau IV). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Haddada *et al.* [36] et Zarrouk *et al.* [30] quant à l'influence de la variété sur la composition quantitative en composés phénoliques dans l'huile d'olive.

**Tableau IV** - Teneurs en composés phénoliques totaux et en ortho-diphénols des différents extraits méthanoliques des huiles d'olives par méthode colorimétrique

Variété	Teneur en composés phénoliques totaux (mg/Kg)	Teneur en ortho-diphénols (mg/Kg)
<i>Aghenfas</i>	161,78 ± 6,24 <sup>c</sup>	13,15 ± 0,00 <sup>d</sup>
<i>Akerma</i>	130,92 ± 7,68 <sup>b</sup>	10,07 ± 0,00 <sup>c</sup>
<i>Blanquette de Guelma</i>	365,24 ± 8,40 <sup>f</sup>	23,37 ± 0,59 <sup>g</sup>
<i>Bouricha</i>	369,79 ± 6,88 <sup>f</sup>	15,65 ± 0,86 <sup>e</sup>
<i>Chemlal</i>	234,38 ± 6,42 <sup>d</sup>	15,49 ± 0,18 <sup>e</sup>
<i>Chemlal Tazmalt</i>	115,73 ± 4,35 <sup>a</sup>	7,54 ± 0,00 <sup>b</sup>
<i>Ferkani</i>	243,23 ± 2,87 <sup>e</sup>	19,30 ± 0,00 <sup>f</sup>
<i>Limli</i>	123,43 ± 0,79 <sup>ab</sup>	5,68 ± 0,00 <sup>a</sup>
<i>Neb Djemel</i>	420,95 ± 2,02 <sup>g</sup>	29,67 ± 0,73 <sup>h</sup>
<i>Tabelout</i>	239,79 ± 1,69 <sup>e</sup>	19,36 ± 0,97 <sup>f</sup>

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

Les teneurs les plus élevées sont enregistrées pour la variété *Neb Djemel* (420,95 mg/kg) suivie des variétés *Bouricha* (369,79 mg/kg) et *Blanquette de Guelma* (365,24 mg/kg), tandis que les teneurs les plus faibles sont obtenues pour les variétés *Akerma* (130,92 mg/kg), *Limli* (123,43 mg/kg) et *Chemlal Tazmalt* (115,73 mg/kg). Le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 161,78 à 243,23 mg/kg.

D'après Tsimidou [42], on peut classer les variétés étudiées par rapport à leurs teneurs en polyphénols comme suit: les variétés *Aghenfas*, *Akerma*, *Chemlal Tazmalt*, *Limli* sont classées dans la catégorie à teneur faible en polyphénols totaux, tandis que les variétés *Blanquette de Guelma*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Neb Djemel* et *Tabelout* sont à teneur moyenne en polyphénols totaux.

Nos variétés présentent des teneurs en polyphénols relativement proches de celles des variétés italiennes étudiées par Baiano *et al.* [43], pour lesquelles les teneurs en polyphénols sont comprises entre 133,68 et 322,18 mg/kg, et des variétés turques étudiées par Ocakoglu *et al.* [34] qui varient entre 75,46 et 333,37 mg/kg; mais supérieures aux teneurs des variétés espagnoles analysées par Cerretani *et al.* [44], qui présentent des teneurs en polyphénols totaux comprises entre 37,2 et 93,2 mg/kg, et aux variétés *Picual*, *Barnea*, *Empeltre*, *Manzanilla Californiana* et *Manzanilla Criolla* cultivées en Argentine, dont les teneurs varient de 25,3 à 92,7 mg/kg [45].

D'après Tovar *et al.* [46], au cours de la maturation, l'activité de l'enzyme PAL diminue et l'activité des estérases et des glucosidases augmente entraînant ainsi une réduction des taux des polyphénols totaux, ce qui peut expliquer les faibles concentrations obtenues pour les huiles des variétés *Tabelout* et *Chemlal* pour lesquelles nous avons noté des indices de maturités de 6,79 et 5,55 respectivement, par rapport aux variétés *Neb Djemel*, *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* dont les teneurs en polyphénols sont élevées et un indice de maturité qui varie entre 3,38 et 4,85.

### 3.5 LES ORTHO-DIPHÉNOLS

Les teneurs en *ortho*-diphénols sont représentées dans le Tableau IV. Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont relevées entre les variétés d'huiles étudiées sauf entre les huiles de *Chemlal* et *Bouricha* et entre *Ferkani* et *Tabelout*.

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

nols totaux. Un coefficient de corrélation significatif ( $p < 0,05$ ) est relevé entre le taux de polyphénols totaux et *ortho*-diphénols ( $r = 0,88$ ). Nos résultats sont en accord avec ceux de Di Giovacchino *et al.* [47] et ceux de Cerretani *et al.* [10] qui ont enregistré un coefficient de corrélation de 0,88 et 0,82 respectivement.

Les teneurs enregistrées en *ortho*-diphénols pour nos variétés sont relativement proches des variétés espagnoles *Picual*, *Hojiblanca* et *Arbequina* dont les teneurs varient entre 3,99 et 18,92 mg/kg [48], mais largement inférieures aux variétés tunisiennes telles rapportées par Zarrouk *et al.* [30] dont les teneurs varient entre 188,12 et 213,24 mg/kg.

### 3.6 DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES HUILES D'OLIVES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

L'analyse des chromatogrammes des extraits phénoliques des huiles étudiées montre une composition qualitative en composés phénoliques similaire pour l'ensemble des échantillons, mais différente d'un point de vue quantitatif. La composition de la fraction phénolique présente un intérêt dans la caractérisation variétale des huiles d'olive vierges [49].

Ce profil en composés phénoliques (Tableau V) est analogue à celui observé par d'autres auteurs pour les variétés espagnoles [50], les variétés turques [51], les variétés françaises [52] et les variétés algériennes [17].

En comparant aux taux des polyphénols totaux, pour toutes nos variétés étudiées, les secoiridoïdes représentent la classe majoritaire des polyphénols totaux, leurs distributions varient d'une variété à une autre ce qui est en accord avec les résultats de Torre-Carbot *et al.* [53], Gómez-Rico *et al.* [54] et ceux de Dabbou *et al.* [35]. C'est la variété *Neb Djemel* qui enregistre le pourcentage le plus élevé 83,61% et le pourcentage minimal est obtenu pour l'huile de la variété *Chemlal Tazmalt* (43,19%). Un coefficient de corrélation positif est enregistré  $r = 0,98$  entre le taux des polyphénols totaux et les dérivés d'oleuropéine et de ligstroside.

Les variétés *Neb Djemel* et *Bouricha* se caractérisent par les teneurs les plus élevées en dérivés d'oleuropéines (276 et 235 mg/kg) et dérivés de ligstroside (173 et 150 mg/kg), suivie des variétés *Chemlal*, *Ferkani*, *Blanquette de Guelma* et *Tabelout* dont les teneurs oscillent entre 119 et 103 mg/kg (dérivés d'oleuropéine) et entre 91 et 124 mg/kg (dérivés de ligstroside). Les teneurs les plus faibles sont relevées pour les variétés *Chemlal Tazmalt*, *Limli*, *Akerma* et *Aghenfas* dont les valeurs varient entre 36 et 61 mg/kg (dérivés d'oleuropéine) et entre 26 et 62 mg/kg (dérivés de ligstroside).

D'après Servili *et al.* [55] et Dabbou *et al.* [35], les

**Tableau V** - Teneurs en composés phénoliques (mg/Kg) des huiles d'olive de variétés algériennes par HPLC

	<i>Aghenfas</i>	<i>Akerma</i>	<i>Blanquette de Guelma</i>	<i>Bouricha</i>	<i>Chemlal</i>	<i>Chemlal Tazmalt</i>	<i>Ferkani</i>	<i>Limli</i>	<i>Neb Djemel</i>	<i>Tabelout</i>
Dérivés d'oleuropéine (mg/kg)	50	36	203	235	133	61	119	60	276	120
➤ Hydroxytyrosol	0,5	0,9	5	5	3	2	1	3	4	4
Dérivés de ligstroside (mg/kg)	26	44	115	150	101	50	91	62	173	124
➤ Tyrosol	3	4	28	26	3	3	4	26	5	11
Flavonoïdes (mg/kg)	44	49	18	25	23	34	14	10	33	13
➤ Apigénine	12	11	6	7	8	14	4	3	13	7
➤ Lutéoline	32	38	12	18	15	20	10	7	20	6
Lignanes (mg/kg)	16	38	33	51	38	41	42	25	21	29
Polyphénols oxydés (mg/kg)	14	15	51	55	54	67	13	42	19	22
Polyphénols totaux (HPLC) (mg/kg)	169	207	430	522	354	257	287	208	537	316

dérivés secoiridoides sous forme dialdehydique de l'acide élénolique liées à l'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) ou liés au tyrosol (*p*-HPEA-EDA) et les isomères d'oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA) sont les secoiridoides les plus abondants dans l'huile d'olive. Ils sont issus de l'hydrolyse des secoiridoides glucosides présents dans le fruit d'olive par activation de l'enzyme,  $\beta$ -glucosidase au cours de l'extraction [56, 57].

L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et le tyrosol (*p*-HPEA) sont les principaux alcools phénoliques présents dans les huiles des variétés étudiées ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Servili *et al.* [55] et Ocakoglu *et al.* [34]. Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs en tyrosol plus élevées que celles en hydroxytyrosol, les valeurs oscillent entre 3 et 28 mg/kg pour le tyrosol, et entre 0,5 et 5 mg/mg pour l'hydroxytyrosol. Les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* enregistrent les valeurs les plus élevées en tyrosol (28 et 26 mg/kg) et hydroxytyrosol (5 mg/kg), tandis que la valeur la plus faible en tyrosol est enregistrée pour les variétés *Aghenfas*, *Chemlal* et *Chemlal Tazmalt* (3 mg/kg) et la plus faible en hydroxytyrosol pour la variété *Aghenfas* (0,5 mg/kg).

Ce que l'on peut relever également est que malgré que la variété *Limli* se révèle pauvre en polyphénols totaux, elle enregistre un taux plus élevé en tyrosol que la variété *Neb Djemel* qui est considérée comme étant la variété la plus riche en polyphénols totaux. Les mêmes résultats sont obtenus par Dabbou *et al.* [35] sur la variété *Ascolana Tenera* introduite en Tunisie.

Nos variétés présentent des teneurs en alcool phé-

noliques (hydroxytyrosol et tyrosol) proches de celles des variétés espagnoles étudiées par Gómez-Rico *et al.* [54], pour lesquelles les teneurs en tyrosol sont comprises entre 1,2 et 29,8 mg/kg, celles en hydroxytyrosol entre 0,4 et 5 mg/kg; supérieures aux teneurs des variétés tunisiennes qui présentent des teneurs en tyrosol comprises entre 0,65 et 5,36 mg/kg et l'hydroxytyrosol comprises entre 0,05 et 1,59 mg/kg [36], mais inférieures aux teneurs des huiles commerciales siciliennes analysées par Saitta *et al.* [58] présentant des teneurs qui varient de 10,5 à 32,3 mg/Kg (tyrosol) et de 12,8 à 36,1 mg/Kg (hydroxytyrosol).

Brenes *et al.* [59] et Baiano *et al.* [43] ont observé que les teneurs en tyrosol et hydroxytyrosol sont généralement faibles dans l'huile nouvellement extraite mais augmentent graduellement au cours du stockage parallèlement à une diminution des formes phénoliques complexes telle que 3,4-DHPEA-EDA et *p*-HPEA-EDA ce qui permet de déduire que la dégradation de ces derniers génère les phénols simples telles que l'hydroxytyrosol et le tyrosol.

Qualitativement parlant, pour toutes nos huiles analysées, les lignanes viennent en 2<sup>ème</sup> position après les secoiridoides à l'exception des huiles des variétés *Aghenfas*, *Akerma* et *Neb Djemel* dont le taux des flavonoïdes sont supérieurs à ceux des lignanes, les mêmes résultats sont observés par García-Villalba *et al.* [50] sur les variétés espagnoles où les variétés *Picual* enregistrent des teneurs plus élevées en flavonoïdes par rapport aux lignanes, alors que pour la variété *Arbequina*, ils ont relevé des teneurs plus importantes en lignanes. Les pourcentages en lignanes de nos huiles

varient entre 3,91% (*Neb Djemel*) et 15,95% (*Chemlal Tazmalt*) par rapport aux polyphénols totaux.

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en lignanes, la variété *Bouricha* se caractérise par la teneur la plus élevée (51 mg/kg) suivie des variétés *Ferkani* et *Chemlal Tazmalt* avec des teneurs de 42 et 41 mg/kg respectivement, la valeur la plus faible est relevée pour la variété *Aghenfas*, le reste des variétés présentent des teneurs comprises dans l'intervalle de 21 et 38 mg/kg.

Bien que la variété *Neb Djemel* se révèle être riche en polyphénols totaux (537 mg/kg), elle ne renferme que 21 mg/kg en lignanes par contre la variété *Chemlal Tazmalt* qui est moins riche en polyphénols totaux (257 mg/kg) montre une teneur en lignanes de 41 mg/kg. En plus du facteur variété, ceci peut être attribué à l'origine géographique [60]. Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* [61] sur la variété espagnole *Arbequina* cultivée à Tarragona et Jaén dont les teneurs sont de 65 mg/kg et 61 mg/kg respectivement, et largement inférieurs à ceux des variétés étudiées par Brenes *et al.* [59] dont les teneurs sont supérieures à 100 mg/kg, mais supérieurs aux teneurs des variétés *Picual* et *Hojiblanca* analysées par García-Villalba *et al.* [50] et les variétés tunisiennes analysées par Haddada *et al.* [33] dont les teneurs oscillent entre 3,15 et 9,35 mg/kg.

Toutes les variétés d'huiles étudiées présentent des teneurs appréciables en flavonoïdes, les variétés *Akerma* et *Aghenfas* se caractérisent par les teneurs les plus élevées 49 et 44 mg/kg respectivement, alors que les variétés *Limli*, *Tabelout* et *Ferkani* enregistrent les teneurs les plus faibles (10, 13 et 14 mg/kg respectivement). Les teneurs du reste des variétés oscillent entre 18 et 41 mg/kg. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus par Criado *et al.* [61] et ceux de Ilyasoglu *et al.* [51].

Les flavonoïdes représentent 26,03% des polyphénols totaux pour la variété *Aghenfas* alors qu'elle enregistre la teneur la plus faible en polyphénols totaux, tandis que les variétés *Blanquette de Guelma* et *Tabelout* enregistrent les taux les plus faibles (4,18% et 4,11%).

D'après les résultats obtenus, l'apigénine et la lutéoline sont les flavonoïdes présents dans toutes les huiles analysées, avec une prédominance de la lutéoline à l'exception de la variété *Tabelout*. Les variétés étudiées par Andjelkovic *et al.* [11] et García-Villalba *et al.* [50] présentent un taux plus élevé en lutéoline alors que les variétés turques récoltées en 2006 révèlent une dominance de l'apigénine [34]. La variété *Akerma* se caractérise par la teneur la plus élevée en lutéoline (38 mg/kg), cette teneur est proche de celles des variétés françaises obtenues par Andjelkovic *et al.* [52]. C'est la variété

*Chemlal Tazmalt* qui enregistre la teneur la plus importante en apigénine (14 mg/kg) avec aussi une teneur assez élevée en lutéoline (20 mg/kg). On observe également que les variétés *Limli* et *Tabelout* se distinguent par leurs teneurs les plus faibles en apigénine (3 mg/kg) et lutéoline (6 mg/kg) respectivement, ces teneurs sont proches de celles rapportées par Andjelkovic *et al.* [11]. Pour le reste des variétés, les valeurs varient entre 7 et 32 mg/kg (lutéoline) et 4 et 13 mg/kg (apigénine).

D'après Brenes *et al.* [62], la concentration de la lutéoline diminue avec la maturation du fruit d'olive par contre celle de l'apigénine ne subit aucun changement ce qui pourrait expliquer les faibles teneurs en lutéoline chez la variété *Tabelout* qui présente un indice de maturité élevé (6,97).

#### 4. CONCLUSION

Cette étude a permis de donner une première appréciation de la qualité et de la composition des huiles d'olive de variétés algériennes. Les résultats de l'évaluation des paramètres de qualité ont montré que les dix variétés étudiées appartiennent toutes à la catégorie de l'huile d'olive vierge "extra".

Concernant la composition chimique des huiles en acides gras et en composés phénoliques, des variations cultivars-dépendantes ont été relevées. Pour les acides gras, toutes les huiles contiennent des teneurs supérieures à 60% en acide oléique, toutefois, les variétés *Aghenfas* et *Tablout* ont enregistré les plus grandes teneurs (> 70%) et les plus faibles teneurs en acide linoléique. La variété *Blanquette de Guelma* se distingue par le taux le plus élevé en acide linoléique (21,67%) et la variété *Akerma* a enregistré la plus faible teneur en acide gadoléique.

Les résultats de ce travail peuvent être considérés comme une caractérisation préliminaire des huiles d'olive algériennes en composés phénoliques. Le profil en composés phénoliques individuels nous permet de faire une distinction variétale, les variétés *Neb Djemel* et *Bouricha* se caractérisent par les teneurs les plus élevées en dérivés d'oleuropéine (276 et 235 mg/kg respectivement) et en dérivés ligstroside (173 et 150 mg/kg respectivement). Tandis que, les variétés *Blanquette de Guelma* et *Bouricha* enregistrent les taux les plus élevés en tyrosol (28 et 26 mg/kg) et hydroxytyrosol (5 mg/kg), la variété *Limli* se distingue des autres variétés par son taux élevé en tyrosol (26 mg/kg) alors qu'elle a enregistré une teneur faible en polyphénols totaux. La variété *Bouricha* se caractérise par la teneur la plus élevée en lignanes (51 mg/kg), tandis que les variétés *Akerma* et *Aghenfas* enregistrent les taux les plus faibles en polyphénols totaux mais elles se caractérisent par les teneurs les plus élevées en fla-

venoïdes 49 et 44 mg/kg respectivement. Enfin, il est évident que la fraction phénolique peut fournir un outil précieux dans la caractérisation variétale des huiles d'olive.

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements les plus vifs s'adressent aux directeurs et au personnel des institutions suivantes: ITAFV de Takarietz (Bejaia), la ferme pilote A/Mira de Tazmalt (Bejaia) et le laboratoire central de Cevital à Bejaia.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Conseil Oléicole International (novembre 2008). Huiles d'olive. Production, 1 p.
- [2] Conseil Oléicole International. L'oléiculture en Algérie. ALGERIE E108/Doc n° 4, 22p
- [3] P. Inglese, L'influence de la variété sur les caractéristiques qualitatives de l'huile d'olive. *Olivae* (54), 42-44 (1994)
- [4] A. Koutsaftakis, F. Kotsifaki, E. Christopoulou, A. Cert, Etude triennale sur les variations de plusieurs caractéristiques chimiques et de divers composants mineurs des huiles d'olive vierges obtenues à partir d'olives cueillies à différents degrés de maturité. *Olivae* (80), 22-27 (2000).
- [5] L. Abaza, M. Msalem, D. Douad, M. Zarrouk, Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 9 (2), 9-174 (2002)
- [6] R. Aparicio, G. Luna, Characterization of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipids Science and Technology* 104, 1-12 (2002)
- [7] A. El Antari, A. El Moudni, H. Ajana, Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. *Olivae* (95), 26-31 (2003)
- [8] G. Dugo, V. Lo Turco, D. Pollicino, E. Mavrogeni, F. Pipitone, Caractérisation d'huiles d'olive vierges siciliennes. Variation qualitative des huiles des fruits des cultivars « *Biancolilla*, *Nocellara del Belice*, *Cerasuola*, *Tonda Iblea* et *Crastu* » en fonction des techniques et de l'époque de récolte des olives. *Olivae* (101), 44-52 (2004)
- [9] M. Paz Aguilera, G. Beltran, D. Ortega, A. Fernandez, A. Jimenez, M. Uceda, Characterization of virgin olive oil of Italian olive cultivars: Frantoio and Leccino, grown in Andalusia. *Food Chemistry* 89, 387-391 (2005)
- [10] L. Cerretani, A. Bendini, A. Del Caro, A. Piga, V. Vacca, M.F. Caboni, T. G. Toschi, Preliminary characterization of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *European Food Research and Technology* 222, 354-36 (2006)
- [11] M. Andjelkovic, S. Acun, V. Van Hoed, R. Verhe, J. Van Camp, Chemical composition of Turkish olive oil-Ayvalik. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 135-140 (2009)
- [12] M. Talantikite, H. Ait Amar, Composition acide des huiles d'olives des trois cultivars d'Algérie. *Olivae* 5 (23), 29-31 (1988)
- [13] R. Bousseadj, Contribution à la connaissance analytique de l'huile d'olive algérienne. *Olivae* (57), 50-53 (1995)
- [14] A. Tamendjari, F. Angerosa, M.M. Bellal, Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of Chemlal olives. *Ital. J. Food Sci.* 16 (3), 343-354 (2004a)
- [15] A. Tamendjari, M.M. Bellal, R. Laribi, F. Angerosa, Impact de l'attaque de *Bactrocera oleae* et du stockage des olives de la variété *Chemlal* sur la qualité de l'huile. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 81 (1), 23-27 (2004b)
- [16] M. Douzane, M.M. Bellal, Contribution à la caractérisation des huiles de quelques variétés populations d'olive algériennes : étude de quelques composés mineurs de la fraction insaponifiable. *Olivae* (103), 33-41 (2005)
- [17] R. Laribi, P. Rovellini, L. Deflaoui, A. Aidli, S. Metouchi, L. Arrar, A. Tamendjari, Evolution of biophenolic compounds in virgin olive oil during olive ripening of Algerian cultivars. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 86 (3), 151-161 (2009)
- [18] J.L. Perrin, Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev. Franç. Corps Gras* 39, 25-32 (1992)
- [19] M. Uceda, P. Frias, Epocas de recoleccion. Evolucion del contenido graso del fruto y de la composicion del aceite. *Proceedings of II Seminario Oleicolo Internacional Olive Oil Council. Cordoba Spain* (1975)
- [20] Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (U.I.C.P.A.), Méthode d'analyses des matières grasses et dérivés. 6<sup>ème</sup> édition. Edition ETIG Paris (1979)
- [21] Conseil Oléicole International (C.I.O.), Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet. COI/T20/Doc6 N° 19 du 6 Juin 1996, Madrid, Espagne
- [22] E.C. Regulation n° 796 of May 2006 changes EC-Regulation. 2568/91. Official J.L. 128/815/05/02. 2002. Bruxelles (Belgium) (2002)
- [23] M. Tsimidou, G. Papadopolus, D. Boskou, Phenolic compounds and stability of virgin

- olive oil part 1. *Food Chem.* (45), 141-144 (1992)
- [24] A. Bendini, M. Bonoli, L. Cerretoni, B. Bigguzzi., G. Lercker., T.G. Toschi Liquidliquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olives oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography* (985), 425-433, (2003).
- [25] NGD C89-2007. Determination of biophenols in olive oil by HPLC. Natural and oxidized oleuropein and ligstroside derivatives, lignans, flavonoids and phenolic acids.
- [26] C.O.I, Norme commerciale applicabile aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. COI/T.15/NC n° 3/Rév. 4. Conseil Oléicole International (2009)
- [27] K. Yousfi, R.M. Cert, J.M. Garcia, Changes in phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *European Food Research Technology* 223, 117-124 (2006)
- [28] M.D. Salvador, F. Aranda. G. Fregapane, Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry* 73, 45-53 (2001)
- [29] N. Ben Youssef, W. Zarrouk, A. Carrasco-Pancorbo, Y. Ouni, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, D. Daoud, M. Zarrouk, Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 199-204 (2010).
- [30] W. Zarrouk, F.M. Haddada, B. Baccouri, I. Oueslati, W. Taamalli, Z. Fernandez, L. Lizzani-Cuvelier, D. Daoud, M. Zarrouk, Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European Journal of Lipids Science and Technology* 110, 81-88 (2008)
- [31] J.E. Pardo, M.A. Cuesta, A. Alvarruiz, Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel"(Ciudad Real, Spain). *Food Chemistry* 100, 977-984 (2007)
- [32] S. Dabbou, I. Rjiba, A. Nakbi, N. Gazzah, M. Issaoui, M Hammami, Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to Chemlali cultivars. *Scientia Horticulturae* 124, 122-127 (2010)
- [33] F. M Haddada, D. Krichène, H. Manai, I. Oueslati, D. Daoud, M. Zarrouk, Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 905-913 (2008)
- [34] D. Ocakoglu, F. Tokatli, B. Ozen, F. Korel, Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry* 113, 401-410 (2009)
- [35] S. Dabbou, M. Issaoui, M. Servili, A. Taticchi, S. Sifi, G.F. Montedoro, M. Hammami, Characterisation of virgin olive oils from European olive cultivars introduced in Tunisia. *European Journal of Lipids and Science Technology* 111, 392-401 (2009)
- [36] F.M. Haddada, H. Manai, I. Oueslati, D. Daoud, J. Sanchez, E. Osorio, M. Zarrouk, Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10941-10946 (2007)
- [37] G. Gurdeniz, B. Ozen, F. Tokatli, Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *European Food Research & Technology* 227, 1275-1281(2008)
- [38] M. Guerfel, Y. Ouni, A. Taamalli, D. Boujnah, E. Stefanoudaki, M. Zarrouk, Effect of location on virgin olive oils of the two main Tunisian olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 926-932 (2009)
- [39] A. Allalout, D. Krichène, K. Methenni, A. Taamalli, I. Oueslati, D. Daoud, M. Zarrouk, Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae* 120, 77-83 (2009)
- [40] I. Oueslati, C. Anniva, D. Daoud, M.Z. Tsimidou, M. Zarrouk, Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: The commercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry* 112, 733-741(2009)
- [41] G. Di Bella, R. Maisano, L. La Pera, V. Lo Turco, F. Salvo, G. Dugo, Statistical characterization of Sicilian Olive oils from the peloritana and maghrebian zones according to the fatty acid profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (16), 6568-6574 (2007)
- [42] M. Tsimidou, Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Journal of Food Science* 10 (2), 99-112 (1998)
- [43] A. Baiano, G. Gambacorta, C. Terracone, M.A. Previtali, C. Lamacchia, E. La Notte, Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science* 74 (2), 177-183 (2009)
- [44] L. Cerretani, M.J. Motilva, M.P. Romero, A. Bendini, G. Lercker, Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. Euro-

- pean food research & technology 226, 1251-1258 (2008)
- [45] L.N. Ceci, A.A. Carelli, Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *Journal of American Oil Chemist's Society* 84, 1125-1136 (2007)
- [46] M.J. Tovar, M. Paz Romero, J. Girona, M.J. Motilva, L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv *Arbequina*) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science of Food and Agriculture* 82, 892-898 (2002)
- [47] L. Di Giovacchino, N. Costantini, A. Serraiocco, G. Surricchio, C. Basti, Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European journal of lipid science and technology* 103, 279-285 (2001)
- [48] F. Gutiérrez, M.J. Villafranca, M.J. Castellano, Changes in the Main Components and Quality Indices of Virgin Olive Oil During Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (7), 669-676 (2002)
- [49] W. Dhifi, M. Ben Khedher, M. Elyes Kechouk, B. Marzouk, Etude qualitative et quantitative des arômes et des polyphénols de quelques huiles d'olive de Tunisie. *Olivae* (105), 36-40 (2006)
- [50] R. Garcia-Villalba, A. Carrasco-Pancorbo, C. Oliveras-Ferraro, A. Vazquez-Martin, J.A. Menendez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 416-429 (2010)
- [51] H. Ilyasoglu, B. Ozcelik, V.V. Hoed, R. Verhe, Characterization of Aegean Olive Oils by Their Minor Compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, DOI 10.1007/s11746-009-1538-5 (2010)
- [52] M. Andjelkovic, C.J. Van, M. Pedra, K. Renders, C. Socaciu, R. Verhé, Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (13), 5181-5187 (2008)
- [53] D. De La Torre-Carbot, O. Jauregui, E. Gimeno, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventos, M.C. Lopez-Sabater, Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (11), 4331-4340 (2005)
- [54] A. Gómez-Rico, G. Fregapane, M.D. Salvador, Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International* 41, 433-440 (2008)
- [55] M. Servili, R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G. Montedoro, G. Morozzi, Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography* 1054, 113-127 (2004)
- [56] M. Servili, G. Montedoro, Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 602-613 (2002)
- [57] L.S. Artajo, M.P. Romero, M. Suarez, M.J. Motilva, Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology* 225, 617-625 (2007)
- [58] M. Saitta, F. Salvo, G. Di Bella, G. Dugo, G.L. La Torre, Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry* 112, 525-532 (2009)
- [59] M. Brenes, A. Garcia, P. Garcia, A. Garrido, Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11), 5609-5614 (2001)
- [60] J. Tovar, M.J. Motilva, P.M. Romero, Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49 (11), 5502-5508 (2001)
- [61] M.N. Criado, J.R. Morello, M.J. Motilva, M.P. Romero, Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *Journal of American Oil Chemists Society* 81, 633-640 (2004)
- [62] M. Brenes, A. Garcia, P. Garcia, J.J. Rios, A. Garrido, Phenolic compounds in spanish olive oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47 (9), 3535-3539 (1999)

Received June 8, 2010

Accepted September 22, 2010



## Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities

F. Laincer<sup>a</sup>, R. Laribi<sup>a</sup>, A. Tamendjari<sup>a,✉</sup>, L. Arrar<sup>b</sup>, P. Rovellini<sup>c</sup> and S. Venturini<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Bejaia, Algeria

<sup>b</sup>Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biologie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algeria

<sup>c</sup>INNOVHUB – Stazioni Sperimentali per l'Industria-Via Giuseppe Colombo N. 79- Milan- Italy

✉Corresponding author: [abderezakt@yahoo.fr](mailto:abderezakt@yahoo.fr)

Submitted: 4 March 2013; Accepted: 9 September 2013; Published on line: 13/02/2014

**SUMMARY:** The phenolic compositions, antioxidant and antimicrobial activities against six bacteria of phenolic extracts of olive oil varieties from eleven Algerian varieties were investigated. The antioxidant activity was assessed by determining the scavenging effect on the DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals. The antimicrobial activity was measured as a zone of inhibition and minimum inhibitory concentration (MIC) on human harmful and foodborne pathogens. The results show that total phenols was significantly ( $p < 0.05$ ) correlated with DPPH ( $r = 0.72$ ) and ABTS<sup>+</sup> radicals ( $r = 0.76$ ). Among the bacteria tested, *S. aureus* and to a lesser extent *B. subtilis* showed the highest sensitivity; the MIC varied from 0.6 to 1.6 mg·mL<sup>-1</sup> and 1.2 to 1.8 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively. The results reveal that Algerian olive oils may constitute a good source of antioxidant and antimicrobial agents.

**KEYWORDS:** *Antibacterial activity; Antioxidant activity; Olive oil; Phenols*

**RESUMEN:** *Aceites de oliva de Argelia: Componentes fenólicos, actividades antioxidante y antibacteriana.* Se ha estudiado la composición fenólica y las actividades antioxidante y antimicrobiana, contra seis bacterias, de extractos de aceites de oliva de once variedades argelinas. La actividad antioxidante se evaluó mediante la determinación del efecto captador de radicales de DPPH y ABTS<sup>+</sup>. La actividad antimicrobiana se midió como zona de inhibición y como concentración inhibitoria mínima (MIC) sobre bacterias perjudiciales humanas y agentes patógenos transmitidos por los alimentos. Los resultados mostraron que los fenoles totales está significativamente ( $p < 0,05$ ) correlacionados con DPPH ( $r = 0,72$ ) y los radicales ABTS<sup>+</sup> ( $r = 0,76$ ). Entre las bacterias ensayadas, *S. aureus* y, en menor grado *B. subtilis* mostraron la mayor sensibilidad; el MIC varió de 0,6 a 1,6 mg·mL<sup>-1</sup> y 1,2 a 1,8 mg·mL<sup>-1</sup> respectivamente. Los resultados muestran que los aceites de oliva argelinos pueden constituir una buena fuente de antioxidantes y agentes antimicrobianos.

**PALABRAS CLAVE:** *Aceite de oliva; Actividad antibacteriana; Actividad antioxidante; Fenoles*

**Citation/Cómo citar este artículo:** Laincer F, Laribi R, Tamendjari A, Arrar L, Rovellini P, Venturini S. 2014. Olive oils from Algeria: Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Grasas Aceites* 65 (1): e001. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.035713>.

**Copyright:** © 2014 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence.

## 1. INTRODUCTION

The Mediterranean diet is associated with lower incidences of atherosclerosis, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and certain types of cancer. The apparent health benefits have been partially ascribed to the dietary consumption of virgin olive oil by Mediterranean populations (Cicerale *et al.*, 2010). The beneficial effects of virgin olive oil were attributed to its high monounsaturated fatty acids particularly oleic acid and minor compounds such as phenolic compounds, tocopherols and carotenoids (Visioli and Galli, 1998).

Recently, phenolic compounds present in olive oil have received much attention due to their beneficial functional and nutritional effects including antioxidant and antimicrobial activities. In addition to extending the shelf life of foods by inhibiting lipid peroxidation, phenolic compounds scavenge free radicals and can consequently protect the human body (Cicerale *et al.*, 2009). Numerous studies have demonstrated the antioxidant activity of olive oil polyphenols (Visioli *et al.*, 2002, Servili *et al.*, 2009).

Moreover, several studies have shown that the phenolic compounds in olive oil have a high antimicrobial activity against a broad spectrum of foodborne pathogens (Medina *et al.*, 2006; Karaosmanoglu *et al.*, 2010). Oleuropein (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2004), hydroxytyrosol (Bisignano *et al.*, 1999) which inhibits or delays the growth rate of a range of bacteria. Romero *et al.* (2007) reported that the dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycon and the dialdehydic form of decarboxymethyl ligstroside aids in inhibiting the growth of *Helicobacter pylori*. Recently, Bubonja-Songe *et al.* (2011) indicated that olive oil polyphenols can be used as an alternative for the prevention of food spoilage and *monocytogenes* contaminated with *Listeria*. The increasing resistance to antibiotics represents the main factor justifying the need to find out and/or develop new antimicrobial agents. Although strategies have been proposed in an attempt to control the pathogenic bacteria spread, the search for new methods to treat infections stimulates the investigation for natural compounds.

Algeria, one of the main producers of olive oil in the world (9th), has a wide range of varieties. Several studies on Algerian olive oil characterization have been carried out. However, there is no report about antioxidant and antimicrobial activities of phenolic compounds in the olive oil produced in Algeria. The present work was undertaken (i) to identify and quantify the phenolic compounds from various olive oils from Algerian varieties using a reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) system and (ii) to evaluate the antioxidant and antimicrobial properties of olive

oils obtained from different varieties of olives grown in the Bejaia region (Algeria).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Fruit harvest

The extra virgin olive oils used in this work came from eleven different Algerian varieties of olives: *Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel*, *Tabelout* and *Chemlal Tazmalt*.

Fruits were manually harvested from an orchard located in Takerietz (Bejaia), during the 2008 and 2009 seasons, with the exception of the *Chemlal Tazmalt* variety which was harvested in the Tazmalt region (Bejaia) in east-central Algeria. Collection, transportation and processing of the olive samples were carried out rapidly and with care. Therefore, only fresh drupes without damage were selected.

### 2.2. Olive oil extraction

Virgin olive oil samples were obtained using a laboratory oil mill (Levi-Deleo-Lerogsame), consisting of three basic elements: a hammer crusher, thermo-beater (mixer) and a pulp centrifuge. The olive fruits were milled in the hammer crusher, and then the olive paste was kneaded for 30 min with the addition of warm water (50 mL of water was added to 920 g of paste). After the vertical centrifugation, the oil was collected and left to stand. The oil samples were stored in amber glass bottles at 4 °C in the dark without headspace until analysis.

### 2.3. Quality indices

Acidity and peroxide values were determined following the analytical methods described by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1979).  $K_{232}$  and  $K_{270}$  were determined according to the analytical methods described by the International Olive Oil Council (IOOC, 1996).

### 2.4. Liquid–liquid extraction of phenolic compounds

A Liquid–liquid extraction system was carried out in the same extraction conditions, reported by Tsimidou *et al.* (1992) with some modifications. Briefly, 50 g of oil were dissolved in 50 mL of hexane, the solution was extracted successively three times with 30 mL of an MeOH/water (80:20, v/v) solution. The extracts were combined and washed twice with 50 mL of hexane to remove the residual oil. The hexane phase was discarded, and the methanolic solutions were concentrated and dried using rotary evaporator under vacuum at 40 °C. Finally, the residue was re-dissolved in a solution of MeOH/water (80:20, v/v).

## 2.5. Determination of total phenols

The total phenolic content of the extract was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method at 765 nm, using gallic acid as calibration curve (Favati *et al.*, 1994).

## 2.6. Determination of *O*-diphenols

According to Bendini *et al.* (2003), 0.5 mL of phenolic extract obtained from olive oil were dissolved in 5 mL of MeOH-water (1:1, v/v); a mixture of 4 mL of the solution and 1 mL of a 5% solution of sodium molybdate dihydrate in MeOH-water (1:1, v/v) was shaken vigorously. After 15 min, the absorbance at 370 nm was measured using caffeic acid for the calibration curve with a glass cuvette.

## 2.7. Chromatographic determination of phenolic compounds

A solution of internal standard (1 mL of 0.015 mg·mL<sup>-1</sup> of syringic acid in water/MeOH (20:80 v/v) was added to a sample of virgin olive oil (2 g). The mixture was shaken (30 s) and 5 mL of extraction solution water and MeOH (20:80 v/v) were added. The obtained mixture was shaken for 1 min, extracted for 15 min in an ultrasonic bath and then centrifuged at 5000 r.p.m. (2500 g) for 25 min at T= 20 °C (NGD., 2010). The upper phase was filtered with a 0.45 µm PVDF syringe filter. 20 µL of the filtered solution were analyzed by HPLC with a UV detector at 280 nm. The HPLC system used consisted of a C18 Spherisorb ODS-2 reverse column (5 µm, 250 mm, 4.6 mm). Elution was performed at a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> following a gradient composed of a mixture of water and orthophosphoric acid (99.8:0.2 v/v) (solvent A), MeOH (solvent B) and acetonitrile (solvent C): from 96% (A) – 2% (B) – 2% (C) to 0% (A) – 50% (B) – 50% (C) in 60 min. The last gradient was kept for 10 min. The successive gradient was: from 0% (A) – 50% (B) – 50% (C) to 96% (A) – 2% (B) – 2% (C) in 2 min and then kept for 10 min.

The identification of phenolic compounds was performed by HPLC-MS. The main phenolic compounds were identified by comparison with relative retention times and UV spectra of pure standards.

## 2.8. Determination of antioxidant activity

### 2.8.1. DPPH radical- Scavenging assay

The capacity of methanolic extracts of olive oil to reduce the DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) radical was assessed using the method of Keceli and Gordon (2001). 0.1 mL of a methanolic extract were added to 2.9 mL of a solution of DPPH (6.10<sup>-5</sup> M) in methanol for 30 min and the absorbance was

recorded at 515 nm. The scavenging activity of the extracts was evaluated according to the formula:

$$\text{percent of scavenging} = [A_0 - (A_1 - A_s)] / A_0 \cdot 100$$

where  $A_0$  is the absorbance of DPPH alone,  $A_1$  is the absorbance of DPPH + extract and  $A_s$  is the absorbance of the extract alone.

### 2.8.2. Scavenging activity against the ABTS<sup>+</sup> radical cation

The total antioxidant activity of extracts was measured by the ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay of Re *et al.* (1999) with minor modifications. ABTS<sup>+</sup> was generated by the oxidation of ABTS with potassium persulfate. Prior to assay, the ABTS<sup>+</sup> stock solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.700 ± 0.020 at 734 nm. Then 990 µL of a diluted ABTS<sup>+</sup> solution was mixed with 10 µL of the test sample, and the absorbance was measured at 734 nm after 30 min. The inhibition percentage of absorbance was calculated using the formula specified in the DPPH method. The antioxidant capacity of test compounds was expressed as IC<sub>50</sub><sup>+</sup>, the concentration necessary for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup>.

## 2.9. Determination of antibacterial activity

### 2.9.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used as test organisms were *Escherichia coli* Nalidixic Acid Resistant NAR, *Klebsiella pneumoniae* E47, *Listeria innocua* CLIP 74915, *Pseudomonas aeruginosa*; ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The bacteria were cultured at 37 °C in a nutrient broth and agar medium. Before experimental use, the cultures from solid medium were sub-cultivated in a liquid medium, incubated for 18 h and used as the source of inoculums for each experiment.

### 2.9.2. Antibacterial Activity Assay

The agar diffusion method (Kappel *et al.*, 2008) was used for the antibacterial assay. Suspensions of the microorganisms were prepared to contain approximately 10<sup>8</sup> CFU/mL then 0.1 mL of the test organisms were inoculated with a sterile swab on the surface of the Mueller–Hinton agar. Sterile paper disks (6 mm in diameter) (REF-NO: 321 261, Antibiotica-testblattchen D 3354, Dassel W-Germany) were impregnated with 20 µL of the extract solutions in order to obtain final concentrations of 1, 0.5, 0.25 and 0.12 mg, respectively, of extract in the disks. Negative controls were prepared

using the same solvent employed to dissolve the samples (Methanol/water (80:20, v/v)). Standard reference antibiotics, gentamycin (15 µg), chloramphenicol (30 µg) and ofloxacin (5 µg) were used as positive controls for the tested bacteria. After incubation for 18–24 hours at 37 °C the diameters of the zone of inhibition (without diameter of the disc) were measured and expressed in mm. The presence of a zone of inhibition indicates the activity of tested extracts against bacteria.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were also investigated for the bacterial strains which were determined as sensitive to the compounds in the disc diffusion assay; the minimum inhibitory concentration (MIC) for each extract tested was determined using the agar dilution technique (Tunçel and Nergiz, 1993). Appropriate amounts of each extract were aseptically added to the super-cooled sterile Mueller–Hinton to give final concentrations of 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 and 2 mg·mL<sup>-1</sup>. Approximately 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> of each culture were inoculated as a spot onto the Mueller–Hinton containing the desired extract using a 1 µL calibrated loop and the plates were incubated at 37 °C for 48 h. The minimum concentration without bacterial growth was determined to be the MIC.

### 2.10. Statistical analysis

The data reported were subjected to analysis of variance using the Statistica 5.5 package (StatSoft 97 edition). Where statistical differences were noted, differences among packages were determined using the ANOVA/MANOVA following the Newman-Keuls test. Significance was defined at  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Quality Indexes

For the majority of the oils analyzed, the mean values of the quality parameter (acidity, peroxide index, and specific ultraviolet absorbance) fell within the ranges allowed by the IOC norms (2003) for the extra-virgin olive oil category (free acidity  $\leq 0.8\%$ , peroxide value  $\leq 20$  meq·kg<sup>-1</sup>,  $K_{270} \leq 0.22$  and  $K_{232} \leq 2.50$ ).

The peroxide value and acidity of the studied oil were in the ranges of 3.25–8.75 meq·kg<sup>-1</sup> and 0.05–0.23 (% oleic acid), respectively.  $K_{270}$  was between 0.107 and 0.206 and  $K_{232}$  was in the range of 1.155 to 2.461.

### 3.2. Total phenols and O-diphenols

As shown in Table 1, the amount of total phenols and O-diphenols in the analyzed oils varies significantly ( $p \leq 0.05$ ) among the different cultivars. The results show that the amounts of total phenols

and O-diphenols are highly variety-dependent. The average folin-ciocalteu content of total phenols in the samples analyzed was 218.66 mg·kg<sup>-1</sup>, although a wide range of concentrations was observed, from 115 mg/kg (*Chemlal Tazmalt* variety) up to 420.95 mg·kg<sup>-1</sup> (*Neb Djemel* variety). The extract from the *Neb Djemel* variety had the highest contents of phenols and O-diphenols (420.95 and 29.67 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively), whereas, the extracts from the *Chemlal Tazmalt* variety (115.73 and 7.54 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively) and *Limli* variety (123.43 and 5.68 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively) had the lowest (Table 1). Our results are higher than those found by Taniglan *et al.* (2007) for several Turkish olive oil varieties. A significant positive correlation between total phenol and O-diphenol contents was observed ( $r=0.88$ ,  $p < 0.05$ ). These results are in accordance with the correlation coefficient reported by Cerretani *et al.* (2006).

### 3.3. HPLC profiles of phenols

According to the classification of Montedoro *et al.* (1992), the total phenol contents determined by HPLC (Table 2) can be classified as high for *Neb Djemel*, *Blanquette de Guelma* and *Bouricha*, mid-range for *Akerma*, *Chemlal*, *Chemlal de Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli* and *Tabelout* and low for *Aghenfias* and *Bouchouk Soummam*.

The identified phenolic compounds are mainly secoiridoid derivatives, phenolic alcohols, flavonoids, and lignans. The main simple phenols found in the analyzed olive oils were hydroxytyrosol and tyrosol. The concentration of tyrosol varied from 2 to 28 mg·kg<sup>-1</sup> in all analyzed samples, which was higher than that of hydroxytyrosol (0.5–5 mg·kg<sup>-1</sup>). These results agree with previous data found in

TABLE 1. Total phenols and O-diphenols (mean±SD, n=3) in different Algerian varieties of virgin olive oil

Varieties	Total phenols (mg·kg <sup>-1</sup> )	O-diphenols (mg·kg <sup>-1</sup> )
Aghenfias	161.78±6.25 <sup>e</sup>	13.15±0.00 <sup>d</sup>
Akerma	130.93±7.68 <sup>b</sup>	10.07±0.00 <sup>c</sup>
Blanquette de Guelma	365.25±8.41 <sup>f</sup>	23.37±0.59 <sup>g</sup>
Bouchouk Soummam	152.17 ± 7.24 <sup>c</sup>	10.92±0.00 <sup>c</sup>
Bouricha	369.79±6.88 <sup>f</sup>	15.65±0.86 <sup>c</sup>
Chemlal	234.38±6.43 <sup>d</sup>	15.49±0.18 <sup>c</sup>
Chemlal Tazmalt	115.73±4.36 <sup>a</sup>	7.54±0.00 <sup>b</sup>
Ferkani	243.23±2.87 <sup>e</sup>	19.30±0.00 <sup>f</sup>
Limli	123.43±0.79 <sup>ab</sup>	5.68±0.00 <sup>a</sup>
Neb Djemel	420.95±2.03 <sup>g</sup>	29.67±0.73 <sup>h</sup>
Tabelout	239.79±1.69 <sup>c</sup>	19.36±0.97 <sup>f</sup>

<sup>a-h</sup> Means the column followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Tunisian varieties (Haddada *et al.*, 2008) and Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia (Allalout *et al.*, 2009). Tyrosol was the main phenolic component present in the *Blanquette de Guelma* variety, with 28 mg·kg<sup>-1</sup> (Table 2).

The most abundant secoiridoids of the olive oil analyzed were secoiridoid derivatives of oleuropein and ligstroside; these results agree with previous data found for Spanish varieties (Brenes *et al.*, 2000; Oliveras-Lopez *et al.*, 2007). The content of oleuropein and ligstroside derivatives ranged from 50 to 26 mg·kg<sup>-1</sup> in *Aghenfas* oils to 276 and 173 mg·kg<sup>-1</sup> in *Neb Djemel* oils, respectively.

The amount of derivatives of oleuropein in all the analyzed samples was higher than that of the derivatives of ligstroside except for the *Akerma*, *Limli* and *Tabelout* varieties which showed higher contents of the derivatives of ligstroside (44, 62 and 124 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively). Arslan, (2012) noted that oleuropein was the most abundant phenolic in the olive oil of Turkish varieties.

Flavonoids are present in considerable amounts with concentrations varying from 10 mg·kg<sup>-1</sup> for the *Limli* variety to 44 mg·kg<sup>-1</sup> for the *Aghenfas* variety. These results were higher than those reported by Ilyasoglu *et al.* (2010). The main flavonoid compounds quantified in our study were luteolin and apigenin. Considerable quantitative differences in their concentrations among the different varieties were noted. The luteolin amount ranged from 6 mg·kg<sup>-1</sup> for the *Tabelout* variety to 38 mg·kg<sup>-1</sup> for the *Akerma* variety. Apigenin was present at a high level in the *Chemlal Tazmalt* variety (14 mg·kg<sup>-1</sup>) compared to the others.

Lignans were also present in significant amounts in all the analyzed samples at concentrations ranging from 12 mg·kg<sup>-1</sup> in the *Bouchouk Soummam* variety to 51 mg·kg<sup>-1</sup> in the *Bouricha* variety. Although the variety *Neb Djemel* showed a high level of total polyphenols (537 mg·kg<sup>-1</sup>), it contains only 21 mg·kg<sup>-1</sup> of lignans, on the other hand, the *Chemlal Tazmalt* variety, which is less rich in total polyphenols (257 mg·kg<sup>-1</sup>) showed a high content of lignans (41 mg·kg<sup>-1</sup>).

Lignans are the main component of the phenolic fraction of the olive seed and are practically absent in the pulp, leaves, and limbs, therefore their presence in the oil must be due to the breaking of the stones when the olives are crushed (Owen *et al.*, 2000).

The presence of elenolic acid in olive oil in its free form is due to the hydrolysis of oleuropein, ligstroside, and related glucosidic compounds. The *Neb Djemel* variety was distinguished by a high concentration of elenolic acid (68.4 mg·kg<sup>-1</sup>), the lowest value was noted for the *Blanquette de Guelma* variety (13.3 mg·kg<sup>-1</sup>). This compound was found at a low concentration compared to the varieties cultivated in Chile and Spain (García-González *et al.*, 2010) which did exceed 115 mg·kg<sup>-1</sup>.

Recently, an interest in the oxidized form of virgin olive oil phenols has significantly increased, especially in relation to determination of freshness/ageing status (Rovellini and Cortesi, 2002). The ratio between oxidized and natural forms is the key for a good quality judgment (Rovellini, 2008). A high amount of oxidized phenols was noted in the *Chemlal Tazmalt* variety (67 mg·kg<sup>-1</sup>).

TABLE 2. Phenolic compounds composition obtained from Algerian virgin olive oil (mg·kg<sup>-1</sup>), by HPLC analysis

	Aghenfas	Akerma	Blanquette de Guelma	Bouchouk Soummam	Bouricha	Chemlal	Chemlal Tazmalt	Ferkani	Limli	Neb Djemel	Tabelout
Oleuropein derivatives	50	36	203	82	235	133	61	119	60	276	120
Ligstroside derivatives	26	44	115	32	150	101	50	91	62	173	124
Hydroxytyrosol	0.5	0.9	5	2	5	3	2	1	3	4	4
Tyrosol	3	4	28	2	26	3	3	4	26	5	11
Total Flavonoids	44	49	18	41	25	23	34	14	10	33	13
Apigenin	12	11	6	12	7	8	14	4	3	13	7
Luteolin	32	38	12	29	18	15	20	10	7	20	6
Lignans	16	38	33	12	51	38	41	42	25	21	29
Natural Elenolic acid	33.6	27.2	13.3	23.2	58.3	24.2	29.9	42.9	34.7	68.4	27.7
Oxidized elenolic acid	0.20	0.12	0.11	0.02	0.09	0.05	00	0.02	0.07	0.02	0.20
Phenols oxidized	14	15	51	18	55	54	67	13	42	19	22
Total phenols (HPLC)	169	207	430	197	522	354	257	287	208	537	316

The concentration of oxidized elenolic was very low in all varieties and was completely absent in the *Chemlal Tazmalt* variety, the highest values were noted for the *Aghenfas*, *Tabelout* varieties.

### 3.4. Antioxidant activity

#### 3.4.1. DPPH assay

The results of DPPH radical-scavenging activities (Table 3) showed significant differences ( $p < 0.05$ ) among the varieties. The *Blanquette de Guelma* variety exhibited the best DPPH scavenging activity (72.20%). The extracts of *Limli*, *Akerma* and *Chemlal Tazmalt* oils recorded the lowest percentages (39.96, 38.20 and 36.57% respectively). These values were similar to those reported by Nakbi *et al.* (2010) for Tunisian cultivars (78.56 and 37.23% for *Chetoui* and *Chemlali* varieties, respectively).

A significant correlation ( $p < 0.05$ ) is noted between DPPH radical-scavenging activity and phenolic compound content ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ) and *O*-diphenols ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.05$ ). These coefficients are in agreement with the report by Samaniego-Sánchez *et al.* (2007) with the coefficient  $r = 0.79$  ( $p < 0.05$ ) between total polyphenol and DPPH radical-scavenging activity.

The different radical-scavenging activities of our extracts might depend on the composition and profile of phenolic compounds among the varieties, particularly *O*-diphenols. The oleuropein derivatives were the main compounds found in eight varieties. Their antioxidant properties can be related to hydrogen donation and their ability to improve radical stability by forming an intra-molecular hydrogen bond between the free hydrogen of their phenoxyl radicals. The presence of a second hydroxyl group at the ortho-position significantly enhances their ability to act as an antioxidant as measured by the DPPH radical test.

On the other hand, the minor compounds present in the extracts such as flavonoids can control this activity, in fact, *Bouchouk Soummam* and *Aghenfas* have higher activity (61.77 and 60.15%) than the *Ferkani* (57.84%) and *Tabelout* (49.34%) varieties, despite their high total phenolic contents. This higher activity could be explained by the concentrations of flavonoids, in fact, *Bouchouk Soummam* and *Aghenfas* varieties presented higher flavonoid contents and contain 41 and 44  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively, corresponding to 26.03 and 23.71% of the total polyphenols, while the *Ferkani* and *Tabelout* varieties contain 13 and 14  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively, corresponding to 4.87 and 4.11% of the total polyphenols. The abilities of the flavonoids to scavenge the radicals were related the presence of functional groups in their structure, mainly the B-ring catechol, the 2,3-double bond conjugated with the 4-oxo function. Luteolin represents 72.7 and 70.7% of total

flavonoids in extracts from *Aghenfas* and *Bouchouk Soummam*, respectively; this compound with two hydroxyl in the B-ring is several times stronger than apigenin (Majewska *et al.*, 2011).

#### 3.4.2. ABTS.<sup>+</sup> assay

All the samples tested were able to scavenge the ABTS.<sup>+</sup> radical cation. Table 3 shows that the results were statistically different among the olive oil varieties ( $p < 0.05$ ). The results are also expressed as  $\text{IC}_{50}$ , (Table 3), representing the concentration needed to decrease the initial ABTS.<sup>+</sup> concentration by 50%, a smaller  $\text{IC}_{50}$  value corresponds to a higher antioxidant activity of the extracted olive oil.

The best ABTS.<sup>+</sup> scavenging activity was shown by the extract from the *Bouricha* variety (73.38%) followed by the *Blanquette de Guelma* variety (66.73%). They exhibited the lowest  $\text{IC}_{50}$  values (0.12  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 0.18  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectively), corresponding to a higher efficiency of the oil extracts to neutralize the radical ABTS.<sup>+</sup>; whereas extracts from the *Limli*, *Akerma* and *Chemlal Tazmalt* varieties showed a lower ABTS.<sup>+</sup> scavenging activity (46.25, 46.19 and 45.25%) and higher  $\text{IC}_{50}$  values (0.33, 0.42, 0.37  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). A significant correlation between the polyphenol contents and the ABTS.<sup>+</sup> scavenging ability ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ) was found. This coefficient is very close to that noted by Miniotti and Georgiou (2010). Despite its high content of phenolic compounds, the *Neb Djemel* variety presented a lower antioxidant activity of 61.20% ( $\text{IC}_{50} = 0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) compared with other varieties such as *Bouricha* and

TABLE 3. Scavenging activity of different extracts Algerian olive oils determined by DPPH and ABTS.<sup>+</sup> methods

Varieties	Scavenging activity		
	DPPH (%)	ABTS. <sup>+</sup> (%)	$\text{IC}_{50}$ (mg mL <sup>-1</sup> )
Aghenfas	60.17±2.77 <sup>cd</sup>	58.33±1.61 <sup>c</sup>	0.280±0.010 <sup>e</sup>
Akerma	38.20±1.01 <sup>a</sup>	46.19±0.64 <sup>a</sup>	0.420±0.010 <sup>g</sup>
Blanquette de Guelma	72.20±2.19 <sup>e</sup>	66.73±1.54 <sup>d</sup>	0.180±0.010 <sup>b</sup>
Bouchouk Soummam	61.77±0.92 <sup>de</sup>	59.96±1.03 <sup>c</sup>	0.270±0.007 <sup>d</sup>
Bouricha	64.61±2.27 <sup>d</sup>	73.38±0.16 <sup>c</sup>	0.12±0.017 <sup>a</sup>
Chemlal	62.53±0.42 <sup>de</sup>	60.23±0.22 <sup>c</sup>	0.260±0.006 <sup>cd</sup>
Chemlal Tazmalt	36.57±1.71 <sup>a</sup>	45.25±1.66 <sup>a</sup>	0.370±0.011 <sup>f</sup>
Ferkani	57.84±1.23 <sup>c</sup>	57.64±0.03 <sup>c</sup>	0.300±0.005 <sup>f</sup>
Limli	39.96±1.79 <sup>a</sup>	46.25±1.05 <sup>a</sup>	0.330±0.005 <sup>e</sup>
Neb Djemel	63.37±0.45 <sup>de</sup>	61.21±1.64 <sup>c</sup>	0.250±0.002 <sup>c</sup>
Tabelout	49.34±1.71 <sup>b</sup>	49.82±1.48 <sup>b</sup>	0.320±0.005 <sup>e</sup>

<sup>a-f</sup> Means the column followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). (mean±SD, n=3).

TABLE 4. Antibacterial activity (Inhibition zone diameter (mm)) of Algerian olive oil extracts against each bacterial species.

Varieties	Concentrations (mg·disc <sup>-1</sup> )	Micro-organism Inhibition zone diameter (mm)*					
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Aghenfas	1	19.00±0.00 <sup>p</sup>	4.00±1.00 <sup>d</sup>	–	–	–	–
	0.5	17.66±0.57 <sup>no</sup>	2.66±0.57 <sup>c</sup>	–	–	–	–
	0.25	15.00±0.00 <sup>kl</sup>	–	–	–	–	–
	0.12	13.00±0.00 <sup>hij</sup>	–	–	–	–	–
Akerma	1	18.00±0.00 <sup>mop</sup>	03.00±0.00 <sup>cd</sup>	–	–	–	–
	0.5	17.33±1.15 <sup>mn</sup>	01.00±0.00 <sup>ab</sup>	–	–	–	–
	0.25	14.33±1.15 <sup>sk</sup>	–	–	–	–	–
	0.12	11.00±1.00 <sup>fg</sup>	–	–	–	–	–
Blanquette de Guelma	1	21.33±0.57 <sup>a</sup>	06.33±0.57 <sup>ij</sup>	2.33±0.57 <sup>a</sup>	02.00±1.00 <sup>ab</sup>	–	04.00±1.00 <sup>b</sup>
	0.5	17.33±0.57 <sup>mn</sup>	05.33±0.57 <sup>fg</sup>	–	00.66±0.57 <sup>a</sup>	–	03.33±0.57 <sup>b</sup>
	0.25	13.00±0.00 <sup>hij</sup>	04.00±0.00 <sup>de</sup>	–	–	–	02.66±0.57 <sup>b</sup>
	0.12	08.33±0.57 <sup>de</sup>	01.00±0.00 <sup>a</sup>	–	–	–	00.66±0.57 <sup>a</sup>
Bouchouk Soummam	1	10.33±0.57 <sup>f</sup>	04.00±0.00 <sup>de</sup>	–	–	–	–
	0.5	08.33±0.57 <sup>d</sup>	02.33±0.57 <sup>bc</sup>	–	–	–	–
	0.25	05.00±0.00 <sup>e</sup>	01.00±0.00 <sup>ab</sup>	–	–	–	–
	0.12	02.00±0.00 <sup>ab</sup>	–	–	–	–	–
Bouricha	1	26.00±0.00 <sup>s</sup>	11.00±0.81 <sup>l</sup>	09.66±0.47 <sup>c</sup>	08.66±0.94 <sup>d</sup>	09.00±0.00 <sup>d</sup>	10.66±0.47 <sup>e</sup>
	0.5	22.66±0.47 <sup>r</sup>	10.33±0.94 <sup>l</sup>	09.00±0.81 <sup>bc</sup>	07.66±0.94 <sup>d</sup>	07.66±0.47 <sup>c</sup>	08.00±0.81 <sup>d</sup>
	0.25	20.33±0.47 <sup>q</sup>	09.33±0.47 <sup>k</sup>	08.00±0.81 <sup>bc</sup>	07.00±0.00 <sup>c</sup>	07.00±0.00 <sup>b</sup>	07.00±0.00 <sup>cd</sup>
	0.12	17.00±0.00 <sup>mn</sup>	08.66±0.47 <sup>jk</sup>	07.33±0.47 <sup>b</sup>	06.00±0.81 <sup>b</sup>	06.00±0.00 <sup>a</sup>	06.00±0.00 <sup>c</sup>
Chemlal	1	16.00±0.00 <sup>lm</sup>	06.00±0.00 <sup>gh</sup>	–	–	–	–
	0.5	12.00±1.00 <sup>gh</sup>	04.33±0.57 <sup>e</sup>	–	–	–	–
	0.25	09.66±0.57 <sup>f</sup>	02.00±0.00 <sup>abc</sup>	–	–	–	–
	0.12	07.33±0.57 <sup>d</sup>	01.00±0.00 <sup>a</sup>	–	–	–	–
Chemlal Tazmalt	1	04.33±0.57 <sup>c</sup>	–	–	–	–	–
	0.5	03.00±0.00 <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
	0.25	01.00±0.00 <sup>a</sup>	–	–	–	–	–
	0.12	–	–	–	–	–	–
Ferkani	1	14.66±0.57 <sup>k</sup>	06.66±0.57 <sup>h</sup>	–	–	–	–
	0.5	09.66±0.57 <sup>f</sup>	04.66±0.57 <sup>ef</sup>	–	–	–	–
	0.25	04.66±0.57 <sup>c</sup>	02.00±0.00 <sup>ab</sup>	–	–	–	–
	0.12	02.66±0.57 <sup>b</sup>	01.00±0.00 <sup>a</sup>	–	–	–	–
Limli	1	12.66±0.57 <sup>hi</sup>	2.33±0.57 <sup>bc</sup>	–	–	–	–
	0.5	07.66±0.57 <sup>d</sup>	01.00±0.00 <sup>ab</sup>	–	–	–	–
	0.25	05.66±0.57 <sup>c</sup>	–	–	–	–	–
	0.12	02.66±0.57 <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
Neb Djemel	1	19.00±0.00 <sup>p</sup>	08.66±0.57 <sup>i</sup>	–	–	–	–
	0.5	17.33±0.57 <sup>mn</sup>	06.66±0.57 <sup>h</sup>	–	–	–	–
	0.25	14.00±1.00 <sup>ijk</sup>	04.00±0.00 <sup>de</sup>	–	–	–	–
	0.12	10.00±1.00 <sup>f</sup>	02.00±0.00 <sup>abc</sup>	–	–	–	–
Tabelout	1	05.00±0.00 <sup>c</sup>	–	–	–	–	–
	0.5	03.00±1.00 <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
	0.25	01.66±0.57 <sup>ab</sup>	–	–	–	–	–
	0.12	–	–	–	–	–	–

Means (mean±DS, n=3) with the same letter in the same column are not significantly different. Diameter of zone of inhibition (mm) not including diameter of 6 mm disc; –: No inhibitory effects.

*Blanquette de Guelma*. This could be explained by a higher content of free hydroxytyrosol and lignans of these two varieties. Literature data attests that hydroxytyrosol shows a high antioxidant activity (Lavelli, 2002). Regarding lignans' antioxidant power, Owen *et al.* (2000) showed the existence of a clear correlation between the radical scavenging ability of a virgin olive oil phenolic extract and the lignan concentration. The antioxidant activity of (+)-pinosresinol was more prominent than the activity of the following compounds: ligstroside aglycon, tyrosol, elenolic acid (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005).

### 3.5. Antibacterial Activity

The different olive oils extracts at different concentrations (0.12, 0.25, 0.5 and 1 mg·disc<sup>-1</sup>) were screened for their antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *L. innocua* (Gram-positive), *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* (Gram-negative) following the agar diffusion method (Table 4). The minimal inhibitory concentration (MIC) values for bacteria (Table 5) were determined. Standard antibiotics (Gentamycin, Chloramphenicol and Ofloxacin) were used, and are also mentioned in Table 6. The solvents used for extraction were also used for dissolving the extracts, and all the solvent controls did not show any activity (data not shown).

As shown in Table 4, the results of the in-vitro antimicrobial activity assay showed that the phenolic extracts from the *Bouricha* and *Blanquette de Guelma* varieties possessed broad antibacterial activity against the microorganisms tested. The zone of inhibition varied from 6 to 26 mm and from 0.6 to 21 mm, respectively. The extracts from the *Chemlal Tazmalt* and *Tabelout* varieties only showed activity against *S. aureus*. Whereas the others eight extracts displayed a moderate activity against *S. aureus* and *B. subtilis*. Our results are in concordance with those reported by Medina *et al.* (2006) who observed higher activity in virgin olive oils and none in other edible vegetable oils (corn, sunflower, soybean, rapeseed and cotton). The authors attributed this activity of olive oil to the phenolic compounds; the dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein and ligstroside aglycons, hydroxytyrosol, and tyrosol were the phenolic compounds that statistically

correlated with bacterial survival. A recent study by Karaosmanoglu *et al.* (2010) showed different antimicrobial activities among extra virgin olive oil, refined olive oil and canola oil against three microorganisms (*E. coli*, *S. enteritidis* and *L. monocytogenes*). This activity was also related to the high concentrations of phenolic compounds found in virgin olive oils. The oil contained many phenolic compounds; an increase in their overall effect can be related to a synergistic interaction.

The effect of each individual phenolic compound, isolated by HPLC, against *L. monocytogenes*, showed that the dialdehydic form of decarboxy methyl-ligstroside presented a potent antimicrobial activity. These results are in agreement with ours because the Algerian olive oil varieties presented high percentages of oleuropein and ligstroside derivatives.

Gentamycine, chloramphenicol and ofloxacin, which were used as a positive control, had inhibition zones ranging from 28 to 38 mm. *S. aureus*, with high sensitivity to some extracts, was also sensitive to antibiotics at a concentration much lower than methanolic extracts.

The MICs reported in Table 6 show quantitative evidence of the antimicrobial activity of different extracts the olive oil varieties. The MICs of the extracts varied from 0.6 to 2 mg·mL<sup>-1</sup> on most of the tested bacteria. In fact, the growth of *S. aureus* was significantly inhibited (0.6-1.6 mg·mL<sup>-1</sup>). The lowest MIC value (0.6 mg·mL<sup>-1</sup>) was observed for the extract from *Bouricha* on *S. aureus*. These values of MIC are higher than those reported by Pereira *et al.* (2006) for the phenolic compound extract from Portuguese table olives. Nevertheless, they are in accordance with the results reported by Tunçel and Nergis (1993) on the MIC of ferulic, vanillic, and caffeic acids and tyrosol against *S. aureus*, which were determined as 0.6, 0.55, 0.4 and 0.6 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively, by the agar dilution method.

The MICs of phenolic compounds that inhibit bacterial growth are much higher than those found in olive oils. In the study by Bisignano *et al.* (1999), minimum inhibitory concentrations of hydroxytyrosol against *Staphylococcus aureus* (penicillin susceptible) and *Staphylococcus aureus* (penicillin-resistant) were determined; they ranged from 3.9–31.25 µg·mL<sup>-1</sup> and 3.9–31.25 µg·mL<sup>-1</sup>, respectively. These concentrations of this phenolic compound

TABLE 5. Antibacterial activity (Inhibition zone diameter) of antibiotics against each bacterial species.

	Concentrations (µg·disc <sup>-1</sup> )	Microorganisms Inhibition zone diameter (mm)*					
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Gentamycin	15	30.7±1.2	34.0±0.0	26.7±1.2	28.7±1.2	26.0±0.0	–
Chloramphenicol	30	30.7±1.2	34.7±1.2	31.3±1.2	34.7±1.2	22.7±1.2	–
Ofloxacin	5	32.0±0.0	36.7±1.2	38.0±0.0	–	38.0±2.0	30.0±0.0

Diameter of zone of inhibition (mm) including diameter of 6 mm disc; –: No inhibitory effects (mean±SD, n=3).

TABLE 6. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of different extracts of Algerian olive oils against Each Bacterial Species

	MIC mg·mL <sup>-1</sup>					
	S. aureus	B. subtilis	L. innocua	P.aeruginosa	E. coli	K. pneumoniae
Aghenfas	0.9	1.3	NT	NT	NT	NT
Akerma	0.9	1.4	NT	NT	NT	NT
Blanquette de Guelma	0.7	1.2	1.8	NT	1.8	>2
Bouchouk Soummam	1.2	2	NT	NT	NT	NT
Bouricha	0.6	1.2	1.6	1/1.1	1.8	>2
Chemlal	1.2	1.2	NT	NT	NT	NT
Chemlal Tazmalt	1.6	NT	NT	NT	NT	NT
Ferkani	1	1.2	NT	NT	NT	NT
Limli	1.2	1.8	NT	NT	NT	NT
Neb Djemel	0.9	1.2	NT	NT	NT	NT
Tabelout	1.6	NT	NT	NT	NT	NT

NT= Not tested

are about 1000 times higher than the levels of those in extra virgin olive oil, EVOO.

Among the bacteria used in the present study, *S. aureus* (Gram-positive) showed a higher sensitivity to different extracts with the largest zone of inhibition and lowest MIC (Tables 4 and 6). This was consistent with the results from previous reports, which suggested a higher susceptibility of food-borne pathogenic Gram-positive bacteria to polyphenols compared with Gram-negative bacteria (Brenes *et al.*, 2006). This observation can be attributed to differences in the structure of the bacteria cell wall. The less complex the structure of the cell wall is in the Gram-positive bacteria, the more permeable it is to anti-microbial compounds (Papadopoulou *et al.*, 2005).

Although the anti-microbial effects of various phenolic extracts are well documented, the mechanisms of action of these products and their components are not fully understood. Polyphenols are thought to cause surface activity that damages the membranes of bacterial cells, to inhibit its enzymes, or to interfere with the production of certain amino acids necessary for bacterial growth (Cowan, 1999). Antibacterial activity of olive oil's phenolic compounds is due to the presence of the ortho-diphenolic system (catechol) (Bisignano *et al.*, 1999). Therefore, the position and number of hydroxyl groups on the phenol group are thought to be related to their relative toxicity to microorganisms, with evidence that increasing hydroxylation results in an increase in anti-microbial activity. Oleuropein was significantly less toxic to bacterial cells than hydroxytyrosol; one can speculate that the glycosidic group of oleuropein might render the unable to penetrate cell membranes or to reach the target site.

#### 4. CONCLUSIONS

The phenolic composition represents a useful contribution to the biochemical characterization of the Algerian olive oil cultivars. Derivatives of oleuropein and ligstroside, the abundant phenolic compounds hydroxytyrosol, tyrosol, flavonoids, and lignans vary quantitatively according to the variety; in fact, the cultivar affects quantitative phenolic fractions of these EVOOS, demonstrating a unique and characteristic phenolic profile. These phenolic fractions also influenced and allowed to differentiate the total antioxidant and antibacterial activity observed in the cultivars.

The results obtained in the present work reveal that Algerian olive oils may constitute a good source of healthy compounds in the diet, especially phenolic compounds, suggesting that their consumption could be useful in the prevention of diseases in which free radicals are implicated and may be good candidates for applications such as antimicrobial agents against bacteria responsible for human gastro-intestinal and respiratory tract infections and foodborne pathogens, particularly important against *S. aureus*, a microorganism extensively studied due to its ability to produce enterotoxins. As far as we know, this is the first report considering the antioxidant and anti-microbial potential of phenolic compounds in EVOO from Algeria.

#### REFERENCES

- Allalout A, Krichène D, Methenni K, Taamalli A, Oueslati I, Daoud D, Zarrouk M. 2009. Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Sci. Hortic.* **120**, 77–83.

- Arslan D. 2012. Physico-chemical characteristics of olive fruits of Turkish varieties from the province of Hatay. *Grasas Aceites* **63**, 158–166
- Bendini A, Bonoli M, Cerretani L, Bigguzi B, Lercker G, Toschi TG. 2003. Liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olives oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr.* **985**, 425–433.
- Bisignano G, Tomaino A, Cascio RL, Crisafi G, Uccella N, Saija A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 971–974.
- Brenes M, Hidalgo, FJ, García A, Ríos JJ, García P, Zamora R, Garrido A. 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* **77**, 715–720.
- Brenes M, Medina E, Romero C, De Castro A. 2006. Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry hi-tech*, **18**, 6–8.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem.* **127**, 1821–1827.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lercker G, Compagnone D, Fernández-Gutiérrez A. 2005. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agri. Food Chem.* **53**, 8918–8925.
- Cerretani L, Bendini A, Del Caro A, Piga A, Vacca V, Caboni M F, Toschi TG. 2006. Preliminary characterization of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 354–361
- Cicerale S, Conlan X A, Sinclair AJ, Keast R S J. 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 218–236.
- Cicerale S, Lucas L, Keast, R. 2010. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 458–479.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* **12**, 564–582.
- Favati F, Caporale G, Bertuccioli, M. 1994. Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. *Grasas Aceites* **45**, 68–70.
- Furneri PM, Piperno A, Saija A, Bisignano G. 2004. Antimicrobial activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob. Agents Ch.* **48**, 4892–4894.
- Haddada FM, Krichène D, Manai H, Oueslati I, Daoud D, Zarrouk M. 2008. Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *J. Lipid Sci Technol.* **110**, 905–913.
- Ilyasoglu H, Ozcelik B, Hoed V V, Verhe R. 2010. Characterization of Aegean Olive Oils by Their Minor Compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **87**, 627–636.
- IOC 1996. Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet. Conseil Oléicole International/T20/ Doc 19 6 juin 1996, Madrid. Espagne.
- IOC 2003. Classification des huiles d'olive. Normes Internationales applicables à l'huile d'olive et l'huile de grignon d'olive. Conseil Oléicole International.
- IUPAC 1979. International Union of Pure and Applied Chemistry. Méthodes d'analyses des matières grasses et dérivés. 6ème édition. Edition ETIG. Paris.
- García-González D L, Romero N, Aparicio, R. 2010. Comparative Study of Virgin Olive Oil Quality from Single Varieties Cultivated in Chile and Spain. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12899–12905.
- Kappel VD, Costa GM, Scola G, Silva FA, Landell MF, Valente P, Souza D, Vanz D, Reginatto F, Moreira CDG. 2008. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *J. Med. Food* **11**, 267–274.
- Karaosmanoğlu H, Soyer F, Ozen B, Tokatli F. 2010. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8238–8245
- Keceli T, Gordon MH. 2001. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 1391–1396.
- Lavelli L. 2002. Comparison of the antioxidant activities of extra virgin olive oils. *J. Agri. Food Chem.* **50**, 7704–7708.
- Majewska M, Skrzycki M, Podsiad M, Czczot H. 2011. Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an in vitro study. *Acta Pol. Pharm.* **68**, 611–5.
- Medina E, De Castro A, Romero C, 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.* **54**, 4954–4961.
- Minioti KS, Georgiou CA. 2010. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Aceites* **61**, 45–51
- Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. 1992. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1571–76.
- Nakbi A, Issaoui M, Dabbou S, Koubaa N, Echbili A, Hammami M, Attia N. 2010. Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *J. Food Compos. Anal.* **23**, 711–715.
- NGD C89. 2010. Determinazione dei biofenoli negli oli di oliva mediante HPLC. 1–8
- Oliveras-Lopez M J, Innocenti M, Giaccherini C, Ieri F, Romani A, Mulinac N. 2007. Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta* **73**, 726–732.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. 2000. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clin. Chem.* **46**, 976–988.
- Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG. 2005. Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* **43**, 41–46.
- Pereira JA, Pereira APG, Ferreira IGFR, Valentap P, Andrade PB, Seabra R, Estivinho L, Bento A. 2006. Table olives from Portugal; phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8425–8431.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS<sup>+</sup> radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A. 2007. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 680–686.
- Rovellini P, Cortesi N. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **79**, 1–14.
- Rovellini P. 2008. Elenolic acid in virgin olive oil: liquid chromatography-mass spectrometry method. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **85**, 21–31.
- Samaniago-Sánchez C, Troncoso González AM, García-Parrilla MC, Quesada Granados JJ, López García de la Serrana H, López Martínez MC. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta* **593**, 103–107.
- Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro G F. 2009. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and Organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacol.* **17**, 1–9.
- Taniglan K, Ozcan M, Unver A. 2007. Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas Aceites* **58**, 142–147
- Tsimidou M, Papadopoulou G, Boskou D. 1992. Phenolic compounds 443 and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chem.* **45**, 141–144.
- Tunçel G, Nergiz C. 1993. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Lett. Appl Microbiol.* **17**, 300–302.
- Visioli F, Galli C. 1998. Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4292–4296.

## RESUME

Le premier aspect traité dans ce travail consiste à déterminer l'évolution des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge durant le processus de maturation des olives par méthode colorimétrique et par HPLC. Quatre variétés (*Boughenfous*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* et *Takesrit*) ont été étudiées. Les résultats obtenus montrent que la maturation et la variété sont deux facteurs qui influencent significativement la quantité et la qualité des composés phénoliques de l'huile d'olive. Au cours de la maturation, toutes les variétés ont enregistré une diminution de la fraction phénolique et qui varie en fonction de la variété. *Chemlal* a enregistré la plus basse diminution. Le deuxième volet de cette étude concerne la caractérisation du profil en composés phénoliques par HPLC d'une dizaine de variétés de l'huile d'olive vierge (*Aghenfas*, *Akerma*, *Blanquette de Guelma*, *Bouchouk Soummam*, *Bouricha*, *Chemlal*, *Chemlal Tazmalt*, *Ferkani*, *Limli*, *Neb Djemel* et *Tabelout*) et la détermination de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles. Les résultats montrent que la variété *Neb Djemel* se distingue par les teneurs les plus élevées en polyphénols et *ortho*-diphénols suivie des variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma*. L'analyse par HPLC de la composition en polyphénols des échantillons d'huiles d'olive nous révèle une composition qualitative similaire en composés phénoliques individuels, mais différente d'un point de vue quantitatif, ce qui nous a permis de faire une distinction variétale. Les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* se montrent très performantes avec une bonne activité réductrice, les meilleurs pouvoirs antiradicalaires (DPPH, ABTS<sup>+</sup>) des extraits phénoliques et les plus faibles IC<sub>50</sub> du radical ABTS<sup>+</sup>. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des huiles d'olive révèle encore que les variétés *Bouricha* et *Blanquette de Guelma* sont les plus actives sur toutes les souches bactériennes testées. Les extraits des huiles étudiées présentent une activité antibactérienne, particulièrement, intéressante contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres de zone d'inhibition les plus élevés et des (CMI) et (CMB) les plus faibles. Les résultats de ce travail montrent clairement que l'huile d'olive vierge algérienne est une source de composés phénoliques doués d'activité antioxydante et antibactérienne.

**Mots clés** : Huile d'olive, composés phénoliques, HPLC, variété, maturation, activité antioxydante, activité antibactérienne.

### ملخص

تطرق المحور الأول من هذا العمل إلى تحديد تطور المركبات الفينولية لزيت الزيتون البكر أثناء مراحل نضج الزيتون بطرق تلوينية و ب HPLC. تمت دراسة أربعة أصناف ( بوغنفوس ، بلانكات قالمة، شلال و تكسريت). أظهرت النتائج المحصل عليها أن مرحلة النضج و صنف الزيتون هما عاملان يؤثران جدا على كمية و نوعية المركبات الفينولية لزيت الزيتون. أثناء مراحل النضج سجلت كل الأصناف انخفاضا في الجزئية الفينولية وهذا يتغير حسب الصنف. سجل صنف شلال أكبر نسبة نقصان من هذه المركبات. إهتم المحور الثاني لهذه الدراسة بتحديد نوعية المركبات الفينولية بطريقة HPLC لعشرة أصناف من زيت الزيتون البكر (اغنفاس، اكرمة، بلونكات قالمة، بوشوك صومام، بوريشة، شلال، شلال تازمالت، فركاني، ليملي، نب جمل وطابلوط)، وتحديد الخصائص المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية للزيوت. أظهرت النتائج أن صنف نب جمل يتميز بأعلى كمية من المركبات الفينولية و الأرتوديفينولية، يتبعها صنف بوريشة و بلنكات قالمة. بينت نتائج التحليل بطريقة HPLC لعينات زيت الزيتون نفس التركيبة النوعية فيما يخص المركبات الفينولية الأحادية و لكن تختلف من حيث الكميات. هذا ما سمح لنا بالتمييز بين مختلف الأصناف. يتميز صنف بوريشة و بلانكات قالمة على باقي الأصناف بامتلاكها لأحسن نشاط إرجاعي و أكبر قدرة مضادة للجذور في طريقي DPPH , ABTS، للمستخلصات الميثانولية و يملكان أيضا أصغر IC<sub>50</sub> لجذر ABTS. إن تقدير النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية للزيوت تظهر أن صنف بوريشة و بلانكات قالمة هما الأنشطة ضد جميع البكتيريا المجربة و عموما تملك جميع المستخلصات نشاطا مضادا للبكتيريا وخاصة ضد *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* مع ظهور أكبر اقطار لمناطق تثبيط نمو البكتيريا و أصغر CMI و CMB. تظهر النتائج المحصل عليها في هذا العمل بوضوح أن زيت الزيتون البكر الجزائري يعتبر مصدرا للمركبات الفينولية المتميزة بنشاط مضاد للأكسدة، و نشاط مضاد للبكتيريا.

**كلمات المفتاح** : زيت الزيتون، المركبات الفينولية، HPLC، الصنف، نضج، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا.