



N° d'ordre...../ 2014

UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal

Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Techniques »
Formation doctorale « Ressources Naturelles, Environnement et Santé »

THÈSE

Présentée par

Mustapha EL BIR

Pour obtention du grade du

Doctorat

Spécialité : Génie Chimie

Option : Chimométrie, Biochimie

Contribution à la valorisation des produits et sous produits de l'olivier (*Olea europaea L*) : Application chimométrique à la détermination de l'origine géographique des huiles d'olives et valorisation des composés phénoliques des noyaux d'olives marocaines

Soutenue publiquement le 27 Juin 2014 devant la commission d'examen :

Pr. Abderrahim Jaouad	Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech	Président
Pr. Zehor Ait Yacine	Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Rapporteur
Pr. El hadrami El mestafa	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Rapporteur
Pr. Mohammed Chigr	Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Rapporteur
Pr. Hassan Chaair	Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia	Examineur
Pr. Mohamed Berkani	Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Examineur
Pr. Mohamed Mbarki	Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Directeur de thèse

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

□ اللَّهُ نُورُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ مَثَلُ نُورِهِ
كَمِشْكَاةٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ
الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ
شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا
غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ
نَارٌ نُوْرٌ عَلَيَّ نُورٌ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ
يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ
شَيْءٍ عَلِيمٌ □

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

سورة التور الآية (35)

Cette thèse vient consacrer cinq années d'études et de recherche qui s'inscrivent dans le cadre d'une formation universitaire pour l'obtention d'un doctorat (PhD) en Génie Chimie, (Option : Chimométrie, Biochimie). Bien que cet ouvrage représente une très grande satisfaction personnelle, il demeure avant tout important, pour moi, d'exprimer mes plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui, de façon directe ou indirecte, m'ont aidé à réaliser ce travail.

Dédicaces

A ma chère mère.
A la mémoire de mon cher père,
À ma sœur et mes frères.

AVANT PROPOS

• **Nom et prénom de l'auteur:** Mustapha EL BIR

• **Intitulé du travail:**

- Contribution à la valorisation des produits et sous produits de l'olivier (*Olea europaea L*) : Application chimiométriques à la détermination de l'origine géographique des huiles d'olives et valorisation des composés phénoliques des noyaux d'olives marocaines.
- Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au sein de l'Équipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable (ETSADD), Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal -Université Sultan Moulay Slimane.

• **Noms et prénoms des directeurs de recherche:**

- Encadrant : Professeur Mohamed M'BARKI, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Béni-Mellal.
- Co-Encadrant : Professeur Adelatif AMHOUD, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Béni-Mellal.

• **Laboratoires où les travaux ont été réalisés:**

- Laboratoire de l'Équipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable (ETSADD), Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Maroc.
- Laboratoire de Spectro-Chimie Appliquée et Environnement(LSCAE), Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Maroc.
- Laboratoire de Chimie Organique et Analytique (LCOA), Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, Maroc.
- Laboratoire des analyses physico-chimique, société KHAROUBA, Meknès, Maroc
- Centre Régional de la Recherche Agronomique (CRRA), Marrakech, Maroc.
- Laboratoire d'Instrumentation et Sciences Analytiques (LISA), Faculté des Sciences et Techniques de St Jérôme, Université Aix-Marseille, France.

• **Cadre de coopération-soutien financier:**

- Bourse d'excellence du CNRST Maroc.
- Projet de Recherche CHIMIE 02/09 CNRST/CNRS n° 22571.

LISTES DES PUBLICATIONS, PRÉSENTATIONS ORALES ET PRÉSENTATIONS AFFICHES

1- Publications dans des revues à comité de lecture

1. **Elbir, M.** Oukrich, J. Moubarik, A. Amhoud, Fakir, M. Berkani, M. Naciri Bennani, M. Mbarki, M. 2014. **Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols.** Journal of Materials and Environmental Science. 5 (1) 101-110.
2. **Elbir, M.** Amhoud, A. Houlali, I. Moubarik, A. Hasib, A. Jouad, A. Mbarki, M. Vanloot, P. Artaud, J. 2014. **Caractérisation et classification des huiles d'olives monovariétales de deux régions au Maroc (Meknès-Tafilalet et Marrakech-Tensift-Al Haouz).** Journal of Materials and Environmental Science. 5 (2) 565-570.
3. **Elbir, M.** Amhoud, A. Mbarki, M. Visioli, F. 2014. **Antioxidant activity of a crude preparation rich in phenolic compounds from the olive stones of two Moroccan cultivars : A Preliminary Study.** International Journal of Probiotics and Prebiotics. 12 (1).
4. **Elbir, M.** Es-Safi, N. Amhoud, A. Mbarki,. 2014. **Characterization of phenolic compounds in olive stones of three Moroccan varieties.** Maderas Ciencia y tecnología. (Soumis).
5. Houlali, I. Rabi, S. **Elbir, M.** Ait Ider, A. Amhoud, A. Moubarik, A. Hasib, A. Jaouad, A. Mbarki M. 2014. **Caractérisation chimique de l'huile d'olive dans la région Marocaine de Tadla Azilal.** Journal of Materials and Environmental Science. 5 (2) 599-604.
6. Houlali, I. Gouskir, M. **Elbir, M.** Amhoud, A. Moubarik, A. Bouikhalene, B. Chair, H. Mbarki, M. 2014. **Effects of sunlight, temperature and adulteration on the quality of the virgin olive oil.** Journal of Materials and Environmental Science. (sous presse).
7. Moubarik, A. Grimi, N. **Elbir, M.** Mbarki, M. 2014. **Characterisation of Moroccan Picholine olive stone by-product for its potential of valorization.** Maderas Ciencia y tecnología. (sous presse).

8. **Elbir, M.** Moubarik, A. Rakib, E.M. Grimi, N. Amhoud, A. Miguel, G. Hanine, H. Vanloot, P. Artaud, J. Mbarki, M. 2012. **VALORIZATION OF MOROCCAN OLIVE STONES BY USING IT IN PARTICLEBOARD PANELS.** *Maderas Ciencia y tecnología.* 14 (3) 361-371

2- Présentations orales

1. **M. Elbir,** A. Amhoud, I. Houlali, A. Moubarik, H. Hasib, A. Jouad, M.Mbarki, P. Vanloot and J. Artaud. **CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF MOROCCAN VIRGIN OLIVE OIL BY CHEMOMETRICS ON NIRS AND GC DATA.** 5^{ème} Rencontre Internationale sur la Chimie et la Qualité (RICQ 5), 25-27 Avril 2013 à Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques Fés, Maroc.
2. **M. Elbir,** J. Oukrich, A. Moubarik, A. Amhoud, M. Fakir and M. Mbarki. **Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols.** Congrès annuel de CHIMIOMETRIE 2013, 25 et 26 septembre 2013 à Université de Bretagne Occidentale, Faculté des Sciences et Techniques, Brest, France.

3- Présentations par affiches

1. **M. Elbir,** J. Oukrich, A. Moubarik, A. Amhoud, M. Fakir, M. Berkani, M. Naciri Bennani, M. Mbarki. **Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols.** *AgroStat 2014* 13^{èmes} Journées Agro-Industrie et Méthodes Statistiques, 26 – 28 mars 2014 à Rabat, Maroc.
2. **M. Elbir,** A. Amhoud, A. Moubarik and M. Mbarki. **CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF MOROCCAN VIRGIN OLIVE OIL BY CHEMOMETRICS.** Congrès annuel de CHIMIOMETRIE 2013, 25 et 26 septembre 2013 à Université de Bretagne Occidentale, Faculté des Sciences et Techniques, Brest, France.

3. **M. Elbir**, A. Moubarik, E.Rakib, A. Amhoud, and M.Mbarki. **Analytical study of the olive in Morocco: Valorization of olive stones by extraction, identification and antifungal testing of phenolic compounds.** 1^{er} Colloque Intenentional Pluridisciplinaire de l'Arbre du 21 au 22 Mars 2012 à La Faculté des Lettre et Sciences Humaines Béni Mellal, Maroc.
4. **M. Elbir**, A. Moubarik, A. Amhoud, E.M. Rakib, M. Mbarki, J. Artaud, P. Vanloot. **ANALYTICAL STUDY OH PHENOLIC COMPOUNDS IN THE OLIVE STONES FROM THREE MOROCCAN VARIETIES : TEST THEIR EFFECT ON WOOD.** 5th International Conference on Polyphenols and Health, 17-20 October 2011, Sitges, Bracelona, Spain.
5. **M. Elbir**, A. Moubarik, E.M. Rakib, A. Amhoud and M. Mbarki. **ANALYTICAL STUDY OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS IN THE OLIVE STONES FROM THREE MOROCCAN VARIETES : TEST THEIR EFFECT ON WOOD.** Symposiun Internetonel de Chimie Hétérocyclique, 26-29 Octobre 2011, Fès, Maroc.
6. **M. Elbir**, A. Moubarik, E.Rakib, A. Amhoud, I.Houlali, M.Mbarki. **Analytical study of the olive in Morocco: Valorization of olive stones by extraction, identification and antifungal testing of phenolic compounds.** La Quatrième Rencontre Internationale sur la Chimie Moléculaire et développement RICMD4 du 24 au 27 Novembre 2010 à Marrakech, Maroc.
7. Houlali, I. M. Mbarki. **Elbir, M.** A. Amhoud, A. Hasib, A. Jaouad, P. Vanloot, N.Dupuy, J .Artaud. **Spectroscopic study of virgin olive oil in the Moroccan Tadla Azilal area.** La Quatrième Rencontre Internationale sur la Chimie Moléculaire et développement RICMD4 du 24 au 27 Novembre 2010 à Marrakech, Maroc.
8. Houlali, I. M. Mbarki M. **Elbir, M.** Amhoud, A. Moubarik, M. Bouzaid. **Searching and development of heterocyclic compounds in olive leaves extracts from different olive varieties.** Symposium International de Chimie Hétérocyclique (FSDM) du 27 au 29 Octobre 2011 à Fès, Maroc.

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été effectué au laboratoire (.....) au sein du département de Chimie et environnement à l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Maroc, sous la direction de Mr Pr. Mohamed M'BARKI, et co-direction de Mr Pr. Adelatif AMHOUD.

*Je tiens à remercier Mr **Mohamed M'BARKI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse sous sa direction. Je le remercie pour son implication inconditionnelle, sa grande disponibilité, son encadrement et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.*

*J'aimerais également exprimer ma profonde reconnaissance au co-directeur, Mr **Adelatif AMHOUD**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, pour m'avoir accueilli, guidé et soutenu. Je le remercie pour sa confiance et sa générosité. Il m'a inspiré par son enthousiasme, son esprit critique et sa passion pour le travail.*

Merci à tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ce travail.

*Mr **Abderrahim JAOUAD**, Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, me fait l'honneur de présider ce jury. Je l'en remercie vivement.*

*Merci à Mme **Zehor AIT YACINE**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Mr **El mestafa EL HADRAMI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, et Mr **Mohammed CHIGR**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, d'avoir aimablement accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs de cette thèse. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et veuillez recevoir mes sincères remerciements.*

Je remercie Mr **Hassan CHAAIR**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II, Mohammedia et Mr **Mohamed BERKANI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, pour l'honneur qu'ils me font d'être examinateurs de cette thèse, avec toute ma reconnaissance et mes remerciements.

Merci au Mr **El Moustafa RAKIB**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation des manipulations de ce travail. Pour sa sincérité et ses qualités relationnelles.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr **Abdelkhalek OUSSAMA**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, qui m'a aussi accueilli dans son laboratoire de Spectrochimie Appliquée et Environnement. Je le remercie pour son aide, sa compréhension, son encouragement et sa gentillesse.

Je remercie Mr **Amine MOUBARIK**, Professeur à la Faculté polydisciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, qui m'a apporté son savoir faire, concernant les expériences nécessaires pour la réalisation et le développement de ce travail.

Je remercie Mr **Nour-Eddine ES-SAFI**, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure, Université Mohammed V Agdal, pour sa disponibilité, son appui technique, ses précieux conseils et avis éclairés sur ce travail.

À Mr **Francesco VISIOLI**, Professeur à l'Université Cantoblanco, Madrid, un grand Merci pour votre compétence scientifique, sa disponibilité et son soutien. Ce fut un plaisir de produire un article commun avec son équipe.

Merci à tous les membres du Département de Chimie et Environnement de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, pour leur encouragement, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Merci à Mr le directeur de la société **KHAROUBA**, pour m'avoir fourni des échantillons d'olives et des huiles d'olives de la région de Meknès-Tafilalet.

Merci au Centre Régional de la Recherche Agronomique de Marrakech (CRRA) et l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Béni Mellal et de Tassaout, pour les échantillons d'olives et des huiles d'olives de la région Marrakech-Tensift-Al Haouz qu'ils m'ont fourni.

À tous les membres de l'Équipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable (ETSADD) de l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, je vous remercie pour tous, pour les bons moments passés ensemble au laboratoire.

*Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père **M'hammed EL BIR**, aucun mot ne pourra exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers lui. A ma mère **Zahra ZAKHNOUF**, pour son amour inconditionnel, pour ses sacrifices, pour son soutien indéfectible jusqu'à la dernière étape de cette thèse.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à ma sœur **Nadia** et mes frères **Redouan, Youssef et Mohammed** pour leur soutien précieux, leur amour et leur implication. Merci à tous les membres de ma famille.*

Enfin une pensée à toutes les personnes, amis, collègues, personnel de la faculté, qui ont contribué de près ou de loin, par leurs compétences, leurs conseils et leur aide technique à la réussite de ce travail.

Merci à tous et toutes!

Contribution à la valorisation des produits et sous produits de l'olivier (*Olea europaea L*) : Application chimiométriques à la détermination de l'origine géographique des huiles d'olives et valorisation des composés phénoliques des noyaux d'olives marocaines.

Résumé

L'olivier, arbre typiquement méditerranéen, se caractérise par un fruit, l'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen. Le présent travail s'intègre dans le cadre de la caractérisation et la valorisation des produits et sous-produits de l'olivier (*Olea europaea L*) au Maroc.

Nous avons étudié, les composés phénoliques extraits de noyau d'olive de trois cultivars marocains, les résultats obtenus ont montré que la quantité totale de composés phénoliques varie en fonction de la variété d'olive. Les noyaux de la variété Picholine marocaine sont les plus riches en composés phénoliques totaux (11,32 mg EAG / g MS), suivie par Haouzia (4,55 mg EAG / g MS) et Menara (3,56 mg EAG / g MS). L'analyse qualitative effectuée par l'analyse HPLC-DAD-ESI/MS a montré que dans les extraits analysés, ce sont le nüzhenide et ses dérivés qui prédominaient. Parmi les trois échantillons étudiés, la variation de certains composés individuels a été observée, mais les trois cultivars étaient qualitativement similaires.

Nous avons évalué les activités antioxydantes des extraits phénoliques de deux variétés marocaines, (Picholine et Haouzia). Nous avons procédé à trois essais différents in vitro de l'activité anti-oxydante qui montrent comment le piégeage des radicaux libres et l'activité antioxydante de l'extrait de Picholine sont comparables à ceux de l'oleuropéine pure et de la vitamine C.

Les noyaux d'olives de trois variétés ont été caractérisées par spectroscopie moyen infrarouge a transformé de Fourier (FT- MIR). Une analyse thermogravimétrique indique que jusqu'à 195 ° C, il n'y a pas de dégradation des noyaux d'olive. La performance de biocide sur l'agar-agar a été testée avec les champignons. Les résultats les plus intéressants sont obtenus avec la variété Picholine marocaine. La présence des noyaux d'olive de la Picholine marocaine dans les panneaux de particules améliore la résistance totale de ces panneaux contre les champignons de pourriture, *Coriolus versicolor* et *Coniophora puteana*.

L'absence de données sur les huiles d'olive Marocaines, nous a amené à analyser des échantillons de l'huile d'olive issus d'un seul cultivar de deux régions au Maroc, la région Meknes-Tafilalet et la région Marrakech-Tansift-Alhaouz. Ces données constituent une banque de données originale. De plus, nous avons décrit l'utilisation potentielle de la caractérisation et la classification des huiles d'olives marocaine par chimiométrie sur des données spectroscopique. Les résultats ont été tout à fait satisfaisants, malgré la similitude des compositions de cultivars entre deux éventuelles appellations d'origine ("Meknes-Tafilalet" et "Marrakech-Tansift-Alhaouz").

Une classification des huiles d'olives sur la base de la composition en acides gras et stérols, grâce aux méthodes de PCA, K-means et CAH, a été proposée. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a une faible variabilité dans la composition en acides gras et stérols des huiles d'olives vierges produites dans la province marocaine de Meknès. L'utilisation de méthodes chimiométriques a permis de caractériser et de différencier les principales huiles d'olives monovariétales. Les résultats obtenus contribuent à la détermination de l'origine géographique et à la traçabilité des HO marocaines.

Mots clés: Olivier, *Olea europaea L*, Noyaux d'olive, Huile d'olive, Polyphénols, Activité antioxydante, Résistance à la pourriture, panneaux de particules, Méthodes spectroscopiques, Méthodes chromatographiques, Acides Gras, Stérols, Chimiométrie, Classification automatique.

**Contribution to the development of products and by-products of olive (*Olea europaea* L):
Application to chemometric determination of the geographical origin of olive oil and
valorization of phenolic compounds from Moroccan olive stones.**

Abstract

The typically Mediterranean olive tree, characterized by an olive fruit whose oil is an essential component of the Mediterranean diet. This work fits in the context of the characterization and development of products and by-products of the olive tree (*Olea europaea* L) in Morocco.

We have studied phenolic compounds in olive stone from three Moroccan cultivars. The obtained results showed that the total amount of phenolic compounds varies depending on the olive cultivars. The olive stones of the Moroccan Picholine cultivar are the richest in total phenolic compounds (11.32 mg EAG/g DM), followed by Haouzia cultivar (4.55 mg EAG/g MS) and Menara cultivar (3.56 mg EAG/g MS). Qualitative analysis by HPLC-DAD-ESI/MS showed that in the analyzed extracts nüzhenide and its derivatives predominate. Of the three tested samples, the individual variation of some compounds has been observed, but the three cultivars were qualitatively similar.

We have evaluated the antioxidant activities of phenolic extracts of two Moroccan cultivars (Picholine and Haouzia). We carried out three different in vitro tests, of antioxidant activity, that show how the free radical scavenging and antioxidant activity of the Picholine extract is comparable to that of pure oleuropein and vitamin C.

The olive stones of the three cultivars have been characterized using a Fourier transform middle infrared spectroscopy (FT- MIR). Thermogravimetric analysis indicated that up to 195 °C, there is no degradation of olive stones. The performance of the biocide on agar with fungi was tested. The most interesting results have been obtained for the Moroccan Picholine cultivar. The presence of olive stones of Moroccan Picholine in a chipboard improves its total resistance against decay fungi, *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana*.

The lack of data on Moroccan olive oil, has led us to analyze samples of olive oil from one cultivar of two regions: Meknes -Tafilalet and Marrakech- Tansift - Alhaouz. These data constitute an original database. In addition, we have described the potential use of the characterization and classification of Moroccan olive oils thanks to chemometrics on spectroscopic data. The results were quite satisfactory, despite the similarity of compositions between two possible origin designations cultivars ("Meknes-Tafilalet" and "Marrakech-Tansift-Alhaouz").

A classification of olive oils, based on the composition of fatty acids and sterols, using PCA, K-means and AHC methods, has been proposed. The results showed that there was a little variability in the composition of fatty acids and sterols in the olive oil produced in Meknes province. The use of chemometric methods has allowed us to characterize and differentiate the main monovariety. The results contribute to the determination of the geographical origin and the traceability of the Moroccan olive oil.

Keywords : Olive tree , *Olea europaea* L, olive stones , olive oil , polyphenols , antioxidant activity, decay resistance, particle board, spectroscopic methods, chromatographic methods, fatty acids , sterols, chemometrics , automatic classification .

المساهمة في تثمين المنتجات والمنتجات الثانوية للزيتون (أوليا أوروبيا: *Olea europaea L*) :
تطبيق كيميائي إحصائي لتحديد المنشأ الجغرافي لزيت الزيتون و تثمين المركبات الفينولية لنواة الزيتون
المغربي.

ملخص

شجرة الزيتون، نموذجية للبحر الأبيض المتوسط، تتميز بثمار الزيتون كعنصر أساسي من عناصر النظام الغذائي المتوسطي. هذا العمل يدخل في سياق توصيف و تثمين المنتجات والمنتجات الثانوية لشجرة الزيتون بالمغرب. درسنا المركبات الفينولية في نواة الزيتون من ثلاثة أصناف مغربية. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الكمية الإجمالية للمركبات الفينولية تختلف تبعا لأصناف الزيتون. نواة صنف "البكولين" (Picholine) المغربي هي أكثر غنى بالمركبات الفينولية الإجمالية (11,32 mg EAG / g MS)، يليه صنف "منارة" (Menara) (4,55 mg EAG / g MS) ثم صنف "حوزية" (Haouzia) (3,56 mg EAG / g MS). وأظهر التحليل النوعي الذي قمنا به عبر تقنية الكروماتوغرافي (HPLC-DAD-ESI/MS) أنه في مستخلصات الزيتون يسود النوزينيد (nüzhenide) و مشتقاته. في العينات الثلاثة لوحظ اختلاف فردي لبعض المركبات، رغم كون الثلاثة أصناف مماثلة بينها نوعيا. قمنا بتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للمستخلصات الفينولية من صنفين مغربيين بيكولين و حوزية. وأجرينا ثلاثة تجارب مختلفة في المختبر (in vitro) للنشاط المضاد للأكسدة، التي أظهرت كيف أن حبس الجذور الحرة (radicaux libres) و النشاط المضاد الأكسدة لعينة بيكولين هو مماثل للذي يتوفر عليه الأولو- روبيين (oleuropéine) وكذلك الفيتامين س (vitamine C).

وقد تم توصيف نواة الزيتون من الأصناف الثلاثة باستخدام تقنية الكيمياء الطيفية تحت الحمراء (FT- MIR). كما أبان تحليل تغير الوزن تبعا للحرارة أنه إلى حد (195 °C) كدرجة حرارية، نواة الزيتون لا تشهد تدهورا أو إنحلال. و تم اختبار المتانة ضد الجراثيم في وسط الاغار (Agar-Agar).النتائج المهمة هي تلك التي حصلنا عليها مع صنف البيكولين. يحسن تواجد نواة الزيتون خاصة من صنف البيكولين في ألواح الإعلانات من مقاومة هذه الألواح ضد الفطريات الإنحلال أو التسوس (*Coriolus versicolor et Coniophora puteana*). هذا و قد أدى بنا عدم وجود بيانات كافية على زيت الزيتون المغربي إلى تحليل عينات من زيت الزيتون من صنف واحد من منطقتي : مكناس تافيلالت و مراكش تانسيفت الحوز. ليشكل هذا قاعدة بيانات. بالإضافة إلى ذلك، وصفنا الاستخدام المحتمل لتوصيف وتصنيف زيوت الزيتون المغربية عبر البيانات الكيميائية الطيفية (spectroscopiques). و كانت النتائج مرضية تماما، على الرغم من تشابه بين اثنين من التراكيب الممكنة للتسميات الأصل لأصناف ("مكناس تافيلالت" و "مراكش تانسيفت الحوز").

لقد تم اقتراح تصنيف زيوت الزيتون ، استنادا إلى تكوين الأحماض الدهنية والستيرول (stérols) ، وذلك باستخدام الطرق الإحصائية (PCA, K-means, CAH). فأظهرت النتائج أن هناك تباينا قليلا في تكوين الأحماض الدهنية والستيرول في زيت الزيتون المنتجة في إقليم مكناس بالمغرب. كما أن استخدام الطرق الكيميائية الإحصائية (chimiométriques) أتاح توصيف و تمييز زيوت الفصائل الرئيسية . هذا وتساهم النتائج المحصل عليها في تحديد المنشأ الجغرافي لزيت الزيتون المغربي و تتبع مساره بأثر رجعي.

الكلمات المفتاحية : شجرة الزيتون، أوليا أوروبيا، نواة الزيتون، زيت الزيتون، البوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، مقاومة التسوس، ألواح الجسيمات، الطرق الطيفية، طرق الكروماتوغرافي، الأحماض الدهنية، الستيرول، الكيمياء الإحصائية، تصنيف أوتوماتيكي.

SOMMAIRE

Avant propos	iv
Principales publications et communication	v
Remerciements	viii
Résumé	xi
Abstract	xii
ملخص	xiii
Sommaire	xiv
Liste des Figures et Tableaux	xix
Liste des abréviations	xxiii

INTRODUCTION GÉNÉRALE

2

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur l’Olivier et l’Huile d’Olive	12
1.1. L’OLIVIER	13
1.1.1. Historique	13
1.1.2. Éléments de botanique	14
1.1.3. Caractéristiques de l’olivier et de son fruit	15
1.2. L’OLIVIER ET L’HUILE D’OLIVE DANS LE MONDE	16
1.2.1. L’olivier dans le monde	17
1.2.2. L’huile d’olive dans le monde	18
1.3. DESCRIPTION GÉNÉRALE DE L’OLÉICULTURE DU MAROC	19
1.3.1. Introduction	19
1.3.2. Situation géographique des plantations au Maroc	20
1.3.3. Variétés	21
1.4. DU FRUIT D’OLIVE A L’HUILE D’OLIVE	22
1.4.1. L’extraction	23
1.4.2. Techniques de production	25
1.5. CRITERES DE QUALITE DE L’HUILE D’OLIVE VIERGE	29
1.5.1. Introduction	29
1.5.2. Définitions	29
1.6. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE D’OLIVE	31
1.6.1. Les acides gras	31
1.6.2. Les triglycérides	33
1.6.3. Les substances insaponifiables	33

RÉFÉRENCES	34
2. Les polyphénols, Structures, Propriétés et Activité Antioxydante	38
2.1. LES POLYPHÉNOLS	39
2.1.1. Généralités sur les polyphénols	39
2.1.2. Quelques propriétés des composés phénoliques	40
2.1.3. Structures et classification des composés phénoliques	41
2.1.4. Extraction des composés phénoliques	50
2.1.5. Analyse et quantification des polyphenols	51
2.1.6. Importance nutritionnelle des polyphénols	52
2.2. ANTIOXYDANTS	52
2.2.1. Définition	52
2.2.2. Propriétés antioxydantes	52
2.2.3. Caractéristiques chimiques	53
2.2.4. Activité antioxydante	53
2.2.5. Mesure de l'activité antioxydante des polyphénols	54
2.2.6. Antioxydants Naturels	55
2.2.7. Effet des antioxydants sur la santé humaine	55
2.3. L'OLIVIER SOURCE DES POLYPHENOLS ET DES ANTIOXYDANTS	56
2.3.1. Diversité des composés phénoliques de l'huile d'olive	59
2.3.2. Pouvoir antioxydant de l'olivier	60
CONCLUSION	61
RÉFÉRENCES	63
3. Méthodes Chimométriques	72
3.1. INTRODUCTION	73
3.2. HISTORIQUE	73
3.3. MÉTHODES CHIMIOMÉTRIQUES	74
3.3.1. Méthodes Descriptives : Exploration des données	76
3.3.2. Méthodes prédictives	79
3.3.3. Méthodes de classification	84
CONCLUSION	87
RÉFÉRENCES	88
CHAPITRE 2. CARACTÉRISATION ET VALORISATION DES NOYAUX D'OLIVE	
2.1. Caractérisation physico-chimiques et activité anti-oxydante des noyaux d'olives	93
2.1.1. Caractérisation des composés phénoliques des noyaux d'olives de trois variétés marocaines	95
1. INTRODUCTION	96

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	97
2.1. Matières végétales	97
2.2. Préparation des échantillons	97
2.3. Conditions d'extraction	98
2.4. Estimation des polyphénols totaux	98
2.5. Analyse HPLC- DAD- ESI/MS	98
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	99
3.1. Extraction et analyse quantitative des composés phénoliques totaux de noyaux d'olive	99
3.2. Analyse et caractérisation des composés phénoliques des noyaux d'olive	100
3.3. Analyse quantitative des composés phénoliques	104
4. CONCLUSIONS	108
RÉFÉRENCES	109
2.1.2. l'Activité antioxydante d'une préparation brute riche en composés phénoliques des noyaux d'olives de deux cultivars marocaines : une étude préliminaire	113
1. INTRODUCTION	115
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	115
2.1. Matières végétales	115
2.2. Extraction des polyphénols	116
2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux	116
2.4. Analyse de l'activité antioxydante	116
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	117
4. CONCLUSIONS	118
RÉFÉRENCES	119
2.2. Valorisation des Noyaux d'Olives	121
2.2.1. Valorisation des noyaux d'olives marocaine par utilisation des panneaux de particules	123
1. INTRODUCTION	124
2. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	125
2.1. Matières végétales	125
2.2. Extraction et estimation des composés phénoliques totaux	126
2.3. Spectroscopie moyen-infrarouge à transformée de fourier (MIR-FT)	126
2.4. Analyse thermogravimétrique (ATG)	126
2.5. Préparation de panneaux de particules	127
2.6. Propriétés biologiques	127
2.6.1. Test pourriture des composites de panneaux de particule	127
2.6.2. Test pourriture de poudres des noyaux d'olives	128
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	128
3.1. Impact des variétés de noyaux d'olive sur l'extraction des polyphénols	128
3.2. Etude thermique des différents noyaux d'olives	130
3.3. Résistance pourriture de composites de panneaux de particules	131
3.4. Effet fongicide de noyaux d'olives	132

4. CONCLUSION	133
RÉFÉRENCES	134

CHAPITRE 3. CLASSIFICATION ET DISCRIMINATION CHIMIOMÉTRIQUE DES HUILES D'OLIVES MAROCAINES

3.1. Caractérisation et classification des huiles d'olives monovariétales de deux régions au Maroc (Méknes-Tafilalet et Marrakech-Tensift-al Haouz) 141

1. INTRODUCTION	142
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	143
2.1. Échantillons	143
2.2. Caractérisation physicochimique	144
2.3. Préparation et analyse des esters méthyliques d'acides gras	144
2.4. Spectroscopie proche infrarouge	145
2.5. Analyse en Composantes Principales	145
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	145
3.1. Caractérisation physicochimique :	145
3.2. Composition en acides gras	147
3.3. Spectroscopie Proche infrarouge	148
3.4. Analyse en Composantes Principales	149
4. CONCLUSION	151
RÉFÉRENCES	152

3.2. Authentification chimiométrique des huiles d'olives vierges Marocaines (Picholines) par classification automatique basée sur la composition en acides gras et en stérols 156

1. INTRODUCTION	158
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	159
2.1. Collecte des échantillons	159
2.2. Chromatographie en phase gazeuse	159
2.3. Analyse des données chromatographiques	159
2.4. Méthodes de classification	161
2.4.1. K-means	161
2.4.2. Classification ascendante hiérarchique	161
3. RÉSULTATS	162
3.1. Chromatographie en phase gazeuse	162
3.2. Analyse en composantes principales	163
3.3. Classification via des requêtes (Base de données)	166
3.4. Diagramme de dispersion des données	166
3.5. Classification via K-Means	167
3.6. Classification via CAH	168
4. DISCUSSION	168

5. CONCLUSION	170
RÉFÉRENCES	172
CONCLUSION GÉNÉRALE	175

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

1- Liste des figures

Chapitre 1.

Figure 1.	De l'oléastre à l'olivier (Breton, et al. 2004).	13
Figure 2.	Aire d'extension de l'olivier (Ghedira, K. 2008).	14
Figure 3.	Schéma d'une olive (variété Picholine, dessin V. Ollivier).	16
Figure 4.	Composition chimique du fruit, l'olive (Ghanam, et al. 2012).	16
Figure 5.	Zone de répartition géographique de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996).	17
Figure 6.	Zone de répartition géographique de l'olivier dans le bassin méditerranéen (Amouretti & Comet, 1998).	18
Figure 7.	Les principaux producteurs d'oliviers dans le monde (Anonyme, 2012).	18
Figure 8.	Consommation mondiale d'huile d'olive durant la campagne 2011/2012 (COI 2012)	19
Figure 9.	Évolution de la superficie consacrée à l'oléiculture (ha) (COI 2012).	20
Figure 10.	Schéma des quatre principales étapes de l'extraction de l'huile d'olive (Ghanam, et al. 2012).	23
Figure 11.	Schéma de fabrication de l'huile d'olive vierge par procédé discontinu (AFIDOL).	25
Figure 12.	Schéma de fabrication de l'huile d'olive vierge par procédé continu (Alfalaval).	26
Figure 13.	Système discontinu d'extraction par presse (Ghanam, et al. 2012).	27
Figure 14.	Système continu d'extraction avec centrifugation (2 phases et 3 phases) (Ghanam, et al. 2012).	28
Figure 15.	Structure des acides hydroxybenzoïques.	42
Figure 16.	Structure des acides hydroxycinnamiques.	42
Figure 17.	Structure de base des flavonoïdes.	43
Figure 18.	Structure des flavones.	44
Figure 19.	Structure des flavonols.	44
Figure 20.	Structure des flavanones.	45
Figure 21.	Structure des chalcones et dihydrochalcones.	46
Figure 22.	Structure des flavanols.	47
Figure 23.	Structure des proanthocyanidines.	48
Figure 24.	Structure primaire des anthocyanes.	49
Figure 25.	Structure des lignanes.	49
Figure 26.	Structure des stilbènes.	50
Figure 27.	Pouvoir antioxydant de l'hydroxytyrosol (composé phénolique majeur de l'huile d'olive) par rapport à d'autres antioxydants.	61
Figure 28.	Choix des axes pertinents en ACP.	78
Figure 29.	Principaux résultats d'une ACP.	79
Figure 30.	Exemple d'un score plot (Murali Krishna et al., 2005).	80
Figure 31.	Le positionnement des centroides C1, C2 et Ck .	85
Figure 32.	La partition hiérarchique.	86

Chapitre 2.

2.1.

Figure 1.	Chromatogrammes (HPLC) des extraits des noyaux d'olives acquises par DAD (A) et ESI/MS (B).	104
------------------	---	-----

2.2.

Figure 1.	Quelques composants trouvés dans les noyaux et les graines d'olives.	125
Figure 2.	Spectres infra-rouge des noyaux d'olives des variétés Haouzia, Menara et Picholine Marocaines.	130
Figure 3.	Graphes de l'analyse ATG des noyaux d'olives des variétés Haouzia, Menara et Picholine Marocaines.	131

Chapitre 3.

3.1.

Figure 1.	Carte géographique du Maroc montrant les 2 régions sièges de la collecte des huiles d'olives vierge du présent travail	144
Figure 2.	L'acidité des huiles d'olive de deux régions au Maroc « Marrakech-Tansift-Al Haouz et Meknès-Tafilalt ».	146
Figure 3.	Indice de peroxyde des huiles d'olive de deux régions au Maroc « Marrakech-Tansift-Al Haouz et Meknès-Tafilalt ».	146
Figure 4.	Spectres proche infrarouge d'huiles d'olive vierges	148
Figure 5.	Représentation ACP des spectres PIR des échantillons des huiles d'olives vierges. M : Meknès; K : Marrakech	149
Figures 6a et 6b.	Composantes principales des spectres PIR ((a) CP-1 ; (b) CP-2).	150

3.2.

Figure 1.	Chromatogramme (CPG) des huiles d'olives vierges marocaines de la région de Meknès.	162
Figure 2.	Graphique des valeurs propres.	165
Figure 3.	Variance totale en fonction des composantes principales.	165
Figure 4.	Composantes principales en 2 dimensions: PC1 et PC2.	165
Figure 5.	Diagramme de dispersion des échantillons en fonction du taux de cholestérol.	167
Figure 6.	Dendrogramme de classification de la méthode CAH.	168

2- Liste des tableaux

Chapitre 1.

Tableau 1.	Situation botanique de l'espèce <i>Olea europea</i> L. (Ghedira, K. 2008).	15
Tableau 2.	Noms vernaculaires de l'olivier (Ghedira, K. 2008).	15
Tableau 3.	Production d'huile d'olive dans la dernière décennie en milliers de tonnes (COI, 2013).	19
Tableau 4.	Composition en acides gras des huiles d'olive vierges (noms, nomenclatures, limites fixées par le Codex Alimentaire, année).	32
Tableau 5	Principales classes de composés phénoliques (Macheix, <i>et al.</i> 2006).	40
Tableau 6.	La composition chimique de chaque partie de l'olive (Aragón and Palancar, 2001).	56
Tableau 7.	Composés phénoliques identifiés dans les matrices d'olive (Ryan et al. 2002).	57
Tableau 8.	Les outils de la chimométrie (Lantéri et al. 1998).	75

Chapitre 2.

2.1.

2.1.1

Tableau 1.	Polyphénols Totaux des noyaux d'olives des trois variétés étudiées (en g EAG / g MS).	100
Tableau 2.	Identification des composés phénoliques des noyaux d'olives.	106
Tableau 3.	Quantités en composition chimique des extraits des noyaux d'olives de trois cultivars étudiés (résultats en%).	107

2.1.2.

Tableau 1.	Polyphénols totaux des noyaux d'olives de deux cultivars marocains.	117
Tableau 2.	L'activité antioxydante des polyphénols extraits des des noyaux d'olives de deux cultivars marocains.	117

2.2.

Tableau 1.	Concentration en Polyphénols totaux dans les différents noyaux d'olive.	129
Tableau 2.	Perte en masse des panneaux de particules en présence de noyaux d'olive vis-à-vis des champignons (<i>Coriolus versicolor</i> et <i>Coniophora puteana</i>).	132
Tableau 3.	Effet de la concentration des noyaux d'olives sur le développement de champignons	133

Chapitre 3.

3.1.

Tableau 1.	Teneur en acide oléique et l'acide linoléique des huiles d'olives vierges.	147
-------------------	--	-----

3.2.

Tableau 1.	Principaux acides gras des huiles d'olives vierges marocaines de la région de Meknès.	163
Tableau 2.	Base de données des huiles d'olives vierges.	163
Tableau 3.	Matrice de corrélation.	164

Tableau 4.	Pourcentage du total de la variance.	164
Tableau 5.	Composantes principales retenues.	166
Tableau 6.	Requête de selection.	166
Tableau 7.	Résultats de la requête.	166
Tableau 8.	Classification selon la méthode K-means (K=2, K=5, K=10 et K=14), K est le nombre de classes.	167
Tableau 9.	Notations des acides gras et les stérols dans l'huile d'olive vierge.	171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAO	: Activité antioxydante;
Abs	: Absorbance;
ABTS	: Acide 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid);
ACP	: Analyse en Composantes Principales;
AG	: Acide Gallique;
AGPI	: Acide gras polyinsaturé;
ATR	: Réflexion Totale Atténuée;
COI	: Conseil Oléicole International
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse;
DO	: Degrés d'Oxydation;
EC	: Épicatéchine;
ECG	: Épicatéchine gallate;
EDTA	: Acide éthylènediamine tétra-acétique;
EGC	: Épigallocatechine;
EGCG	: Épigallocatechine gallate;
ELL	: Extraction Liquide-Liquide,
EOR	: Espèces oxygénées réactives;
EPS	: Extraction en Phase Solide;
Fl-OH	: Flavonoïde;
FTIR	: Infrarouge avec transformée de Fourier;
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance;
LDL	: Low-Density Lipoprotein;
MIR	: Moyen Infrarouge;
MLR	: Multiple Linear Régression;
MO	: Micro-Ondes;
m/z	: Rapport masse / charge;
NIPALS	: Non Linear Interactive Partial Least Squares;
NIR	: Proche Infrarouge;
OGly	: O-glycosyl;
OMe	: O-methyl;
OH	: Hydroxyl;
ORAC	: Capacité d'Absorber les Radicaux Oxygénés;
OSC	: Orthogonal signal correction;
PARAFAC	: Analyse de facteurs en parallèle;
PCR	: Principal Component Regression;
PLS	: Partial least Square;
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire;
RO	: Radical Oxyl;
ROO	: Radical Peroxyl;
ROS	: Reactive Oxygen Species;
RPE	: Résonance Paramagnétique Électronique;
SIMCA	: Soft independent modelling of class analogies;
SIMPLS	: Statistically Inspired Modification of Partial Least Squares;
SM	: Spectromètre de Masse;
SNV	: Standard normal variate;

- SVD** : Décomposition en valeurs singulières;
TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity;
UV : Ultra-Violet;

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'olivier est l'une des plus anciennes cultures ligneuses et particulièrement répandue dans toute la région méditerranéenne et joue un rôle important dans l'économie rurale, le patrimoine local et la protection de l'environnement. Le secteur oléicole, jadis important dans les pays du pourtour méditerranéen, fait l'objet d'un intérêt croissant dans le monde entier. La consommation mondiale des produits oléicoles a connu une hausse importante au cours des dernières décennies. Plusieurs raisons expliquent cette situation telles que : l'expansion du commerce international, l'intérêt croissant des consommateurs à l'égard d'un régime alimentaire sain et les efforts pour garantir une production durable et non contraignante pour l'environnement. En outre, les avancées technologiques pour réduire les coûts de production, l'intérêt pour la qualité, l'effet des campagnes de promotion et l'augmentation des revenus par habitant dans de nombreux pays.

L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen où la production d'olive a une fortune économique transmise sur plusieurs générations (Uccella, *et al.* 2001). Sur le plan national, la filière oléicole est considérée comme filière de poids mais accusant un net retard de développement compte tenu de la croissance du marché mondial et face à la montée en puissance de la concurrence. Comme conséquence, des interventions de l'état ont été menées visant, d'une part, l'extension du verger national et l'augmentation de la production et d'autre part, la valorisation de ce patrimoine national. Les principaux plans qui se sont succédés dans le temps sont le Plan National Oléicole (1998-2010) et le Plan Maroc Vert lancé en 2008. Ce dernier a pour objectif, entre autres, d'augmenter les ambitions et de renforcer les moyens de développement de la filière, et ce à travers le contrat-programme oléicole, dont le principal objectif est de réaliser 510 projets pour l'amélioration de la productivité et de la qualité des produits oléicoles.

L'huile d'olive est une combinaison de différents composants, dont chacun joue un rôle important dans sa caractérisation. Un rôle important dans la détermination du niveau de la qualité est donné par la classification caractérisant des différents types d'huile d'olive. La caractérisation peut être faite de différentes manières, mais seulement une évaluation globale des paramètres analytiques peut assurer une évaluation objective. Cette approche est également essentielle pour suivre les changements possibles au cours du temps sur l'altération possible ou falsification (Aguilera, *et al.* 2005; Luna, *et al.* 2006).

La qualité d'huile d'olive est influencée par une combinaison de facteurs (variété /méthodes de récolte /processus d'extraction (Pinatel, *et al.* 2004; Tsimidou, *et al.* 2005). Kler, en 1992 a observé en premier l'influence de la variété, de la région de culture et des conditions climatiques sur la composition et les caractéristiques de l'huile d'olive. Différents travaux, dans le monde, ont investi l'huile d'olive vierge en la valorisant grâce à des méthodes analytiques couplées à des méthodes chimiométriques (Guillén, *et al.* 2012). Il existe de très nombreuses données sur la caractérisation et la composition en acides gras de l'huile d'olive d'origines variées des différents pays (Espagne, France, Grèce, Italie, Portugal et Tunisie). Plusieurs études ont été effectuées pour pouvoir faire corréler la composition chimique de l'huile d'olive avec sa qualité et l'origine géographique (Aparicio, *et al.* 1987; Leardi, *et al.* 1987 ; Fiorino, *et al.* 1991; Ferreira, *et al.* 1992; Gigliotti, *et al.* 1993; Tsimidou, *et al.* 1993; Ulberth & Buchgraber, 2000; Di Giovacchino, *et al.* 2002; Dhifi *et al.* 2005; Galeano, *et al.* 2005; Pardo, *et al.* 2007).

Actuellement plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des techniques spectroscopiques et chromatographiques en couplage avec la chimiométrie comme une alternative pour la vérification de l'origine géographique, la classification, la discrimination des différents grades et la détection des artefacts ou adultérations dans l'huile d'olive (Pristouri, *et al.* 2010; Galtier, *et al.* 2007; Collomb, *et al.* 200; Musa-Veloso, *et al.* 2011). Cette méthodologie de couplage, en permettant l'interprétation de plusieurs variables simultanées, est susceptible de discriminer facilement les moindres différences existantes entre les spectres Infrarouge ou chromatogrammes en phase gazeuse.

Les méthodes spectrales sont largement utilisées en raison de leur rapidité, leur sensibilité et par le fait qu'elles puissent aussi bien analyser la matière organique à l'état liquide, solide ou gazeux. L'acquisition rapide d'une masse d'informations spectrales sur un échantillonnage conséquent conduit le spectroscopiste à utiliser les outils de la chimiométrie pour traiter ces données afin d'obtenir une nouvelle information décisionnelle.

Pour la classification et la discrimination des huiles d'olive, des méthodes chimiométriques ont été appliquées (Ollivier, *et al.* 2006; Runcio, *et al.* 2008), parmi ces méthodes, l'Analyse en Composante Principale, l'Analyse Discriminante et la Classification Hiérarchique sont utilisées. Au Maroc. Il n'existe pas une base de données d'ensemble récente sur les huiles d'olives marocaines issues des principales régions oléicoles. Seules quelques études sur la caractérisation des huiles d'olive provenant des régions oléicoles de Maroc sont réalisées (Ait Yacine, Z. 2002, Oussama, A. 2011, Chimi, H. 2001).

Olea europaea L possède des propriétés pharmacologiques, telles que, les activités anti-inflammatoires et l'anti-bactériennes (Ding, 1999). Ces propriétés ont été attribuées à la présence de nombreux composés, y compris des phénols. Les olives sont considérées comme une riche source de composés phénoliques. Ces derniers sont reconnus comme des produits potentiellement bioactifs et peuvent avoir des propriétés antioxydantes et thérapeutiques qui produisent des anti-cancers, anti-inflammatoires, et d'autres activités biologiques (Obied, *et al.*2005).

Les composés phénoliques sont une gamme variée de métabolites secondaires issus de la voie shikimique du métabolisme. *Olea europaea L* contient un certain nombre de composés phénoliques inhabituels, y compris divers oleosides. Les quantités et les types de composés phénoliques varient fortement entre feuilles et fruits (pulpe et noyaux). Les relations métaboliques entre les différentes parties et le contenu phénolique sont mal comprises. L'intérêt dans ce domaine est lié à l'importance du profil phénolique, de la qualité des produits de l'olivier et de son utilisation ou bien sa valorisation.

De nombreuses constatations, liées à la présence de phénols antioxydants dans des sources végétales, étaient établies dans le but de mieux les étudier, les évaluer et les valoriser tels que les produits traditionnels, les sous-produits agricoles et d'autres moins connues. Très peu d'études ont porté sur la composition phénolique des noyaux d'olive. Il est à noter que dans les baies de raisin, les graines, qui sont riches en tanins de faible masse moléculaire condensé, sont généralement considérés comme des réservoirs pour les composés phénoliques (Katalinic, *et al.* 1997). La composition phénolique dans les différentes parties du fruit est complexe en fonction de la variété, la saison de collecte, les conditions de croissance, et le temps de la maturation (Solinas, *et al.* 1975; Vlahov, 1992; Esti, *et al.* 1998; Romani, *et al.* 1999). Egalement, de rares études ont porté sur la composition phénolique des noyaux d'olives, néanmoins certains composés phénoliques ont été identifiés, notamment salidroside, hydroxytyrosol, oleuropéine, tyrosol, et demethyloleuropein à tous les stades de maturation (Maestro-Durán, *et al.* 1994; Servili, *et al.*1999; Silva, *et al.* 2010). En outre, les noyaux contiennent plusieurs composés phénoliques observés dans d'autres tissus de la plante.

Les noyaux d'olive sont un important sous-produit généré lors de l'extraction de l'huile d'olive et les olives de table dénoyautées. Généralement, ce matériau est utilisé comme combustible pour produire de l'énergie électrique ou de la chaleur. Un grand nombre d'articles de recherche ont été publiés portant sur la composition chimique des olives et de l'huile d'olive. Toutefois, seules quelques unes ont été consacrées à l'analyse des composants de noyau d'olive et leurs utilisations (Rodríguez, *et al.* 2008).

Il y a différentes procédures d'analyse des substances phénoliques, mais certaines sont utilisées dans l'analyse d'olive. Les méthodes de chromatographie HPLC qui donnent des informations spécifiques sur les substances individuelles sont de plus en plus fréquentes que l'importance de certaines substances phénoliques devient mieux comprise. La teneur en composés phénoliques des fruits d'olive a été étudiée beaucoup plus que tout autre tissu végétal d'olive et a été examinée (Ryan, *et al.* 1998; Ryan, *et al.* 1999). Les principaux composés phénoliques dans les fruits d'olive sont l'oleuropéine et ligstroside, deux glucosides de l'acide élénolique avec 2 - (3,4-dihydroxyphényl) et le 2 - (4-hydroxyphényl). Servili *et al.* (1999) ont caractérisé les changements induits par la maturation dans le contenu phénolique du fruit de l'olivier complète, englobant la peau, la pulpe et le noyau dans trois cultivars d'olivier différents. Nüzhenide a été détecté uniquement dans les noyaux d'olive de toutes les différentes variétés et à tous les stades de maturation. La lutéoline glucoside et la rutine ont été détectés seulement dans la peau d'olive, tandis que verbascoside, oleuropéine, et dimethyloleuropéine ont été trouvés dans les trois matrices d'olive. La concentration de ces deux derniers composés phénoliques était plus grande dans la pulpe d'olive. De même, Rovellini *et al.* (1997) ont analysé la composition en flavonoïdes des fruits, et des feuilles ainsi que l'huile d'olive. Au Maroc, l'olivier a un grand intérêt et cultivé dans de nombreuses régions du pays. Certaines études ont été faites sur la composition phytochimique des variétés marocaines de l'huile d'olive, au meilleur de notre connaissance, il n'existe pas de rapport sur les noyaux d'olives phytochimiques de cultivars de croissance au Maroc.

L'objectif du présent travail est le développement de méthodes rapides crédibles et efficaces pour la caractérisation et la classification des huiles d'olives marocaines (*Olea europaea L.*) en fonction de leur origine géographique. Ce ci, dans un but de construire une base de données sur les huiles d'olives marocaines, d'une part et la valorisation des composés phénoliques des noyaux d'olives marocaines, d'autre part. Cette valorisation a été assurée par le présent travail grâce à la caractérisation physico-chimique, le pouvoir antioxydant et les tests biologiques pour l'utilisation de matériaux issus du noyau d'olives dans des panneaux de particules en bois.

Cette thèse s'organise en trois chapitres.

Le **premier chapitre**, a été réservé aux concepts fondamentaux sur lesquels se basent notre étude. Il est divisé en trois parties qui donnent les bases de compréhension des problématiques et des éléments utilisés pour les aborder. La **première partie**, a été consacrée à la présentation des notions générales sur l'olivier et l'huile d'olive, y compris sa composition et ses propriétés chimiques. Nous avons présenté dans la **deuxième partie**, les différentes classes de polyphénols ainsi que leurs propriétés chimiques suivies, par un rappel sur leur activité antioxydante. La diversité des composés phénoliques et leur pouvoir antioxydant ont été cités dans ce chapitre. Enfin nous avons présenté dans la **troisième partie**, les méthodes chimiométriques les plus courantes et celles utilisées dans ce travail pour la classification et discrimination, afin d'extraire les informations issues de nos échantillons.

Le **deuxième chapitre**, présente et discute les résultats obtenus dans ce travail sur la caractérisation et la valorisation des composés phénoliques des noyaux d'olives marocaines. En fait, ces résultats ont été présentés sous forme d'articles. Il est divisé en deux parties: La **première partie**, composée de deux articles, le premier détaille les analyses quantitatives et qualitatives des composés phénoliques de trois variétés marocaines de noyaux d'olive (Picholine, Haouzia et Menara), le deuxième fait l'objet d'une étude préliminaire sur l'activité antioxydante d'une préparation brute riche en polyphénols des noyaux d'olives de deux cultivars marocains. La **deuxième partie**, consiste à l'extraction des composés phénoliques à partir de trois variétés de noyaux d'olives marocaines et la caractérisation (chimique, thermique et biologique) afin de les valoriser dans des panneaux de particules en bois.

Le **troisième chapitre**, présente les résultats d'étude sur les huiles d'olives marocaines, ces résultats ont été présentés sous la forme d'articles. Ce chapitre est, alors, divisé en deux parties. Nous avons présenté dans la **première partie**, une caractérisation par l'analyse des critères de qualité et la classification par traitement chimiométrique des spectres proches infrarouge de l'huile d'olive. Cette dernière issue de deux régions marocaines; "Marrakech-Tansift-Al Haouz" et "Meknès-Tafilalet". La **deuxième partie**, de ce chapitre a été consacrée à l'authentification chimiométrique de l'huile d'olive vierge par classification automatique selon la composition en acides gras et stérols.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilera, M.P. Beltran, G. Ortega, D. Fernandez, A. Jimenez, A. Uceda, M. 2005. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89, 387-391.
- Aparicio, R. Albi, T. Lanzon, A. et Navas, M.A. 1987 Sexia, un sistema experto para la identificación de aceites : base de datos de zonas olivareras. *Grasas y Aceites*, 38, 9-14.
- Chimi, H. 2001. Qualité des huiles d'olive au Maroc. *PNTTA*, 79, 1-3.
- Collomb, M. Butikofer, U. Sieber R. Jeangros, B. Bosset, J.O. 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *Inter Dairy J*, 12, 649.
- Dhifi, W. Angerosa, F. Serraiocco, A. Oumar, I. Hamrouni, I. Marzouk, B. 2005 Virgin olive oil aroma : Characterization of some Tunisian cultivars. *Food Chemistry*, 93, 697-701.
- Di Giovacchino, L. Sestili, S. Di Vincenzo, D. 2002. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104, 587-601.
- Ding, B.P. 1999. Pharmacology of Qingguo pills on relieving cough. *China Traditional Patent Medicine*, 21, 27-28.
- Esti, M. Cinquanta, L. la Notte, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 32-35.
- Ferreiro, L. Aparicio, R. 1992. Influencia de la altitud en la composición química de los aceites de oliva vírgenes de Andalucía. *Grasas y Aceites*, 43, 149-156.
- Fiorina, M. Nizzi, F. 1991 The spread of olive farming. *Olivae*, 44, 9.
- Galeano Diaz, T. Durán Merás, I. Sanchez Casas, J. Alexandre Franco, M.F. 2005. Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control*, 16, 339-347.
- Galtier, O. Dupuy, N. Le Dréau, Y. Ollivier, D. Pinatel, C. Kister, J. Artaud, J. 2007. Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra. *Analy Chimica Acta*, 595, 136.
- Gigliotti, C. DAghetta, A. Sidoli, A. 1993. Indagine conoscitiva sul contenuto trigliceridico di oli extra vergini di oliva di varia provenienza. *Rivista Italiane dell Sostanza Grasse*, 483-489.
- Guillén, M.D. Uriarte, P.S. 2012. Study by ¹H NMR spectroscopy of the evolution of extra virgin olive oil composition submitted to frying temperature in an industrial fryer for a prolonged period of time. *Food Chemistry*, 134, 162-172.

- Katalinic, V. Males, P. Konja, G. 1997. Low molecular weight flavans in wine. *Journal of Wine Research*, 8, 19-20.
- Kler, J. 1992. Histoire des corps gras In Manuel des corps gras KARLESKIND.A. *Tome 1, Edition : Lavoisier*, Paris, 10-11.
- Leardi, R. Paganuzzi, V. 1987. Caratterizzazione dell'origine di oli di oliva extravergini mediante metodi chemiometrici applicati alla frazione sterolica. *Rivista Italiane dell Sostanza Grasse*, 131-136.
- Luna, G. Morales, M. T. Aparicio, R. 2006. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98, 243-252.
- Maestro-Durán, R. Cabello, L.R. Gutiérrez, R.V. Roncero, V.A. 1994. Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites*, 45, 332-335.
- Musa-Veloso, K. Poon, T. H. Ann Elliot, J. Chung, C. 2011. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. *PLEFA*, 85, 9.
- Obied, H. K. Allen, M. Bedgood, D. R. Prenzler, P. D. Robards, K. Stockmann, R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem*, 53, 823-837.
- Ollivier, D. Artaud, J. Pinatel, C. Durbec, J.P. Guérère, M. 2006. Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions, and chemometrics. *Food Chemistry*, 97, 382-393.
- Pardo, J.E. Cuesta, M.A. Alvarruiz, A. 2007. Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel". *Food Chemistry*, 100, 977-984.
- Pinatel, C. Petit, C. Ollivier, D. Artaud, J. 2004. Outils pour le suivi de la qualité de l'huile d'olive vierge et son amélioration. *OCL*, 11, 217-219.
- Pristouri, G. Badeka, A. Kontominas, M.G. 2010. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food Control*, 21, 412.
- Rodríguez, G. Lama, A. Rodríguez, R. Jiménez, A. Guillén, R. Fernández-Bolaños, J. 2008. Olive stone and attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bior. Techn*, 99, 5261-5269.
- Romani, A. Mulinacci, N. Pinelli, P. Vincieri, F.F. Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 964-967.
- Rovellini, P. Cortesi, N. Fedeli, E. 1997. Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 74, 273-279.
- Tsimidou, M. Georgiou, A. Koidis, A. 2005. Loss of Stability of "veiled" (cloudy) Virgin Olive Oils in Storage. *Food Chem*, 93, 377-383.
- Tsimidou, M. Karakostas, K.X. 1993. Geographical classification of Greek virgin olive oil by non-parametric multivariate evaluation of fatty acid composition. *J. of Sci. of Food Agri*, 62, 253-257.

- Runcio, A. Sorgona, L. Mincione, A. Santacaterina, S. et Poiana, M. 2008. Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. *Food Chemistry*, 106, 735-740.
- Ryan, D. Robards, K. Lavee, S. 1999. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Food Sci. Technol*, 34, 265-274.
- Ryan, D. Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31-44.
- Servili, M. Baldioli, M. Selvaggini, R. Macchioni, A. Montedoro, G. 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Sci. Food Agric*, 47, 12-18.
- Silva, S. Gomes, L. Leitão, F. Bronze, M. Coelho, A.V. Villas-Boas, L. 2010. Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 61, 157-164.
- Solinas, M. di Giovacchino, L. Cucurachi, A. 1975. I polifenoli delle olive e dell'olio di oliva. *Ann. Ist. Sperimen. Elaiotec*, 5, 105-126.
- Uccella, N. 2001. Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Sci. Technol*, 11, 315-327.
- Ulberth, F. et Buchgraber, M. 2000. Authenticity of fats and oils. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol*, 102, 687-694.
- Vlahov, G. 1992. Flavonoids in three olive (*Olea europaea* L.) fruit: varieties during maturation. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 58, 157-159.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

**1. GÉNÉRALITÉS SUR L'OLIVIER ET L'HUILE
D'OLIVE**

1. GÉNÉRALITÉS SUR L'OLIVIER ET L'HUILE D'OLIVE

L'olivier est le nom commun d'environ 35 espèces d'arbustes et d'arbres du genre *Olea*. Le nom est particulièrement utilisé pour l'espèce *Olea europaea*. L'olivier, arbre typiquement méditerranéen, se caractérise par un fruit, l'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen. Riche en acides gras insaturés, en vitamine E et en polyphénols. L'huile d'olive exerce un effet protecteur vis-à-vis de certaines tumeurs malignes et diminue l'incidence de certains types de cancer.

Ce chapitre est consacré à la présentation de notions générales sur l'olivier et l'huile d'olive, y compris la composition et les propriétés chimiques de l'huile d'olive.

1.1. L'OLIVIER

1.1.1. Historique

La culture de l'olivier aurait débuté il y a plus de 4 000 ans avant J-C, probablement en Crète, mais certains citent les Phéniciens comme ses premiers cultivateurs. Des amphores datant de 3 500 avant J.C ont été retrouvées sur l'île de Crète. Encore que l'huile d'olive n'était pas conservée dans des amphores mais dans des jarres. Des traces sur les murs des tombes royales égyptiennes attestent également d'une culture ancienne dans cette partie de l'Afrique du Nord. L'olivier s'est peu à peu étendu à travers la Méditerranée, au gré des civilisations et des conquêtes. De la Grèce à l'Espagne en passant par l'Egypte, l'Italie, la Tunisie, le Maroc ou la France, l'olivier va s'implanter durablement sur tout le pourtour méditerranéen jusqu'au XIXe siècle. C'est en Asie mineure, que la culture de l'olivier s'est développée, avant de s'étendre vers la Grèce, la Crète et l'Égypte où l'olivier était autant un ingrédient alimentaire qu'un élément décoratif. La culture de l'olivier s'est enfin étendue à travers l'ensemble du bassin méditerranéen, implanté par les Grecs en Corse, en Sardaigne, en Sicile et dans toute l'Italie ainsi qu'en Gaule, par la ville de Marseille, en 600 av. J.C.

Le commerce de l'huile d'olive s'est développé au fur et à mesure des conquêtes et grâce au progrès de la navigation. Sous l'Empire romain, les plantations se sont agrandies et de nombreux moulins ont été créés. La culture de l'olivier se retrouve dans toutes les provinces du pourtour méditerranéen et l'olivier est devenu un symbole de la modernité économique.

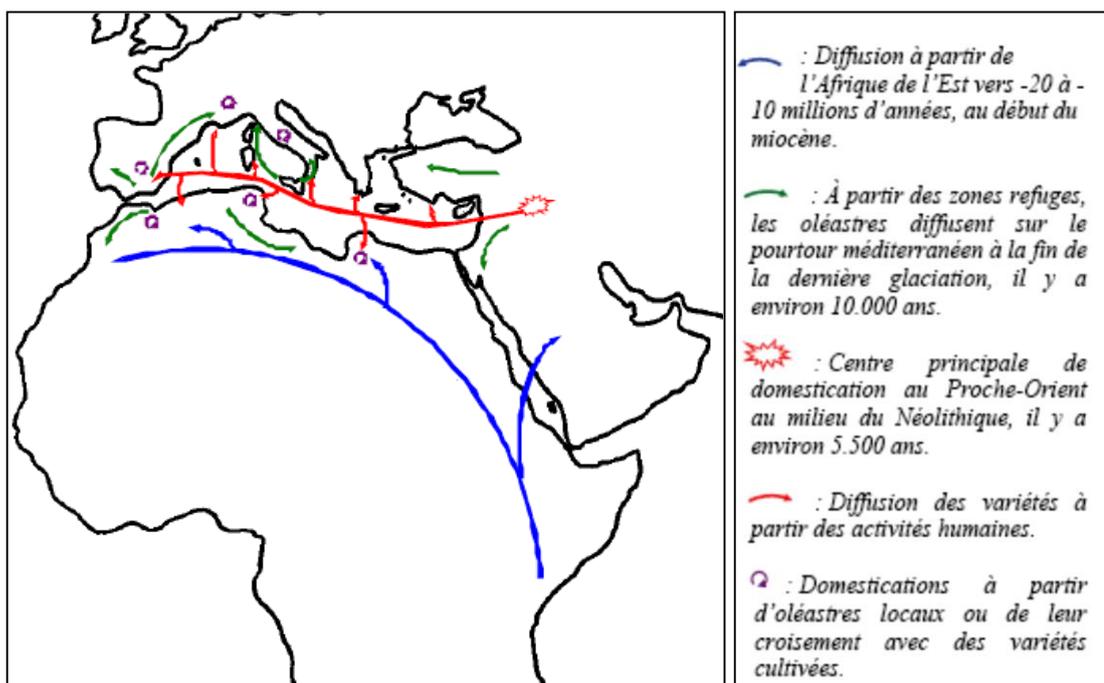


Figure 1. De l'oléastre à l'olivier (Breton, et al. 2004)

1.1.2. Éléments de botanique

L'olivier est le nom commun d'environ 35 espèces d'arbustes et d'arbres du genre *Olea*. Le nom est particulièrement utilisé pour l'espèce *Olea europaea*. L'origine botanique de cet arbre et le début de sa culture ont été un sujet de litige (Anon, 1983 ; Loukas et Krimbas, 1983 ; Blazquez, 1996) (tableau 1, 2).

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen (figure 2), de 6 à 8 m de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre et crevassée. Les feuilles sont blanches argentées sur la face inférieure, vertes grisâtres sur la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces et lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées. Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme. Des 35 espèces connues du genre *Olea*, *O. Chrysophylla*, trouvée en Asie et en Afrique est considérée comme l'ancêtre de l'olivier. Cependant, une autre théorie existe et selon laquelle l'ancêtre est l'olivier méditerranéen sauvage, *Olea oléastre* (Loukas et Krimbas, 1983). D'autres considèrent *Olea oléastre* comme intermédiaire dans le développement de l'olivier sauvage *Olea chrysophylla* à *Olea europaea* (Blazquez, 1996 ; Lavee, 1996).

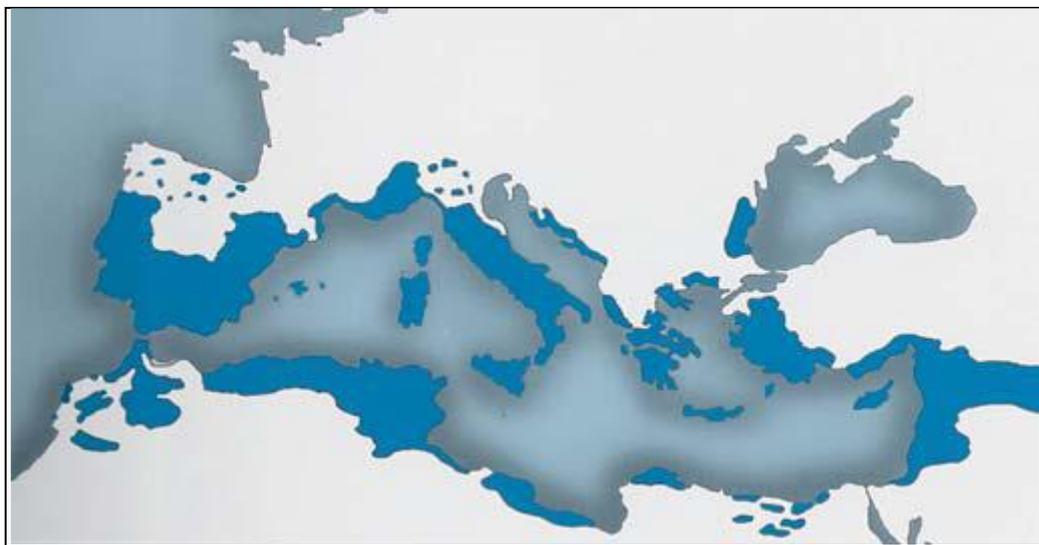


Figure 2. Aire d'extension de l'olivier (Ghedira, K. 2008)

Tableau 1. Situation botanique de l'espèce *Olea europea* L. (Ghedira, K. 2008)

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dialypetales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europea</i> L
Sous-espèces	<i>O.europea subsp.europea var sylvestris</i> <i>O.europea subsp.europea var. europaea</i>

Tableau 2. Noms vernaculaires de l'olivier (Ghedira, K. 2008)

Français:	olivier (olive)
Anglais :	olivetree (olive)
Allemand :	Olbaum (Olive)
Italien :	ulivo (olivo)
Espagnol:	olivo (aceituna)
Portugais :	oliveira (azeitona)
Arabe :	chajaret azzeitoun (zeitouna)

1.1.3. Caractéristiques de l'olivier et de son fruit

L'olive est une drupe de forme ovale constituée d'un péricarpe et d'un endocarpe. Elle pèse de 2 à 12 g, bien que certaines variétés puissent peser jusqu'à 20 g. Le péricarpe comprend deux parties : l'épicarpe (la peau) et le mésocarpe (la pulpe) qui représente environ 65-83 % du poids total. L'endocarpe (noyau) représente 13 % à 30 % du poids total. L'épicarpe est couvert de cire et passe du vert clair au noir quand le fruit mûrit (figure 3).

La composition chimique moyenne de l'olive est la suivante (figure 4) : l'eau, 50 % ; huiles 22 % ; polyphénols 1,5 % ; protéines 1,5 % ; sucres 18 % ; cellulose 5,5 % ; minéraux (cendres) 1,5 %. D'autres constituants importants sont les pectines, les acides organiques, les pigments et les glycosides de phénols (Ghanam, *et al.* 2012).

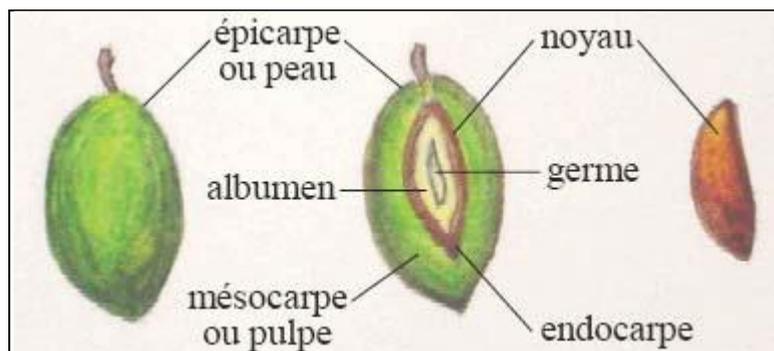


Figure 3. Schéma d'une olive (variété Picholine, dessin V. Ollivier).

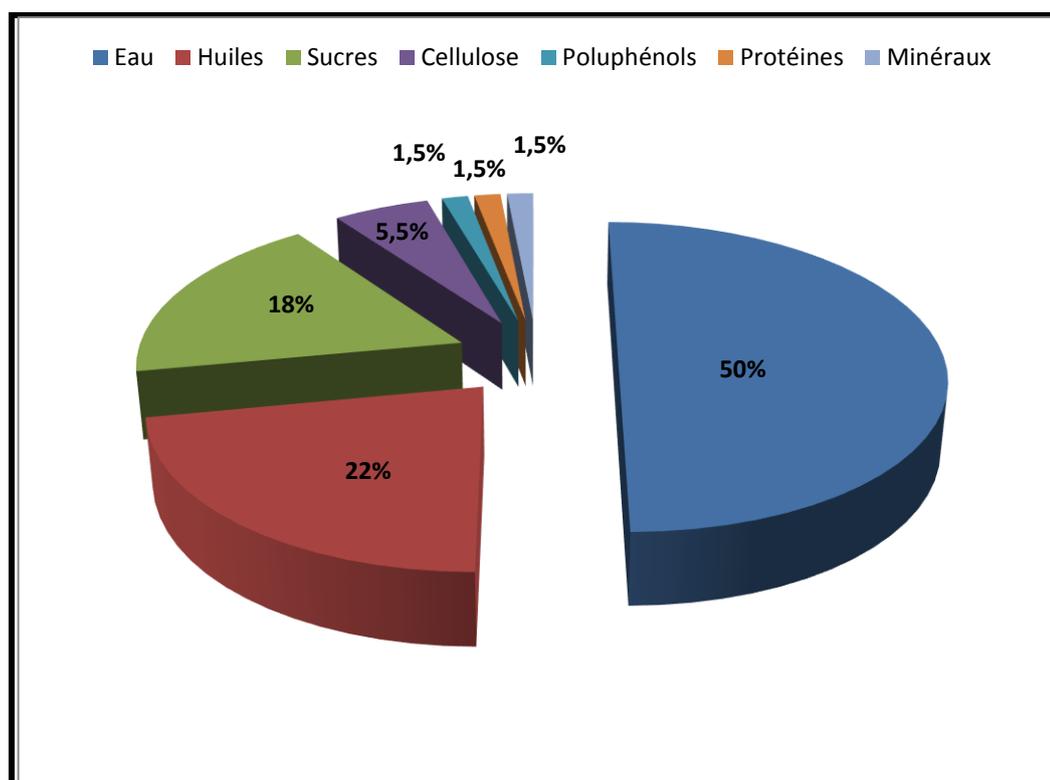


Figure 4. Composition chimique du fruit, l'olive (Ghanam, et al.2012).

1.2. L'OLIVIER ET L'HUILE D'OLIVE DANS LE MONDE

La culture de l'olivier, ainsi que la production et l'utilisation de l'huile d'olive ont été un bien connus et la pratique établie dans la région méditerranéenne depuis plus de 7000 ans. La consommation d'huile d'olive augmente rapidement dans le monde entier, en raison de sa valeur diététique et nutritionnelle élevée.

1.2.1. L'olivier dans le monde

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 26e et le 45e degré de latitude nord et sud (figure 5). Ce qui explique son introduction avec succès en Chine, au Japon, aux Etats Unis (Californie), et au Mexique pour l'hémisphère Nord, en Australie, en Afrique du Sud et dans divers pays de l'Amérique du Sud pour l'hémisphère Sud.

En Afrique, on le retrouve par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Égypte, Afrique du Sud et Angola. Au Moyen Orient et en Asie on le retrouve par ordre d'importance dans les pays suivants : Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine. En Amérique on le retrouve principalement dans les régions colonisées par les Espagnols et les Portugais et par ordre d'importance dans les pays suivants : Argentine, Mexique, Chili, Pérou, Uruguay, Brésil et Etats Unis (en Californie). L'Australie fait partie des nouveaux pays producteurs.

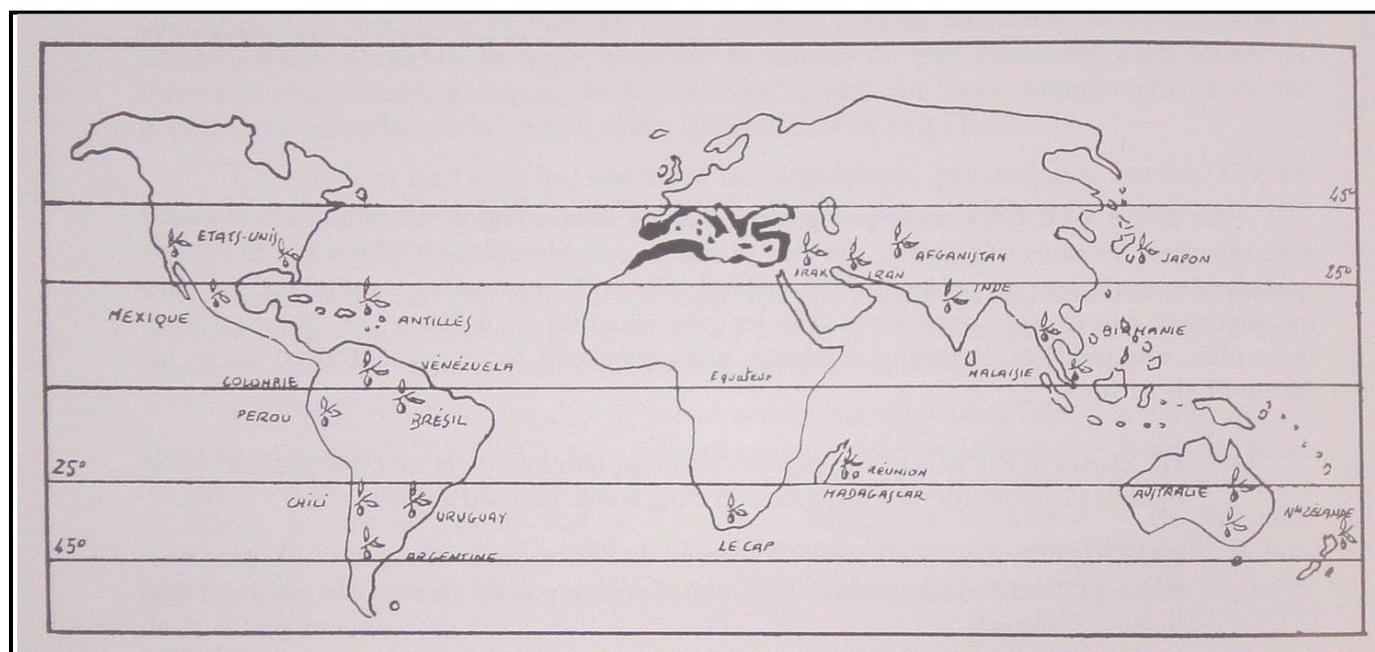


Figure 5. Zone de répartition géographique de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996)

Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau d'hydrométrie (figure 6). Les pays d'Europe qui cultivent l'olivier sont par ordre d'importance : l'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, l'Albanie, Chypre, la France, la Slovénie et Malte.

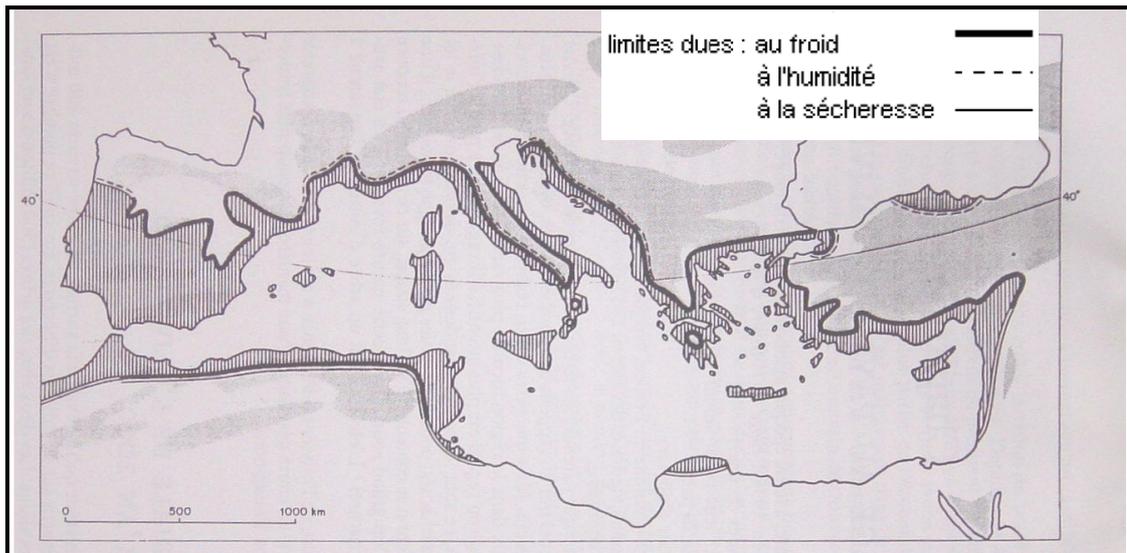


Figure 6. Zone de répartition géographique de l'olivier dans le bassin méditerranéen (Amouretti & Comet, 1998)

1.2.2. L'huile d'olive dans le monde

L'olivier a été cultivé depuis des milliers d'années dans les pays méditerranéens, l'huile d'olive a joué un rôle important dans le régime, l'économie et la culture de la population dans cette région (Keys, 1980; Viola, 1987; Muriana, *et al.* 1989). Il y a environ 750 millions d'oliviers productifs à travers le monde, 98% d'entre eux situés dans la région méditerranéenne, où plus de 97% de l'huile d'olive est produite (Figure 7). Les trois principaux producteurs d'huile d'olive dans le monde sont l'Espagne, l'Italie et la Grèce, suivie par la Turquie, la Tunisie et, dans une moindre mesure le Portugal, le Maroc et l'Algérie (Tsagaraki, *et al.* 2007).

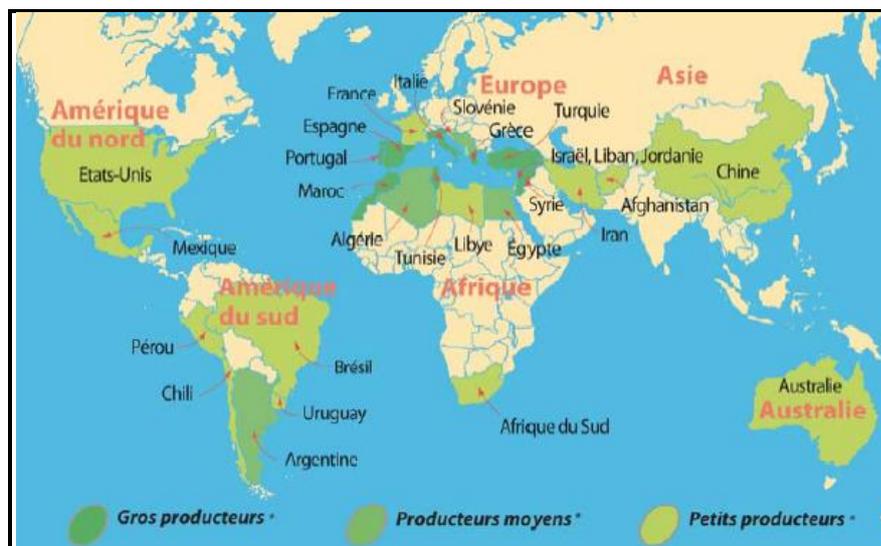


Figure 7. Les principaux pays producteurs d'oliviers dans le monde (Anonyme, 2012).

Selon le Conseil Oléicole International (2013), la production de l'huile d'olive est passée de 3,174 million de tonnes en 2003 à 3,321 million de tonnes en 2012 (augmentation de 10,34 %) (Tableau 3).

Tableau 3. Production d'huile d'olive dans la dernière décennie en milliers de tonnes (COI, 2013)

2003/04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13
3,174	3,013	2,572	2,767	2,713	2,669	2,973	3,075	3,321	2,425

En ce qui concerne la consommation, 90 % de la production mondiale d'huile d'olive sont consommés dans les pays producteurs eux-mêmes (Figure 8).

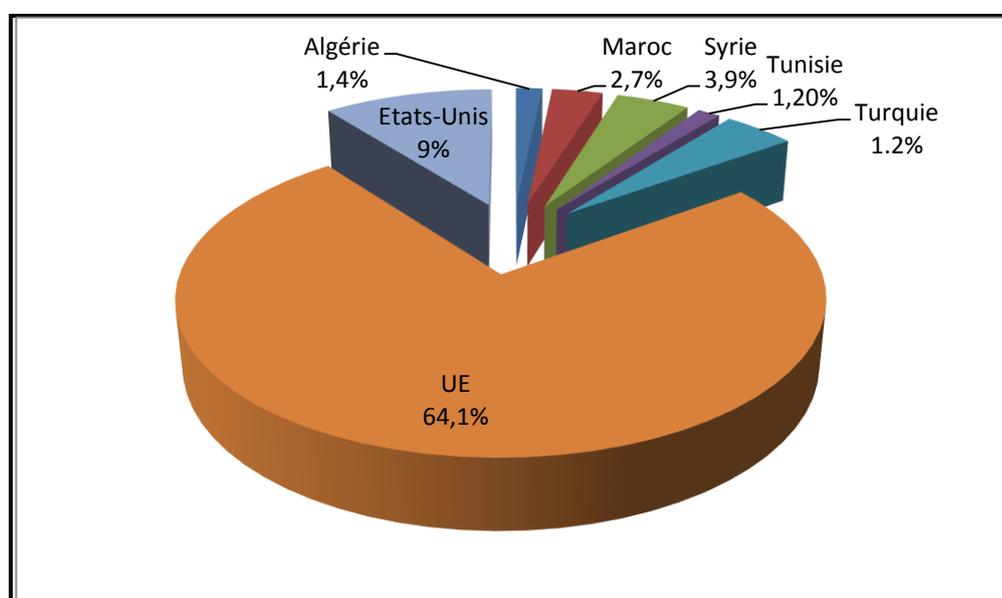


Figure 8. Consommation mondiale d'huile d'olive durant la campagne 2011/2012 (COI, 2012)

1.3. DESCRIPTION GÉNÉRALE DE L'OLÉICULTURE DU MAROC

1.3.1. Introduction

Pour ses capacités d'adaptation à tous les étages bioclimatiques, l'olivier est présent dans tout le pays, à l'exception de la bande côtière atlantique.

L'oléiculture connaît actuellement une grande expansion, avec un essor de la surface consacrée aux oliviers qui a passée de 600 000 ha en 2005 à 840 000 en 2011. D'après les prévisions, ce mouvement ascendant a encore de la ressource, et d'ici 2014, la surface oléiculture devrait atteindre les 900 000 ha, notamment grâce à la mise en œuvre de programmes nationaux de développement de l'oléiculture (Figure 9).

La filière oléicole se divise en deux branches d'importances inégales :

- **L'huile d'olive** : environ 75 % des olives produites au Maroc sont destinées à la production d'huile d'olive, principalement pour le marché national. L'huile d'olive représente 60 % des revenus et 30 % des exportations du secteur.
- **Les olives de table** : la production des olives de table, principalement destinée à l'exportation, représente 25 % de la production d'olives totale, 40 % des revenus de la filière et 70 % des exportations (moyenne annuelle d'environ 60 000 t).

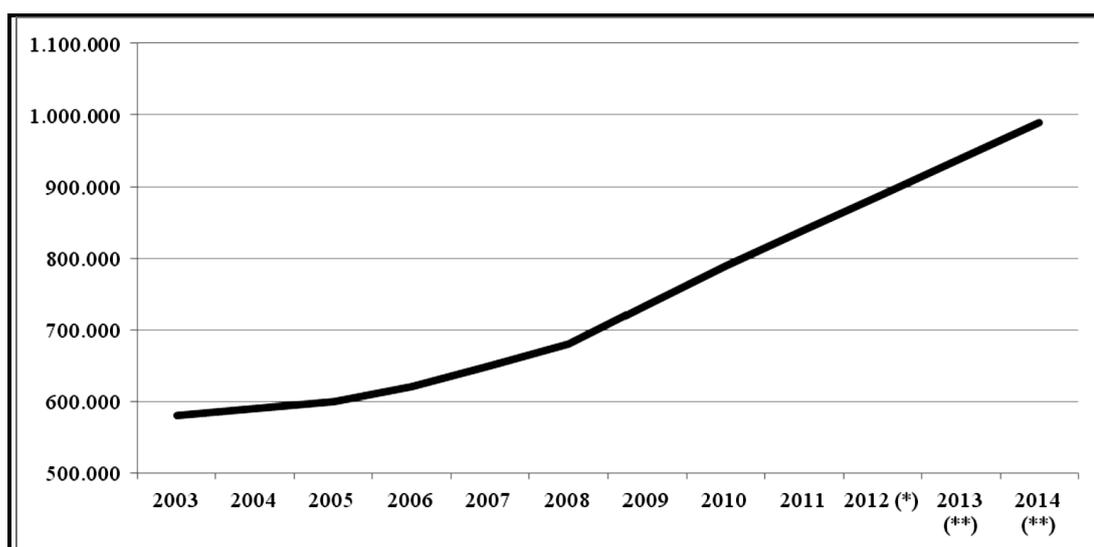


Figure 9. Évolution de la superficie consacrée à l'oléiculture au Maroc (ha) * Estimations ** Prévisions
(COI, 2012)

1.3.2. Situation géographique des plantations au Maroc

Les principales zones géographiques des plantations sont réparties en trois grandes régions :

- **Le Nord** : Chefchaouen, Taounate et Ouezzane qui présentent des sols pauvres, un terrain accidenté et un niveau de précipitations de 1 000 mm/an.

- **Le Centre** : Taza, Fez et Meknès qui présentent des sols riches et profonds, un terrain peu accidenté et des précipitations entre 450 et 500 mm/an.
- **Le Sud** : Tadla, Haouz, Safi et Essaouira qui présente des sols très riches, un terrain plat et une pluviométrie de moins de 400 mm/an. Les plantations y reçoivent une irrigation pérenne ou d'appoint.

1.3.3. Variétés

La principale variété cultivée au Maroc est la Picholine marocaine, présente à plus de 96 % dans les plantations du pays. Les 4 % restants se composent de la Picholine Languedoc, de la Dahbia et de la Meslala, qui sont cultivées en régime irrigué (Haouz, Tadla, El Kelâa) et de quelques variétés espagnoles et italiennes telles que la Picual, l'Arbequine, la Manzanilla, la Gordal et la Frantoio. (Ministère de l'Agriculture du Maroc 2012)

L'Institut national de la recherche agricole a commencé à étudier la Picholine marocaine il y a quelques années dans le cadre de son programme pour l'amélioration variétale afin de sélectionner les clones les plus performants. Ce travail a conduit à la sélection de deux clones viables, baptisés Haouzia et Menara qui sont actuellement en cours de diffusion.

a. Picholine marocaine

C'est une variété qui s'adapte bien aux sols et aux conditions climatiques de tout le pays. Elle a subi une sélection afin d'introduire des clones présentant des caractéristiques spécifiques dans les nouvelles plantations. Elle est rustique et présente une capacité rhizogène moyenne.

Présentant les caractéristiques typiques de la variété de double aptitude, les olives produites sont utilisées pour tout type de confiserie : des olives vertes cassées aux olives noires mûres. La pulpe se sépare facilement du noyau. Elle présente un rendement en huile moyen (20 %). L'huile extraite est d'excellente qualité, avec une forte teneur en acide oléique. En outre, elle présente une grande résistance à la congélation (elle conserve sa fluidité jusqu'à - 12°C), d'où son utilisation pour les produits en conserve. Elle est sensible à la maladie de l'oeil de paon.

b. Haouzia

Cette variété récente est issue d'une sélection clonale de la Picholine marocaine. Elle se distingue des autres clones par un nombre de fleurs parfaites par inflorescence, une entrée en production

précoce, une meilleure capacité de multiplication par bouturage semi-ligneux et une productivité élevée. C'est également une variété rustique, présentant une capacité rhizogène élevée.

En régime irrigué, les premiers fruits apparaissent dès la troisième année. Son époque de floraison est intermédiaire, elle est autocompatible et présente un pourcentage d'avortement ovarien élevé. Elle est souvent associée au pollinisateur Picholine Languedoc. Sa productivité est élevée et alternante, l'époque de maturation intermédiaire. Elle est utilisée pour la production d'huile d'olive (rendement de 23 %) comme pour la préparation d'olives vertes. La pulpe se sépare facilement du noyau. Elle est très résistante à la maladie de l'oeil de paon, et tolérante à la tuberculose et à la sécheresse.

c. Menara

Nouvelle variété issue d'une sélection clonale de la Picholine marocaine, elle se distingue de celle-ci par une meilleure aptitude à la multiplication par bouturage semi-ligneux, le nombre supérieur de fleurs parfaites par inflorescence, une entrée en production précoce et une productivité élevée. Elle est très rustique et présente une capacité rhizogène élevée.

En régime irrigué, elle se développe et entre en production très rapidement (dès la troisième année). Son époque de floraison est intermédiaire et bien qu'elle soit partiellement autocompatible, il est recommandé de l'associer avec un pollinisateur adéquat tel que la Picholine Languedoc. Elle présente un pourcentage d'avortement ovarien moyen et produit un pollen abondant. Son époque de maturation est intermédiaire. Elle est utilisée pour la production d'une huile d'olive de bonne qualité (teneur en huile de 24 %) comme pour la confiserie en vert ou en noir. La pulpe des fruits se sépare facilement du noyau. Elle est particulièrement résistante à la tuberculose (COI 2000).

1.4. DU FRUIT D'OLIVE A L'HUILE D'OLIVE

Les huiles d'olive vierges sont les huiles obtenues du fruit de l'olivier (*Olea europaea* L.) uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration (COI 2013).

La teneur en huile varie en fonction du terroir, de la variété (cultivar), du stade de maturité à la récolte et des pratiques agronomiques locales (Chanam, *et al.* 2012).

1.4.1. L'extraction

Le principe de la méthode d'extraction consiste à produire la plus grande quantité d'huile possible sans altération de sa qualité d'origine. Toutefois, si la qualité ne doit pas être modifiée, il est nécessaire d'utiliser uniquement des méthodes mécaniques ou physiques pour extraire l'huile, en évitant les réactions chimiques et enzymatiques qui pourraient changer sa composition naturelle (Figure 10).

L'extraction de l'huile des olives présuppose sa libération des tissus végétaux la contenant. L'huile est principalement localisée dans les cellules du mésocarpe (pulpe) des olives et renfermée, dans une moindre mesure, dans le système colloïdal du cytoplasme ; en outre, elle est présente dans l'épicarpe (péricarpe ou peau), l'endocarpe (endosperme) et dans le germe en faible quantité.

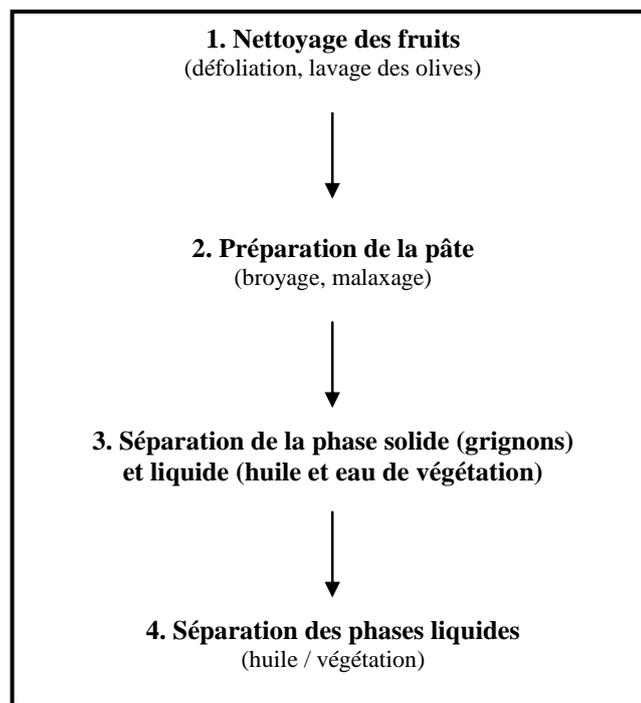


Figure 10. Schéma des quatre principales étapes de l'extraction de l'huile d'olive (Ghanam, et al. 2012).

a. Nettoyage des fruits

Cette étape contient deux opérations :

1- Effeillage

Cette opération est nécessaire pour éviter une coloration trop verdâtre de l'huile, se traduisant par un excès d'amertume et par une moindre aptitude à la conservation de l'huile.

2- Lavage

Il s'agit d'une opération fondamentale pour éviter plusieurs problèmes, comme l'interférence des terres avec la couleur et les autres propriétés organoleptiques (odeur, goût) de l'huile.

b. Broyage

Il est réalisé à l'aide d'un broyeur à marteau. Le broyage des olives ne doit être trop grossier, ni trop fin. Il doit être adapté à la condition physique des olives et à leur degré de maturité. Selon la norme du Conseil Oléicole International (COI), la durée de broyage ne doit pas dépasser 20 à 30 minutes. Si le broyage est plus prolongé, les polyphénols inhibiteurs naturels de l'oxydation ainsi que l'huile produite s'oxydent en présence de l'air et cette dernière perd de sa qualité.

c. Malaxage

L'huile doit être extraite par des moyens mécaniques et doit être libérée à partir des tissus de telle sorte que les gouttelettes peuvent fusionner en gouttes plus grosses jusqu'à ce qu'elles forment ce qu'on appelle les « poches ».

Le malaxage est fondamental pour augmenter le rendement de l'extraction. Il est conçu pour renforcer l'effet d'écrasement et d'uniformiser la pâte. Son premier objectif est de briser l'émulsion huile/eau de sorte que les gouttelettes d'huile se rassemblent pour former des gouttes plus grosses.

d. Séparation de la phase liquide et solide

Le broyage et le malaxage aboutissent à la formation d'une pâte qui contient de la matière solide et des fluides. La matière solide appelée grignon est constituée de débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires...etc., alors que la partie fluide est composée d'huile et d'eau de végétation appelée margine.

La séparation des grignons du mélange huile/eaux de végétation fait appel à des systèmes de pression, de centrifugation et de percolation (Caputo, *et al.* 2003). Au cours de ces étapes, différents appareils fonctionnant selon les principes des forces physiques sont utilisés.

e. Conditions de stockage de l'huile d'olive

L'huile d'olive peut être stockée pendant plusieurs mois. Durant son stockage, l'huile d'olive peut subir des changements organoleptiques caractérisés par l'augmentation de l'acidité (due à l'action des lipases) et le développement des réactions de rancissement.

Les températures supérieures à 22 °C doivent également être évitées car elles accélèrent les modifications biochimiques et les phénomènes d'oxydation qui peuvent conduire au rancissement de l'huile d'olive (Sacchi, 2007).

1.4.2. Techniques de production

Les différentes étapes nécessaires à l'obtention de l'huile à partir d'olives sont restées identiques.

La technique de production s'est améliorée et diversifiée au cours des siècles. Durant ces dernières années, le processus général de trituration des olives a connu des développements technologiques qui tendent vers la mécanisation complète du processus, l'augmentation de la capacité de travail et la spécialisation du processus d'extraction dans le souci de réduire les coûts, mais aussi d'améliorer la qualité de l'huile (Ben Sassi, *et al.* 2006).

Les olives sont acheminées vers le moulin dans lequel elles subiront des traitements successifs qui présentent des légères différences selon le procédé mise en œuvre :

1- Le procédé discontinu (Figure 11) dit "traditionnel" est l'adaptation ou la reprise des systèmes ancestraux (avec des meules et des presses), utilisé soit par "goût", désir de perpétuer la tradition ou désir de retrouver certaines caractéristiques organoleptiques, soit par nécessité économique dans des pays n'ayant pas de structure d'aide à l'amélioration technique.

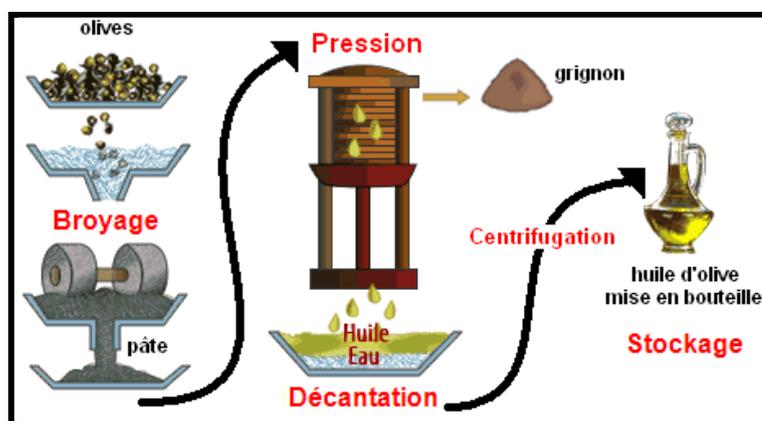


Figure 11. Schéma d'extraction de l'huile d'olive vierge par procédé discontinu (AFIDOL)

2- **Le procédé continu** (Figure 12) permet par l'utilisation de technologies et de matériaux modernes, de limiter les risques d'oxydation et de pollutions croisées car les différentes opérations de production se situent en ligne. Ce système permet d'abaisser les coûts de production en utilisant un personnel réduit.

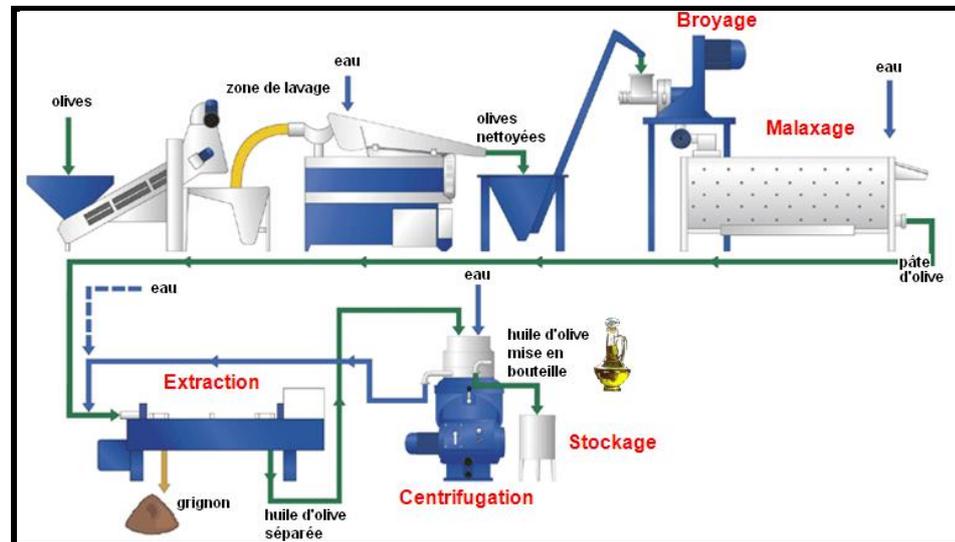


Figure 12. Schéma de fabrication de l'huile d'olive vierge par procédé continu (Alfalaval)

Les systèmes d'extraction de l'huile d'olive sont essentiellement de trois types :

a- Les presses

Elles sont classées selon la pression exercée : unités traditionnelles maâsras dont la pression est de l'ordre de 100 kg/cm², unités semi-modernes dont la pression est aux environs de 200 kg/cm² et les unités modernes équipées en super-presses pouvant développer une pression de 400 kg/cm² (Figure 13).

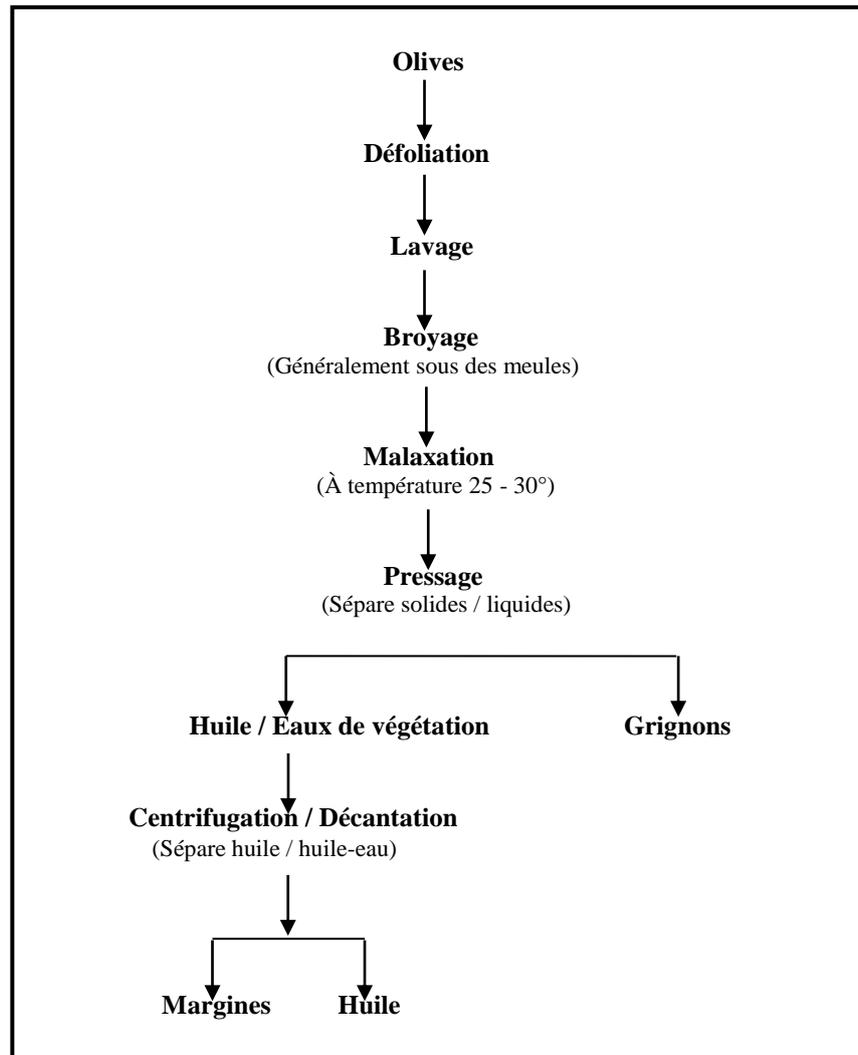


Figure 13. Système discontinu d'extraction par presse (Ghanam, et al. 2012).

Ce système, utilise des presses métalliques à vis ou, le cas échéant, des presses hydrauliques. La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtins, à raison de 5 à 10 kg/scourtin. L'application de la pression sur la charge des scourtins doit être réalisée de manière progressive. La durée totale de l'opération de pressage, réalisée en une seule fois, varie entre 45 à 60 mn.

b- Les chaînes continues à deux phases

A l'aide d'une centrifugation permettant de séparer l'huile et les grignons humidifiés par les eaux de végétation provenant de l'olive (les deux phases sont les huiles et les grignons) (Figure 14).

Le procédé technologique d'extraction des huiles d'olives fonctionne avec un nouveau décanteur avec centrifugation à 2 phases (huile et grignons) qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides contenant les grignons et les margines.

c- Les chaînes continues à trois phases

Avec deux centrifugations, la première pour séparer les grignons et les huiles plus margines et la deuxième pour séparer les huiles et les margines (les trois phases sont les grignons, les margines et les huiles) (Figure 14).

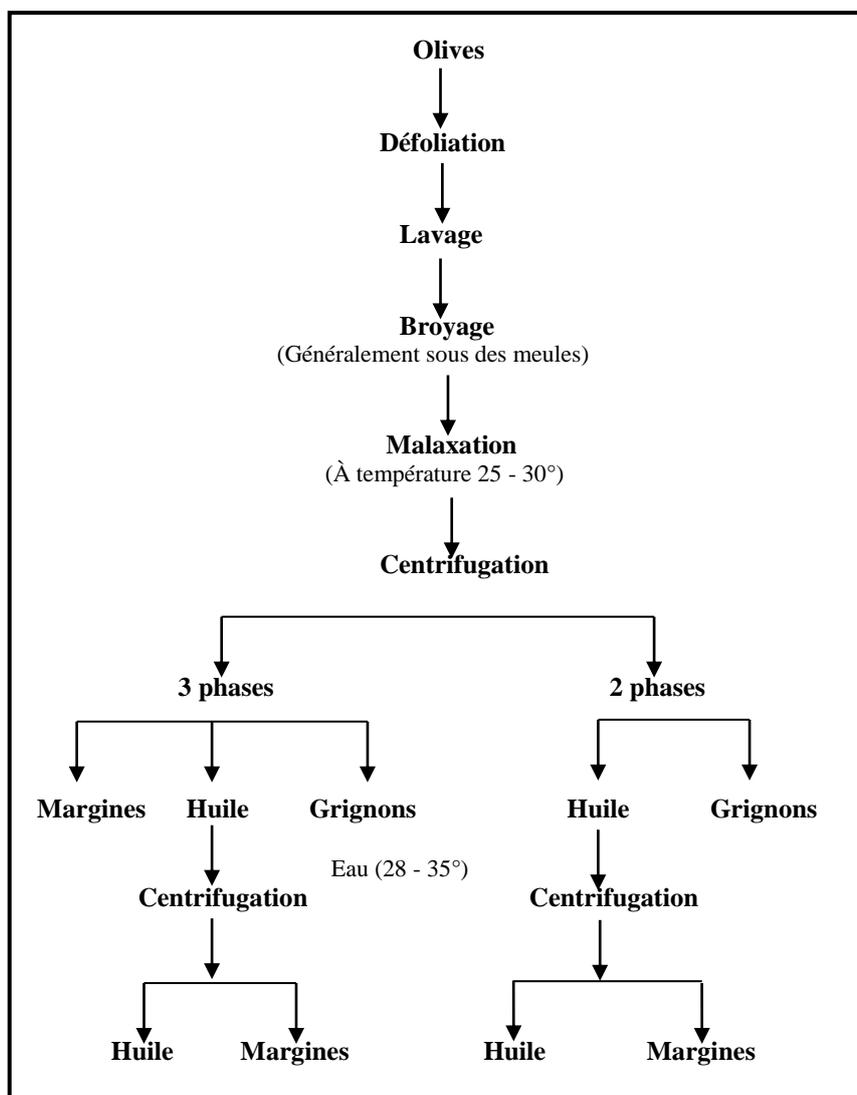


Figure 14. Système continu d'extraction avec centrifugation (2 phases et 3 phases) (Ghanam, et al. 2012).

L'utilisation des installations d'extraction par centrifugation à 3 phases (huile, margines et grignons) a commencé depuis les années 1970 et on dénombre actuellement plus d'une dizaine de maisons de fabrication de ce type de matériel (Pieralisi, Alfa-Laval, Rapanelli,...).

1.5. CRITERES DE QUALITE DE L’HUILE D’OLIVE VIERGE

1.5.1. Introduction

Les critères de qualité et d’authenticité des divers types d’huile d’olive sont décrits en détail dans la norme du Codex Alimentarius et dans le règlement de la Commission Européenne CE 2568/91, ainsi que dans les amendements et les additions à ce règlement de base. Ces ensembles de normes des deux organismes sont complémentaires.

Les huiles d’olive vierges se classent en différentes catégories en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques et organoleptiques (*Règlement (CEE) N°2568/91; Conseil Oléicole International, 1991*). Les définitions ci-dessous ont été adoptées par les pays producteurs d’huiles d’olive dans l’Accord International des Huiles d’Olive et des Olives de Table de 1986.

Les paramètres physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques (qualités gustatives) permettent de caractériser une huile d’olive vierge. Cependant, l’acidité apparaît comme un moyen simple et fiable pour évaluer la qualité; cette dernière traduit la qualité des olives avant la trituration, plus elle est faible plus la qualité des olives est bonne. Les producteurs d’huiles d’olive l’adoptent facilement car l’analyse est peu coûteuse, et peut même être mise en œuvre sur place avec un minimum de moyens. Ils peuvent alors s’en servir pour gérer leur production au point de vue qualitatif (Pinatel, *et al.* 2004).

1.5.2. Définitions

L’huile d’olive est l’huile provenant uniquement du fruit de l’olivier à l’exclusion des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d’autre nature. Elle est commercialisée selon les dénominations et définitions ci après :

a. L’huile d’olive vierge

Est l’huile obtenue de fruit de l’olivier uniquement par des procédés mécaniques ou d’autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n’entraînent pas d’altération de l’huile, et n’ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration.

Selon ses caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques, l’huile d’olive vierge est classée en deux grands groupes :

1- L'huile d'olive vierge propre à la consommation

- **Huile d'olive vierge extra** : l'acidité, exprimée en acide oléique doit être inférieure à 0,8 g/100 g d'huile. Au niveau des caractéristiques organoleptiques, cette huile a une présence de fruité et une absence de défaut
- **Huile d'olive vierge** : l'acidité, exprimée en acide oléique doit être inférieure à 2 g/100 g d'huile. Au niveau des caractéristiques organoleptiques, cette huile a une présence de fruité et une présence possible de défauts légers

2- L'huile d'olive vierge non propre à la consommation

L'huile d'olive vierge non propre à la consommation en l'état dénommée huile d'olive vierge lampante est l'huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est supérieure à 3,3 grammes pour 100 grammes et/ou dont les caractéristiques organoleptiques correspondent à celles fixées pour cette catégorie par la présente norme. Elle est destinée aux industries du raffinage ou à des usages techniques. On distingue, l'huile d'olive raffinée et l'huile d'olive simple.

b. L'huile d'olive raffinée

Est l'huile d'olive obtenue des huiles d'olives vierges par les techniques de raffinage qui n'entraînent pas de modification de la structure glycérique initiale.

- **L'huile d'olive simple** : est l'huile constituée par le coupage d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive vierge propre à la consommation en l'état.
- **L'huile de grignons d'olive** : est l'huile obtenue par traitement aux solvants des grignons d'olive à l'exclusion des huiles obtenues par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec d'autres huiles.

1.6. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE D'OLIVE

L'huile d'olive est un système chimique complexe constitué de plus de 250 composés (Angerosa, *et al.* 2004; Kiritsakis, 1993). La composition de l'huile d'olive change selon la variété, les conditions climatiques et l'origine géographique.

La composition chimique de l'huile d'olive contient des éléments majeurs et mineurs. L'huile d'olive possède une composition nutritionnelle équilibrée en acides gras et en triglycérides (98 % du poids total). L'abondance de l'acide oléique, un acide gras mono-insaturé, est la caractéristique qui définit l'huile d'olive en dehors des autres huiles végétales. L'acide oléique (C18 :1 n-9) représente 56 à 84 % des acides gras de l'huile d'olive (Rossell, 2001), tandis que l'acide linoléique (C18 :2 n-6) qui est un acide gras polyinsaturé essentiel pour l'alimentation humaine, représente 3 à 21 % (Tiscornia, *et al.* 1982; Visioli, *et al.* 1998). Les composants mineurs, représentent environ 2 % du poids total de l'huile, notamment, plus de 230 composés chimiques, tels que les alcools aliphatiques et triterpéniques, les stérols, les hydrocarbures, les composés volatils et les polyphénols (Servili, *et al.* 2002).

Selon la norme internationale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive, les constituants chimiques de l'huile d'olive vierge peuvent être subdivisés en deux catégories:

- La fraction saponifiable (triglycérides, cires, esters de stérols, ...) (98% de l'huile)
- La fraction insaponifiable (2 % de l'huile).

1.6.1. Les acides gras

Un acide gras est un hydrocarbure (chaîne de carbones liés à des hydrogènes) terminé par une fonction acide (COOH). Il existe 3 types d'acides gras :

- l'acide gras saturé,
- l'acide gras mono-insaturé (la chaîne carbonée contient une double liaison),
- l'acide gras polyinsaturé (contenant plusieurs doubles liaisons).

Les acides gras présents dans l'huile d'olive sont : l'acide palmitique (C16 : 0), l'acide palmitoléique (C16 : 1), l'acide stéarique (C18 : 0), l'acide oléique (C18 : 1), l'acide linoléique (C18 : 2), l'acide linoléique (C18 : 3), l'acide myristique (C14 : 0). Les acides heptadécanoïque et eicosanoïque se trouvent en quantités infimes. Scano et al. (1999), ont détecté des traces d'acides 11-cis-vaccénique et éicosénoïque en analysant une fraction de l'huile d'olive par RMN-13C (Résonance Magnétique Nucléaire).

Le tableau 4 donne les noms des différents acides gras rencontrés dans les huiles d'olive vierges ainsi que leur nomenclature dans les trois systèmes utilisés (Δ , ω , n). Les proportions des différents acides gras sont également données dans ce tableau.

La teneur en acides gras de l'huile d'olive varie en fonction de la zone de production, la latitude, le climat, la variété et le stade de maturation du fruit. Baccouri et al. (2008) ont prouvé que le ratio acide oléique/acide linoléique montre une tendance à baisser avec la maturité des olives. Ninni (1999), a signalé que l'acide oléique se forme en premier dans le fruit et qu'il existe une forte relation antagoniste entre les acides oléique, palmitique, palmitoléique et l'acide linoléique.

Les facteurs primaires affectant la composition en acide gras sont la variété, la latitude, les conditions climatiques, et de maturité des olives.

Tableau 4. Composition en acides gras des huiles d'olive vierges (noms, nomenclatures, limites fixées par le Codex Alimentaire) (Δ , ω et n - X l'insaturation des acides gras insaturés)

Noms communs	Symboles abrégés	Noms chimiques	Nomenclature chimique (Δ)	Nomenclature biochimique (ω ou n - X)	Limites (%)
Ac. Palmitique	P	Ac. Hexadécanoïque	16:0	16:0	7,5 - 20,0
Ac. Palmitoléique	Po	Ac. Hexadécène-9-oïque	16:1 Δ^9	16:1 $\omega 7$	0,3 - 3,5
Ac. Margarique	M	Ac. Heptadécanoïque	17:0	17:0	0,0 - 0,05
Ac. Margaroléique	Mo	Ac. Heptadécène-9-oïque	17:1 Δ^9	17:1 $\omega 8$	0,0 - 0,6
Ac. Stéarique	S	Ac. Octadécanoïque	18:0	18:0	0,5 - 5,0
Ac. Oléique	O	Ac. Octadécène-9-oïque	18:1 Δ^9	18:1 $\omega 9$	55,0 - 83,0
Ac. Linoléique	L	Ac. Octadécène-9,12-dioïque	18:1 $\Delta^{9,12}$	18:2 $\omega 6$	3,5 - 21,0
Ac. Linoléique	Ln	Ac. Octadécène-9,12-dioïque	18:1 $\Delta^{9,12,15}$	18:3 $\omega 3$	0,0 - 1,5
Ac. Arachidique	Ar	Ac. Eicosanoïque	20:0	20:0	0,0 - 0,08
Ac. Gondoïque	Go	Ac. Eicosène-11-oïque	20:1 Δ^{11}	20:1 $\omega 9$	Non spécifié
Ac. Béhénique	Be	Ac. Docosanoïque	22:0	22:0	0,0 - 0,2
Ac. Lignocérique	Lg	Ac. Tétracosanoïque	24:0	24:0	0,0 - 0,1

1.6.2. Les triglycérides

Les substances saponifiables sont constituées d'environ 97 à 99% de triglycérides. Ces triglycérides résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol avec trois molécules d'acides gras.



La présence d'une part des différents acides gras et d'autre part des trois possibilités d'estérification sur le glycérol conduit à un grand nombre de combinaisons possibles pour les triglycérides de l'huile d'olive.

Les triglycérides sont couramment désignés par trois lettres correspondant aux abréviations des acides gras qui estérifient le glycérol. Ainsi à titre d'exemple, OOO est le trioléoyl glycérol ou trioléine et POO, le palmitoyl, dioléoyl glycérol ou palmitoyl dioléine. Les triglycérides qui se trouvent dans des proportions significatives dans l'huile d'olive sont: OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) et SOO (3-7%) (Casadei, 1978; Catalano, 1968). Aucune norme ne fixe de limite quand aux proportions de triglycérides présents dans les HOV.

1.6.3. Les substances insaponifiables

Les substances insaponifiables représentent l'ensemble des constituants (naturels) qui ne réagissent pas avec un hydroxyde alcalin pour donner des savons et qui, après saponification restent solubles dans des solvants classiques des corps gras (hydrocarbures saturés, éthers diéthylique ou diisopropylique, solvants chlorés, etc.). Ces substances insaponifiables peuvent être divisés en deux groupes. Le premier groupe se compose des dérivés d'acides gras tels que les mono- et diacylglycérols, les phosphatides, les cires "Waxes" et les esters de stérol. Le deuxième groupe inclut des classes de composés non-reliés chimiquement aux acides gras. Ces classes sont les hydrocarbures, les alcools aliphatiques, les stérols libres, les tocophérols, les chlorophylles, les caroténoïdes et les composés phénoliques polaires tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol.

Les constituants mineurs de l'huile d'olive sont des indicateurs de son authenticité (Harwood *et al.* 2000), de même que ses caractéristiques sensorielles (Ollivier, *et al.* 2007).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amouretti, M. C. Comet, G. 1998. Le livre de l'olivier. *Edisud Ed*, France
- Angerosa, F. Servili, M. Selvaggini, R. Taticchi, A. Esposito, S. Montedoro, G. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr*, 1054, 17-31.
- Anon. 1983. Presencia Historica del Aceite de Oliva, in (Cabrera,F.B,ed), Las Raices del Aceite de Oliva, *Ministerio de Agricultura*, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid.
- Artaud, J. 2002. L'olivier et l'huile d'olive dans le monde et en France. *Ann. Fals. Exp. Chim*, 95, 381-391.
- Baccouri, O. Guerfel, M. Baccouri, B. Cerretani, L. Bendini, A. Lercker, G. Zarrouk, M. Daoud Ben Miled, D. 2008. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109, 743-754.
- Ben Sassi, A. Boularbah, A. Jaouad, A. Walker, G. Boussaid, A. 2006. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41, 74-78
- Blazquez-Martinez, J.M. 1996. History of Olive Tree, The World Olive Encyclopaedia, *IOOC*, Madrid, 19-54.
- Breton, C. Claux, D. Metton, I. Skorski, G. Bervillé, A. 2004. Comparative Study of Methods for DNA Preparation from Olive Oil Samples to Identify Cultivar SSR Alleles in Commercial Oil Samples: Possible Forensic Applications. *J. Agric. Food Chem*, 52, 531-537.
- Caputo, E. Camarca, A. Moharram, R. Tornatore, P. Thatcher, B. Guardiola, J. Martin, B. M. 2003a. Structural study of GCDFP-15/gp17 in disease versus physiological conditions using a proteomic approach. *Biochemistry*, 42, 6169-6178.
- Caputo, E. Moharram, R. Martin, B. M. 2003b. Methods for on chip Protein Analysis. *Analytical Biochemistry*, 321, 116-124.
- Casadei, E. 1978. First Results on Detection of Adulterated Olive Oil Products with Hazelnut and/or Esterified Oils by HPLC of Triglycerides. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 64.
- Catalano, M. 1968. The Olive Oil Triglyceride Structures Obtained by Combined Chromatographic Techniques. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 45.
- Chanam, J. Benlemlih, M. 2012. Polyphénols d'huile d'olive, trésors santé. *Macro pietteur, éditeur*.
- Coutance, A. 1877. L'olivier, l'olive, l'huile d'olive. *Rothschild Editeur*, France.

- Evagelia, T. Harris, N. Lazarides and Konstantinos, B. 2004. Olive Mill Wastewater Treatment. Petrotos Aristotle University of Thessaloniki, *Department of Food Science and Technology*, 54006, Greece.
- Figuieral, I. Terral, J. F., 2002. Late quaternary refugia of Mediterranean taxa in the portuguese estremadura: charcoal based paleovegetation and climatic reconstruction. *Quaternary Science Reviews*, 21, 549-558.
- Ghedira, K. 2008. L'olivier. *Phytothérapie*, 6, 83-89.
- Harwood, J. Aparicio, R. 2000. Handbook of olive oil - Analysis and properties. *Aspen Publishers, Inc.* Gaithersburg, Maryland, 1-513.
- Keys, A. 1980. seven countries: A multivariate analysis in death and coronary heart disease. *Harvard Univ. Press*, Cambridge, USA,
- Kislev, M. E. Nadel, D. Carmi, I. 1992. Epipalaeolithic (19,000 BP) cereal and fruit diet at Ohalo II, Sea of Galilee, Israel. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 73, 161-166.
- Kiritsakis, A. K. 1993. La chimie de l'huile d'olive. *Olivae*, 45, 28-33.
- Lavee, S. 1996. Olive Tree Biology and Physiology, World Olive Encyclopaedia, *IOOC*, Madrid, 5910.
- Loukas, M. Krimbas, C. B. Vergini, Y. 1983. Evolution of the obscura group drosophila species. II. Phylogeny of ten species based on electrophoretic data. *Heredity*, 53, 483-493.
- Muriana, F. J. G. Ruiz-Gutierrez, V. 1989. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids ingestion on rat liver membrane-associated enzymes and fluidity. *J. Nutr. Biochem*, 3, 659-663.
- Ninni, V. 1999. A Statistical Approach to the Biosynthetic Route of the Fatty Acids in Olive Oil : Crosssectional and Time Series Analyses. *J.Sci.Food Agric*, 79, 2113-2121.
- Ollivier, D. Pinatel, C. Dupuy, N. Guérère, M. Artaud, J. 2007. Caractérisations sensorielles et chimiques d'huiles d'olive vierges de six AOC françaises. *OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 14, 116-129.
- Pagnol, J. 1996. L'Olivier. *Aubanel Ed*, France.
- Pinatel, C. 2002. Les variétés d'oliviers. *Le Nouvel Olivier*, 30 (Novembre-Décembre), 3-14.
- Pinatel, C. Petit, C. Ollivier, D. Artaud, J. 2004. Outils pour le suivi de la qualité de l'huile d'olive vierge et son amélioration. *OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 11, 217-219.
- Rossell, J. B. 2001. Frying : Improving quality. Woodhead Publishing Limited, CRC Press, *Boca Raton*, DC.
- Sacchi, R. 2007. Extraction technology In L'Extravergine, a guide to the best certified quality olive oil in the world. Oreggia, M. *Ed Cucina Vini*, 82-103.

- Scano, P. Casu, M. Lai, A. 1999. Recognition and Quantitation of Cis-vaccenic and Eicosenoic Fatty Acids in Olive Oils by C-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids*, 34 757-759.
- Servili, M. Montedoro, G. 2002. Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.
- Terral, J. F. Arnold-Simard, G. 1996. Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Research*, 46, 176-185.
- Tiscornia, E. Forina, M. 1982. Pattern-recognition methods in the prediction of italian olive oil origin by their fatty-acid content. *Annali Di Chimica*, 72, 143-155.
- Tsagaraki, E. Lazarides, H. N. Petrotos, K. B. 2007. Olive mill wastewater. In V.Oreopoulou & W. Russ (Eds.), Utilisation of by-products and treatment of waste in the food industry. *Springer*, 133-157.
- Viola. P. 1987. Olive oil and health, *International Olive Oil Council*, Madrid, Spain.
- Visioli, F. Galli, C. 1998. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease : new findings. *Nutr Rev*, 56, 142-147.
- Zohary, D. Spiegel-Roy, P. 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187, 319-327.

**2. LES POLYPHÉNOLS, STRUCTURES,
PROPRIETES ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

2. LES POLYPHÉNOLS, STRUCTURES, PROPRIETES ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi-universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique (ex.: acide gallique) à des composés polymériques complexes comme les tanins. Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

In vitro, les polyphénols présentent des activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes classes de polyphénols ainsi que leurs propriétés chimiques suivies, par un rappel sur leur activité antioxydante (piégeurs des radicaux libres); la diversité des composés phénoliques et leurs pouvoirs antioxydant de l'olivier seront cités dans ce chapitre.

2.1. LES POLYPHÉNOLS

2.1.1. Généralités sur les polyphénols

Le terme «polyphénols» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Fleuriet, *et al.* 2005).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Les principales sources de polyphénols dans notre régime alimentaire sont les fruits, les légumes, les céréales, les olives, les légumineuses, le thé, le café et le vin. Au cours des dernières années, on a assisté à une explosion du nombre de travaux de recherches consacrés aux effets des polyphénols sur la santé (Edwin, *et al.* 2011; Crozier, *et al.* 2009; Cao, *et al.* 1998; Halliwell, *et al.* 1995; Jitoe, *et al.* 1992; Le Tutour, *et al.* 1992; Kasuga, *et al.* 1988;).

Les polyphénols se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (Kühnau, 1976). Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. On distingue les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les stilbènes (C6-C2-C6), (Tableau 5). Les polyphénols sont répartis de façon organisée dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces.

Dans cette partie, nous présenterons la classification, les structures des polyphénols, ainsi que les différents composés phénoliques dans notre matière première, à savoir les noyaux de fruit d'olive.

Tableau 5. Principales classes de composés phénoliques (Macheix, et al. 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïque	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Coumarines	Acide caféique, acide Férulique Scopolétine, esculétine	Pomme, Olive Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, Plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes		
	- Flavonols	Kaempférol, Quercétine	Fruit, légumes,
	- Anthocyanes	Cyanidine, pélagonidine	Fruit rouges
	- Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin Citrus
	- Flavanones	Naringénine	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins		Olive, raisin rouge

2.1.2. Quelques propriétés des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont de nature acide en raison de la dissociabilité de leur hydroxyle. Leur acidité est toutefois relativement faible (leur pK_a est d'habitude compris entre 10 et 12). Aussi, ils sont facilement oxydables et, le cas échéant, forment des polymères bruns à noirs. Par ailleurs, les composés phénoliques sont assez réactifs et peuvent former des ponts hydrogène en l'absence d'une éventuelle inhibition stérique due aux chaînes latérales supplémentaires. Par conséquent, plusieurs flavonoïdes possèdent des ponts intramoléculaires.

Une autre propriété importante est leur capacité à former des chélates avec les métaux. Dans un autre sens, certains dérivés phénoliques de faible poids moléculaire présentent des odeurs agréables notamment les coumarines, l'acide cinnamique, l'acide sinapinique, les alcools coniféryl. Comme il a été mentionné ci-dessus, les composés phénoliques ne se trouvent généralement pas à l'état libre dans les tissus végétaux. Ils sont surtout couplés à des résidus tels que les acides carboxyliques (acide quinique), sucres (rhamnose), acides organiques (acide malique), amines (putrescine), lipides (glycérol), ainsi qu'à d'autres molécules phénoliques. Cette liaison des composés phénoliques aurait pour rôle de dissimuler, au moins partiellement, leur toxicité.

Par ailleurs, la glycosylation des flavonoïdes augmente la gamme et les tons des couleurs des fleurs. Sur le plan écologique, la glycosylation de ces composés serait en rapport avec leur pouvoir protecteur contre les pathogènes (Harborne, 1989).

2.1.3. Structures et classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate). La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composants, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Cheynier, 1997). Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques : de ce fait, on peut les retrouver très souvent présents sous ces formes.

a. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxybenzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxycinnamiques.

a.1. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques ont une formule de base de type C₆-C₁ (Figure 15). Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4) donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïque, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentsique (Tomas-Barberan, *et al.* 2000a). Ils sont le plus fréquemment présents dans les fruits et légumes sous forme de conjugués (esters ou glycosides), cependant l'acide gallique peut être retrouvé sous forme libre dans certains fruits. La réaction d'estérification d'un de ces acides avec une molécule de glucose donnera des structures plus complexes appelées tanins hydrolysables (Clifford, *et al.* 2000) comme les gallotanins ou les ellagitannins.

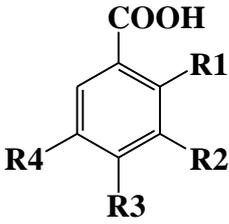
Structure	Composés	R1	R2	R3	R5
	Acide 4-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
	Acide 3-hydroxybenzoïque	H	OH	H	H
	Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH
	Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
	Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Acide salicylique	OH	H	H	H
	Acide gentisique	OH	H	H	OH

Figure 15. Structure des acides hydroxybenzoïques.

a.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide cinnamique. Ils sont très répandus dans le règne végétal, ces composés ont une formule de base de type C6-C3 (Figure 16) et leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique (Clifford, 2000b). Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits (D'Archivio, *et al.* 2007). Les acides férulique, sinapique et 4-coumarique sont également répandus dans les aliments (Clifford, 2000b). Les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous formes conjuguées. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach, *et al.* 2004; Macheix, *et al.* 2006). Le conjugué le plus commun est l'acide 5-cafféoylquinique également appelé acide chlorogénique.

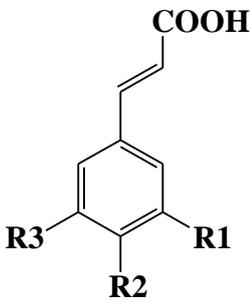
Structure	Composés	R1	R2	R3
	Acide cinnamique	H	H	H
	Acide 4-coumarique	H	OH	H
	Acide 3-coumarique	OH	H	H
	Acide caféique	OH	OH	H
	Acide férulique	OH	OCH ₃	H
	Acide isoférulique	OCH ₃	OH	H
	Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure 16. Structure des acides hydroxycinnamiques.

b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits. Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio, *et al.* 2007). Ils présentent une structure commune en C6-C3-C6 (Figure 17). Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) (Macheix, *et al.* 2006). Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols et les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier, *et al.* 2009).

Il existe dans chaque sous-classe de nombreux composés selon les substitutions des cycles aromatiques. La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau (Crozier, *et al.* 2009).

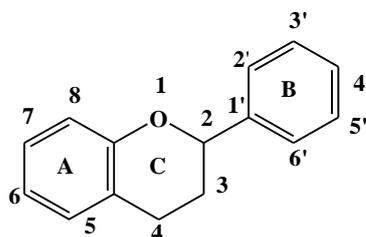


Figure 17. Structure de base des flavonoïdes.

b.1. Les 4-oxoflavonoïdes

- Les flavones

Les flavones comme tous les flavonoïdes ont une structure C6-C3-C6, ils présentent une double liaison en position 2-3 et le noyau aromatique B est fixé en position 2 (Figure 18). De manière générale, les flavones sont présentes sous forme de 7-O-glycosides. Moins répandues dans les fruits et légumes que les flavonols, les flavones sont principalement présentes sous forme de glycosides de lutéoline et d'apigénine.

Structure	Composés	R1	R2	R3
	Chryisine	H	H	H
	Apigénine	H	OH	H
	Lutéoline	OH	OH	H
	Diosmétine	OH	OCH ₃	H
	Chrysoériol	OCH ₃	OH	H

Figure 18. Structure des flavones.

- Les flavonols

Les flavonols sont des composés flavonoïdes largement répandus dans le règne végétal à l'exception des algues et des champignons. Caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (Figure 19). Les principaux composés sont le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnétine et la myricétine. Ils sont le plus souvent présents sous forme de glycosides, avec une molécule de glucose ou de rhamnose (Crozier, *et al.* 2009).

Structure	Composés	R1	R2	R3	R4
	Galangine	H	H	H	OH
	Kaempférol	H	OH	H	OH
	Kaempféride	H	OCH ₃	H	OH
	Quercétine	OH	OH	H	OH
	Myricétine	OH	OH	OH	OH
	Tamarixétine	OH	OCH ₃	H	OH
	Isorhamnétine	OCH ₃	OH	H	OH
	Rhamnétine	OH	OH	H	OCH ₃

Figure 19. Structure des flavonols.

- Les flavanones

Les flavanones sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes. Elles sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2. La plupart des flavanones rencontrées dans la nature ont le cycle B rattaché au cycle C en C2 dans la configuration (Figure 20). La structure des flavanones est très réactive et donne lieu à des réactions d'hydroxylation, d'O-méthylation et de glycosylation. On distingue deux sous-familles : les rutinosides (6-O- α -L-rhamnosyl-D-glucosides) et les néohespéridosides (2-O- α -L-

rhamnosyl- D-glucosides) (D'Archivio, *et al.* 2007). La distribution des flavanones dans les fruits est hétérogène et elles sont plus particulièrement concentrées dans les parties solides du fruit.

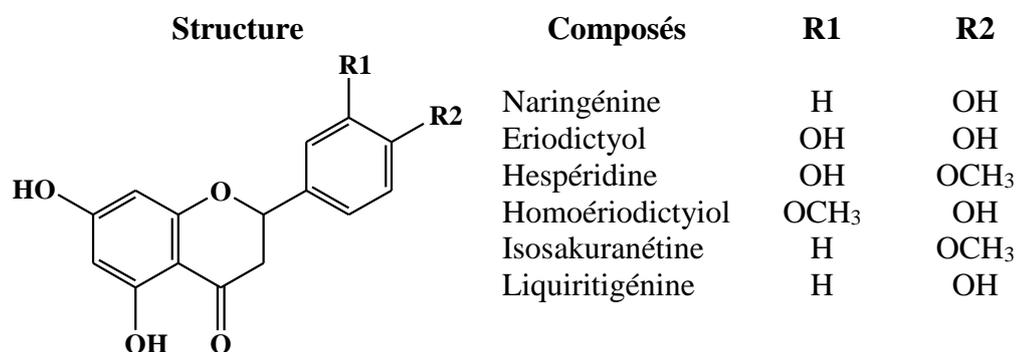


Figure 20. Structure des flavanones.

- Les isoflavones

Les isoflavones se différencient des flavones par la fixation du noyau benzénique B au carbone 3 de l'hétérocycle. Elles présentent de fortes similitudes avec les oestrogènes. En effet, la présence de groupements hydroxyles en C7 et C4' leur donne une structure similaire au 17- β -oestradiol leur conférant ainsi des propriétés pseudo-hormonales dont celle de se lier aux récepteurs aux oestrogènes. Ainsi elles sont également nommées phyto-estrogènes.

b.2. Les chalcones et dihydrochalcones

Les chalcones dérivent des flavanones par isomérisation réversible en milieu alcalin, ce qui se traduit par l'ouverture de l'hétérocycle C avec formation d'une double liaison en position C2-C3 (Figure 21). Les chalcones sont peu présentes dans l'alimentation en raison de leur transformation en flavanones en milieu acide, principalement au cours des étapes d'extraction (Tomas-Barberan, *et al.* 2000b).

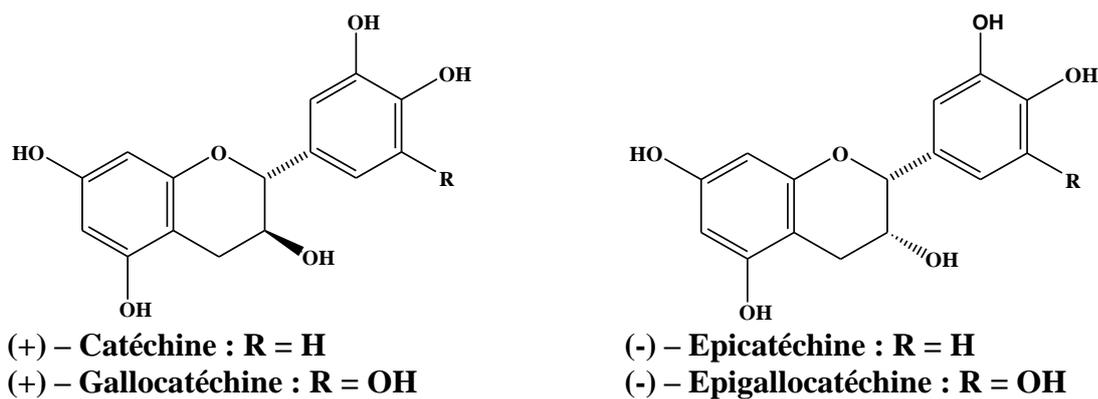


Figure 22. Structure des flavanols.

b.4. Les proanthocyanidines

Les proanthocyanidines (Figure 23), encore appelées « tanins condensés » se forment par polymérisation des monomères de flavanols lors de réactions d'auto-oxydation ou le plus souvent sous l'action d'une enzyme, la polyphénoloxydase (Mayer *et al.* 1979). La polymérisation se fait entre les molécules de (+)-catéchine et (-)-épicatéchine par des liaisons C4-C8 ou C4-C6 pour les proanthocyanidines de type B. Les proanthocyanidines de type A ont en plus une liaison C2-O-C7. Ces polymères peuvent contenir jusqu'à plus de 50 unités. Cependant, le degré de polymérisation pour un aliment donné est rarement déterminé. Les proanthocyanidines uniquement constituées d'unités (épi)catéchines sont appelés procyanidines et sont les plus répandues. Les proanthocyanidines contenant l'(épi)gallocatechine sont appelées prodelphinidines et sont plus rares. Les proanthocyanidines participent à la saveur des aliments.

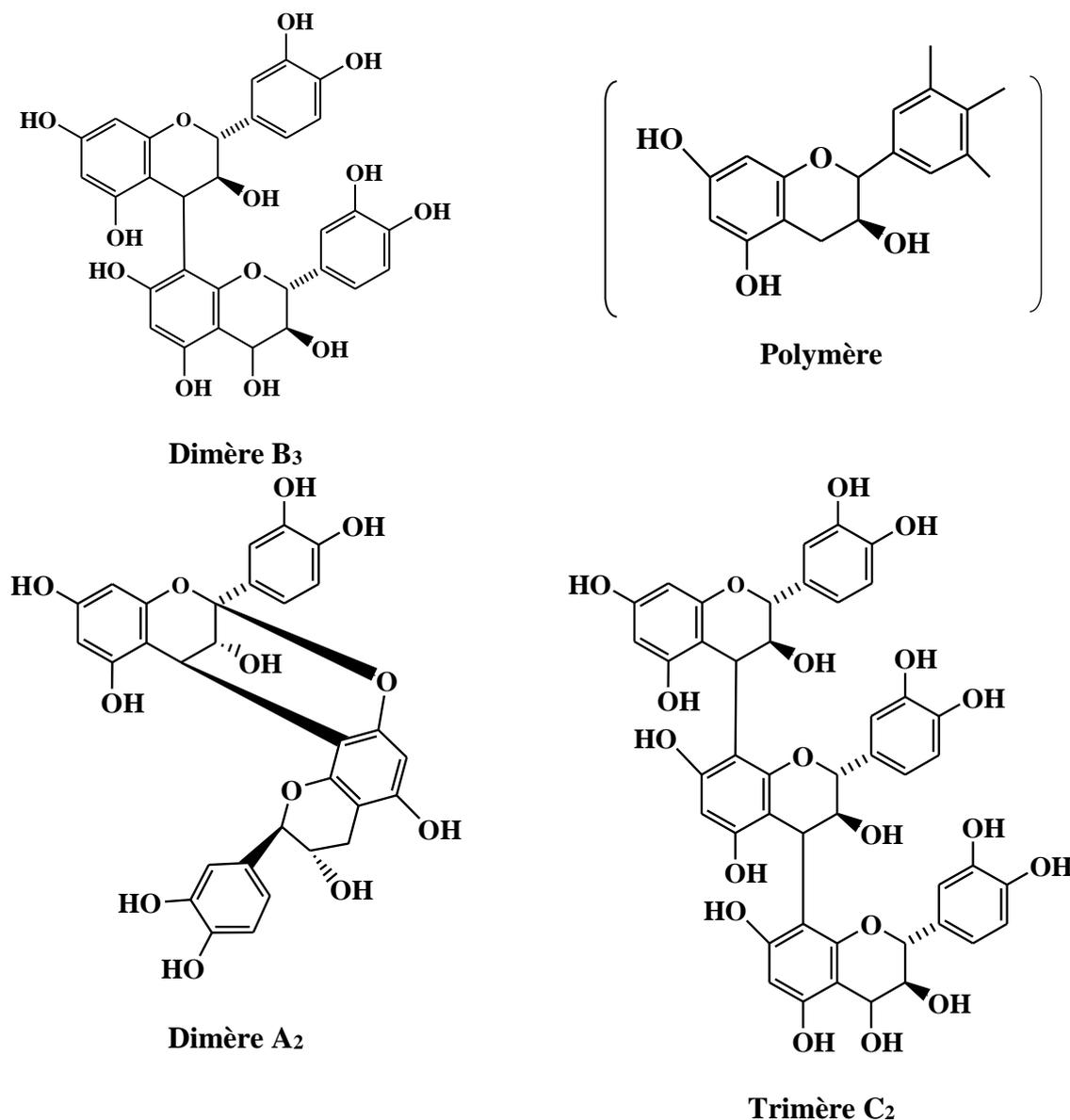


Figure 23. Structure des proanthocyanidines.

b.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau le plus important. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des tissus auxquels ils donnent des couleurs rose, rouge, bleu et violet (Mazza, *et al.* 1993). Plusieurs centaines de molécules sont connues. Elles varient selon le nombre et la position des différents groupements hydroxyles et méthoxyles, la nature, le nombre et la position des sucres et l'acylation éventuelle de ces sucres (Clifford, 2000a) (Figure 24). Très rarement présents sous forme aglycone (anthocyanidine), les

anthocyanes les plus fréquents sont des 3-glycosides ou des 3,5-diglycosides de pélargonidine, cyanidine (anthocyanidine la plus répandue dans l'alimentation), péonidine, delphinidine, pétunidine et malvidine. Leur couleur varie en fonction du pH. Les anthocyanes sont particulièrement instables sous forme d'aglycones mais stabilisés par la glycosylation. Les anthocyanes sont principalement présents dans la peau à l'exception de certains fruits. Leur quantité dans l'aliment est souvent proportionnelle à l'intensité de la pigmentation du fruit.

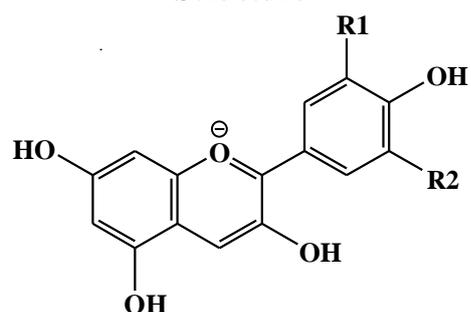
Structure	Composés	R1	R2
	Pélargonidine	H	H
	Cyanidine	OH	H
	Delphinidine	OH	OH
	Péonidine	OCH ₃	OH
	Pétunidine	OCH ₃	OH
	Malvidine	OCH ₃	OCH ₃

Figure 24. Structure primaire des anthocyanes.

c. Les lignanes

Les lignanes sont formés par la dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane (Figure 25). Les lignanes sont métabolisés par la flore colique libérant de l'entérodiol et de l'entérolactone ; ils sont ainsi considérés comme des phytoestrogènes. Même si leur quantité reste relativement faible dans une alimentation standard, leur ubiquité dans le règne végétal laisse penser qu'ils pourraient constituer une source importante de phytoestrogènes en particulier dans les régimes végétariens.

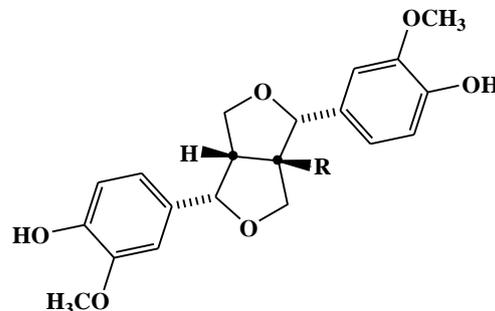
Structure	Composés	R
	(+)-Pinoresinol	H
	(+)-1-Acetoxypinoresinol	OCOCH ₃
	(+)-1-Hydroxypinoresinol	OH

Figure 25. Structure des lignanes.

d. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont éthylène avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyyles en méta, ortho et para (Figure 26). Ils sont synthétisés à partir de dérivés d'acides cinnamiques dont la substitution déterminera celle du cycle B et ainsi la molécule elle-même. Ils sont présents dans la plante sous forme de monomères, dimères, trimères ou polymères. La molécule la plus courante et la plus étudiée est le resvératrol (3,5,4'- trihydroxystilbène) qui existe sous forme cis ou trans. Cependant, la forme trans est majoritaire.

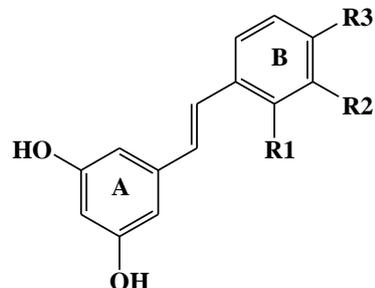
Structure	Composés	R1	R2	R3	Acide phénolique précurseur
	Pinosylvine	H	H	H	Acide cinnamique
	Resvératrol	H	H	OH	Acide p-coumarique
	Picéatannol	H	OH	OH	Acide caféique
	Rhapontigénine	H	OH	OCH ₃	Acide isoféruleique

Figure 26. Structure des stilbènes.

2.1.4. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les huiles, les terpènes, les chlorophylles... etc. Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques, l'extraction solide-liquide est une procédure plus couramment utilisée.

En effet, les techniques d'extractions sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être largement appliquées. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tel que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits

complètement avec les solvants organiques purs, les mélanges d'alcool - eau ou acétone-eau sont recommandés (Naczka, *et al.* 2004). Les solvants moins polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...). Les extractions sont répétées deux à trois fois.

2.1.5. Analyse et quantification des polyphénols

De nombreuses procédures d'analyse orientée vers la détermination du profil complet phénoliques ont été proposées. La méthode colorimétrique universellement appliquée pour la détermination des phénols dans l'extrait est basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton et Rossi (Singleton, *et al.* 1999). Le réactif, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm. La teneur en phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression établie avec l'acide gallique (gamme d'étalonnage 0-100 mg/l).

Les résultats sont généralement exprimés en équivalents de l'acide gallique (mg acide gallique / kg d'échantillon sec), bien que d'autres phénols peuvent également être utilisés comme standards, à savoir : l'acide caféique et l'acide tannique (Tsimidou, 1999). Les résultats peuvent varier, en fonction de la norme utilisée et la concentration relative des différents composés (Singleton, *et al.* 1999 ; Hrnčirik, *et al.* 2004). Cependant, la méthode colorimétrique classique est largement appliquée pour la quantification des phénols totaux polaires, car elle fournit une bonne indication (Gutfinger, 1981; Aparicio, *et al.* 1999 ; Blekas, *et al.* 2002 ; Psomiadis, *et al.* 2003).

En général, la procédure d'analyse pour la détermination des différents composés phénoliques comporte trois étapes principales : l'extraction, la séparation analytique et la quantification. L'ensemble des techniques d'extraction à base d'Extraction Liquide-Liquide (ELL) ou d'Extraction en Phase Solide (EPS) ont été utilisées pour isoler la fraction phénolique polaire. Les techniques d'analyse sont basées sur des méthodes analytiques, telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (CE). Toutefois, la CE a récemment été appliquée à l'analyse des composés phénoliques, et ainsi, elle a ouvert de grands horizons, surtout en raison de sa haute résolution. La technique a été optimisée par la réduction du volume de l'échantillon et de la durée d'analyse (Carrasco-Pancorbo, *et al.* 2005).

2.1.6. Importance nutritionnelle des polyphénols

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle. L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydants sont remarquables.

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme.

De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols sur les pathologies (cancers, ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète...).

2.2. ANTIOXYDANTS

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

2.2.1. Définition

Un antioxydant biologique se définit comme une substance qui, lorsqu'elle est « présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1990).

2.2.2. Propriétés antioxydantes

L'effet antioxydant des fruits et légumes est dû en partie à des micronutriments tels que les polyphénols, les vitamines C et E, les caroténoïdes... (Rice-Evans, *et al.* 1995). Cet effet antioxydant avait en partie été suggéré dans les années 90 à la suite d'études épidémiologiques montrant une corrélation inverse entre la prévalence des maladies coronariennes dues à une consommation élevée d'acides gras saturés et un régime méditerranéen associé à une consommation élevée de vin rouge, ce qui avait été appelé le « French paradox » (Renaud, *et al.* 1992).

2.2.3. Caractéristiques chimiques

Selon leur mode d'action les antioxydants sont classés en trois classes : éliminateurs de radicaux libre, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres (Shahidi, *et al.* 2003).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols.

2.2.4. Activité antioxydante

La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux.

Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs (Prior, *et al.* 2005) : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physicochimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des

substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante (Prior, *et al.* 2005; Frankel, *et al.* 2000).

2.2.5. Mesure de l'activité antioxydante des polyphénols

L'activité antioxydante des polyphénols se détermine *in vitro* par mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres et de réduction de certains composés chimiques. Les données obtenues sont comparées à des composés de référence comme le Trolox (dérivé hydrosoluble de la vitamine E), l'acide gallique ou la catéchine. Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène.

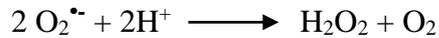
Divers oxydants peuvent être utilisés pour cette détermination :

- L'ABTS^{o+} formé à partir de l'ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid)) en présence de metmyoglobine et de peroxyde d'hydrogène. Il est utilisé dans la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Rice-Evans, *et al.* 1994). Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{o+} de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.
- Les radicaux formés par le chauffage de l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) dans la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao *et al.* 1998) ou TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ghiselli, *et al.* 1995). La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant.
- Le test DPPH, Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH^o. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A^o.



- L'ion ferrique Fe³⁺ dans la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) (Benzie, *et al.* 1996).

- Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène 10000 fois plus rapidement que la dismutation spontanée de l'anion superoxyde (Halliwell, *et al.* 1999).



- Les radicaux formés par l'auto-oxydation de l'acide linoléique (Velioglu, *et al.* 1998).

Les méthodes ABTS et DPPH sont couramment utilisées pour analyser les extraits de plantes et de fruits. La méthode ORAC est plus récente et est applicable sur quasiment toutes les matrices (extraits végétaux, aliments, plasma sanguin, ...).

2.2.6. Antioxydants Naturels

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont les tocophérols, la vitamine C et les caroténoïdes. De nombreuses études ont mis en évidence des composés antioxydants dans divers végétaux (Kasuga, *et al.* 1988) comme par exemple le romarin (Wu *et al.* 1982), la cosse de riz (Ramarathnam, *et al.* 1989), le thé (Amarowicz et Shahidi, 1996), la graine de sésame (Fukuda, *et al.* 1985) ou de colza (Wanasundara, *et al.* 1994), le gingembre (Jitoe, *et al.* 1992), etc.

2.2.7. Effet des antioxydants sur la santé humaine

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances antioxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisés. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par notre organisme quand on consomme des végétaux ou des produits dérivés de ceux ci. Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus anti-âge et leurs implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif.

Les potentiels antioxydants, comparés à celui de la vitamine E, les plus élevés pour les fruits et légumes sont respectivement ceux de la fraise (15,36) et l'ail (19,4) (Rice-Evans, *et al.* 1996, Cao, *et al.* 1996).

2.3. L'OLIVIER SOURCE DES POLYPHENOLS ET DES ANTIOXYDANTS

Le terme «polyphénol» est attribué à la fraction phénolique polaire du fruit d'olive (un terme désuet dans les publications récentes). Ce terme est utilisé dans la littérature pour définir les substances qui possèdent un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyle, y compris leurs dérivés fonctionnels (Harborne, 1989). Les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive, sont communément désignés comme bio-phénols (Uccella, 2001).

Les constituants chimiques du fruit de l'olivier sont résumés dans le tableau

Tableau 6. La composition chimique de chaque partie de l'olive (Aragón and Palancar, 2001).

	Pulpe	Noyau	Graine
Eau (%)	50–60	9.3	30
Huile (%)	15–30	0.7	27.3
Sucre (%)	3–7.5	41	26.6
Cellulose (%)	3–6	38	1.9
Minéraux (%)	1–2	4.1	1.5
Polyphénols (%)	2–2.25	0.1	0.5–1
Autres (%)	–	3.4	2.4

Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties de la plante, mais leur nature et leur concentration varie considérablement entre les différents tissus (Tableau 7).

Dans *O. europaea*, oleuropéine, dimethy-loleuropéine, ligstroside, et oleoside représentent les oleosides prédominantes (Soler – Rivas, *et al.* 2000). Oleuropéine est généralement composé phénolique le plus important chez les cultivars d'olive.

Tableau 7. Composés phénoliques identifiés dans les matrices d'olive (Ryan et al. 2002).

(1) Amiot et al. (1986); (2) Akasbi et al. (1993); (3a) Brenes et al. (1995) olives avant traitement par NaOH; (3b) Brenes et al. (1995) olives après traitement par NaOH; (4) Esti et al. (1998); (5) Heimler et al. (1992); (6) Lavee et al. (1986a,b); (7) Le Tutour et Guedon (1992); (8) Mannino et al. (1995); (9) Montedoro et al. (1992); (10) Ryan et al. (1999b); (11) Gariboldi et al. (1986); (12) Vlahov (1992); (13) Servili et al. (1999); (14) Rovellini et al. (1997); (15) Romani et al. (1999); (16) Tsimidou et al. (1992); (17) Movsumov et al. (1987); (18) Baldi et al. (1995); (19) Zunin et al. (1995); (20) Kuwajima et al. (1988); (21) Limiroli et al. (1996); (22) De Nino et al. (1997); (23) Duran et al. (1994); (24) Mousa et al. (1996); (25) Brenes-Balbuena et al. (1992); (26) Lo Scalzo and Scarpati (1993); (27) Amiot et al. (1989); (28) Balice and Cera (1984); (29) Kubo and Matsumoto (1984); (30) Brenes-Balbuena et al. (1992); (31) Vacca et al. (1993); (32) Poiana et al. (1997); (33) Mincione et al. (1996); (34) Nergiz and Unal (1991); (35) Evangelisti et al. (1997); (36) Cimato et al. (1990); (37) Litridou et al. (1997).

Composés phénoliques	Feuille	Peau	Pulpe	Graine	Huile
Apigénine	17		14, 17		14
Apigénin-glucoside	14				
Apigénin-7-glucoside	7		15		
Apigénin-7-glycosides	18,19		12,18		
Apigénin-7-rutinoside	7		15		
Acide Caffeique	18	13	3b, 13, 18		2, 9, 16, 31, 32
Acide 5-Caffeoylquinique	5,6				
Acide Cinnamique					9, 31, 32, 33
Acide 2-Coumarique			24		9, 16
Acide 4-Coumarique	18		3a, 3b, 18, 24, 25		9, 16, 19, 31, 32, 33, 34, 35
Cyanidine-3-glucoside			12, 15		
Cyanidine-3-glycoside	18		12, 18		
Cyanidine-3-rutinoside			12, 15		
Demethylleuropeine	7, 18	13	4, 13, 15, 18, 26, 27,	13	
3,4-DHPEA-EDA			13	13	
Acide Élénolique	18		18		
Acide Férule			10, 24		9, 32, 34
Acide Gallique			24		8
Hespéridine	18		18		
Homoorientine (lutéoline-6-glucoside)			15		
Acide Homovanillique			10		2
Acide p-Hydroxyphenylacétique			28		2, 16, 21
Acide 4-Hydroxybenzoïque		13			9, 16, 21
Hydroxytyrosol	18	13	3b, 4, 13, 15, 18, 25	13	2, 8, 9, 16, 19, 32, 34, 36, 37
Ligstroside	7, 11, 20, 21		10, 29		
Lutéoline	5, 14, 17	14	14, 15, 17		14
Lutéoline-glucoside	14				
Lutéoline-4'-glucoside	7				
Lutéoline-7-glucoside	7, 18, 19		1, 3a, 3b, 4, 12, 15, 18, 30		

Composés phénoliques	Feuille	Peau	Pulpe	Graine	Huile
Lutéoline-7-glycoside	5	13			
Lutéoline-rutinoside	14	14			
Lutéoliène-7-rutinoside	7, 19				
Nuzhenide		13		13, 23	
Nuzhenide oleoside				23	
Oleoside	11, 20				
Oleuropéine	7, 11, 17, 18, 19, 20, 22	13	1, 3a, 3b, 4, 7, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 21, 25, 27, 29, 30	13	
Oleuropeine aglycone			15		9
Oleuroside	7, 20	14			
Acide Protocatechuique					9, 16
Quercétine	17		17		
Quercétine-3-rhamnoside	5		10, 12		
Rutine (quercétine-3-rutinoside)	5, 7, 12, 17	13, 14	1, 3a, 3b, 4, 12, 15		
Acide Sinapique					32, 33
Acide Syringique			10, 24		9, 16, 31, 32, 33, 34, 37
Tyrosol			3b, 10, 13, 15, 24, 21	13	2, 8, 9, 16, 31, 32, 33, 35, 36, 37
Acide Vanillique			13, 15, 24, 25		8, 9, 16, 19, 31, 32, 33, 34, 35
Verbascoside		13	1, 3a, 3b, 7, 10 (isomères), 11, 13, 15, 25, 30,	13	

La teneur en composés phénoliques des fruits d'olive a été étudiée plus que tout autre tissu végétal de l'olivier et qui a été soigneusement examiné (Ryan, *et al.* 1999a; Ryan et Robards, 1998). Servili *et al.* 1999 a caractérisé le contenu phénolique du fruit de l'olivier complet (peau, la pulpe et les graines) de trois variétés de l'olivier italiens (Coratina, Leccino et Moraiolo). Nuzhenide a été détectée exclusivement dans les graines et la peau d'olive de tous les trois variétés et à tous les stades de maturation. La lutéoline -7- glucoside et de la rutine ont été détectés seulement dans la peau d'olive, tandis que verbascoside, oleuropéine, et démethyloleuropéine ont été trouvés dans les trois matrices d'olive. La concentration de ces deux derniers composés phénoliques était plus grande dans la pulpe d'olive. De même, Rovellini *et al.* (1997) ont analysé la composition en flavonoïdes des fruits, des feuilles et de l'huile d'olive (tableau 6). La lutéoline, la lutéoline rutinoside, et la lutéoline glucoside ont été détectés dans les feuilles et la peau. Apigénine glucoside a été trouvé que dans des feuilles d'olivier (Rayan, *et al.* 2002).

Oleuropéine a été identifié et caractérisé dans les années 1950 par Shasha et Liebowitz (1958, 1961).

Dans le fruit d'olive, une large gamme de structures phénoliques ont été rapportés, y compris les acides phénoliques simples tels que les isomères de l'acide coumarique (Romani, *et al.* 1999), ArC1 et ArC2 (composés phénoliques dans lesquels un ou deux atomes de carbone, respectivement, sont attachés au cycle aromatique), les glucosides phénoliques, oléosides phénoliques et des flavonoïdes. En revanche, la fraction phénolique de feuilles d'olivier est dominé par des phénols complexes tels que les flavonoïdes et les sécoiridoïdes phénoliques, et contient très peu d'acides phénoliques simples (tableau 9). Graines et peau d'olive contiennent relativement peu d'espèces phénoliques, en générale les composés phénoliques simples, y compris tyrosol et l'acide caféïque, en combinaison avec les flavonoïdes et sécoiridoïdes. Ces différences permettent de déduire que chaque composante a son propre métabolisme distinct. Ce qui reste à déterminer est la mesure dans laquelle le métabolisme dans les différents compartiments est lié.

2.3.1. Diversité des composés phénoliques de l'huile d'olive

La composition chimique de l'huile d'olive contient des éléments majeurs et mineurs. L'huile d'olive possède une composition nutritionnelle équilibrée en acides gras et en triglycérides (98 % du poids total). Les composants mineurs, représentent environ 2 % du poids total de l'huile, notamment, plus de 230 composés chimiques, tels que les alcools aliphatiques et triterpéniques, les stérols, les hydrocarbures, les composés volatils et les polyphénols (Servili, *et al.* 2002).

La présence de composés phénoliques et d'autres antioxydants particuliers qui confèrent à l'huile d'olive une haute stabilité contre l'oxydation avec une couleur et une saveur unique la distinguant des autres huiles.

Le nombre des travaux qui s'intéressent à ces composés a augmenté de façon exponentielle au cours de ces 10 dernières années, pour diverses raisons, les composés phénoliques sont liés à la stabilité de l'huile d'olive, notamment, pour leurs propriétés biologiques. Actuellement, plusieurs composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive, principalement l'hydroxytyrosol et ses dérivés, sont sujet de recherches approfondies. La fraction phénolique de l'huile d'olive est constituée d'un mélange hétérogène de composés. Les composés phénoliques de l'huile d'olive, qui regroupent les acides et les alcools phénoliques sont, l'apigénine, l'acide caféïque, l'acide cinnamique, acide férulique, l'acide gallique, l'acide vanillique, acide p-hydroxybenzoïque, hydroxytyrosol, lutéoline, l'oleuropéine, l'acide sinapique, l'acide syringique, tyrosol. La présence d'acide élénolique dans la même fraction a également été vérifiée à plusieurs reprises (tableau 9).

2.3.2. Pouvoir antioxydant de l'olivier

Les composés phénoliques peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières. Dans les systèmes utilisant l'oxydation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer, ils peuvent chélater ces ions métalliques, qui sont des initiateurs des réactions de Fenton pouvant générer de fortes concentrations de radical hydroxyle (Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Halliwell, *et al.* 1995). Visioli et ses collaborateurs (1998b) ont montré que la propriété antioxydante des polyphénols est associée à leur capacité à former des liaisons hydrogène intramoléculaires entre le groupe hydroxyle et les radicaux phénoxylique.

L'activité antioxydante des composés phénoliques de l'huile d'olive, et en particulier, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine, a été étudiée dans de nombreux modèles expérimentaux avec utilisation de métaux de transition. L'oxydation des LDL induite chimiquement; la formation des ROS, par exemple le radical superoxyde, le radical trichlorométhylperoxylique et l'acide hypochloreux (Aeschbach, *et al.* 1994 ; Salami, *et al.* 1995; Visioli, *et al.* 1995, 1998; Aruom *et al.* 1998). En estimant l'activité antioxydante de ces composés polyphénoliques sur la base de leur capacité à inhiber la formation des peroxydes, il a été démontré que l'acide caféique, l'hydroxytyrosol et l'acide protocatéchique ont une plus grande activité antiradicalaire (Papadopoulos et Boskou, 1991). L'activité antioxydante de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol a également été démontrée sur des modèles cellulaires et *in vivo* sur des animaux (Manna, *et al.* 1997 ; Speroni, *et al.* 1998).

Les principaux antioxydants de l'huile d'olive sont les carotènes et les composés phénoliques, y compris, les phénols lipophiles et hydrophiles (Boskou, 1996). Les tocophérols (phénols lipophiles) peuvent être retrouvés dans les huiles d'autres légumes, tandis que certains phénols hydrophiles tel l'hydroxytyrosol de l'huile d'olive ne sont généralement pas présents dans les autres huiles et graisses (Boskou, 1996 ; Shahidi, 1997). L'huile d'olive contient bien plus de substances protectrices à grand effet antioxydant que le raisin, le thé vert et la vitamine C. Les radicaux libres sont piégés d'une façon efficace par les polyphénols de l'huile d'olive ce qui explique leur grand pouvoir antioxydant. Les antioxydants exogènes ont une double fonction; ils empêchent l'oxydation des aliments, en particulier, les lipides. Les antioxydants diététiques les plus importants sont certaines vitamines (acide ascorbique, les tocophérols, carotènes) et les composés phénoliques, qui sont présents dans divers aliments d'origine végétale caractéristiques de l'alimentation méditerranéenne, comme l'huile d'olive (Edwin, *et al.* 2011) (Figures 30).

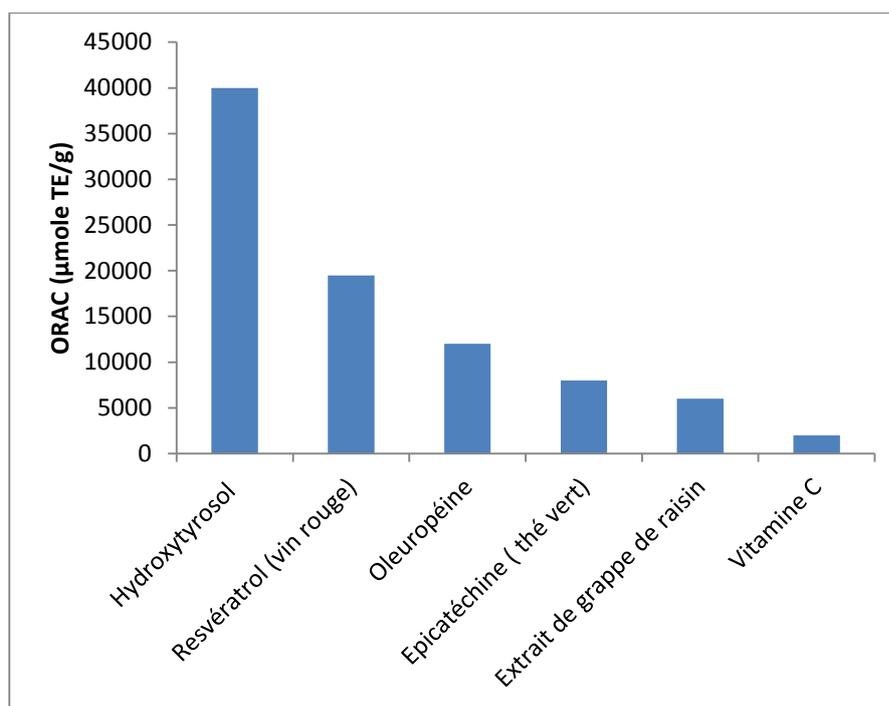


Figure 27. Pouvoir antioxydant de l'hydroxytyrosol (composé phénolique majeur de l'huile d'olive) par rapport à d'autres antioxydants.

Keceli et Gordon (2001), ont comparé l'activité antioxydante de l' α -tocophérol et des composés phénoliques extraits à partir d'olives et d'huile d'olive au fil du temps. Il a été démontré que dans les premières 15 minutes, l'activité de l' α -tocophérol a été plus élevée, mais elle chute rapidement. L'extrait d'olives et d'huile d'olive continue à réduire plus lentement la concentration des radicaux ; après les 60 minutes de la réaction, les extraits d'olive et d'huile d'olive ont été beaucoup plus actifs que l' α -tocophérol. Cette activité s'étend jusqu'au sixième jour.

Conclusion

Les composés phénoliques sont classés comme métabolites secondaires plutôt que métabolites primaires. Ces derniers comprennent des protéines, des acides nucléiques, des glucides, des lipides et des cofacteurs, et sont impliqués dans la synthèse des matériaux essentiels pour la croissance de tous les organismes. Ces métabolites secondaires sont présents dans toutes les parties du fruit d'olive, mais leur nature et leur concentration varie considérablement entre les différents tissus.

L'activité antioxydante des composés phénoliques de l'olivier, a été étudiée dans de nombreux modèles expérimentaux par plusieurs auteurs. Notre travail traitera la caractérisation quantitative et qualitative des composés phénoliques extraits à partir des noyaux d'olive de trois variétés

marocaines, ainsi que l'étude de leur pouvoir antioxydant afin de les valoriser par des tests biologiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aeschbach, R. Loliger, J. Scott, B. C. Murcia, A. Butler, J. Halliwell, B. Aurome, O. I. 1994. Antioxidant actions of tymol, carvacrol, 6-gingerolo, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
- Akasbi, M. Shoeman, D.W. Csallany, A.S. 1993. High-performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *JAOCS*, 70, 367-370.
- Amarowicz, R. Shahidi, F. 1996. A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. *Food Research International*, 29, 71-76.
- Amiot, M. J. Fleuriet, A. Macheix, J. J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem*, 34, 823-826.
- Amiot, M. J. Fleuriet, A. Macheix, J. J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69
- Aparicio, R. Roda, L. Albi, M. Gutierrez, F. 1999. Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat. *J. of Agr. and Food Chem*, 47, 4150-4155.
- Aragón, J.M. Palancar, M.C. 2001. IMPROLIVE 2000, present and future of alpeorujo, *Ed. Complutense S. A*, Madrid.
- Aruoma, O. I. Deiana, M. Jenner, A. Halliwell, B. Harparkash, K. Banni, S. Corongiu, F. F. Dessi. M. A. Aeschbach, R. 1998. Effect of hydroxytyrosol found in extravirgin olive oil on DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *J. of Agr. and Food Chem*, 46, 5181-5187.
- Balice, V. Cera, O. 1984. Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by a gas chromatographic method. *Grasas Aceites*, 35, 178-180.
- Baldi, A. Romani, A. Tatti, S. Mulinacci, N. Vincieri, F.F. 1995. HPLC analysis of polyphenolic compounds present in *Olea europaea* L. *Colloq. Inst. Natl. Rech. Agron*, 69, 269-270.
- Benzie, I.F.F. Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76.
- Blekas, G. Vassilakis, C. Harizanis, C. Tsimidou, M. Boskou, D.G. 2002. Biophenols in table olives. *J. of Agr. and Food Chem*, 50, 688-692.
- Boskou, D. 1996. Olive oil : Chemistry and Technology. *AOCS Press*, 52- 83.
- Boskou, D. 2002. Vegetable Oils in Food Technology. *CRC Press*, 244-277.
- Brenes, M. Rejano, L. Garcia, P. Sanchez, A.H. Garrido, A. 1995. Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *J. Agric. Food Chem*, 43, 2702-2706.
- Brenes, M. Garcia, A. Garcia, P. Rios, J.J. Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem*, 47, 3535-3540.

- Brenes-Balbuena, M. Garcia-Garcia, P. Garrido-Fernandez, A. 1992. Phenolic compounds related to the black colour formed during the processing of ripe olives. *J. Agric. Food Chem*, 40, 1192-1196.
- Cao, G. Muccitelli, H.U. Sanchez-Moreno, C. 2001. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women : a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*, 73, 920-926.
- Cao, G. Russell, R.M. Lischner, N. 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr*, 128, 2383-2390.
- Cao, G. Sofic, E. Prior, R. L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. of Agr. and Food Chem*, 44, 3426-3431.
- Carrasco-Pancorbo, A. Cerretani, L. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Gallina- Toschi, T. Fernandez-Gutierrez, A. 2005. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci*, 28, 837-858.
- Cheyrier, V. Fulcrand, H. Sarni, P. Moutounet, M. 1997. Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de leur vinification. *Analisis*, 25-14-44.
- Cheyrier, V. Prieur, C. Guyot, S. Rigaud, J. Moutounet, M. 1997. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. *American Chem. Soc*, 81-93.
- Cimato, A. Mattei, A. Osti, M. 1990. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hort*, 286, 453-456.
- Clifford, M. N. 2000a. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1063-1072.
- Clifford, M. N. 2000b. Chlorogenic acids and other cinnamates : nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Wiley*, 348.
- Clifford, M. N. Scalbert, A. 2000. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1118-1125.
- Crozier, A. Jaganath, I.B. Clifford, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26, 1001-1043.
- De Nino, A. Lombardo, N. Perri, E. Procopio, A. Raffaelli, A. Sindona, G. 1997. Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 32, 533-541.
- De Nino, A. Mazzotti, F. Perri, E. Procopio, A. Raffaelli, A. Sindona, G. 2000. Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Cortina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 35, 461-467.
- D'Archivio, M. Filesi, C. Di Benedetto, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43, 348-361.

- Durán, N. Angelo, R. 1998. Proc. Fifth Workshop on Lignocellulosics and Pulp-EWLP-98. *Aveiro*, 505–508.
- Durán, N. Curotto, E. Esposito, E. Aguirre, C. Nazal, A. Angelo, R. 1994. In: Galindo E, Ramirez OT, eds. *Advances in Bioprocesses Engineering. Academic Publishers*, 489–494.
- Edwin, N. Frankel. 2011. Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*, 59, 785-792.
- Esti, M. Cinquanta, L. La Notte, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem*, 46, 32-35.
- Evangelisti, F. Zunin, P. Tiscornia, E. Petacchi, R. Drava, G. Lanteri, S. 1997. Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions. Study of polar compounds by chemometric methods. *JAOCS*, 74, 1017-1023.
- Fleuriet, A. Jay-Allemand, C. Macheix, J. J. 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121-216.
- Frankel, E. N. Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. of the Sc, of Fd and Agr*, 80, 1925-1941.
- Fukuda, Y. Osawa, T. Namiki, M. Ozaki, T. 1985. Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 301-306.
- Gariboldi, P. Jommi, G. Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25, 865-869.
- Ghiselli, A. Natella, F. Guidi, A. 2000. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem*. 11, 76-80.
- Ghiselli, A. Serafini, M. Maiani, G. 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med*, 18, 29-36.
- Goris, A. Liot, A. 1942. Pharmacie galénique. Edition Masso et cie, 2, 937.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J. of the Amer. Oil Chem. Soc*, 58, 966-968.
- Halliwell, B. Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Methods Enzymol*, 186, 1-86.
- Halliwell, B. Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford.
- Halliwell, B. 1997. Antioxidants and human disease : a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55, 44-52.
- Halliwell, B. Aeschbach, R. Loliger, J. Aruoma, O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.

- Harborne, 1989. General procedures and measurement of total phenolics. *Plant Phenolics*, 1, 1-28.
- Heimler, D. Pieroni, A. Tattini, M. Cimato, A. 1992. Determination of flavonoids, flavonoid glycosides, and biflavonoids in *Olea europaea* L. leaves. *Chromatographia* 33, 369-373.
- Hrcirik, K. Fritsche, S. 2004 Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur J Lip Sc and Tec*, 106, 540-549.
- Jitoe, A. Masuda, T. Tengah, I. G. P. Suprpta, D. N. Gara, I. W. Nakatani, N. 1992. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J. Agric. Food Chem*, 40, 1337-1340.
- Kasuga, A. Aoyagi, Y. Sugahara, T. 1988. Antioxidant activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35, 828-834.
- Kubo, I. Matsumoto, A. 1984. Mollusciscides from olive *Olea europaea* and their efficient isolation by counter-current chromatographies. *J. Agric. Food Chem*, 32, 687-688.
- Kühnau, J. 1976. The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24, 117-191.
- Kuwajima, H. Uemura, T. Takaishi, K. Inoue, K. Inouye, H. 1988. Monoterpene glucosides and related natural products. *Phytochemistry*, 27, 1757-1759.
- Limiroli, R. Consonni, R. Ottolina, G. Marsilio, V. Bianci, G. Zetta, L. 1995. ¹H and ¹³C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 1, 1519-1523.
- Limiroli, R. Consonni, R. Ranalli, A. Bianchi, G. Zetta, L. 1996. ¹H NMR study of phenolics in the vegetation waters of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *J. Agric. Food Chem*, 44, 2040-2048.
- Lavee, S. Harshemesh, H. Avidan, N. 1986a. Phenolic acids possible involvement in regulating growth and alternate fruiting in olive trees. *Acta Hort*, 179, 317-328.
- Lavee, S. Harshemesh, H. Avidan, N. 1986b. Endogenous control of alternate bearing: possible involvement of phenolic acids. *Olea*, 17, 61-66.
- Le Tutour, B. Guedon, D. 1992. Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31, 1173-1178.
- Litridou, M. Linssen, J. Schols, H. Bergmans, M. Posthumus, M. Tsimidou, M. Boskou, D. 1997. Phenolic compounds in virgin olive oils: fractionation by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *J. Sci. Food Agric*, 74, 169-174.
- Lo Scalzo, R. Scarpati, M.L. 1993. A new secoiridoid from olive wastewaters. *J. Natl. Prod*, 56, 621-623.
- Macheix, J. J. Fleuriet, A. Sarni-Manchado, P. 2006. Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaire*, 1-28.

- Manach, C. Scalbert, A. Morand, C. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727-747.
- Manna, C. Galletti, P. Cucciolla, V. Moltedo, O. Leone, A. Zappia, V. 1997. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 127, 286-292.
- Manna, C. Galletti, P. Cucciolla, V. Montedoro, G. F. Zappia, V. 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J of Nut Biochem*, 10, 159-165.
- Manna, C. Galletti, P. Maisto, G. Cucciolla, V. Dangelo, S. Zappia, V. 2000. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS*, 470, 341-344.
- Mannino, S. Cosio, M.S. Bertuccioli, M. 1995. High performance liquid chromatography of phenolics in virgin olive oils using amperometric detection. *Ital. J. Food Sci*, 150-157.
- Mazza, G. Miniati, E. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. *Boca Raton*, 362.
- Mincione, B. Poiana, M. Giuffre, A. M. Modafferi, V. Giuffre, F. 1996. Research on monovariety olive oils. *Sostanze Grasse*, 73, 245-257.
- Montedoro, G. Servili, M. Baldioli, M. Miniati, E. 1992. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. II. *J. Agric. Food Chem*, 40, 1577-1580.
- Montedoro, G. Servili, M. Baldioli, M. Selvaggini, R. Miniati, E. Maccioni, A. 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. III. *J. Agric. Food Chem*, 41, 2228-2234.
- Mousa, Y. M. Gerasopoulos, D. Metzidakis, I. Kiritsakis, A. 1996. Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of Mastoides olives. *J. Sci. Food Agric*, 71, 345-350.
- Movsumov, I. S. Aliev, A. M. Tagieva, Z. D. 1987. Pharmacochemical studies of olives grown in the Azerbaijan Soviet Socialist Republic. *Farmatsiya*, 36, 32-34.
- Naczki, M. Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Nergiz, C. Unal, K. 1991. Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric*, 56, 79-84.
- Papadopoulos, G. Boskou, D. 1991. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. of the Am Oil Chem Soci*, 68, 669-671.
- Poiana, M. Giuffre, A. M. Giuffre, F. Modafferi, V. Neri, A. Mincione, B. Taccone, P. L. 1997. Research on monovariety olive oils. Note IV. *Sostanze Grasse*, 74, 59-71.
- Prior, R. L. Wu, X. Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. of Agr. Fd Chem*, 53, 4290-4302.
- Psomiadis, E. Karakostas, K. Blekas, G. 2003. Proposed Parameters for Monitoring Quality of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 105, 403-408.

- Ramarathnam, N. Osawa, T. Namiki, M. Kawakishi, S. 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. *J. Agric. Food Chem*, 37, 316-319.
- Romani, A. Mulinacci, N. Pinelli, P. Vincieri, F. F. Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem*, 47, 964-967.
- Rovellini, P. Cortesi, N. Fedeli, E. 1997. Analysis of *Olea europaea* by HPLCUV and HPLC-electrospray-MS. *Sostanze Grasse*, 74, 273-279.
- Ryan, D. Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31R-44R.
- Ryan, D. Robards, K. Lavee, S. 1999a. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Food Sci. Technol*, 34, 265-274.
- Ryan, D. Robards, K. Lavee, S. 1999b. Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 832, 87-96.
- Ryan, D. Robards, K. Prenzler, P. Jardine, D. Herlt, T. Antolovich, M. 1999c. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J. Chromatogr A*, 855, 529-537.
- Ryan, D. Antolovich, M. Prenzler, P. Robards, K. Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92, 147-176.
- Renaud, S. de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Met. Enzym*, 234, 279-293.
- Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. Bolwell, P. G. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Biol. Med*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. Miller, N. J. Bolwell, P. G. Bramley, P. M. Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-794.
- Salami, M. Galli, C. De Angelis, L. Visioli, F. 1995. Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein. Inhibitory effects of hydroxytyrosol. *Pharma Research*, 31, 275-279.
- Servili, M. Baldioli, M. Selvaggini, R. Macchioni, A. Montedoro, G. 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Fd Chem*, 47, 12-18.
- Servili, M. Montedoro, G. 2002. Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *Eur. J. of Lip. Sc. and Tech*, 104, 602-613.

- Shahidi, F. Naczk, M. 1995. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. *Technomic Publishing Co Inc*, 330.
- Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants : Chemistry, health effects and applications. *AOCS*, 97-149.
- Shahidi, F. Naczk, M. 2003. Antioxidant properties of food phenolics. *Phe in fd nutras*, 403-442.
- Shasha, B. Liebowitz, I. 1958. Oleuropein from *Olea europaea*. *Council Is. A*, 8, 92.
- Shasha, B. Liebowitz, I. 1961. On the oleuropein, the bitter principle of olives. *J. Org. Chem*, 26, 1948-1954.
- Singleton, V. L. Orthofer, R. Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Met. Enzym*, 299, 152-178.
- Soler-Rivas, C. Espin, J.C. Wichers, H. J. 2000. An easy and Fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal*, 11, 330-338.
- Speroni, E. Guerra, M. C. Minghetti, A. Crespi-Perello, N. Pasini, P. Piazza, F. Roda, A. 1998. Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phyto Research*, 12, 98-100.
- Tomas-Barberan, F. A. Clifford, M. N. 2000a. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1024-1032.
- Tomas-Barberan, F. A. Clifford, M. N. 2000b. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones : nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1073-1080.
- Tsimidou, M. 1999. Analysis of Virgin Olive Oil Polyphenols. *Semi in Food Analysis*, 4, 13-29.
- Tsimidou, M. Papadopoulos, G. Boskou, D. 1992. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reverse-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Fd Chem*, 44, 53-60.
- Uccella, N. 2001. The olive biophenols : hedonic-sensory descriptors of evoo and wotos in the Mediterranean aliment culture. *In Food flavours and Chemistry*, 253-265.
- Vacca, V. Fenu, P. Franco, M. A. Sferlazzo, G. 1993. Phenolic fraction of sardinian virgin olive oils: multivariate statistical analysis of HPLC results. *Sostanze Grasse*, 70, 595-599.
- Velioglu, Y.S. Mazza, G. Gao, L. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*, 46, 4113-4117.
- Visioli, F. Bellomo, G. Montedoro, G. Galli, C. 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Ath erosclerosis*, 117, 25-32.
- Visioli, F. Galli, C. 1998. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agric. Food Chem*, 46, 4292-4296.
- Visioli, F. Galli, C. 1998b. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease : new findings. *Nutrition Reviews*, 56, 142-147.

- Visioli, F. Galli, C. Bornet, F. Mattei, A. Patelli, R. Galli, G. Caruso, D. 2000 Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS*, 468, 159-60
- Visioli, F. Caruso, D. Galli, C. Viappiani, S. Galli, G. Sala, A. 2000 Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, 797-9
- Visioli, F. Caruso, D. Plasmati, E. Patelli, R. Mulinacci, N. Romani, A. Galli, G. Galli, C. 2001. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res*, 34, 301-5
- Visioli, F. Galli, C. Grande, S. Colonnelli, K. Patelli, C. Galli, G. Caruso, D. 2003 Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr*, 133, 2612-5.
- Vlahov, G. 1992. Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric*, 58, 157-159.
- Wanasundara, U. Amarowicz, R. Shahidi, F. 1994. Isolation and Identification of an Antioxidative Component in Canola Meal. *J. Agric. Food Chem*, 42, 1285-1290.
- Wu, J. W. Lee, M. H. Ho, C. T. Chang, S. S. 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 59, 339-345.
- Zunin, P. Evangelisti, F. Pagano, M.A. Tiscornia, E. 1995. Phenolic compounds in oil from *Olea europaea* and anti-Dacus treatments. *Sostanze Grasse*, 72, 55-59.

3. MÉTHODES CHIMIOMÉTRIQUES

3. MÉTHODES CHIMIOMÉTRIQUES

La chimiométrie est la science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques qui visent à extraire des informations pertinentes présentes dans des masses données d'analyses chimiques, inexploitable par des moyens conventionnels. Le terme français de chimiométrie est issu de l'anglais "chemometric" dont la paternité est attribuée au suédois Wold (1976) et à l'américain Kowalski (1975) dans le début des années 70. La chimiométrie a pour but de traiter les données chimiques, avec divers objectifs: la description des données sous une forme synthétique, la modélisation, la classification, les plans d'expériences, l'optimisation, ... etc. Ces données sont représentées et visualisées par des vecteurs, des matrices, des cubes ou des «hyper-cubes » dans le cas des données multi-voies.

Dans ce chapitre, nous présenterons les méthodes chimiométriques les plus courantes et celles utilisées dans ce travail pour la discrimination et la classification afin d'extraire les informations présentes dans nos échantillons.

3.1. INTRODUCTION

Le terme «chimométrie» (chemometrics) a été introduit en 1972 par S. Wold et B.R. Kowalski. Plusieurs définitions de Chimométrie existent, mais la plus communément acceptée est : «La Chimométrie est la discipline de la chimie qu'utilise des méthodes mathématiques, statistiques et d'autres employant une logique formelle pour planifier ou sélectionner des expériences et des procédures expérimentaux optimales, pour extraire le maximum d'informations pertinentes à partir de l'analyse des données chimiques et pour comprendre des systèmes chimiques» (Massart, *et al.* 1997).

La chimométrie est une discipline de création récente. Au départ, le terme chimométrie avait une acception restrictive associant analyse de données et chimie analytique. Aujourd'hui, ce terme recouvre l'ensemble des applications en chimie des méthodes statistiques et mathématiques avec l'appui de l'outil informatique (Lantéri, *et al.* 1996). Actuellement, dans tous les domaines où un nombre important de mesures est collecté, on fait appel à un traitement statistique de ces données. En ce qui concerne la chimie, le terme chimométrie trouve sa place dans de nombreuses applications analytiques (spectroscopie, chromatographie...). Aujourd'hui, il recouvre l'ensemble des applications de la chimie, de la physique, des sciences de la vie, de l'économie, de la sociologie, des méthodes statistiques et de l'informatique..

3.2. HISTORIQUE

Le terme « français » de chimométrie vient de l'anglais « chemometrics », il peut constituer un paradigme fédérateur et méthodologique. Rappelons que le mot « chemometrics » a une double paternité (Geladi, *et al.* 1990): celle du Suédois Svante Wold et de l'Américain Bruce Kowalski, avec au départ une acception restrictive associant analyse de données et chimie analytique. L'apport de la statistique dans la démarche scientifique, avec notamment la prise en compte de la notion d'erreur, est relativement récent. Il remonte aux expérimentateurs-statisticiens nés au siècle dernier, dont l'oeuvre est pérennisée à travers les outils statistiques qu'ils nous ont légués. Cinq auteurs méritent tout spécialement d'être cités : le premier , Sir Ronald Aylmer Fisher (1890-1962), diplômé en astronomie de Cambridge (1912), enseignant les mathématiques en 1919 dans le cadre de l'agronomie, de la biologie et de la génétique qui s'intéressa à la méthode expérimentale pour développer des théories statistiques sur les petits échantillons, son nom est définitivement lié à l'analyse de variance ; le second Karl Pearson (1857-1936), un autre biostatisticien dont les travaux portent sur l'analyse de la régression et l'introduction du test du chi-deux ; le troisième William

Sealey Gosset, un autre britannique qui se plaçait déjà dans une démarche « qualité » relative à la noble activité de brasseur de bière, allait imprimer sa marque en inventant le test en « t » de « Student » ; le quatrième Jacques Salomon Hadamard (1865-1963), un brillant chercheur français sur les séries de Taylor et sur les nombres premiers (Schwartz, *et al.* 1997), et bien que n'adhérant pas du tout à cette approche expérimentale, nous a légué les matrices d'Hadamard si chères au cœur de ceux qui pratiquent les plans de pesées (et connues aussi sous le nom de matrices Plackett et Burman (Plackett, *et al.* 1946). Pour terminer il faut citer l'américain George E.P. Box, qui est un des pères de la méthode expérimentale associant chimie et statistique (Box, *et al.* 1976).

3.3. METHODES CHIMIOMETRIQUES

Il existe une grande gamme de méthodes multivariées, dont une liste non-exhaustive des plus populaires inclue les suivantes: PCA, Factor Analysis, ICA, PCR, PLS, PLS-DA, SIMCA, PARAFAC, Tucker, MANOVA, Réseaux de neurones, «Kohonen networks», «Fuzzy methods», «Warping», Algorithmes génétiques, «Support vector machines», «Multivariate curve resolution», Ondelettes ...etc. Le tableau 8 présente les méthodes chimiométriques utilisés dans différents domaines.

Tableau 8. Les outils de la chimiométrie (Lantéri, et al. 1998).

Thème	Méthodes/Outils	Domaines
Analyses de données	<ul style="list-style-type: none"> – Analyse Statistique – Analyse factorielle – Analyse en composantes principales (PCA) – Régression PLS- – Réseaux neuronaux – Relation Structure Propriété 	Analyses NIR, IR-FT, UV Chromatographies HPLC Spectrométrie Masse, Fluorescence PCR Cinétique, Propriétés Physicochimiques Analyse des eaux, Archéologie, Biotechnologie, Géochimie Huiles essentielles, Pharmacie, Pollution
Calibration	<ul style="list-style-type: none"> – Régression MLR, PCR, PLS – Réseaux neuronaux – PCA Médicament – Validation croisée 	UV, IR-FT, NIR Fluorescence Analyse chimique
Classification	<ul style="list-style-type: none"> – Réseaux neuronaux – PCA – Analyse Discriminante – Filtre de Kalman 	Arôme, Archéologie Dosage des vins Déchets plastiques NIR, HPLC, Contrôle qualité, Analyse chimique
Plans d'expérience	<ul style="list-style-type: none"> – Plan factoriel – Plackett et Burman – Taguchi – Simplexe – Doehlert – Composite – Surfaces de réponses – D-Optimalité 	Agroalimentaire, Médicaments Optimisation Calorimétrie Analyse chimique, Chromatographie HPLC Electrochimie, Electrophorèse Environnement, Ecologie, Biologie Polarographie Mélanges
Algorithmes et Assistance ordinateur	<ul style="list-style-type: none"> – Réseaux neuronaux – Système flou – Algorithme Génétique 	Analyses Chimiques pH métrie, IR, Spectrométrie, Relations Structures-propriétés, Etalonnage, PLS/calibration

Les méthodes chimiométriques peuvent être classées en fonction de leur nature linéaire ou non linéaire. Les méthodes linéaires s'appuient sur l'hypothèse que l'information utile peut être extraite à partir de combinaisons linéaires de variables contrairement aux méthodes non linéaires. Ces dernières appartiennent au domaine de l'intelligence artificielle et mettent principalement en jeu les réseaux de neurones qui sont un ensemble de cellules reliées les unes avec les autres, appelées neurones par analogie avec le système nerveux.

Les méthodes d'analyses multidimensionnelles facilitent l'interprétation et l'utilisation des grands tableaux de données, qui contiennent un nombre important de variables mesurées pour un nombre d'individus élevé. Ces méthodes chimiométriques peuvent être :

- **Descriptives** (analyse qualitative ou exploratoire), repose sur la description des données sous une forme synthétique (pour structurer et simplifier les données issues de plusieurs variables, sans privilégier l'une d'entre elles en particulier, tout en apportant des informations sur les variations sans connaissance a priori du système) ; comme l'analyse en composantes principales (ACP) qui met en évidence les relations existant entre les variables et les échantillons;
- **Discriminantes**, qui ont pour objectif de rechercher la meilleure séparation possible des différents groupes prédéfinis d'échantillons. La sélection de variables pour atteindre ce but est possible, mais pas systématique;
- **Prédictives** (de régression ou analyse quantitative), permettant d'estimer une ou plusieurs caractéristiques d'un échantillon à partir d'autres mesures effectuées sur le même échantillon, comme la régression en composantes principales, (Bertrand, *et al.* 2000) ou la régression PLS (Partial Least Squares, ou régression des moindres carrés partiels);
- **La classification** permet de classer les objets.

Toutes ces méthodes d'exploitation statistique sont très clairement détaillées dans la littérature (Bertrand, *et al.* 2000; Vigneau, *et al.* 2000; Naes, *et al.* 2002). C'est pourquoi, dans la présente étude, les principes de ces techniques seront brièvement décrits.

3.3.1. Méthodes Descriptives : Exploration des données

a. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Objectif : exploration, compression des données

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode statistique ancienne publiée à l'origine par Pearson (1901) et Hotteling (1933). La théorie de l'ACP a été décrite en détail par Wold *et al.* (1987). L'ACP est considérée comme une méthode de base de l'analyse des données multidimensionnelles, lorsque toutes les variables observées sont de type numérique, et que l'on veut voir s'il y a des liens entre ces variables et entre les échantillons. Elle a pour objet la description des données contenues dans un tableau à n lignes (individus) et p colonnes (variables) (Bouroche, *et al.* 2002).

L'ACP est une méthode :

- Exploratoire : elle permet de révéler des informations sous-jacentes, d'analyser rapidement les corrélations entre les variables par modélisation de leurs variations systématiques;

- Descriptive : elle caractérise les données sans avoir besoin de connaissances a priori sur le sujet et conduit à une représentation graphique, synthétique et visuelle qui facilite l'analyse des données;
- Factorielle : elle réduit le nombre de variables par construction de nouvelles variables synthétiques et elle réorganise les données pour qu'elles ne soient plus corrélées entre elles;
- Linéaire : elle établit un modèle spectral linéaire qui est une combinaison linéaire qui considère un spectre comme la somme de spectre purs ou de signaux sous-jacents;
- Classification : les individus, présentant des analogies, se regroupent en catégories homogènes.

L'ACP est une méthode d'analyse factorielle classique utilisée pour la réduction du nombre de dimensions. Elle consiste en un calcul de combinaisons linéaires des variables de départ, et elle est particulièrement adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales, même si elle peut être appliquée à tout type de données. Elle permet de remplacer les variables d'origine (absorbances, ou autre), fortement redondantes, par des variables synthétiques (facteurs ou variables latentes), les composantes principales (PCs), qui contiennent la quasi-totalité de l'information, et qui ont l'avantage d'être orthogonales entre elles (d'où la résolution des problèmes liés à la colinéarité), et classées par ordre décroissant de variance (d'où la réduction de dimensionnalité, une variance « faible » étant associée au bruit dans les données, et pouvant donc être éliminée sans perdre d'information). A l'aide de l'ACP, il est souvent possible de condenser la collection spectrale dans des proportions très importantes : 20 composantes sont en général largement suffisantes (même souvent trop) pour résumer l'information utile, et la taille de la matrice des données peut être réduite par un facteur de 10 à 100 ou plus.

L'ACP peut être réalisée par la décomposition en valeur singulière ou "Singular Value Decomposition" (SVD) qui décompose une matrice de données X en matrices orthonormées (indépendantes- linéaires), qui explore à la fois l'espace des lignes et l'espace des colonnes. Cette décomposition de matrice est basée sur les calculs des vecteurs (axes) correspondant aux plus importantes sources de variabilité présente dans X (Roggo, 2003). Les vecteurs liés à l'espace des lignes de X sont désignés sous le nom de "Scores" (Coordonnées Factorielles) et ceux liés à l'espace des colonnes de X sont connus sous le nom de "Loadings" (Contributions Factorielles). Chaque composante principale se caractérise donc par trois ensembles de caractéristiques complémentaires: la variance qui y est associée, les contributions factorielles (ou "loadings") décrivant les contributions des variables initiales à cette composante, et les coordonnées factorielles (ou "scores") décrivant la position ou les coordonnées des échantillons sur cette composante principale (Dunteman, 1989).

D'un point de vue géométrique, l'ACP peut être plus facilement comprise comme une méthode de rotation des données pour que l'observateur soit le mieux placé pour comprendre les relations entre les individus. Les coordonnées factorielles permettent de projeter les individus sur des plans construits à partir des PCs, où l'on peut éventuellement détecter des répartitions structurées des objets, la formation de groupes ou la présence d'individus aberrants. Comme on peut voir dans la figure 28, la direction d'observation des données peut avoir une grande influence sur la compréhension de ce que l'on observe.



Figure 28. *Choix des axes pertinents en ACP*

Les principaux résultats d'une ACP sont résumés dans la figure 29. Les algorithmes NIPALS et SVD permettent de retrouver les composantes principales de l'ACP. Ils ne calculent pas directement toutes les CPs, mais procèdent de façon itérative. L'utilisation de NIPALS permet cependant une amélioration des temps de calculs lorsque le nombre de variables est très élevé. En effet, les premières CPs de l'ACP sont produites sans avoir à diagonaliser explicitement la matrice de variance-covariance. L'encombrement mémoire est ainsi moindre et le temps de calcul réduit.

L'algorithme NIPLAS (Non Linear Iterative Partial Least Square) (Wold, 1966) est utilisé pour réduire la dimensionnalité dans un problème de description. Cet algorithme est une implémentation possible des techniques de Décomposition en Valeur Singulières (SVD), décrites par Golub et Reinsch (1970). Ces deux algorithmes sont utilisés dans les logiciels de chimiométrie.

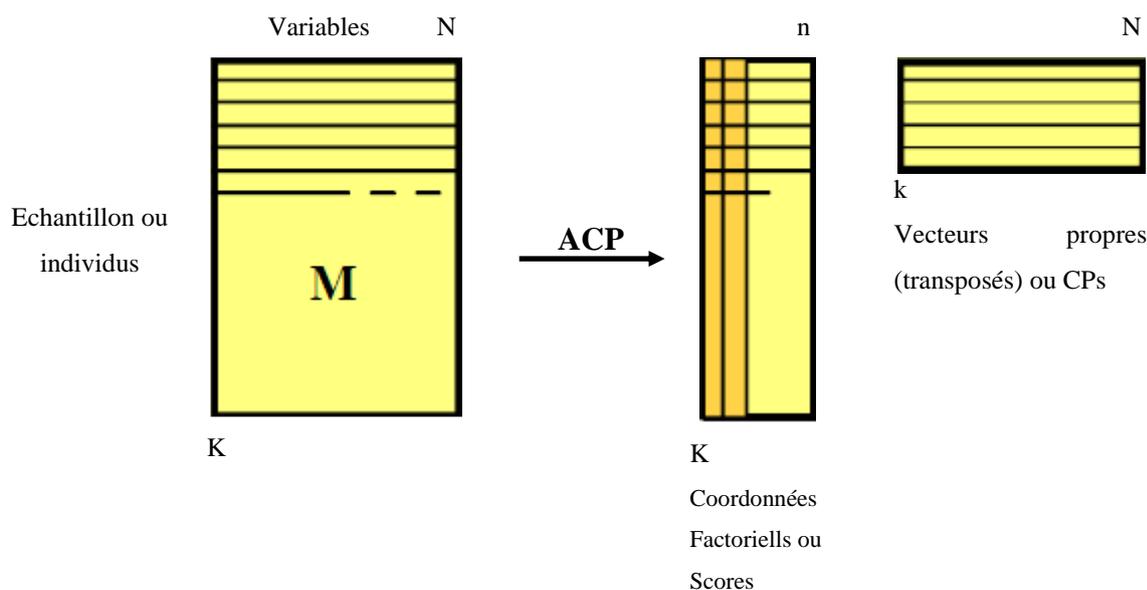


Figure 29. Principaux résultats d'une ACP.

L'interprétation des résultats d'une ACP est habituellement assurée par la visualisation des scores et des loadings (Beckwith-Hall, *et al.* 2002). Les données condensées résultants de l'ACP peuvent servir de variables de base à d'autres traitements statistiques tels que l'analyse discriminante ou la régression.

b. Traitement de données spectrales

Pour le traitement de données, les spectres sont numérisés et sont assimilés à des vecteurs, la longueur du vecteur, N_λ , dépend de la gamme spectrale et de la résolution spectrale. Un ensemble de N_s spectres constitue donc une matrice de données de dimensions $N_\lambda \times N_s$. Les différentes variables (ici les nombres d'onde) contiennent des informations redondantes, il est donc possible de réduire la dimension des données tout en conservant l'information liée à la variabilité (Scharf, 1991). L'ACP (ou PCA pour Principal Component Analysis) est un outil de compression, elle permet de remplacer les variables redondantes par des composantes principales (PC pour Principal Component) qui sont en fait des combinaisons linéaires des variables initiales (Comon, 1994; Hyvärinen, 1999; Hyvärinen *et al.* 2001). L'ACP est une méthode de traitement couramment utilisée en spectroscopie (Deinum, *et al.* 1999; Haka, *et al.* 2002).

On cherche à travailler dans un sous-espace de dimension k (avec $k < N_\lambda$). On choisira alors le sous-espace engendré par les k premiers vecteurs propres, qui ont été arrangés par poids décroissant. Un des points faibles de l'ACP est que l'utilisateur doit déterminer manuellement le nombre de composantes principales.

Dans notre cas, les premières composantes principales (1^{ère} à 10-15^{ème} PC) contiennent la majeure partie de l'information spectrale, les composantes suivantes n'en contiennent qu'une quantité décroissante tandis que les dernières (à partir de la 30^{ème}) ne sont formées que de bruit. L'ACP peut par ailleurs être utilisée pour débruiter les signaux (Comon, 1994; Hyvärinen, 1999; Hyvärinen, *et al.* 2001). De manière générale, une dizaine de composantes principales suffisent pour décrire plus de 99% de la variance des données. Utilisée de façon descriptive, l'ACP permet de mettre en évidence des groupements entre spectres (portant par exemple la même information spectrale) par le biais de score plots (Krishna, *et al.* 2005; Krishna Murali, *et al.* 2005). Ces représentations graphiques comparent les valeurs des scores de chaque spectre selon deux ou trois composantes principales, définies par l'utilisateur figure 30.

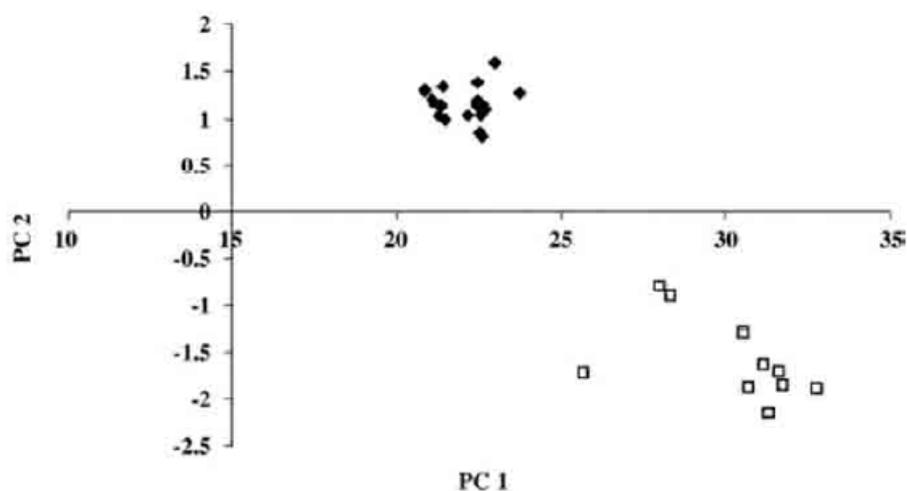


Figure 30. Exemple d'un score plot (Krishna Murali, *et al.* 2005)

Si les similitudes ou les différences entre les données ne sont pas visibles dans un espace à N_λ dimensions (de manière générale, N_λ vaut plus de 500), elles peuvent l'être plus distinctement dans l'espace des composantes principales. Au niveau des données spectroscopique, l'analyse des loads permet également de comprendre quelles variables (ici les nombres d'ondes) ont contribué le plus au regroupement ou à la discrimination entre les données. Par exemple, la première composante principale représentant le spectre le plus corrélé sur les N_s spectres acquis, les variables qui ont contribué le plus à cette composante auront des valeurs plus grandes que les variables n'ayant pas contribué. Cependant, les scores et les loads peuvent prendre des valeurs négatives (à cause de la contrainte d'orthogonalité), rendant difficile la corrélation.

3.3.2. Méthodes prédictives

Objectif : construction des modèles d'étalonnages

Les méthodes de régression ont pour objectif de construire un modèle d'étalonnage qui permet de prédire au mieux des valeurs d'une ou plusieurs variables quantitatives. Il existe deux familles différentes de méthodes de régressions linéaires : les régressions linéaires simples (univariées), et les régressions linéaires multiples (multivariées).

Les méthodes les plus utilisées sont :

- La régression linéaire multiple (Multiple Linear Régression, MLR),
- La régression en composantes principales (Principal Component Régression, PCR),
- La régression des moindres carrés partiels (Partial Least Square, PLS).

La régression est un processus en deux étapes : la première consiste à construire le modèle, c'est-à-dire déterminer le vecteur de régression. C'est l'étape d'étalonnage. La deuxième consiste à vérifier que notre modèle réagit bien face à de nouvelles données. C'est l'étape dite de test.

a. Régression linéaire multiple (Multiple Linear Régression, MLR)

On peut définir la régression linéaire multiple comme une généralisation à n variables de la régression linéaire simple. En rappel, la régression linéaire simple ne prend en compte qu'une seule variable explicative pour une seule variable expliquée (Geladi, 1986). Dans le cas de n échantillons pour m variables indépendantes, nous pouvons distinguer 3 cas :

1. $m > n$: Il y a plus de variables que d'échantillons. Dans ce cas, il y a une infinité de solutions pour $\hat{\mathbf{b}}$. Ce n'est pas l'objectif de la régression.
2. $m = n$: Le nombre d'échantillons est égal au nombre de variables. C'est une situation très peu probable. Cependant elle donne une solution unique pour $\hat{\mathbf{b}}$, en notant que le rang de la matrice de variables indépendantes soit maximal. Aussi, dans ce cas, on a une erreur nulle, puisque la solution est exacte.
3. $m < n$: Il y a plus d'échantillons que de variables dépendantes. Cela ne permet pas d'avoir une solution exacte pour $\hat{\mathbf{b}}$. Cette solution peut être obtenue en minimisant l'erreur obtenue. Généralement, pour minimiser l'erreur, on utilise la méthode des moindres carrés, dont la solution est donnée par :

$$\hat{\mathbf{b}} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y} \quad \text{e.q (1)}$$

Cependant, l'inverse de $\mathbf{X}'\mathbf{X}$ n'existe pas forcément : colinéarité des éléments, singularité de la matrice, déterminant nul, sont des termes synonymes décrivant ce même problème (Helge, 2006).

La MLR est la plus simple des régressions pour relier un ensemble de prédicteurs à une variable dépendante. Malgré sa simplicité, la MLR a quelques défauts. Tout d'abord, la détermination du modèle est très instable lorsque le nombre d'observations est inférieur au nombre de variables : c'est une situation pourtant rencontrée fréquemment. Ensuite, on se heurte à l'impossibilité de prendre en compte les données manquantes, et cela oblige souvent le praticien à rejeter certaines observations qui peuvent néanmoins se révéler utiles pour le modèle, des informations importantes peuvent être contenues dans les variables disponibles.

Enfin, la MLR présente une grande sensibilité aux données colinéaires au sein des variables explicatives.

b. Régression en composantes principales (PCR, Principal Component Regression)

La régression PCR est constituée de deux étapes (Mardia, *et al.* 1981). Dans un premier temps les données sont traitées par ACP, ensuite une régression MLR est appliquée aux données issues de l'ACP, avec les coordonnées factorielles comme variables prédictives.

Prenant l'exemple de traitement des spectres; soient \mathbf{X} une matrice de spectres et \mathbf{Y} une variable à prédire. La régression en composantes principales utilise l'analyse en composantes principales (ACP) de la matrice \mathbf{X} pour réduire les données à utiliser pour la régression, seules les composantes principales de la matrice \mathbf{X} sont utilisées pour la régression. La nécessité de réduire les données à utiliser est induite par la colinéarité des données. Le but de la PCA est d'exprimer l'information principale contenue dans les variables de la matrice \mathbf{X} par un nombre plus faible de variables regroupées dans la matrice \mathbf{T} et appelées composantes principales. Il s'agit ensuite d'appliquer une régression linéaire aux moindres carrés sur les variables décorréliées de la matrice \mathbf{T} .

Il existe plusieurs avantages de la méthode PCR; l'analyse en composante principale supprime les colinéarités entre les variables, et ne demande pas de sélection de celles-ci a priori. Cependant, un inconvénient majeur est qu'il n'y a pas de garantie que les composantes principales soient corrélées aux propriétés à prédire. On lui préfère donc une méthode un peu plus avancée qui est la régression des moindres carrés partiels (PLS).

c. Régression des moindres carrés partiels (PLS, Partial Least Squares)

La méthode de régression PLS est actuellement la méthode la plus connue et la plus largement utilisée dans de nombreux domaines (Vigneau, *et al.* 2006). C'est une méthode d'analyse de données initiée par Wold (1966) qui a connu un fort développement par la suite (Geladi et Kowalski, 1986; Tenenhaus, 1998). L'algorithme PLS a été tout d'abord développé pour résoudre des problèmes de sciences économiques (Martens et Naes, 1989). Ses premières applications à l'analyse quantitative remontent aux années 1980 (Mardia, *et al.* 1981). Cette méthode est une alternative à la régression linéaire multiple classique.

La technique PLS est basée sur la transformation linéaire d'un grand nombre de descripteurs vers un nouvel espace de variables orthogonales le plus petit possible (ce sont les variables latentes). Ces facteurs sont mutuellement indépendants (orthogonaux) et aussi combinaison linéaire des descripteurs initiaux. À la différence de la régression en composantes principales, les variables latentes sont déterminées de telle manière que la corrélation entre elles et les variables dépendantes soit maximum.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'écriture d'une relation linéaire entre une variable d'intérêt et des spectres de réflectance nécessite une étape de sélection des longueurs d'onde ou de réduction des données du fait de la colinéarité des données. La PCR utilise l'analyse en composantes principales pour extraire des variables décorrélatées tout en conservant l'ensemble de l'information disponible. Cependant, cette technique a l'inconvénient de ne pas prendre en compte la variable à prédire pour extraire les composantes principales. Cela a pour conséquence d'identifier des composantes d'intérêt qui sont explicatives de la variable X mais peuvent ne présenter aucun intérêt pour expliquer la variable d'intérêt Y (Martens et Næs, 1989). Au contraire, la régression linéaire partielle aux moindres carrés (PLS) cherche des composantes de X qui soient aussi pertinentes pour Y, c'est-à-dire des composantes (appelées variables latentes) qui réalisent simultanément une décomposition de X et de Y avec comme contrainte que ces composantes expliquent au maximum la covariance entre X et Y. Il s'agit d'une généralisation de l'ACP. La décomposition simultanée de X et Y s'effectue de manière itérative, quand une première variable latente est trouvée, elle est soustraite à la fois de X et de Y et la procédure (choix d'un vecteur avec contrainte sur la covariance) est réitérée pour un nombre de variables latentes prédéterminé.

Le principal avantage de la régression PLS est que le calcul des coefficients de régression du modèle se fait à partir de variables latentes T qui maximisent la covariance entre les variables prédictives et les variables à prédire.

3.3.3. Méthodes de classification

Les méthodes de classification ont été largement étudiées; la littérature à ce sujet est très abondante. Michie, et al. (1994) ont un point de vue axé sur l'apprentissage, ils définissent la classification par : "La classification est l'action de regrouper en différentes catégories des objets ayant certains points communs ou faisant partie d'un même concept, sans avoir connaissance de la forme ni de la nature des classes au préalable, on parle alors de problème d'apprentissage non supervisé ou de classification automatique, ou l'action d'affecter des objets à des classes prédéfinies, on parle dans ce cas d'apprentissage supervisé ou de problème d'affectation" . Donc on distingue deux types de méthodes de classification :

- La classification non supervisée ou "clustering". Les échantillons similaires se regroupent pour former des groupes (ou clusters). Les méthodes les plus couramment utilisées pour la classification non supervisée sont l'ACP et les méthodes de classification hiérarchique;
- La classification supervisée. Dans ce cas, on dispose d'un lot d'étalonnage dont l'appartenance à chaque groupe est connue. Un modèle d'étalonnage est ainsi créé en utilisant cette information. Il est ensuite validé sur un nouveau lot d'échantillons.

Dans notre travail on s'intéresse seulement sur les méthodes de classification automatique (classification non supervisée)

a. Méthodes de classification automatique

Les problèmes de classification automatique ont été traités à travers plusieurs ouvrages dont : Benzecri (1973), Caillez et Pages (1976), Roux (1986), Celeux, et al. (1989), etc.

L'objectif de ces méthodes est de regrouper les individus en un nombre restreint de classes homogènes. Dans ce type de méthodes les classes seront obtenues à l'aide des algorithmes formalisés et non par des méthodes subjectives.

On distingue aussi les méthodes de classification non hiérarchiques et les méthodes de classification hiérarchiques.

a.1. Méthode de *k*-means

k-Means est une technique de classification non supervisée elle a été développée par J. MacQueen (1967), puis par le juge Hartigan et M.A Wong vers 1975. *k*-Means est un algorithme permettant de classer ou de regrouper des objets basés sur des attributs.

Cette méthode est encore appelée *algorithme des centres mobiles* (Benzécri, 1973). Ce type d'algorithme, où la classe est représentée par son centre de gravité, a été étudié par plusieurs auteurs, à savoir (Bonner, 1964 ; MacQueen, 1967 ; Celeux, *et al.* 1989). L'algorithme *k*-means mis au point par McQueen en 1967 est l'un des algorithmes de clustering les plus connus. Il est basé sur la méthode des centroïdes (ou centres de gravité).

- Principe de la méthode

On se donne pour commencer, k centres arbitraires c_1, c_2, \dots, c_k où chaque c_i représente le centre (centroïde) d'une classe C^i . Chaque classe C^i est représentée par un ensemble d'individus plus proches de c_i que de tout autre centre (Figure 31). Après cette initialisation, on effectue une deuxième partition en regroupant les individus autour des m_j qui prennent alors la place des c_j (m_j est le centre de gravité de la classe C^j , calculé en utilisant les nouvelles classes obtenues). Le processus est ainsi réitéré jusqu'à atteindre un état de stabilité où aucune amélioration n'est possible.

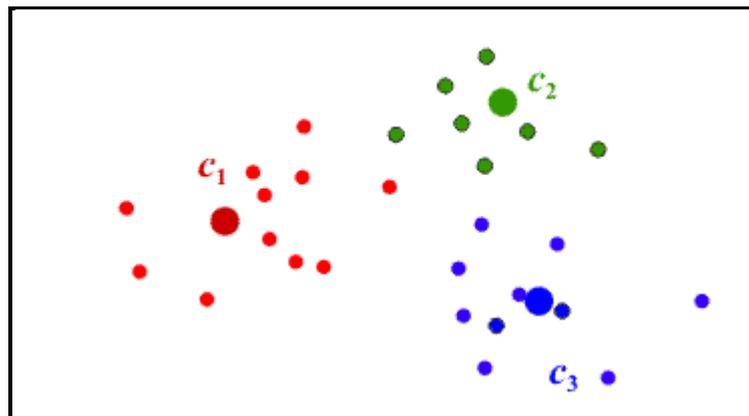


Figure 31. Le positionnement des centroïdes C_1, C_2 et C_k .

Cet algorithme est facile à implémenter, et contrairement à d'autres méthodes, il est très rapide, c'est donc un choix idéal pour la classification des données chromatographiques. Comme l'initialisation est effectuée aléatoirement, il convient de répéter l'algorithme plusieurs fois de suite afin de s'assurer qu'on obtient une solution stable. De plus, le nombre de clusters est un point sensible, des algorithmes sont actuellement mis au point pour donner automatiquement le nombre optimal (Kothari et Pitts, 1999).

a.2. Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)

La classification hiérarchique ascendante (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) est une méthode de classification non supervisée des données. Les objets sont regroupés de façon séquentielle en classes ou clusters selon un critère de ressemblance. Ce critère est défini par la distance inter-spectrale, la distance peut être euclidienne ou de Mahalanobis par exemple. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un arbre hiérarchique appelé dendrogramme. De manière générale, on utilise l'algorithme de Ward pour effectuer le regroupement.

L'algorithme est le suivant (Lasch, *et al.* 2004):

- la matrice de distance entre les objets est calculée. C'est une matrice symétrique qui contient les distances entre les individus deux à deux.
- les deux individus les plus proches sont regroupés en un cluster. Ce cluster sera représenté par son centroïde. Une nouvelle matrice de distance est calculée entre tous les individus restants et le cluster nouvellement formé. Les deux objets les plus proches (individu/cluster ou individu/individu) sont regroupés en un même cluster.
- le processus s'arrête lorsqu'une seule classe regroupant tous les individus est formée.

- Principe de la méthode

La figure 32 est une illustration du principe des méthodes hiérarchiques ascendante. Dans cette figure, on représente la suite de partitions d'un ensemble $\{a, b, c, d, e\}$:

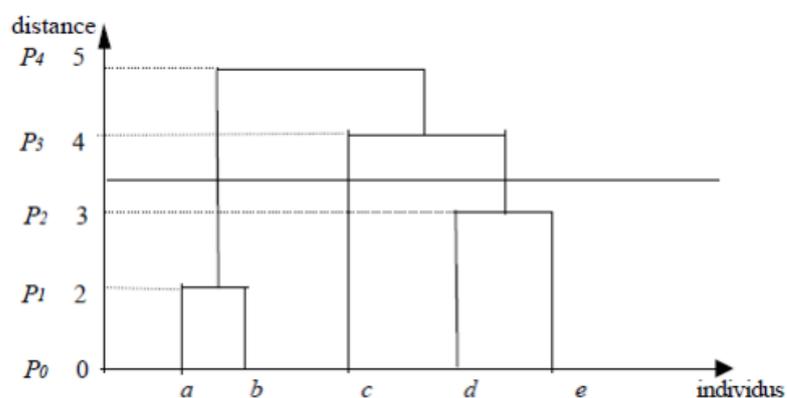


Figure 32. La partition hiérarchique

Les différentes partitions représentées dans la figure 43 sont :

$P_0 = \{\{a\}, \{b\}, \{c\}, \{d\}, \{e\}\}$ correspond à la distance $d = 0$;

$P1 = \{\{a, b\}, \{c\}, \{d\}, \{e\}\}$ correspond à la distance $d = 1$;

$P2 = \{\{a, b\}, \{c\}, \{d, e\}\}$ correspond à la distance $d = 2$;

$P3 = \{\{a, b\}, \{c, d, e\}\}$ correspond à la distance $d = 4$;

$P4 = \{\{a, b, c, d, e\}\}$ correspond à la distance $d = 5$.

A chaque partition correspond une valeur numérique représentant le niveau auquel ont lieu les regroupements. Les partitions sont définies en coupant l'arbre à un certain niveau en regardant les branches qui tombent. Dans l'exemple de la figure 43, si on coupe l'arbre à une valeur 3.5 on aura la partition suivante : $P2 = \{\{a, b\}, \{c\}, \{d, e\}\}$.

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le temps de calcul nécessaire. En effet, la matrice de distance doit être calculée à chaque itération et ceci peut aller au-delà des capacités de mémoire de l'ordinateur lors de l'analyse d'images spectrales (plusieurs dizaines de milliers de spectres).

Conclusion

La chimométrie n'est plus seulement un ensemble d'outils statistiques efficaces, elle a gagné son titre de discipline spécifique dans la mesure où elle représente désormais une méthodologie complète pour bien aborder des aspects de la chimie qui vont de la molécule au procédé, de l'aspect fondamental à la propriété d'usage. Notre travail décrit l'utilisation potentielle de la caractérisation, la classification et la discrimination des huiles d'olives marocaine par chimométrie sur des données spectroscopiques. La spectroscopie infrarouge, suivie d'un traitement chimométrique des données spectrales, a été utilisée pour classer les huiles d'olives en fonction de leur origine géographique. La différenciation des classes des huiles d'olives par des modèles basés de données spectrales sur des algorithmes tels que l'analyse en composantes principales (ACP). Une autre partie de ce travail sera consacré la classification d'huiles d'olives produites dans la province de Meknès, dans un but de leur authentification par divers méthodes de classification automatique, tels que : ACP, K-Means (K-Moyenne) et CAH (Classification Hiérarchique Ascendante).

Les méthodes chimométriques sont des techniques très puissantes et de plus en plus utilisées grâce aux nombreux logiciels statistiques. The Unscrambler et MATLAB sont les deux logiciels utilisés dans ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdi, H. 2007. Partial least square regression : Pls-regression. In Salkind, N. J., éditeur : *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, 740–744.
- Beckwith-Hall, B.M. Brindle, J.T. Barton, R.H. Coen, M. Holmes, E. Nicholson, J.K. Antti, H. 2002. Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ^1H NMR spectra of biofluids. *Analyst*, 127, 1283-1288.
- Benzécri, J.P. 1973. L'analyse des données. *Dunod*, Paris.
- Bertrand, D. Dufour, E. *Tec et Doc*, Lavoisier. Paris, 295-332.
- Bertrand, D. Courcoux, P. Qannari, El. M. 2000. Méthodes exploratoires » dans « la spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. *Tec et Doc*, Lavoisier. Paris, 261-266.
- Bertrand, D. Courcoux, P. Qannari, E. M. 2006. Chimométrie appliquée à la spectroscopie infrarouge. Méthodes exploratoires. Editeur. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. *Collection sciences et techniques agroalimentaires*, 317-345.
- Bertsch, M. Mayfield, H.T. Thomason, M.M. 1981. Proceedings of the fourth international symposium on capillary chromatography, Heidelberg, Germany : Hüthing. *FRG*, 313.
- Bonner R.H. 1964. On some clustering techniques. *IBM Journal*, 22.
- Bouroche, J.M. Saporta, G. 2002 L'analyse des données. *Presses Universitaires de France*, 17
- Box, G. E. P. 1976. Département de statistiques, Université du Wisconsin, Rapport technique, *Madison*, N°455.
- Box, G. E. P. Hunter, W. G. Hunter, J. S. 1978. Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis and model building, *J. Wiley*, NY.
- Box, G. E. P. Draper, N. R. 1987. Empirical Model Building and Response Surfaces, *J. Wiley*, NY.
- Caillez, F. Pages, J.P. 1976. Introduction à l'analyse de données. *S.M.A.S.H.*
- Celeux, G. 1990. Analyse discriminante sur variables continues. *INRIA*, Roquencourt.
- Celeux, G. Nakache, J. P. 1994. Analyse discriminante sur variables qualitatives. *Polytechnica*, Paris.
- Celeux, G. Diday, E. Govaert, G. 1989. Classification automatique de données environnement statistique et informatique. *Dunod*, Informatique.
- Comon, P. 1994. Independent component analysis, A new concept. *Signal Processing*, 36, 287-314.

- Deinum, G. Rodriguez, D. Romer, T. J. Fitzmaurice, M. Kramer, J.R. Feld, M. S. 1999. Histological Classification of Raman Spectra of Human Coronary Artery Atherosclerosis Using Principal Component Analysis *Appl. Spectrosc*, 53, 938-942
- Dunteman, G. H. 1989. Principal Components Analysis. Sage Publications, City
- Geladi, P. Macdougall, D. Martens, H. 1985. Linearization and Scatter-Correction for near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Appl. Spectrosc*, 39, 491-500.
- Geladi, P. Esbensen, K. J. 1990. *Chemometrics*, 4, 337-354.
- Geladi, P. Kowalski, B. R. 1986. Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta*, 185, 1-17.
- Geladi, P. 1995. An overview of multivariate spectral data analysis. In: Davies *AMC*.
- Golub, G. H. Reinsch, C. 1970. Singular value decomposition and least squares solution. *Numer. Math*, 14, 403-42.
- Haka, A.S. Shafer-peltier, K.E. Fitzmaurice, M. Crowe, J. Dasari, R.R. Feld, M.S. 2002. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer Res*, 62, 5375-5380.
- Hartigan, J.A. 1975. Clustering Algorithms. *Wiley*, New York.
- Helge, T. 2006. Book Review: Régression Diagnostics - Identifying influential data and sources of collinearity. *Biometrical Journal*, 48, 1044.
- Hyvärinen, A. 1999. Survey on Independent Component Analysis Neural Computing *Surveys*, 2, 94-128.
- Hyvärinen, A. Karhunen, J. 2001. OJA E Independent Component Analysis. *Wiley*. New York.
- Hotelling, H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24, 417-441.
- Kellner, R. Mermet, J.M. Otto, M. Widmer, H.M. 1998 Analytical chemistry. Weinheim : *Wiley*, VCH.
- Kothari, R. Pitts, D. 1999. On finding the number of clusters. *Pattern Recognition Letters*, 20, 405-416
- Kowalsky, B. R. 1975. Chemometrics : views and propositions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci*, 15, 201-203.
- Krishna, C.M. Sochalingum, G.D. Venteo, L. Bhat, R.A. Kushtagi, P. Pluot, M. Manfait, M. 2005. Evaluation of the suitability of ex vivo handled ovarian tissues for optical diagnosis by Raman microspectroscopy. *Biopolymers*, 79, 269-276.

- Krishna Murali, C.M. Kegelaer, G. Adt, I. Rubin, S. Kartha, V.B. Manfait, M. Sockalingum, G.D. 2005. Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726, 160-167
- Lasch, P. Haensch, W. Naumann, D. Diem, M. 2004. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1688, 176-186.
- Lantéri, P. Longerey, R. *Analisis*, 1996, 24, 17-27.
- Lantéri, P. Longerey, R. 1998. Chimiométrie : outils du XXème siècle, méthode du XXIème siècle ?. *Analisis Magazine, Chemometrics* 98, 26, 15 – 18.
- MacQueen, J.B. 1967. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *University of California Press. Statistics and probability*, 1.
- Mardia, K. Kent, J. Bibby, J. 1981. *Multivariate Analysis. Wiley & sons*, New York.
- Massart, D.L. Vandeginste, B.G.M. Buydens, L.M.C. De Jong, S. Lewi, P.J. Smeyers Verbeke, J. 1997. «Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A». Elsevier, Amsterdam.
- Martens, H. Næs, T. 1989. *Multivariate calibration. John Wiley & Sons*, New York.
- Michie, D. Spiegelhlter, DJ. Taylor, C. 1994. Machine learning, Neural and Statistical classification. *Ellis Horwood series in artificial intelligence*.
- Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies, T. 2002. *Multivariate calibration and classification, NIR, City, Royaume-Uni*.
- Pearson, K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh and Dublin Magazine and Journal of Science*, 2, 559-572.
- Pedersen, B. Martens, H. 1989. Multivariate calibration of fluorescence data. In *Fluorescence Analysis in Foods. Munck, Longman Singapore Publishers Ltd*, Singapore.
- Pedersen, D.K. 2002 Spectroscopic and chemometric exploration of food quality “Early prediction of meat quality”. Thèse de Doctorat, *The Royal Veterinary and Agricultural University*, Denmark, 233.
- Plackett, R. L. Burman, J. P. 1946. Design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
- Qannari, E.M. Wakeling, I. Halliday, J.H. MacFie, J.H. 1995. A hierarchy of models for analysing sensory data. *Food quality and preference*, 6, 309-314.
- Qannari, E.M. Wakeling, I. Courcoux, P. MacFie, H.J.H. 2000. Defining the underlying sensory dimensions. *Food quality and preference*, 11, 151-154.
- Roggo, Y. 2003. Détermination de la qualité de la betterave sucrière par Spectroscopie Infrarouge et Chimiométrie. Thèse de doctorat, *Université des Sciences et technologies de Lille, France*.

- Roux, M. 1986. Algorithmes de classification. *Masson*, Paris
- Scharf, L. 1991. Statistical Signal Processing : Detection, Estimation, and Time Series Analysis. *Addison-Wesley Education Publishers Inc.* New-York.
- Schwartz, L. 1997. Le petit père Hadamard. *Pour la Science*, 88-93.
- Tenenhaus, M. 1998. La Regression PLS: Theorie et Pratique. *Technip*, 254.
- Vigneau, E. Qannari, E. M. Jaillais, B. Mazerolles, G. 2006. Méthodes prédictives, La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*, 347-401.
- Vigneau, E. Qannari, E.M. Devaux, M.F. 2000 Méthodes prédictives. In : La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. *Editions Tec et Doc*, 295-332.
- Wold, H. 1966. Estimation of principal component and related models by iterative least squares. *Multivariate Analysis. Krishnaiah, Academic Press, Newyork.*
- Wold, S. 1976. Pattern-Recognition by Means of Disjoint Principal Components Models. *Pattern Recognition*, 8, 127-139.
- Wold, S. Martens, H. Wold. 1983. The multivariate calibration method in chemistry solved by the PLS method. *In Lecture Notes in Mathematics*, 973, 286-293.
- Wold, S. Esbensen, K. Geladi, P. 1987. Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst*, 2, 37-52.
- Wold, S. Kettaneh, N. Tjessem, K. 1996. Hierarchical multi-block PLS and PC models, for easier interpretation, and as an alternative to variable selection. *Journal of Chemometrics*, 10, 463-482.
- Wold, S. Antti, H. Lindgren, F. Ohman, J. 1998. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, 175-185.
- Wold, S. Sjostrom, M. Eriksson, L. 2001. PLS-regression: a basic tool for chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58, 109-130.
- Wold, S. Trygg, J. Berglund, A. Antti, H. 2001. Some recent developments in PLS modelling. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58, 131-150.

Chapitre 2.

**Caractérisation et valorisation des noyaux
d'olives**

**1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES ET
ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DES NOYAUX
D'OLIVES**

C

HAPITRE 2.

1.1. CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES NOUYAUX D'OLIVE DE TROIS VARIÉTÉS MAROCAINES

Résumé de l'article :

Les composés phénoliques ont une importance fondamentale dans les caractéristiques nutritionnelles et sensorielles d'huile d'olive. Dans ce travail, les composés phénoliques extraits de noyaux d'olives de trois cultivars marocains ont été analysés. L'analyse quantitative a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu, utilisant de l'acide gallique comme standards. L'analyse des polyphénols totaux a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance couplée avec un spectrométrie de masse (HPLC- DAD- ESI/MS).

Les résultats obtenus ont montré que la quantité totale de composés phénoliques varie en fonction de la variété d'olive. Les noyaux de la variété Picholine marocaine sont les plus riches en composés phénoliques totaux (11,32 mg EAG / g MS), suivie par Haouzia (4,55 mg EAG / g MS) et Menara (3,56 mg EAG / g MS). L'analyse qualitative effectuée par l'analyse HPLC-DAD-ESI/MS a montré que dans les extraits analysés, nüzhenide et ses dérivés qui prédominaient. Parmi les trois échantillons étudiés, la variation de certains composés individuels a été observée, bien que les trois cultivars restent qualitativement similaires.

Mots-clés: *Olea Europaea*; noyaux d'olive; composés phénoliques; polyphénols totaux; dérivés de nüzhenide; HPLC-DAD-ESI/MS.

2.1.1. Characterization of phenolic compounds in olive stones of three Moroccan varieties

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le **Journal Maderas Ciencia y tecnología (2014)**.

Elbir, M. Es-Safi, N. Amhoud, A. Mbarki, 2014. Characterization of phenolic compounds in olive stones of three Moroccan varieties. *Maderas Ciencia y tecnología*. (Soumis).

Abstract

Phenolic compounds have a fundamental importance in the nutritional and sensorial characteristics of olive. In this study phenolic compounds extracted from olive fruit stones of three Moroccan registered cultivars were analyzed. Quantitative analysis was achieved by Folin-Ciocalteu method using gallic acid as a standard compound. Qualitative analysis was performed by HPLC with diode array detection and ESI-Ion Trap Mass Spectrometry.

The obtained results showed that the total amount of phenolic compounds varied according to the olive variety. The stones of the Moroccan Picholine variety were the richest in total phenolic compounds (11.32 mg GAE/g DW) followed by Haouzia (4.55 mg GAE/g DW) and Menara (3.56 mg GAE/g DW). The qualitative analysis performed through HPLC-DAD-MS analysis showed that the analyzed extracts were predominated by nüzhenide and its derivatives. Among the three studied samples, variation in some individual compounds was observed but the three cultivars were qualitatively similar.

Keywords: *Olea Europaea*; olive stones; phenolic compounds; total phenols; nüzhenide derivatives; LC-DAD-ESI/MS analysis.

1. Introduction

The olive tree (*Olea Europaea*) belongs to the genus *Olea* of the *Oleaceae* family. Several species within the family provide commercial products such as food, lumber, cosmetics, and medicinal products. In the olive fruit, a wide range of phenolic structures has been reported including simple phenolic acids such as coumaric acid derivatives [1], phenolic glucosides, phenolic oleosides and flavonoids [2-4]. Olive seeds and husks contain relatively few phenolic species, but encompass simple phenolics including tyrosol and caffeic acid, in conjunction with flavonoids and secoiridoids [5-6]. The olive stones and seeds are an important byproduct generated in the olive oil extraction and pitted table olive industries. As a lignocellulosic material, the hemicellulose, cellulose and lignin are the main components of olive stone as well as protein, fat, phenols, free sugars and polyols [39,7-9]. Phenolic compounds have been identified in olive fruits and olive by-products [10-11]. Olive oil contains 2% of the total phenolic content of whole olive fruits, while the remaining 98% is present in olive mill waste [12]. Olive fruits are considered as a rich source of phenolic compounds with a wide array of biological activities [13].

The phenolic compounds in olives are recognized as potentially bioactive products and may have antioxidant and therapeutic properties that produce anti-cancer, anti-viral, anti-inflammatory, hypolipidaemic and hypoglycaemic effects [13]. To date, three aspects of antioxidant activity have been evaluated in olive cakes; antioxidant potency [14-11], anti-radical activities and radical scavenging activities [11,15]. However, little information has been reported on the recovery of phenolic compounds from olive cake as a potential source of bioactive compounds for the pharmaceutical and nutraceutical industries [12].

The phenolic content of olive fruit have been studied more extensively than any other olive plant tissue and has been thoroughly reviewed [16-17]. The main phenolic compounds in olive fruit are oleuropein and ligstroside, two glucosides of elenolic acid with 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol (hydroxytyrosol) and 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol (tyrosol), respectively. Servili characterized maturation-induced changes in the phenolic content of the complete olive fruit, encompassing peel, pulp, and seeds in three different olive cultivars [6]. Nüzhenide was detected exclusively in the olive seeds of all different varieties and at all stages of maturation. Luteolin glucoside and rutin were detected only in olive peel, whereas verbascoside, oleuropein, and demethyloleuropein were found in all three olive matrices. The concentration of the latter two phenolics was greatest in olive pulp. Similarly, Rovellini have analysed the flavonoid composition of fruit, husks, and leaves plus olive oil [18].

The amount and type of phenolic compounds in olive depend obviously on the cultivar and maturity of the fruit, climatic conditions, storage time and processing technique [19]. There are many different procedures for analyzing phenolic substances, but few are used in olive analysis except for anthocyanin or color measures. HPLC methods that give specific information on individual substances are becoming more common as the significance of particular phenolic substances becomes better understood.

In Morocco, olive tree is of great interest and is cultivated in many parts of the country. The production of olive fruits is around 770000 tons and the cultivated areas are around 550000 hectares. Oil production amounted to 95300 tons corresponding to 3.3 % of the oil world production. While some studies have been made on the phytochemical composition of Moroccan varieties olive oil, to the best of our knowledge, there is no report on the phytochemical olive stones from cultivars growing in Morocco. This work was carried out on three olive stones varieties (Picholine, Haouzia and Menara). The main objectives of this study were the extraction of phenolic compounds, their quantification and the identification of the major phenolic compounds through the use of LC-MS analysis technique.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

The study was conducted on three olive fruits varieties; Picholine, Menara and Haouzia. The studied samples were from Beni Mellal (Picholine) and Marrakech (Menara and Haouzia) regions. The olive fruits were harvested during 2010. For each variety, a representative sample of 2 kg of olive fruits has been taken.

2.2. Samples Preparations

For each variety, the harvested olive fruits (2 kg) were boiled in water for 8 minutes, and pulped by manual crushing. The obtained olive stones were then air dried on paper towels during 2 to 4 days. After drying, they were reduced to a fine powder using a knife mill "Retsch SK1" prior to extraction and analysis.

2.3. Extraction conditions

Phenolic compounds were extracted through solid-liquid extraction using a Soxhlet apparatus. Olive stone powder (60 g) was first extracted with hexane (5 hours) to remove lipids and then with acetone (5 hours) and with ethanol (5 hours).

Ultrasound was also used for polyphenols extraction. In this case, dried olive matter (0.25 g of stone) was extracted with methanol/water (50:50 v/v; 5 mL) using an Ultra sound apparatus. The solution was left to stand for 10 min at ambient temperature and filtered and then stored in a refrigerator until quantitative analysis and HPLC-DAD and ESI-MS analysis.

2.4. Estimation of Total Phenols

Total phenolic compounds content in each extract was determined using the Folin–Ciocalteu method [20]. A 2.5 ml portion of Folin-Ciocalteu reagent and 2 ml of a sodium carbonate solution (75 g/l) were added to 0.5 ml of the diluted extract. The assay tubes were kept 5 min in a water bath at 50°C and then transferred to cold water. The mixture was centrifuged before spectrophotometric lecture at 760 nm. Contents of total phenolic compounds were expressed as gallic acid equivalents in milligrams per gram dry weight (mg GAE/g, DW). A calibration curve with equation: $y = 0.0021x + 0.0015$ ($r^2 = 0.99$) was constructed using gallic acid solutions within the range 10–100 mg/l. The results were averages of triplicate analyses.

2.5. HPLC-DAD-MS Analysis

The phenolic compounds were analyzed on a HPLC-MS system consisting of a quaternary solvent delivery pump (Surveyor MS, Thermo-Finnigan, USA) connected to a diode array detector (Surveyor PDA plus, Thermo-Finnigan, USA) and a LCQ Advantage MAX ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany), equipped with an atmospheric pressure ionization interface and operated in ESI negative and positive ion modes. The LC separation was conducted on a C18 LichroCART (250 mm × 4,6 mm) column (Merck, Germany). Separation was achieved using solvent A (H₂O/CH₃COOH: 99/1) and solvent B (MeOH/CH₃CN/CH₃COOH: 89.5/9.5/1). The used elution gradient (1 ml/min flow rate) started from 10 % to 30 % B in 10 min, isocratic during 5 min, from 30 to 40 % B in 10 min, then to 50 % B in 15 min, from 50 to 70 % B in 10 min and to 100 % B in 10 min following by a washing and re-equilibrating of the column.

For the mass spectrometer, the spray voltage was 5 kV, and the temperature of the heated capillary was set to 300 °C. The flow rates for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas were set to 40, 10 and 10 arbitrary units min⁻¹, respectively. The capillary voltage was 36 V, the split lens was -44 V, and the front lens was -3.25 V. The obtained results were processed using the XCALIBUR software program.

3. Results and discussion

3.1 Extraction and quantitative analysis of total phenolic compounds in olive stones

After solid liquid extraction, the levels of total phenolic compounds were measured by Folin-Ciocalteu method using gallic acid as standard. The obtained results (Table 1) showed that the total phenolic compounds contents in the olive stones of the three studied varieties were 11.32 mg GAE/g (Picholine variety), 4.55 mg GAE/g (Haouzia variety) and 4.55mg GAE/g (Menara variety). The results showed thus that Picholine variety produces olive with the highest amounts of phenolic compounds, while Menara was the poorest one.

Comparison between the classical extraction technique achieved through soxhlet apparatus and that assisted by ultrasound, the obtained results showed that the total phenolic compounds obtained through the two techniques are slightly similar with a the difference that the second method was used during few minutes compared to the first one where hours are necessary for the extraction of the same amount of phenolic compounds.

The literature reports a content of total phenolic compounds in olive stones around 0.1 % w/w which slightly differs from the data reported in this study [21-22]. The observed differences could obviously be attributed to the type of the cultivar, geographical origin of the fruits, degree of maturity and the storage conditions but could also be due to the extraction protocols and analytic assays.

As indicated above, the olive stones constitute one of the byproducts in table olive oil industry. The obtained results showed that, in addition to their indicated above uses, olive stones could be considered as an important source of bioactive phenolic compounds. In light of the obtained results, it would seem possible to use table olive stones as a source of natural antioxidants in foods, cosmetics or pharmaceutical products, thus contributing to diminishing the environmental impact of table olive by-product and to its revalorization.

Table 1. Polyphenol contents of the studied olive stones varieties (in g GAE/g DM)

Variety	Soxhlet Extraction			Ultrasound Extraction
	Ethanol	Acetone	Total	MeOH/Water
Picholine	3.07	8.25	11.32	11.50
Menara	1.86	1.70	3.56	4.0
Haouzia	2.15	2.40	4.55	4.75

3.2 Analysis and characterization of olive stone phenolic compounds

After quantitative analysis, the three studied olive stone samples (Picholine, Haouzia and Menara) were analyzed by HPLC coupled to both diode array and mass spectrometry detectors. The latter was used with electrospray ionization source in both negative and positive ion modes. ESI LC-MS analysis was performed using cone voltage providing useful additional fragmentation data.

A representative UV and total ion current (TIC) chromatograms are shown in figure 1. The similarity between the total ion chromatogram (TIC) obtained and its UV analogue indicated that the detected compounds in the stone extracts are ionizable in the experimental used conditions. The HPLC separation profile revealed a high complexity in the stone phenolic composition as demonstrated by the presence of various chromatographic peaks.

The structures of the tentatively identified compounds representing the major detected peaks and summarizing the obtained data for each of the detected chromatographic peak are discussed below. Compounds identification was based on retention data, UV absorption, and ESI mass spectra and by comparison with literature data [6,8,23-31]. The identification of the detected compounds was based on the search of the main molecular ions detected in the both used polarities and also on some of the useful observed fragmentations. ESI LC-MS was performed using cone voltages, in both positive and negative ion modes, with the higher cone voltage providing additional fragmentation data. Compounds with a presence listed as tentative in table 2 were restricted to those instances in which both $[M + H]^+$ and $[M - H]^-$ ions were detected in positive and negative ion ESI, respectively. Among the observed peaks, some were too small to allow structural analyses. The presence of several adducts was observed: acetate in negative ionization mode, due to the presence of acetic acid in the mobile phase, and sodium adducts in positive ion mode.

The compound 4 with the retention time 23.85 min gives in negative ion mode a mass spectrum with intense peak signals at m/z 685 and 1371 corresponding respectively to $[M-H]^-$ and $[2M-H]^-$ of nüzhenide.

This was also confirmed by the appearance of a signal ion at m/z 745, detected in full MS spectrum, which is an acetic acid adduct $[M+CH_3COO]^-$ of nüzhenide. Among the other fragment ion peak signals that observed at m/z 523 in agreement with the structure of nüzhenide. This ion corresponds to the loss of 162 mass units was formed through the release of the glucoside moiety yielding the aglycon part with a m/z value of 523.

When the analysis was performed in the positive ion mode, the protonated ion signal was observed with a weak intensity at m/z 687, while the most intense peak signal in the obtained mass spectrum was observed at m/z 709 corresponding to the sodiated adduct of $[M+Na]^+$ of nüzhenide. These data confirmed thus that this compounds correspond to nüzhenide which has have already been identified in *Olea europaea* L. seeds.

Compound 5 which eluted at 26.73 min showed mass spectrum similar to that of compound 4 suggesting that it was an isomer of nüzhenide. The presence of this compound at several retention times with the same pattern fragmentation has already been reported in olive fruits. This was also observed in the literature for *Ligustrum lucidum* [32] and *Syringa reticulata* [33].

Compound 6 which was eluted at 29.50 min does not give a good answer through ESI-MS at both used polarities. The obtained mass spectra are in favor of a compound with a molecular weight of 534. Indeed signals at m/z 535 and 533 corresponding to the protonated and deprotonated molecular ions were observed respectively in the positive and negative ion modes. In the negative ion mode the deprotonated acetate adduct was also observed at m/z 593. In both cases a loss of a 180 mass unit was observed. However the weak obtained mass spectra did not allow the unambiguous identification of this compound.

Compound 8 eluted at 31.75 min was identified as nüzhenide 11-methyl oleoside. Indeed the obtained results showed that this compound has a more 386 mass units than nüzhenide corresponding to an addition of one unit of 11-methyl oleoside to the latter molecule. This compound was detected in negativse and positive modes. Since it has a molecular mass of 1072 the deprotonated ion $[M-H]^-$ in the mass spectrum in negative mode was observed at m/z 1071 and the acetate adduct was also observed at m/z 1131. Other fragment signals were observed at m/z 685, 523 corresponding to the loss of the 11-methyl oleoside unit yielding the deprotonated nüzhenide fragment while the further loss of the glucose moiety yields the fragment detected at m/z 523.

The positive ionization mode enabled the detection of the ion m/z 1095, corresponding to the sodium adduct of the compound. The fragment corresponding to the loss of the 11-methyl oleoside unit was also observed at m/z 709 corresponding to the sodiated nüzhenide fragment. Nüzhenide oleoside was identified by Maestro-Durán in olive seeds [24].

Nüzhenide and nüzhenide 11-methyl oleoside were detected in samples and represent compounds that have already been identified in *Olea europaea* L. seeds.

Compound 14 which eluted at 39 min showed MS spectra similar to that of compound 8. The detection of nüzhenide 11-methyl oleoside at different retention times indicated the presence of isomers.

The MS spectrum of compound 16 eluted at 43.74 showed a signal at m/z located at 1457 in the negative ion mode showing a 386 uma compared to compounds 8 and 14 which is in agreement with an additional 11-methyl oleoside unit. This compound was thus concluded to be the deprotonated ion of nüzhenide di (11-methyl oleoside) compound. The corresponding sodiated adduct was observed at m/z 1481 in the positive ion mode which was observed as the parent ion. Among the observed fragment, that obtained through successive loss of two methyloleoside units giving a nuzhenide fragment at m/z 685 in the negative ion mode.

The MS spectrum of compound 17 eluted at 45.50 showed a signal at m/z located at 1843 in the negative ion mode. This corresponds to the deprotonated ion of nüzhenide tri (11-methyl oleoside) compound. Other fragments were observed at 1071 and 1131 corresponding respectively to the deprotonated and the acetate adducts of the ion obtained through the successive loss of two methyl oleoside units.

The MS spectrum of this compound obtained in the positive ion mode was characterized by the presence of a signal at m/z 1867 corresponding to the sodiated product ion of nüzhenide tri (11-methyl oleoside) molecule. Among the observed fragments, the ion obtained through the loss of two methyl oleoside units yielding an ion fragment located at m/z 1095.

The compound 2 that eluted at 11.03 min showed an intense ion at m/z 403 corresponding to a molecular weight of 404. This was confirmed by the presence of signals at m/z : 463 and 807 corresponding respectively to the ions $[M + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}]^-$ and $[2M - \text{H}]^-$. A fragment corresponding to the loss of a glucoside moiety was observed at m/z : 241. The observed data are characteristic of the product described in literature for 11-methyloleoside (elenolic acid glucoside), a degradation product of oleuropein which accumulates during ripening. This compound has been already identified in olives [28, 40, 16, 17], such as in other species belonging to the Oleaceae family [34].

The compound 1 was eluted at 9.12 min presents a mass spectrum with a peak signal at m/z 565 corresponding to its deprotonated molecular ion. This was confirmed by the presence of a signal at m/z 625 corresponding to $[M + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}]^-$ ion.

This is in favor of a product with a molecular weight of 566 which presents an additional hexose moiety compared to elenolic acid glucoside which was eluted at 11.03 min.

In addition to the products described above which appeared as major compounds in the obtained chromatographic profiles, other minor products were also observed. This is the case of ligstroside (compound 9) eluting at 33.03 min. and showing a MS spectrum with a signal at m/z 523 in the negative ion mode corresponding to the deprotonated ion. Another compound 3 was eluted at 15.5 min. Its mass spectrum showed a peak signal at m/z : 417 corresponding to that of oleoside dimethyl ester. A fragment loss of 162 amu was observed giving a peak signal at m/z 255 corresponding to the loss of the hexose moiety.

The results obtained above showed that olive fruit stones contain a variety of phenolic compounds that are potent antioxidants. The positive effect of olives and olive-derived products consumption on human health is well documented by a large number of epidemiological studies [35-37]. The presence of various phenolic compounds in olive stones open new perspectives for their important role in the chemical, organoleptic and nutritional properties of the virgin olive oil and the table olives. Indeed olive stones could be used within olive oil industry to enhance the phenolic composition of olive oils [38].

The obtained results showed that the whole olive stone is a rich source of bioactive compounds. These potentially valuable compounds were nüzhenide and its mono, di and tri-oleoside derivatives. Other minor compounds such as salidroside, ligstroside, elenolic acid glucosides, oleoside dimethyl ester were also detected. Other compounds such as flavonoids derivatives, already identified in *Olea europaea* stones, were not detected in the three varieties analyzed. The observed differences could obviously be attributed to the type of the variety or the plant environment such as geographical origin of the fruits, degree of maturity and the storage conditions but could also be due to the extraction and analysis used procedures.

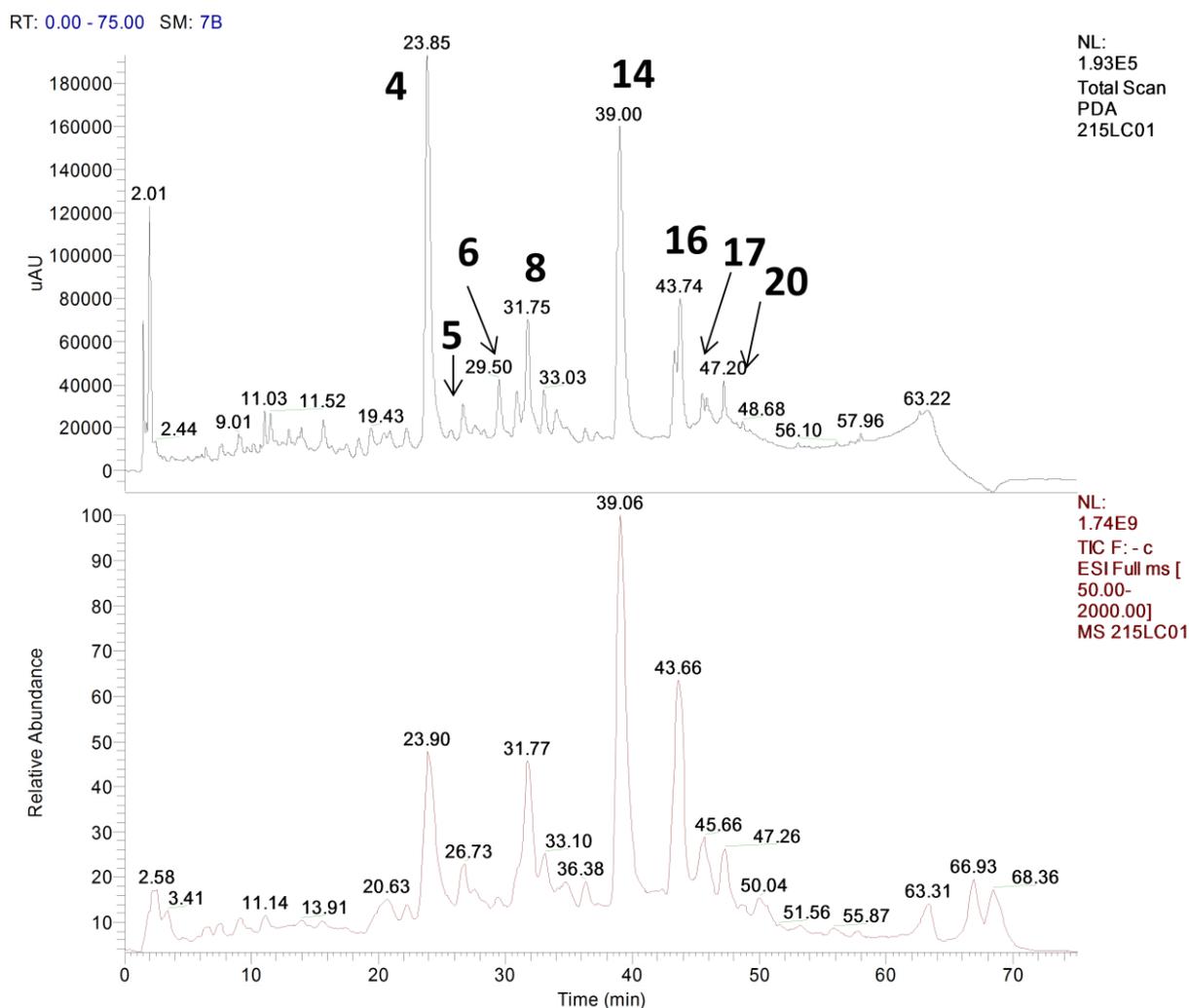


Figure 1. HPLC chromatograms of olive stone extract acquired through DAD (A) and ESI/MS (B). Identified compounds are listed in Table 2 & 3.

3.3 Quantitative analysis of individual phenolic compounds

The phenolic compounds tentatively identified above were analyzed in the stone extracts of the three studied olive varieties. The chromatographic profiles obtained for the extracts of olive stones of three olive tree cultivars were compared and the obtained results are summarized in table 2. The phenolic extracts from the three studied varieties displayed similar qualitative profiles and differed in their quantitative composition as demonstrated by the differences observed in the area of peaks with the same retention time.

The stone extract of the picholine variety showed, significantly, the highest values for the all detected compounds and the Haouzia variety presented lower values.

The chemical compositions of the three studied varieties were dominated by nüzhenide and its 11-methyl oleoside derivatives. The total percentage of these compounds were 23.05 (Haouzia), 38.65 (Menara) and 48.32 (Picholine).

Thus, the major compound in the stone extract of the picholine variety was nüzhenide (19.45 %) followed by one of its 11-methyl oleoside (17.84 %). The total nüzhenide derivatives were 27.64 % (mono oleoside), 12.63 (di oleoside) and 4.5 (tri oleoside).

The chromatographic profile of the stone extract of Menara variety was similar to that of Picholine with the difference that the mono oleoside derivative was the major compound (12.71 %) followed by nüzhenide (10.01 %). The total nüzhenide derivatives were 27.32 % (mono oleoside), 10.38 (di oleoside) and 4.11 (tri oleoside).

In the case of the stone extracted from Haouzia variety, many compounds with small peaks area were observed. Nüzhenide was present with only 6.02 % while its mono oleoside derivatives were the major compounds (17.03 %). The di and tri oleoside nüzhenide derivatives were observed with 5.29 and 0.93 % respectively.

The data obtained that the phenolic compositions of the olive fruit stones were predominated by nüzhenide and its derivatives. High levels of nüzhenide derivatives were indeed detected in the seed extracts of the three cultivars analysed. These data confirmed the previously reported data indicating that nüzhenide is located mainly in olive seed [6].

Table 2. Tentative identification of olive fruit stones phenolic compound.

N°	tr (min.)	MS ⁻	MS ⁺	Molecular weight	Tentative identification
1	9.01	625, 565		566	Elenolic acid diglucoside
2	11.03	807, 463, 241		404	Elenolic acid glucoside
3	15.67	417, 255		418	Oleoside dimethyl ester
4	23.85	1371, 745, 685, 523	709, 687	686	nüzhenide
5	26.67	1371, 745, 685, 523	709, 687	686	nüzhenide isomer
6	29.50	533	535	534	unknown
7	30.90	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
8	31.75	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
9	33.03	523		524	Ligstroside
10	34.02	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
11	34.04	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
12	36.28	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
13	37.22	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
14	39.00	1131, 1071, 685, 523	1095, 709	1072	nüzhenide 11- methyl oleoside
15	43.31	1457, 685	1481	1458	nüzhenide di (11- methyl oleoside)
16	43.74	1457, 685	1481	1458	nüzhenide di (11- methyl oleoside)
17	45.50	1843, 1131, 1071	1867, 1095	1844	nüzhenide tri (11- methyl oleoside)
18	45.84	1843, 1131, 1071	1867, 1095	1844	nüzhenide tri (11- methyl oleoside)
19	46.12	1843, 1131, 1071	1867, 1095	1844	nüzhenide tri (11- methyl oleoside)
20	47.20	1457, 685	1481	1458	nüzhenide di (11- methyl oleoside)
21	48.68	1457, 685	1481	1458	nüzhenide di (11- methyl oleoside)

Table 3. Quantitative chemical composition of the extracts obtained from the three studied olive fruits stones cultivars (results are given in %)

N°	tr (min.)	Compound name	Picholine	Menara	Haouzia
1	9.01	Elenolic acid diglucoside	0.36	0.51	1.18
2	11.03	Elenolic acid glucoside	0.83	1.31	2.19
3	15.67	Oleoside dimethyl ester	0.99	0.22	0.41
4	23.85	nüzhenide	19.45	10.01	4.35
5	26.67	nüzhenide isomer	1.23	1.32	1.67
6	29.50	unknown	1.94	6.34	5.36
7	30.90	nüzhenide 11-methyl oleoside	1.70	3.22	1.49
8	31.75	nüzhenide 11-methyl oleoside	5.47	4.98	3.90
9	33.03	Ligstroside	1.71	1.84	3.94
10	34.02	nüzhenide 11-methyl oleoside	1.43	3.14	3.27
11	34.04	nüzhenide 11-methyl oleoside	0.51	1.18	1.17
12	36.28	nüzhenide 11-methyl oleoside	0.42	1.18	1.16
13	37.22	nüzhenide 11-methyl oleoside	0.27	0.91	0.92
14	39.00	nüzhenide 11-methyl oleoside	17.84	12.71	5.12
15	43.31	nüzhenide di (11-methyl oleoside)	2.83	2.27	1.57
16	43.74	nüzhenide di (11-methyl oleoside)	5.94	5.01	2.40
17	45.50	nüzhenide tri (11-methyl oleoside)	1.98	1.32	0.17
18	45.84	nüzhenide tri (11-methyl oleoside)	1.25	1.37	0.36
19	46.12	nüzhenide tri (11-methyl oleoside)	1.27	1.42	0.40
20	47.20	nüzhenide di (11-methyl oleoside)	3.04	1.68	0.91
21	48.68	nüzhenide di (11-methyl oleoside)	0.82	1.42	0.41

4. Conclusion

This investigation showed that the stones of the studied varieties had an appreciable amount of bioactive compounds. The chemical composition varied slightly among the three studied varieties. The LC/ESI-MS indicated the presence of various compounds and allowed the identification of nüzhénide derivatives among the major compounds in the three studied varieties.

The MS analysis of the detected compounds showed that the analyzed extracts were predominated by nüzhénide and its derivatives. Thus nüzhénide was observed among the major compound in the three studied cultivars. Its mono, di and tri 11-methyl oleoside adducts were also detected. Various compounds with the same molecular weight values and corresponding to nuzhenide or its derivatives were detected indicating the presence of various isomers. Among the three studied samples, variation in some individual compounds was observed but the three cultivars were qualitatively similar.

This study showed thus that olive stones are not waste worthless, they should be considered as an interesting source of potent antioxidants such phenolic compounds. This is of great interest for promoting the olive culture and better exploitation of the olive fruit stones which are considered as a by-product from the table olive canning industry with some residual olive flesh.

References

1. Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F. F.; Cimato, A. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 964-967.
2. Ragazzi, E.; Veronese, G.; Guiotto, A. Demethyloleuropein, a new glycoside isolated from ripe olives. *Annali di Chimica (Rome)*. **1973**, *63*, 13-20.
3. Vazquez Roncero, A.; Graciani Constante, E.; Maestro Duran, R. Phenolic compounds in olive fruits. I. Polyphenols in pulp. *Grasas y Aceites.* **1974**, *25*, 269-279.
4. Vlahov, G. Flavonoids in three olives (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *58*, 157-159.
5. Maestro-Durán R.; Cabello LR.; Gutiérrez RV.; Roncero VA. Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites.* **1994**, *45*, 332-335.
6. Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *47*, 12-18.
7. Fernández-Bolános, J.; Felizón, B.; Heredia, A.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresource Technol.* **1999**, *68*, 121-132.
8. Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R.; Bolanos, J.F. Olive Stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technol.* **2008**, *99*, 5261-5269.
9. Román, S.; González, J.F.; González-García, C.M.; Zamora, F. Control of por development during CO₂ and steam activation of olive stones. *Fuel Processing Technology.* **2008**, *89*, 715-720.
10. Montedoro, G.F.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2228-2234.
11. Shahidi, F.; Naczk, M. Phenolic in food and nutraceutical. *Boca Raton, FL: CRC Press.* **2004**, 1-558.
12. Rodis, P. S.; Karathanos, V. T.; Mantzavinou, A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 596-601.

13. Obied, H. K.; Allen, M. S.; Bedgood, D. R.; Prenzler, P. D.; Robards, K.; Stockmann, R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 823-837.
14. Ranalli, A.; Lucera, L.; Contento, S. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7636-7641.
15. Lesage-Meessen, L.; Navarro, D.; Maunier, S.; Sigoillot, J. C.; Lorquin, J.; Delattre, M. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.* **2001**, *75*, 501-507.
16. Ryan, D.; Robards, K.; Lavee, S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1999**, *34*, 265-274.
17. Ryan, D.; Robards, K. Phenolic compounds in olives. *Analyst.* **1998**, *123*, 31-44.
18. Rovellini, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E. Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **1997**, *74*, 273-279.
19. Fiorentino, A.; Gentili, A.; Isidori, M.; Monaco, P.; Nardelli, A.; Parrella, A. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *51*, 1005-1009.
20. Singleton, V. L.; Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enolo. Viticulture.* **1965**, *16*, 144-58.
21. Heredia, A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J.; Rivas, M. Olives stones as a source of fermentable sugars. *Biomass.* **1987**, *14*, 143-148.
22. Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) A Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *13*, 3291-3340.
23. Silva, S.; Gomes, L.; Leitao, F.; Coelho, A.V.; Boas, L.V. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci. Technol. Intern.* **2006**, *12*, 385-395.
24. Durán, N.; Curotto, E.; Esposito, E.; Aguirre, C.; Nazal, A.; Angelo, R. In: Galindo E, Ramirez OT, eds. *Advances in Bioprocesses Engineering*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. **1994**, 489-494.
25. Luaces, P.; Romero, C.; Gutierrez, F.; Sanz, C.; Perez, G. Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 2721-2727.

26. Owen R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 703-717.
27. Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Bronze, M.; Coelho, A.V.; Vilas Boas, L. Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites.* **2010**, *61*, 157-164.
28. Cardoso S.M.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lopes-da-Silva, J.A.; Renard, C.M.G.C.; Coimbra, M.A. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 21-32.
29. Angelino, D.; Gennari, L.; Blasa, M.; Selvaggini, R.; Urbani, S.; Esposito, S.; Servili, M.;Ninfali, P. Chemical and Cellular Antioxidant Activity of Phytochemicals Purified from Olive Mill Waste Waters. *J. of Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2011-2018.
30. Obied, H.K.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica chimica acta.* **2007**, *603*, 176-189.
31. Lozano-Sanchez, J.; Giambanelli, L.; Quirantes-Pine, R.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *59*, 11491-11500.
32. He, Z.-D.; But, P.P.-H.; Chan, T.-W.D.; Dong, H.; Xu, H.-X.; Lau, C.-P.; Sun, H.-D. Antioxidative glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 780-784.
33. Koichi M.; Kaneko A.; Hosogai T.; Kakuda R.; Yaoita Y.; Kikuchi M. Studies on the constituents of *Syringaspecies*. X. Five new iridoid glycosides from the leaves of *Syringa reticulata* (Blume) Hara. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 493-497.
34. Soler-Rivas, C.; Espin, J. C.; Wichers H. J. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1013-1023.
35. Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil, *Clinical Chem.* **2000**, *46*, 976-988.
36. Visioli, F.; Caruso, D.; Galli, C.; Viappiani, S.; Galli, G.; Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *278*, 797-9

37. Visioli, F.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Zarini, S.; Conte, D.; Vincieri, F. F.; Galli, C. Antioxidant and other biological activities of olive oil mill waste water. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *47*, 3397-3401.
38. Patumi, M.; Terenziani, S.; Ridolfi, M.; Fontanazza, G. Effect of fruit stoning on olive oil quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 249-255.
39. Fernández-Bolños, J.; Felizón, B.; Heredia, A.; Rodríguez, R.; Guillén, R., Jiménez, A. Steam-explosion of olive stones: hemicelluloses solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technol.* **2001**, *79*, 53-61.
40. Ryan, D.; Antolovich, M.; Herlt, T.; Prenzler, P. D.; Lavee, S.; Robards, K. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6716–6724.

C HAPITRE 2.

1.2. L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE D'UNE PRÉPARATION BRUTE RICHE EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES NOYAUX D'OLIVES DE DEUX CULTIVARS MAROCAINS: UNE ETUDE PRÉLIMINAIRE

Résumé de l'article :

Les Olives et les huiles d'olives sont riches en composés phénoliques dont les activités biologiques sont découvertes. Pourtant, très peu d'études ont porté sur la composition phénolique de noyaux d'olives. Il est nécessaire d'apporter une valeur ajoutée aux sous-produits tels que les noyaux d'olives et de construire les bases de leur potentiel d'exploitation, nous avons évalué les activités antioxydantes des extraits de deux variétés marocaines, à savoir Picholine et Haouzia. Un mature fruit d'olive de la variété Picholine marocaine qui se développe dans la province de Beni Mellal de Moyen Atlas et une variété appelé Haouzia de la région Marrakech - Tensift-Al Haouz, au Maroc, a été récupéré pendant les saisons de récolte 2009 et 2010. Les polyphénols ont été extraits avec de l'éthanol et de l'acétone. Nous avons ensuite procédé à trois essais différents in vitro de l'activité anti-oxydante qui montrent comment le piégeage des radicaux libres et l'activité antioxydante de l'extrait de Picholine est comparable à celle de l'oleuropéine pure et de la vitamine C. En résumé, le noyau d'olive de la variété Picholine Marocaine semble être un sous-produit intéressant qui pourrait fournir des informations utiles en tant que sources d'antioxydants phénoliques, afin d'être potentiellement exploitée dans l'alimentation et la cosmétique.

Mots-clés: Antioxydants, sous-produits, olives marocaines, polyphénols

2.1.2. Antioxidant activity of a crude preparation rich in phenolic compounds from the olive stones of two Moroccan cultivars: A Preliminary Study

Cette partie à fait l'objet d'une publication dans le **International Journal of Probiotics and Prebiotics (2014)**.

Elbir, M. Amhoud, A. Mbarki, M. Visioli, F. 2014. Antioxidant activity of a crude preparation rich in phenolic compounds from the olive stones of two Moroccan cultivars : A Preliminary Study. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 12 (1).

Abstract

Olives and olive oil are rich in phenolic compounds whose biological activities are being uncovered. Yet, very few studies have focused upon the phenolic composition of olive pits (aka seeds, stones). Because there is a need to provide added value to by-products such as olive pits and to build the bases for their potential exploitation, we assessed the antioxidant activities of extracts from two Moroccan varieties, i.e. Picholine and Haouzia. Mature olive fruits from the Moroccan Picholine cultivar that grows in the province of Beni Mellal of Middle Atlas and from the Haouzia area called Marrakech-Tensift-Al Haouz, in Morocco, were picked during the 2009 and 2010 harvesting seasons and polyphenols were extracted from the pits with ethanol and acetone. We then performed three different in vitro tests of antioxidant activity that showed how the radical scavenging and antioxidant activity of the Picholine extract is comparable with that of pure oleuropein and of vitamin C. In summary, olive pits from the Moroccan Picholine variety appear to be an interesting by-product that might provide useful as sources of phenolic antioxidants, to be potentially exploited in the food or cosmetic sectors.

Keywords: Antioxidants, By-products, Moroccan olives, Olive oil, Polyphenols

<p style="text-align: center;">CURRENT TOPICS IN NUTRACEUTICAL RESEARCH Vol. 12, No. 1, pp. XX-XX, 2014 ISSN 1540-7535 print, Copyright © 2014 by New Century Health Publishers, LLC www.newcenturyhealthpublishers.com All rights of reproduction in any form reserved</p> <p style="text-align: center;">ANTIOXIDANT ACTIVITY OF A CRUDE PREPARATION RICH IN PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE OLIVE STONES OF TWO MOROCCAN CULTIVARS, A PRELIMINARY STUDY</p> <p style="text-align: center;">¹Mustapha Elbir, ¹Abdellatif Amhoud, ¹Mohamed Mbarki, and ²Francesco Visioli</p> <p style="text-align: center;">¹Transdisciplinary Team of Analytical Science for Sustainable Development, Faculty of Science and Technologies, University of Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal, Morocco; ²Laboratory of Functional Foods, Madrid Institute for Advanced Studies (IMDEA), Food, Madrid, Spain.</p>
--

1. INTRODUCTION

Epidemiological studies have hypothesized that the low incidence of coronary heart disease and of some types of cancer in the Mediterranean area (Visioli et al., 2005) might be partially due to olive oil consumption (Visioli and Bernardini, 2011). Indeed, olives and olive oil are rich in phenolic compounds whose biological activities are being uncovered. Accordingly, the European Food Safety Authority (EFSA) allows the health claim that hydroxytyrosol, the foremost constituent of olives and their by-products, protects low-density lipoprotein from oxidation, in vivo (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011). The phenolic composition of olives depends on the cultivar, collection season, growing conditions, and time of ripening (Visioli and Bernardini, 2011). Very few studies have focused upon the phenolic composition of olive pits (aka seeds, stones); nevertheless, some phenolic compounds have been identified and include salidroside, nuzhenide, hydroxytyrosol, nuzhenide 11-methyl oleoside, oleuropein, tyrosol, and demethyloleuropein at all stages of maturation (Maestro-Duran et al., 1994; Servili et al., 1999; Silva et al., 2010).

Since olive-derived phenolics are being actively explored as potential nutraceutical ingredients (Visioli, 2012), we investigate the phenolic profile and antioxidant activity of selected Moroccan olives stones. As of today, the Moroccan olive cultivars have not been studied in depth, especially in terms of antioxidants content and potential biological activity. In addition, there is a need to provide added value to by-products such as olive pits and to build the bases for their potential exploitation. Therefore, we assessed the antioxidant activities of crude preparations of two Moroccan varieties, i.e. Picholine and Haouzia.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant materials

Mature olive fruits from the Moroccan Picholine cultivar that grows in the province of Beni Mellal of Middle Atlas and from the Haouzia area called Marrakech-Tensift-Al Haouz, in Morocco, were picked during the 2009 and 2010 harvesting seasons. The drupes were heated (between 70 and 80 °C) in water for 8 minutes and the pits were then manually extracted. Olive stones were air-dried on paper towels (2-4 days). After drying, the olive stones were ground (particle less than 0.5 mm) with a Retsch SK1 knife mill.

2.2. Extraction of polyphenols

Phenolics were obtained by solid-liquid extraction. Sixty grams of olive stone powder were extracted with a Soxhlet apparatus, first with hexane (500 ml for five hours to remove lipids), then with acetone (500 ml for five hours) and, finally, with ethanol (500 ml for 5 hours) (Rakib et al., 2012). The resulting extract is hereafter referred as « phenolic extract ».

2.3. Determination of total phenolic content

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method (Scalbert et al., 1989), with gallic acid as the reference compound. Therefore, the total phenolic content of the extracts is expressed as gallic acid equivalents (milligrams per gram of dry matter; mg GAE/g DM). Measurements were performed in triplicate.

2.4. Analysis of antioxidant activity

We performed three different in vitro tests of antioxidant activity. In the first one (which assesses the ability to scavenge the stable free radical DPPH), a 15 μ M ethanolic solution of DPPH was added with the compounds under investigation. After 15 min of incubation, absorbance was read at 517 nm (Visioli and Galli, 1998).

Superoxide anion production was evaluated as follows: cytochrome C (from bovine heart) 1 mg/ml, xantine 200 μ M in phosphate-buffered saline 50 mM, and the compound to be tested were mixed in a quartz cuvette and placed in a spectrophotometer. The reaction was started by the addition of 10 μ U of xantine oxidase and the rate of reduction of cytochrome C was continuously followed at 550-540 nm. Inhibition of the rate of superoxide formation due to the compound under examination was calculated after the addition of 50 ng/ml of superoxide dismutase (Visioli et al., 1998).

The total antioxidant capacity of the extracts (at a concentration of 10-5) was evaluated by a validated assay based upon the reduction of Cu^{++} to Cu^{+} . The results are expressed as mEq of uric acid (Bogani et al., 2007).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the polyphenols concentration in acetone and ethanol extracts. The results show that the Moroccan Picholine variety growing in the province of Beni Mellal has a higher content of total phenolic compounds (11.32 mg/g dry matter) than the Haouzia (4.55 mg/g dry matter) cultivar. The concentrations of polyphenols we found are in agreement with those already reported by some authors, who described the lower levels of phenols in olive stones and seeds, compared with olives pulp or leaves (Ryan et al., 2003).

TABLE 1. Total phenolic content of olive stones of two Moroccan cultivars.

Data are means \pm S.D of experiments performed in triplicate. DM, dry matter; GAE, gallic acid equivalents; A.E., acetone extract; E.E., ethanol extract.

Cultivar	Extraction Solvent	Phenolic content (mg GAE/gDM)	
Picholine	A.E.	8.25 \pm 0.023	11.32
	E.E.	3.07 \pm 0.007	
Haouzia	A.E.	2.40 \pm 0.015	4.55
	E.E.	2.15 \pm 0.003	

TABLE 2. Antioxidant activity of polyphenols extracted from the pits of two Moroccan cultivars.

Data are means \pm S.D. of experiments performed in triplicate.

Cultivar	Test (IC50)		
	DPPH	Superoxide anion formation	Antioxidant capacity
Picholine	4.78 \pm 1.21 $\times 10^{-5}$	20.3 \pm 2.12 μ M	0.33 \pm 0.04
Haouzia	8.94 \pm 1.73 $\times 10^{-5}$	72.8 \pm 2.99 μ M	0.21 \pm 0.02

The three tests of free radical scavenging and antioxidant activity we performed showed that the Picholine variety is more potent than the Haouzia one, with IC50s in the low microMolar range (Table 2). Of note, the radical scavenging and antioxidant activity of the Picholine extract is comparable with that of pure oleuropein and of vitamin C (Visioli et al., 1998) yet weaker than that of pure hydroxytyrosol (Visioli et al., 1998).

It is also noteworthy that the large amount of olive mill by-products that are currently disposed of could be instead recovered and used as added-value source of bioactive compounds (Visioli and Galli, 1993).

A major limitation of this work is that, due to the lack of proper equipment, we could not perform a detailed chromatographic analysis of the crude phenolic extracts. Therefore, we cannot attribute their antioxidant activities to individual components such as hydroxytyrosol or oleuropein aglycone. Also, even though it is currently premature, future toxicological studies are needed before any product might be launched (Aunon-Calles et al., 2013a; Aunon-Calles et al., 2013b).

4. CONCLUSION

In summary, olive pits from the Moroccan Picholine variety appear to be an interesting by-product that might provide useful as sources of phenolic antioxidants, to be potentially exploited in the food or cosmetic sectors.

REFERENCES

Auñón-Calles, D., Canut, L., and Visioli, F., (2013a). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* **55**, 498-504.

Auñón-Calles, D., Giordano, E., Bohnenberger, S., and Visioli, F., (2013b). Hydroxytyrosol is not genotoxic in vitro. *Pharmacological Research* **74**, 87-93.

Bogani, P., Galli, C., Villa, M., and Visioli, F., 2007. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* **190**, 181-186.

EFSA Panel on Dietetic Products, (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* **9**, 2033-2058.

Maestro-Duran, R., Cabello, L.R., Gutierrez, R.V., and Roncero, V.A., (1994). Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y aceites* **45**, 332-335.

Rakib, M., Chich, a.C., Abouricha, S., Alaoui, M., Bouli, A., Hansali, A., and Owen, R., (2012). Determination of phenolic composition of carob pods grown in different regions of Morocco. *Journal of Natural Products* **3**, 134-140.

Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., and Robards, K., (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2532-2538.

Scalbert, A., Monties, B., and Janin, G., (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**, 1324-1329.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., and Montedoro, G., (1999). Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 12-18.

Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Bronze, M., Coelho, A.V., and Villas-Boas, L., (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y aceites* **61**, 157-164.

Visioli, F., (2012). Olive oil phenolics: where do we stand? Where should we go? *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**, 2017-2019.

Visioli, F., Bellomo, G., and Galli, C., (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical Biophysical Research Communications* **247**, 60-64.

Visioli, F., and Bernardini, E., (2011). Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Current Pharmaceutica Design* **17**, 786-804.

Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., and Galli, C., (2005). Mediterranean food and health: building human evidence. *Journal of Physiology and Pharmacology* **56** Suppl 1, 37-49.

Visioli, F., and Galli, C., (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews* **56**, 142-147.

Visioli, F., and Galli, C., (1993). Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Current Topics in Nutraceutical Research* **1**, 85–88.

2. VALORISATION DES NOYAUX D'OLIVES

C

HAPITRE 2.

2.1. VALORISATION DES NOYAUX D'OLIVE MAROCAIN PAR UTILISATION DES PANNEAUX DE PARTICULES

Résumé de l'article :

L'objectif de ce travail est de trouver de nouvelles applications pour la valorisation des noyaux d'olives. Afin d'améliorer les connaissances sur les noyaux d'olive, la concentration des composés phénoliques de trois variétés d'oliviers marocains : Picholine marocaine, Menara et Haouzia ont été étudiées. Les noyaux d'olives de trois variétés ont été caractérisés par spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (FT- MIR). Les composés phénoliques totaux sont quantifiés après extraction solide-liquide par le dosage de Folin -Ciocalteu. Les noyaux d'olive de la variété Picholine marocaine ont une teneur plus élevée en composés phénoliques totaux (11,32 mg GAE / g MS) par rapport à la variété Haouzia (4,55 mg GAE / g DM) et celle de Menara (3,56 mg GAE / g de MS). Une analyse thermogravimétrique indique que jusqu'à 195 ° C, il n'y a pas de dégradation des noyaux d'olives. La performance biocide des noyaux a été testée sur un support agar-agar en présence de champignons. Les résultats obtenus montrent que le pouvoir fongicide est obtenu avec la variété Picholine marocaine. La présence des noyaux d'olives de la variété Picholine marocaine dans un des panneaux de particules améliore la résistance totale des panneaux vis-à-vis des champignons de pourriture, *Coriolus versicolor* et *Coniophora puteana*.

Mots-clés: Résistance à la pourriture, noyaux d'olives, panneaux de particules, composés phénoliques.

2.2.1. Valorization of Moroccan olive stones by using it in particleboard panels

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le **Journal Maderas Ciencia y tecnología (2012)**.

Elbir, M. Moubarik, A. Rakib, E.M. Grimi, N. Amhoud, A. Miguel, G. Hanine, H. Vanloot, P. Artaud, J. Mbarki, M. 2012. VALORIZATION OF MOROCCAN OLIVE STONES BY USING IT IN PARTICLEBOARD PANELS. *Maderas Ciencia y tecnología*. 14 (3) 361-371.

ABSTRACT

The main objective of this work was to find new applications to valorize olive stones (endocarp and seed). In order to improve knowledge on olive stones, the phenolic compounds concentration of three varieties of Moroccan olive trees: Moroccan Picholine, Menara and Haouzian were studied. Olive stones of three varieties were characterized by Fourier Transform Mid Infrared Spectroscopy (FT-MIR). Total phenolic compounds are quantified after solid-liquid extraction by an assay of Folin-Ciocalteu. Moroccan Picholine stones (11.32 mg GAE/g DM) have a higher content of total phenolic compounds than Haouzia stones (4.55 mg GAE/g DM) and Menara stones (3.56 mg GAE/g DM). Thermogravimetric analysis indicates that up to 195°C; there is no degradation of the stones. The biocide performance on agar-agar was tested with decay fungi. Biodegradation studies show that the most interesting results are obtained with Moroccan Picholine stones. The presence of Moroccan Picholine in a particleboard panels improves the total resistance of the particleboard panels against both *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana* rot fungi.

Keywords: Decay resistance; olive stone; particleboard; phenolic compounds

ISSN impresa 0717-3644
ISSN online 0718-221X

Maderas. Ciencia y tecnología, 14(3): 361-371, 2012
DOI 10.4087/S0718-221X2012005000008

VALORIZATION OF MOROCCAN OLIVE STONES BY USING IT IN PARTICLEBOARD PANELS

M. Elbir¹, A. Moubarik^{2*}, E.M. Rakib³, N. Grimi⁴, A. Amhoud¹,
G. Miguel⁵, H. Hanine⁶, J. Artaud⁷, P. Vanloot⁷ and M. Mbarki¹

1. INTRODUCTION

Oleaceae is a family comprising 600 species in 25 genera. Many of the genera are economically important such as the olive (*Olea europaea*) which is cultivated for its fruit and oil (Wallander and Albert 2000). The olive tree is among the oldest woody crops and is particularly widespread throughout the Mediterranean region and plays an important role in its rural economy, local heritage, and environment protection. The largest producing countries are located in the Mediterranean and Middle East regions providing 98% of the total cultivated surface area, and 99% of the total olive fruit production (Niaounakis and Halvadakis 2006, Besnard *et al.* 2011).

Olea europaea dried fruit has pharmacological properties, such as anti-bacterial, anti-viral, anti-inflammatory activities and detoxification (Ding 1999). Such properties have been attributed to the presence of many compounds including phenols. Olive fruits are rich in phenolic compounds that represent 1 to 14% weight of dry pulp. The phenolic composition in the various parts of the fruit is complex depending on the variety, collection season, growing conditions, and time of ripening (Solinas *et al.* 1975, Vlahov 1992, Esti *et al.* 1998, Romani *et al.* 1999). Very few studies have focused upon the phenolic composition of olive seeds, nevertheless some phenolic compounds have been identified including salidroside, nuzhenide, hydroxytyrosol, nuzhenide 11-methyl oleoside, oleuropein, tyrosol, and demethyloleuropein (Fig. 1) at all stages of maturation (Maestro-Durán *et al.* 1994, Servili *et al.* 1999, Silva *et al.* 2010).

The olive stones and seeds are an important by-product generated in the olive oil extraction. Generally, this material is used as combustible to produce electric energy or heat. A large number of research articles have been published dealing with the chemical composition of olives and olive oil. However, only a few studies have been dedicated to analyzing the components and uses of the olive stone (Rodríguez *et al.* 2008).

The main objectives of this work are the extraction of phenolic compounds, the characterization (chemical, thermal and biological) and the valorization of Moroccan olive stones in particleboard panels.

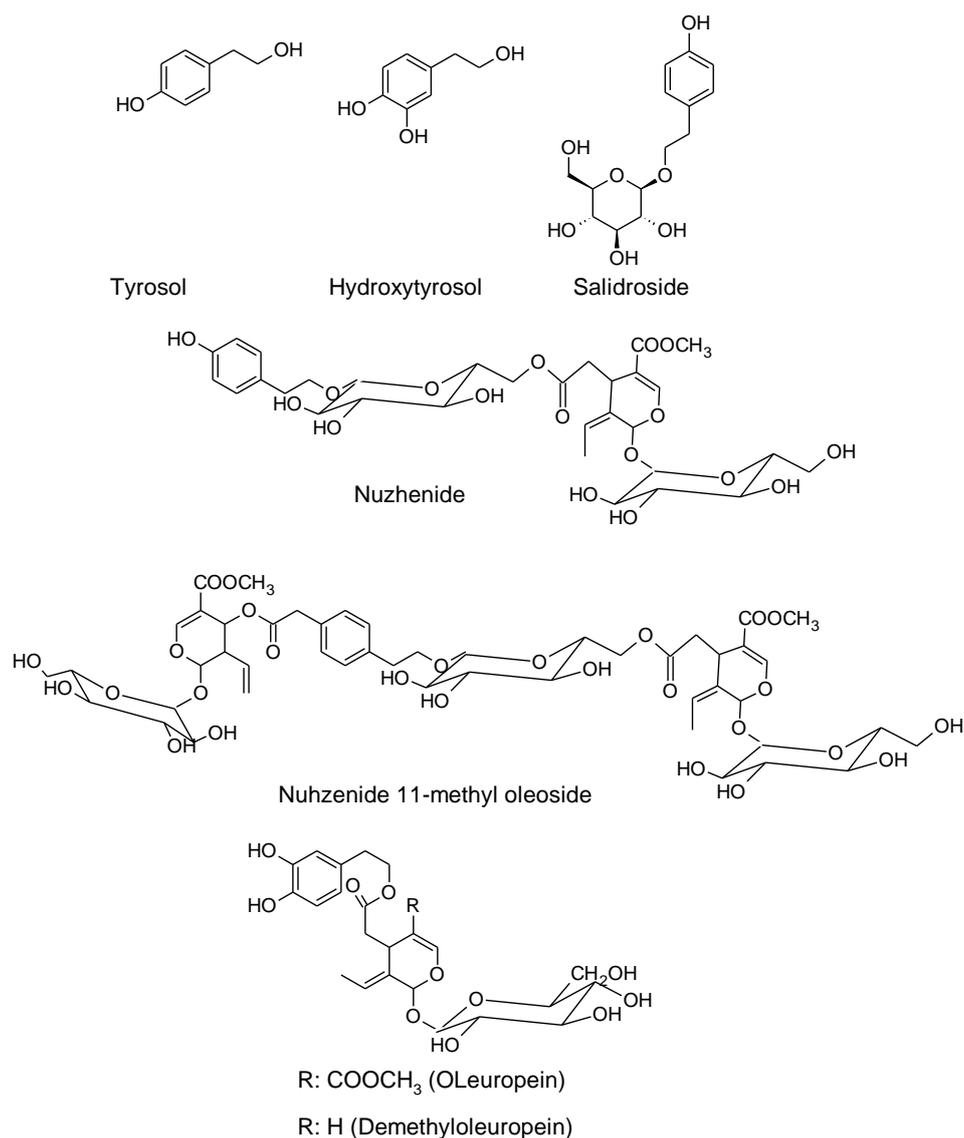


Figure 1. Some components found in stone and seed olives

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1. Plant materials

Mature olive fruits were obtained from the Moroccan Picholine variety, which grows widely in the province of Beni Mellal and from Menara and Haouzia varieties growing in the province of Marrakech of Middle Atlas and Marrakech-Tensift-Al Haouz (Morocco), respectively. Olive fruits were boiled (between 70 and 80°C) in water for 8 minutes, and pulped by crushing them manually. Olive stones were then air dried on paper towels (2-4 days). After drying, the olive stones were ground (particle less than 0.5 mm) in a knife mill "Retsch SK1".

Maritime pine (*Pinus pinaster*) particles was provided by the sawmill Ets. Labadie (Roquefort, France) Sd (moisture content around 8–10%).

2.2. Extraction and estimation of total phenolic compounds

The solid-liquid extraction of total phenolic compounds was performed with a Soxhlet apparatus. Olive stone powder (60 g) was extracted in a Soxhlet apparatus, first with hexane (500 ml) for 5 hours to remove lipids, then with acetone (500 ml) for 5 hours and finally with ethanol (500 ml) for 5 hours to remove total phenolic compounds (Rakib *et al.*2010).

Total phenols are estimated by Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi 1965, Scalbert *et al.* 1989). A 2.5 ml portion of Folin-Ciocalteu reagent and 2 ml of a sodium carbonate solution (75 g/l) are added to 0.5 ml of the diluted extract. The assay tubes are kept 15 min in a water bath at 50°C and then transferred to cold water. The absorbance read was 760 nm. A calibration curve with equation: $y = 0.0021x + 0.0015$ ($r^2 = 0.99$) was constructed using gallic acid solutions within the range 10–100 mg/l. Contents of total phenolic compound in olive stones were expressed as gallic acid equivalents in milligrams per gram dry matter (mg GAE/g, DM). The results were averages of triplicate analyses.

2.3. Fourier Transform Middle-Infrared Spectroscopy (FT-MIR)

Analyses were performed with FT-MIR. The spectra of the samples were recorded with a Perkin Elmer's FTIR (Spectrum One). Samples were deposited without preparation on attenuated total reflection (ATR) cell that is equipped by a diamond crystal. The crystal was cleaned between measurements by deionized water and dried by lint-free tissue. Spectra were recorded between 4000 and 600 cm^{-1} , at 0.5 cm^{-1} nominal resolution.

2.4. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) was used to determine the thermal stability and degradation of olive stones using a TGA Q50 thermogravimetric apparatus. Ten milligrams of each cured sample were placed on a balance located in the furnace and heat was applied over the temperature range from room temperature to 600 °C at a heating rate of 5 °C/min in air. Mass losses versus temperature thermograms were obtained showing the different decomposition processes.

2.5. Particleboard preparation

Single layer laboratory particleboards of dimension 350 mm x 310 mm x 14 mm were prepared from maritime pine (*Pinus pinaster*). The addition of the commercial Urea Formaldehyde (UF) resins to the particles was 7.5 % based on solid mass; press time was 7.5 min at 195°C press platen temperature with a maximum specific pressure of 25 kg/cm². The UF resin had a density of 1280–1290 kg/m³, a pH of about 8.5–9, and a viscosity of 350–600 mPa.s, all measured at 20 ± 2°C; the gel time was 40–50 seconds at 100°C. The content of free formaldehyde is maximum 0.15 % based on the liquid resin. The particles with size between 1 to 4 mm were dried to approx 2 ± 0.5 % moisture content prior to application of the resin. Each olive stone powder was ground and mixed at different concentrations (from 0 to 15%, w/w) in particles. The target board density was 710 kg/m³. The particleboards were pre-conditioned at 25°C and 65 % relative humidity in a Vötsch climate room for one week before testing.

2.6. Biological properties

2.6.1. Decay test of the particleboard composites

Particleboards composites measuring 20 × 20 × 14 mm³ were prepared for decay test, from Maritime pine (*Pinus pinaster*). A fungal decay test was done according to an adaptation of the standard EN 113 (AFNOR 1996) using a brown rot fungus, *Coniophora puteana* (BAM Ebw.15) and the white rot fungus, *Coriolus versicolor* (CTB 863A). A culture medium was prepared in Roux flasks. In each one, a nutritive medium, made up of a malt-agar mixture was placed (40 g of malt and 20 g of agar dissolved in 1000 ml distilled water). After sterilization (121°C for 20 min at 1 bar), the *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana* were inoculated on culture medium in Petri dishes under sterile conditions. Then they were placed in constant conditions at 25°C and 65% relative humidity for 3 weeks to favour fungal development. After being conditioned at 25°C and 65% air moisture content, the particleboard composite samples were put into Petri dishes and exposed to *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana* for 16 weeks in darkness. Finally, test results were expressed as percentage of weight loss of composite panels due to fungal attacks after decay test using Equation (1) (The measurement was done after drying of each sample). Ten replicates were used for each decay fungus. Weight loss was calculated as follows:

$$\text{Weight loss (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

Where m_i and m_f are the oven-dry weights of the sample before and after the decay test.

2.6.2. Decay test of olive stone powders

In order to confirm the fungicidal effect, olive stone powder was added to the culture medium. Each olive stone powder was ground and mixed at different concentrations (from 0 to 7%, p/v) in malt-agar culture medium. After sterilization, the *Coriulus versicolor* and *Coniophora puteana* fungi were inoculated in the centre of the culture medium under sterile conditions. Then they were placed in constant conditions at 25°C and 65% relative humidity for 15 days to favour fungal development. The mean radius of the fungal development was measured. Test results were expressed as percentage of fungal development using Equation (2). Ten replicates were used for each fungal development.

$$\text{Percentage of fungal development (\%)} = \frac{R_1}{R_0} \times 100 \quad (2)$$

Where

R_1 : is the mean radius of the fungal development after 15 days (olive stone powders present in Petri dishes).

R_0 : is the mean radius of the fungal development after 15 days (control: without presence of olive stone powder).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Impact of olive stones varieties on polyphenols extraction

Table 1 shows the polyphenols concentration in acetone and ethanol extracts. The results showed that Moroccan Picholine variety growing in the province of Beni Mellal had the higher contents of total phenolic compounds (11.32 mg/g DM), followed by Haouzia (4.55 mg/g DM) and Menara

(3.56 mg/g DM) variety. The relative amounts of phenols found in our experiment are in agreement with those already reported by some authors which described the lower levels of phenols in stones and seeds in comparison to the remaining tissues (pulp, leaves) of olives (Ryan *et al.* 2003). Nevertheless, compared with some other berries, the total phenolics contents in olive stones (3.56-11.32 mg/g DM) are higher than those of Oregon canberries (4.95–9.80 mg/g DM) berries (Wada and Ou 2002) and bayberries (3.60-4.46 mg/g DM) (Zhongxiang *et al.* 2007).

Table 1. Polyphenol contents of various olive stones. Three replicates of each sample. S.D: standard deviation.

Olive varieties	Extraction methods		Total phenolics (mg GAE/g DM)
	Ethanol extract (mg GAE/g DM)	Acetone extract (mg GAE/g DM)	
	Mean \pm S.D	Mean \pm S.D	
Moroccan Picholine	3.07 \pm 0.007	8.25 \pm 0.023	11.32
Menara	1.86 \pm 0.001	1.70 \pm 0.002	3.56
Haouzia	2.15 \pm 0.003	2.40 \pm 0.015	4.55

FT-MIR spectroscopy can be used to address qualitative and quantitative analyses. In this view, comparison with literature data provides preliminary information for the compositional characterization of FT-MIR bands of olives stones samples. Spectra of different olives stones are presented in figure 2. For the three varieties the spectra seem very similar. By means of FT-MIR spectroscopy, the original structure of different polyphenols can be clearly distinguished. The peak around 1285 cm^{-1} indicates a characteristic feature for the flavonoid-based tannins. This peak was assigned to the ethereal C-O stretching vibration (Socrates, 2001, Edelman and Lendl 2002) arising from the pyran-derived ring structure of this class of tannins. Two broader peaks at around 1350 cm^{-1} and between 1290 and 1150 cm^{-1} can be observed in the spectra of gallic acid, tannic acid (gallotannin) and in the ellagitannin preparation with shifts in exact peak position and deviations in peak shape. Both peaks can be assigned to the combination of C-O stretching and O-H deformation vibrations (Socrates 2001, Edelman and Lendl 2002).

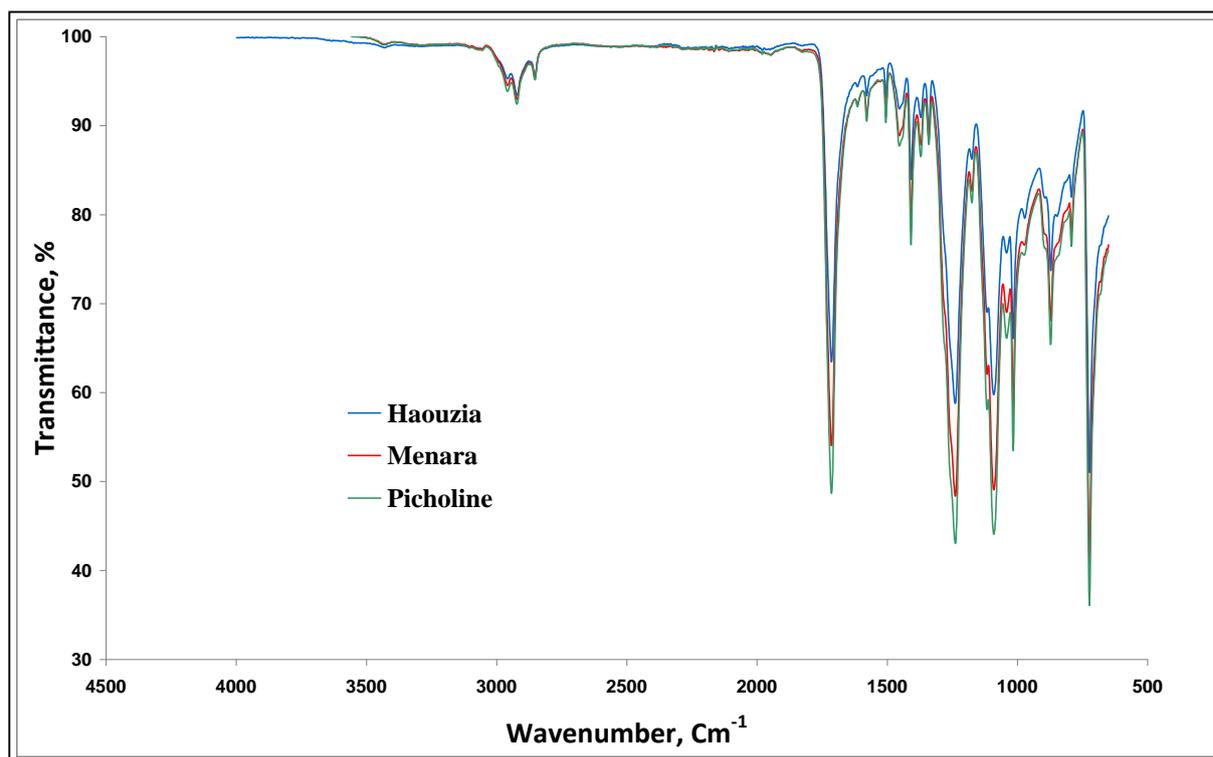


Figure 2. IR spectra of Haouzia, Menara and Moroccan Picholine olive stones.

3.2. Thermal study of different olive stones

Thermogravimetric analysis can check the thermal decomposition and thermal stability of the olive stones. Figure 3 shows the TGA curve of the Moroccan Picholine, Menara and Haouzia varieties in air atmosphere at a heating rate of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, result that matches to typical findings for the decomposition of other lignocellulosic materials. Two steps can be differentiated in the TGA curves: I- Up to 200°C , the weight loss corresponds to moisture release; II- The main weight loss takes place between 200 and 400°C . In this temperature range, two decomposition processes are well defined, with maximum weight loss rates appearing at 245 and 330°C . The first step can be attributed to the group of reactions involved in hemicellulose degradation (Órfão *et al.* 1999, Williams and Besler 1993), and the second one to those related to the thermal decomposition of cellulose (Orfao *et al.* 1999, Williams and Besler 1993).

The curve also shows that thermal degradation began to occur only after the materials have absorbed certain amounts of heat energy. Heat initiated the degradation processes and the breakdown of the structure by causing molecular chain ruptures. The results obtained with thermogravimetric analysis confirm that at 195°C they risk no degradation of the olive stones.

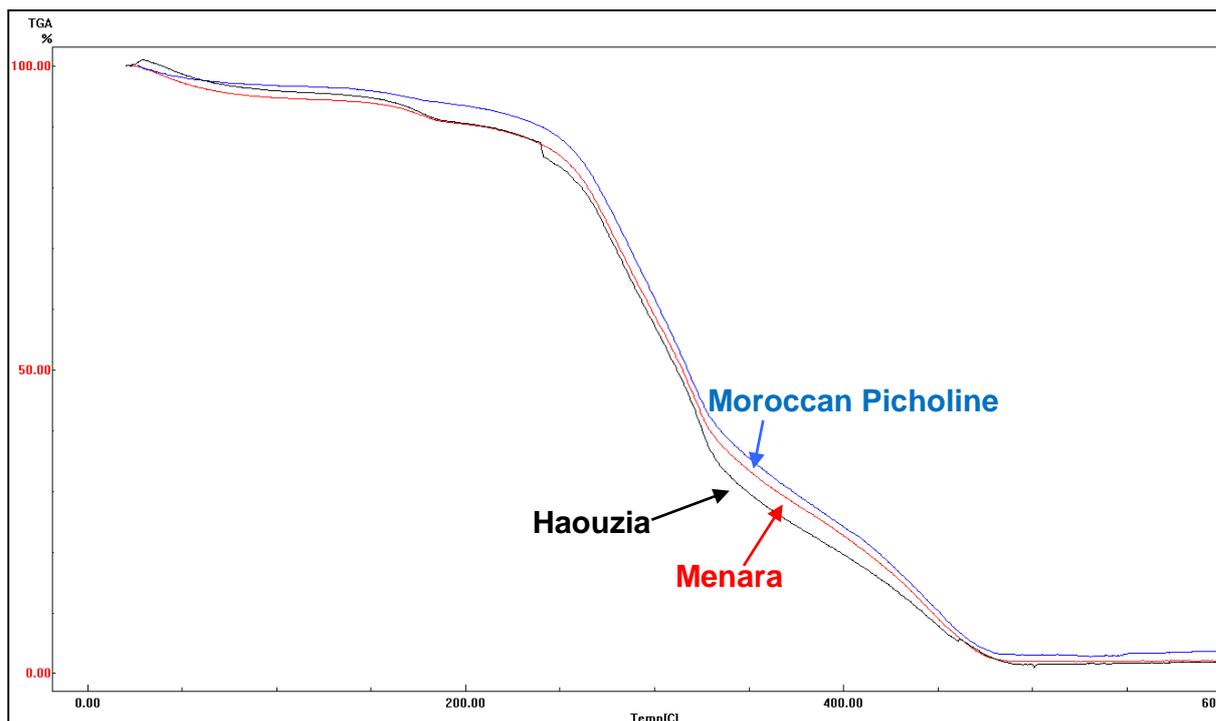


Figure 3. TGA graphical analysis for Menara, Haouzia and Moroccan Picholine olive stone varieties

3.3. Decay resistance of the particleboard composites

Weight losses of the particleboard composites caused by fungal decay after 16 weeks are shown in table 2. We can see that the control particleboard was attacked by both decay fungi (*Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana*) with weight losses near 40%. This proves that the fungus was virulent and the test of durability was valid according to the relevant European Norm 113 (EN 113, 1996). The values of weight losses for all other particleboard panels decreased. Laboratory tests have shown that the addition of olive stones (5, 10 and 15%) is very effective in preventing attack by both decay fungi. We also observed that particleboard with Moroccan Picholine (5, 10 or 15%) showed considerable resistance to both the decay fungi compared with particleboard with Haouzia (5, 10 or 15%) and Menara (5, 10 or 15%).

Results in table 2 seem to indicate that *Coniophora puteana* could be more efficient in wood degradation than *Coriolus versicolor*. This may be due to the differences between their decay mechanisms. This tendency has been previously observed by Nemli *et al.* (2006) and Moubarik *et al.* (2009).

Table 2. Weight loss of composite in presence of olive stones after exposure to both decay fungi (*Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana*). Ten replicates of each decay fungus. S.D: standard deviation.

Olive varieties	Samples	Weight loss (%)	
		<i>Coriolus versicolor</i> Mean \pm S.D	<i>Coniophora puteana</i> Mean \pm S.D
Moroccan Picholine	particleboard + 0% (Control)	35 \pm 3.1	41 \pm 2.8
	particleboard + 5%	24 \pm 5.2	28 \pm 3.6
	particleboard + 10%	19 \pm 4.1	23 \pm 2.5
	particleboard + 15%	12 \pm 2.2	18 \pm 3.7
Menara	particleboard + 0% (Control)	35 \pm 3.1	41 \pm 2.8
	particleboard + 5%	32 \pm 4.4	37 \pm 3.2
	particleboard + 10%	27 \pm 5.1	33 \pm 4.7
	particleboard + 15%	22 \pm 3.7	28 \pm 3.7
Haouzia	particleboard + 0% (Control)	35 \pm 3.1	41 \pm 2.8
	particleboard + 5%	30 \pm 5.1	35 \pm 5.2
	particleboard + 10%	25 \pm 6.2	30 \pm 4.9
	particleboard + 15%	19 \pm 4.7	25 \pm 3.6

3.4. Fungicide effect of olive stones

Table 3 shows the effect of olive stones (Picholine, Haouzia and Menara) concentration on fungal development. A decrease in fungal development for both decay fungi *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana* is observed on incorporation of olive stones into the culture medium. The results in table 3 confirm the fungicide effect of olive stones that contributes to improve the total resistance of the particleboard composites.

Hart and Hillis (1972) have demonstrated that the presence of phenolic compounds improves the durability of wood. Further studies evaluating the fungicide effect of phenolic compounds (tannins) also confirmed this activity (Pizzi and Conradie 1986, Charrier *et al.* 1995, Aloui *et al.* 2004, Cornelius *et al.* 2004, Moubarik *et al.* 2009).

Table 3. Effect of olive stone concentrations on fungus development. Ten replicates of each fungal development. S.D: standard deviation.

Olive varieties	Concentration (%)	Percentage of fungus development (%)	
		<i>Coriolus versicolor</i> Mean \pm S.D	<i>Coniophora puteana</i> Mean \pm S.D
Moroccan Picholine	0	100 \pm 0	100 \pm 0
	2	20 \pm 0.5	25 \pm 0.7
	5	6 \pm 0.1	8 \pm 1
	7	1 \pm 0	3 \pm 0.3
Menara	0	100 \pm 0	100 \pm 0
	2	29 \pm 1.1	31 \pm 1.4
	5	14 \pm 0.9	17 \pm 1.1
	7	7 \pm 0.2	9 \pm 0.4
Haouzia	0	100 \pm 0	100 \pm 0
	2	26 \pm 0.9	28 \pm 1.7
	5	12 \pm 1.1	15 \pm 1.2
	7	5 \pm 0.6	7 \pm 0.4

4. CONCLUSION

The present work proposes an innovative valorization of olive stones for particleboard production. The result of polyphenols extraction from Moroccan Picholine variety growing in the province of Beni Mellal had the higher contents of total phenolic compounds (11.32 mg/g DM), followed by Haouzia (4.55 mg/g DM) and Menara (3.56 mg/g DM) variety. The thermogravimetric analysis shows no significant degradation of the three olive stones varieties at temperature less than 195 °C. A good correlation was observed between the resistance to fungi and the concentration of olive stones. A decrease in fungal development for both decay fungi *Coriolus versicolor* and *Coniophora puteana* is observed after olive stones incorporation into the culture medium. The results of the present work contribute to the valorization of olive stones in the Mediterranean countries and especially in Morocco that has an ambitious agricultural strategy called "Green Morocco".

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the INRA (Beni Mellal and Marrakech) for their olives collection.

REFERENCES

- Aloui, F.; Ayadi, N.; Charrier, F.; Charrier, B. 2004.** Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*): relations with phenol extractives. *Holz als Roh- und Werkstoff* 62: 286-290.
- Besnard, G.; Hernández, P.; Khadari, B.; Dorado, G.; Savolainen, V. 2011.** Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology*.
- Charrier, B.; Haluk, J. P.; Klumpers, J.; Janin, G. 1995.** Characterisation of European oak wood constituents acting in the brown discoloration during kiln drying. *Holzforschung* 49: 168-172.
- Cornelius, M.L.; Bland, J.M.; Daigle, D.J.; Williams, K.S.; Lovisa, M.P.; Connick, W.J.Jr.; Lax, A.R. 2004.** Effect of a lignin-degrading fungus on feeding preferences of formosan subterranean termite (*Isoptera: Rhinotermitidae*) for different commercial lumber. *Journal of Economic Entomology* 97: 1025-1035.
- Ding, B.P. 1999.** Pharmacology of *Qingguo* pills on relieving cough. *China Traditional Patent Medicine* 21 : 27-28.
- Edelmann, A.; Lendl, B. 2002.** Toward the optical tongue: Flowthrough sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 124: 14741-14747.
- El Mostapha, R.; Chicha, C.; Abouricha, S.; Alaoui, M.; Bouli, A.; Hansali, A.; Owen, R. 2010.** Determination of phenolic composition of carob pods grown in different regions of Morocco. *Journal of Natural Products* 3: 134-140.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; la Notte, E. 1998.** Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 32-35.
- EN 113. European Committee for Standardization. 1996.** Wood preservatives- Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes- Determination of toxic values. Brussels, Belgium

- Hart J. H.; Hillis, W.E. 1972.** Inhibition of wood-rotting fungi by ellagitannins in the heartwood of *Quercus alba*. *Phytopathology* 62: 620-626.
- Maestro-Durán R.; Cabello, L.R.; Gutiérrez, R.V.; Roncero, V.A. 1994.** Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites* 45: 332-335.
- Moubarik, A.; Charrier, B.; Charrier, F.; Pizzi, A.; Allal, A. 2009.** Evaluation of decay resistance of wood products made from borax-impregnated wood and bonded with a formaldehyde-free cornstarch and tannin adhesive. *Annals of Forest Science* 66: 109p
- Nemli, G.; Gezer, E.d.; Yidiz, S.; Temiz, A.; Aydin, A. 2006.** Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from particles impregnated with *Pinus brutia* ark extractives. *Bioresource Technology* 97: 2059-2064.
- Niaounakis, M.; Halvadakis, C.P. 2006.** Olive processing waste management: Literature Review and Patent Survey 2nd Edition. Elsevier, Hardbound, ISBN: 0-08-044851-8, USA.
- Órfão, J.J.M.; Antunes, F.J.A.; Figueiredo, J.L. 1999.** Pyrolysis kinetics of lignocellulosic materials three independent reactions model. *Fuel* 78(3): 349-358.
- Pizzi, A.; Conradie, W.E. 1986.** A chemical balance/microdistribution theory-new CCA formulation for soft-rod control. *Material und Organismen* 21: 31-46.
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J. 2008.** Olive stone and attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology* 99: 5261-5269.
- Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F.F.; Cimato, A. 1999.** Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 964-967.

- Ryan, D.; Prenzler, P.D.; Lavee, S.; Antolovich, M.; Robards, K. 2003.** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2532-2538.
- Scalbert, A.; Monties, B.; Janin, G. 1989.** Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1324-1329.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Selvagini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. 1999.** Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 12-18.
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Bronze, M.; Coelho, A.V.; Villas-Boas, L. 2010.** Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites* 61: 157-164.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16,144-158.
- Socrates, G. 2001.** Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts; Wiley: Chichester, UK, ed. 3^a.
- Solinas, M.; di Giovacchino, L.; Cucurachi, A. 1975.** I polifenoli delle olive e dell'olio di oliva. *Ann. Ist. Sperimen. Elaiotec* 5: 105-126.
- Vlahov, G. 1992.** Flavonoids in three olive (*Olea europaea* L.) fruit: varieties during maturation. *Journal of the Science and Food Agriculture* 58: 157-159.
- Wada, L.; Ou, B. 2002.** Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3495-3500.
- Wallander, E.; Albert, V.A. 2000.** Phylogeny and classification of Oleaceae based on *RPS16* and *TRNL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 87: 1827-1841.

Williams, P.T.; Besler, S. 1993. The pyrolysis of rice husks in a thermogravimetric analyzer and static batch reactor. *Fuel* 72: 151-159.

Zhongxiang, F.; Min, Z.; Linxiang, W. 2007. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chemistry* 100: 845-852.

Chapitre 3.

Classification et discrimination chimométrique des huiles d'olives marocaines

**1. CARACTERISATION ET CLASSIFICATION DES
HUILES D'OLIVES MONOVARIETALES DE DEUX
REGIONS AU MAROC (MEKNES-TAFILALET ET
MARRAKECH-TENSIFT-AL HAOUZ)**

C

HAPITRE 3.

1. CARACTERISATION ET CLASSIFICATION DES HUILES D'OLIVES MONOVARIETALES DE DEUX REGIONS AU MAROC (MEKNES-TAFILALET ET MARRAKECH-TENSIFT-AL HAOUZ)

Résumé de l'article :

Il ya un intérêt croissant des consommateurs pour les produits alimentaires de haute qualité avec une origine géographique claire. Ce travail décrit l'utilisation potentielle de la caractérisation et la classification des huiles d'olives marocaine par chimiometrie sur des données spectroscopiques. La spectroscopie infrarouge, suivie d'un traitement chimiométrique des données spectrales, a été utilisé pour classer les huiles d'olives en fonction de leur origine géographique.

Les résultats ont été tout à fait satisfaisants, malgré la similitude des compositions de cultivars entre deux appellations d'origine ("Meknes-Tafilalet» et «Marrakech-Tansift-Alhaouz"). Les résultats ont montré que la spectroscopie proche infrarouge couplée avec des méthodes chimiométriques sont une technique intéressante pour classer les échantillons d'huile d'olive. Les traitements chimiométrique de spectres proche infrarouge nous permettent d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus par analytiques comme le moyen infrarouge et HPLC. Les méthodes spectroscopiques, combinées avec des stratégies chimiométriques, pourraient représenter un outil de classification fiable, pas cher et rapide.

Mots-clés: Huiles d'olives marocaines, méthodes spectroscopiques, proche infrarouge, traitement chimiométriques, ACP.

3.1. Caractérisation et classification des huiles d'olives monovariétales de deux régions au Maroc (Meknès-Tafilalet et Marrakech-Tensift-Al Haouz)

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le **Journal of Materials and Environmental Science (2014)**.

Elbir, M. Amhoud, A. Houlali, I. Moubarik, A. Hasib, A. Jouad, A. Mbarki, M. Vanloot, P. Artaud, J. 2014. Caractérisation et classification des huiles d'olives monovariétales de deux régions au Maroc (Meknès-Tafilalet et Marrakech-Tensift-Al Haouz). *Journal of Materials and Environmental Science*. 5 (2) 565-570.

Abstract

There is an increasing interest by consumers for high quality food products with a clear geographical origin. This review describes the potential use of Characterization and classification of Moroccan olive oil by chemometrics on NIRS and GC data. The infrared spectroscopy, followed by chemometric treatment of the spectral data, was used to classify olive oils according to their geographical origin.

The results were quite satisfactory, in spite of the similarity of cultivar compositions between two denominations of origin ("Meknes-Tafilalt" and "Marrakech-Tansift-Alhaouz"). The results showed that NIR spectroscopy coupled with chemometric methods are an interesting technique in classifying olive oil samples. The Chemometric treatments of NIR spectra allow us to obtain similar results than those obtained by time consuming analytical techniques such as MIR and HPLC. The spectroscopic methods, combined with chemometric strategies, could represent a reliable, cheap and fast classification tool.

Keywords: Moroccan olive oil, spectroscopic methods, NIR, Chemometric treatment, PCA.

J. Mater. Environ. Sci. 5 (2) (2014) 565-570
ISSN : 2028-2508
CODEN: JMESC

Elbir et al.



Caractérisation et classification des huiles d'olives monovariétales de deux régions au Maroc (Meknès-Tafilalet et Marrakech-Tensift-Al Haouz)
[Characterization and classification of monocultivar olive oils from two areas in Morocco (Meknes-Tafilalet and Marrakech-Tansift-Al Haouz)]

M. Elbir¹, A. Amhoud¹, I. Houlali¹, A. Moubarik², H. Hasib³, A. Jouad⁴, M. Mbarki¹

¹ Equipe Transdisciplinaire des Sciences Analytiques pour le Développement Durable (ETSADD), Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, BP 523, Beni Mellal, Maroc.

² INANOTECH-MAScIR, ENSET, Avenue de l'Armée Royale, Madinat El Irhane, 10100 Rabat, Morocco

³ Equipe de Valorisation des Agro-Ressources, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, BP 523, Beni Mellal, Maroc.

⁴ Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc

1. INTRODUCTION

L'olivier est l'une des plus anciennes cultures ligneuses et est particulièrement répandue dans toute la région méditerranéenne et joue un rôle important dans l'économie rurale, le patrimoine local et la protection de l'environnement [12]. L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen où la production d'olive a une fortune économique transmise sur plusieurs générations [38]. L'oliveraie marocaine est constituée pour plus de 96%, par la variété population picholine marocaine [27].

Le secteur des huiles végétales alimentaires représente l'un des secteurs les plus déficitaires au Maroc. L'absence de données sur les huiles d'olives (HO) marocaines nous a conduits à entreprendre une étude générale sur les HO marocaines.

Actuellement plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des techniques chromatographiques et spectroscopiques en couplage avec la chimiométrie comme une alternative pour la vérification de l'origine géographique, la discrimination des différents grades et la détection des artefacts ou adultérations dans l'huile d'olive [10-16-17-18-28-29]. Cette méthodologie de couplage, en permettant l'interprétation de plusieurs variables simultanées, est susceptible de discriminer facilement des moindres différences existant entre les spectres Infrarouge ou chromatogrammes en phases gazeuse.

La spectroscopie infrarouge serait un moyen de choix pour analyser des échantillons agro-alimentaires dans un laboratoire de routine. En plus, les interférences existant entre les liaisons ou fonctions organiques chimiques correspondant à des domaines Infrarouge similaires peuvent être résolues sur la base de l'origine géographique. C'est le cas du Moyen Infrarouge (MIR) pour des vins [32], fromages [24], les huiles d'olive [37] et le miel [35]. En proche Infrarouge (PIR) la classification géographique a été, également, réalisée pour différents aliments tels que le raisin [1], la sauce de soja [23], le vins [26], le riz [25], et l'huile d'olive [9].

La chromatographie en phase gazeux (CPG) est l'une des techniques de séparation les plus utilisées dans l'analyse des aliments, principalement pour les études sur la composition chimique en espèces volatiles et semi-volatiles, les arômes et les pesticides [4]. En analysant les profils CPG de divers composés présents dans le vin, par exemple les alcanes, aldéhydes, alcools et acides, il est possible de classer les vins en fonction de leur origine géographique [14-36]. La détermination, par CPG couplée à la chimiométrie, de la composition en acides gras et leurs concentrations correspondantes a permis la discrimination géographique des échantillons de lait [7] et de l'huile d'olive [29].

Grâce à un tel couplage, la détermination de l'origine géographique a été réalisée sur des masses de cacao [20] et de jus d'orange [34].

Au Maroc, il y a une forte demande des techniques analytiques fiables et rapides permettant d'identifier et classer les différents types des huiles d'olives (HOs) de différentes provenances géographiques, voire variétales. Le présent travail utilise la spectroscopie Proche Infrarouge (SPIR) et la CPG associées à la chimiométrie afin de fournir une méthode alternative aux méthodes d'analyses chimiques laborieuses et coûteuses, grâce à la différenciation des classes des HOs par des modèles basés de données sur des algorithmes tels que l'analyse en composantes principales (ACP). Ces modèles permettent la prédiction de la provenance géographique et variétale des HOs marocaines. Ces bases de données ont été mises en tant que référence pour la classification des huiles olive sans connaissance préalable de leur identité, ce qui raccourcit le temps et le coût d'analyse. En fait, au Maroc, c'est l'insuffisance de telles études sur l'huile d'olive qui nous a poussé à mener le présent travail afin de pouvoir caractériser et classer des l'huiles d'olive de deux régions marocaines; la région Marrakech-Tansift-Al Haouz et la région, noté ci-après "K", cette région à un climat aride ou semi-aride en général et humide dans l'Atlas (de 1500 m à 2000 m d'altitude) et le littoral. La pluviométrie y est très variable: 50% du territoire n'enregistre que des niveaux inférieurs à 300 mm par an et presque 30% à une pluviométrie comprise entre 300 et 400 mm par an. La température est très variable: 80% du territoire régional présente une température moyenne d'environ 18°. La deuxième région est Meknès-Tafilalt notée "M". Le climat de la région est diversifié, il s'étend de l'étage bioclimatique humide (1.100 mm de pluie) et à l'étage bioclimatique pré-saharien avec (250 mm). Il permet la production d'une gamme de cultures résultat de la combinaison d'une pluviométrie et des températures favorables en fonction des zones

2. Matériels et Méthodes

2.1. Échantillons

200 échantillons d'huile d'olive ont été collectés dans deux régions au Maroc, la région de Marrakech-Tansift-Al Haouz et la région de Meknès-Tafilalt : 80 dans la région de Marrakech-Tansift-Al Haouz et 120 de la région de Meknès-Tafilalt. Les deux régions sont distantes de l'ordre de 500 km (fig.1).

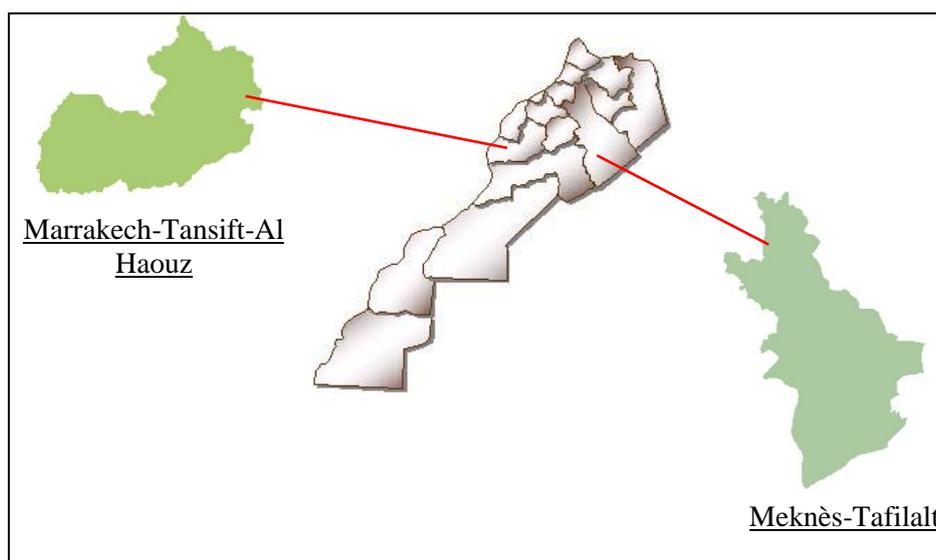


Figure 1. Carte géographique du Maroc montrant les 2 régions sièges de la collecte des huiles d'olives vierge du présent travail

2.2. Caractérisation physicochimique

Trois indices caractérisant les huiles d'olives ont été calculés selon la méthode AFT.60.204, Dec.1985. Ils sont définis ci-dessous :

- L'indice d'acide (I.A) est le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser les acides gras libres de un gramme de corps gras ;
- L'acidité (A) est le pourcentage d'acides gras libres exprimé conventionnellement selon la nature du corps gras, en acides oléiques de poids moléculaire (282) ;
- L'indice de peroxyde (Ip) est le nombre de milliéquivalent d'oxygène par kilogramme de corps gras;

2.3. Préparation et analyse des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques de l'huile d'olive ont été préparés, dans le n-heptane (0.12g/2ml), avec une solution froide de KOH (2M) selon la norme NF EN ISO 5509. Ces esters d'acides gras obtenus ont été analysés selon la norme NF EN ISO 5508 à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies 7890A (GC) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme ($T = 250^{\circ} \text{C}$). La colonne utilisée est une colonne capillaire de silice 60m x 0,25mm.

La pression d'entrée de l'hydrogène comme gaz vecteur était 178kPa. Le programme de la température du four était comme suit: 20 min à 210 °C, de 210 à 245 °C à raison de 6 °C/min puis 10 min à 245 °C.

2.4. Spectroscopie proche infrarouge

Les spectres proche Infrarouge à transformée de Fourier (FT-PIR) ont été enregistrés avec un spectromètre Antaris Nicolet. Les échantillons de l'huile d'olive sont introduits dans une cellule de quartz de trajet optique de 2mm. Tous les spectres sont à une résolution de 4 cm⁻¹ entre 4500 et 10000 cm⁻¹ grâce au logiciel résultat intégration 2.1 Thermo Nicolet. Ces spectres FT-PIR se sont avérés étant très similaires pour pouvoir être distingués entre eux. 10 analyses a été effectuée pour chaque spectre. Un spectre de référence a été enregistrée avant chaque mesure de l'échantillon sur un tube vide.

2.5. Analyse en Composantes Principales

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode statistique ancienne publiée en 1901 par Pearson et en 1933 par Hotteling. Elle est fréquemment utilisée dans la chimie analytique pour la facilité de son interprétation. En outre, elle contribue à réduire la dimensionnalité des données, tout en conservant la plupart de l'information par l'étude de toutes les relations entre les variables, simultanément (Brereton, 2009). L'ACP fournit une représentation graphique des similitudes et des différences entre les données dans l'espace défini par les composantes principales (Guihua Fang 2012). Dans le présent travail, des spectres PIR et des chromatogrammes ont été soumis à l'analyse par ACP afin d'examiner les regroupements possibles des huiles d'olives.

3. Résultats and discussion

3.1. Caractérisation physicochimique :

Les deux figures suivantes (fig. 2, 3) donnent l'acidité et l'indice de peroxyde des échantillons d'huile d'olive collectés dans les 2 régions.

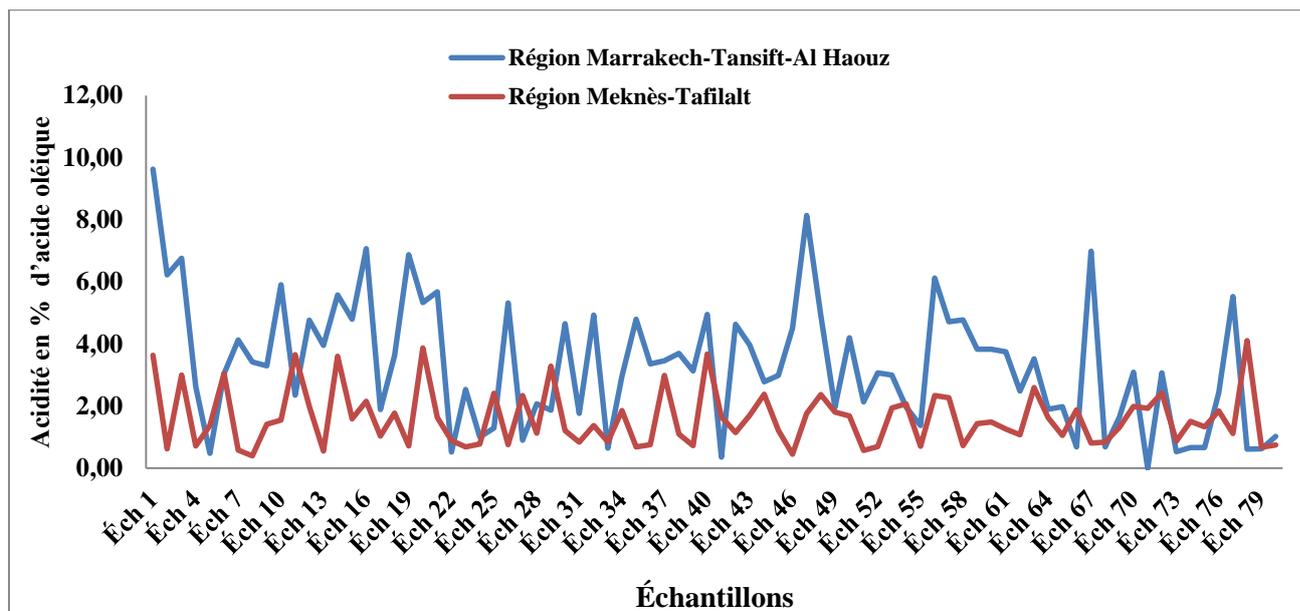


Figure 2. L'acidité des huiles d'olive de deux région au Maroc « Marrakech-Tansift-Al Haouz et Meknès-Tafilalt ».

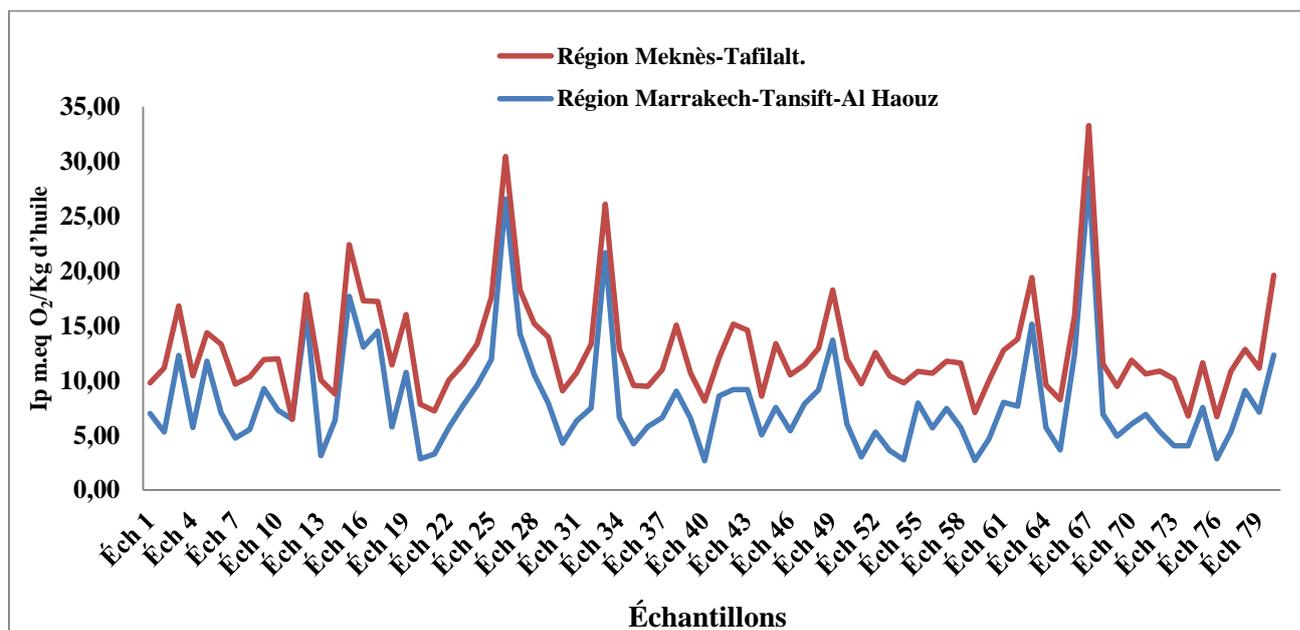


Figure 3. Indice de peroxyde des huiles d'olive de deux région au Maroc « Marrakech-Tansift-Al Haouz et Meknès-Tafilalt ».

Les échantillons de la région Marrakech-Tansift-Al Haouz (fig. 2, 3) présentent des valeurs l'acidité, entre 0.36 et 9.63 d'acidité, variant selon différentes zones de la région. Les valeurs de l'indice de peroxyde sont respectivement entre 2.66 et 28.50 m.eq O₂/Kg d'huile.

Les échantillons de la région Meknès-Tafilalt (fig. 2, 3) présentent assez de différence entre les zones de la région. Les valeurs de l'acidité sont entre 0.39 et 7.33 d'acidité et celles et l'indice de peroxyde sont, respectivement, entre 2.65 et 7.50 m.éq O₂/Kg d'huile.

Les propriétés chimiques des huiles analysées, révèlent que l'acidité qui permet d'apprécier le degré d'altération des corps gras est très variée entre les différents échantillons. Nombreuses zones présentent des valeurs les plus élevées permettant d'affirmer que leurs huiles contiennent assez d'acides gras libres provoquant une acidité élevée, en terme d'acide oléique. En effet les acides gras libres sous l'effet de l'oxygène atmosphérique provoquent le rancissement de l'huile. De plus, nous avons obtenu des valeurs qui sont supérieures à la valeur limite préconisée par de codex alimentaire pour une huile alimentaire. Ce résultat peut être lié à l'hydrolyse des liaisons esters suite à des mauvaises conditions de : récolte, climat, et conservation.

3.2. Composition en acides gras

L'analyse des chromatogrammes en phase gazeuse a révélé l'existence de quatorze (14) acides gras dans la matière grasse issue de l'huile d'olive. La composition en acides gras a donné six acides gras saturés qui sont l'acide palmitique, l'acide margarique, l'acide stéarique, l'acide arachidique, l'acide béhénique, et l'acide lignocérique. Les acides gras insaturés sont au nombre de huit dont six sont monoinsaturé : l'acide hypogéique, l'acide palmitoléique, l'acide margaroléique, l'acide oléique, l'acide cis-vaccénique et l'acide gondoïque et deux autres sont polyinsaturé : l'acide linoléique et l'acide linoléique. Nous notons une certaine variabilité, en termes d'acides gras, dans la teneur des différents échantillons analysés.

Tableau 1. Teneur en acide oléique et l'acide linoléique des huiles d'olives vierges.

	Acide Oléique	Acide Oléique	Acide Oléique	Acide Linoléique	Acide Linoléique	Acide Linoléique
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
Marrakech	73	77,61	75,30	7,65	9,95	8,8
Meknes	46,75	68,32	57,53	13,86	22,44	18,15

Les résultats (tableau1) montrent que la teneur en acide oléique des échantillons de Meknès serait plus importante que celle des échantillons de Marrakech.

Ce qui s'explique par le fait que la teneur en acide linoléique des échantillons de Meknès est moins importante que celle des échantillons de Marrakech.

3.3. Spectroscopie Proche infrarouge

La figure 4 montre les spectres en proche infrarouge obtenus pour les échantillons de l'huile d'olive vierge. Il n'y a aucune différence visuelle entre les spectres selon l'origine géographique. Les bandes autour de 8252 cm^{-1} proviennent de secondes harmoniques des vibrations d'élongations CH, tandis que celles de 7180 et 7075 cm^{-1} sont dues à la combinaison de l'élongation CH et de la déformation CH du groupe $-\text{CH}_2$ (Bertrand & Dufour, 2006; Hourant et al., 2000; Wang et al., 2006). Les pics à 5791 et 5673 cm^{-1} sont attribués aux premières harmoniques des vibrations CH des groupes méthyle, méthylène et l'éthylène (Christy et al., 2004; Cozzolino et al., 2005). Les pics d'intensités faibles à 4659 et 4593 cm^{-1} sont associés à des combinaisons des vibrations CH de $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$.

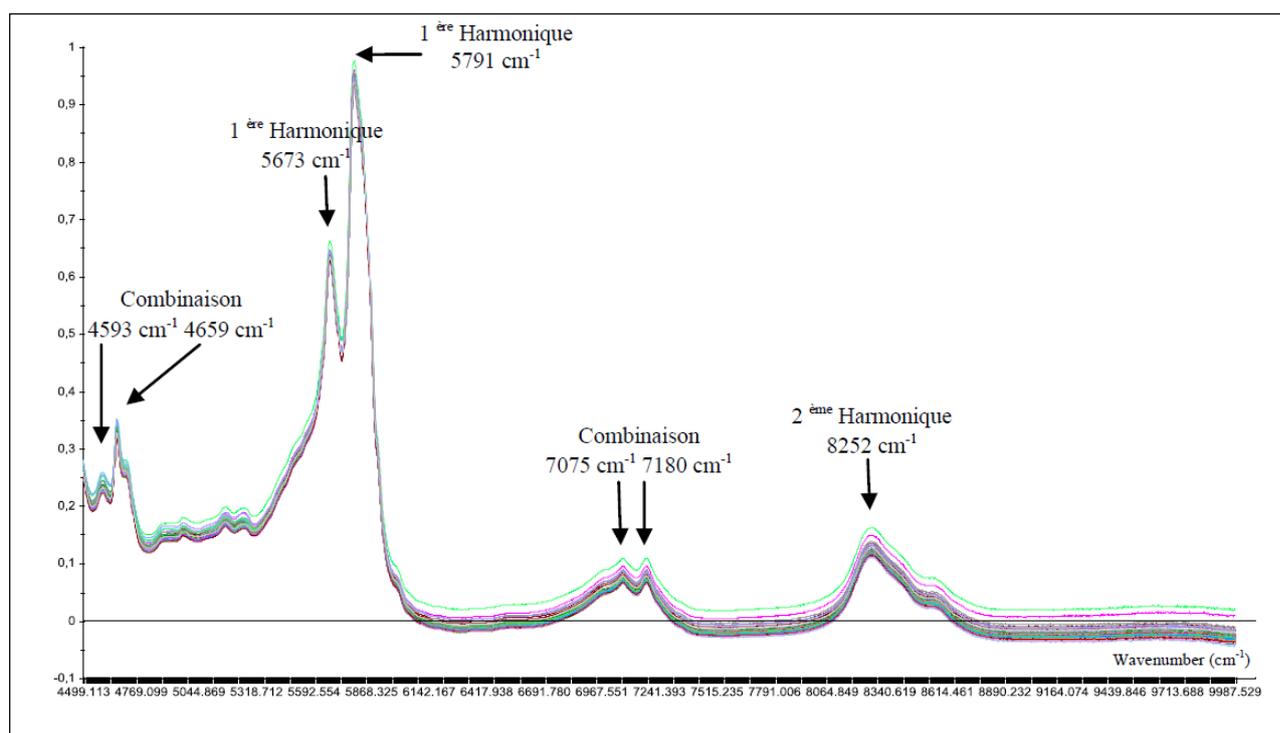


Figure 4. Spectres proche infrarouge d'huiles d'olive vierges

3.4. Analyse en Composantes Principales

Comme il a été possible de classer les échantillons en fonction de leur origine géographique, il est intéressant de comprendre comment cette classification a été faite sur la base des données proche infrarouge. Afin d'examiner la structure des données, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée (fig. 5).

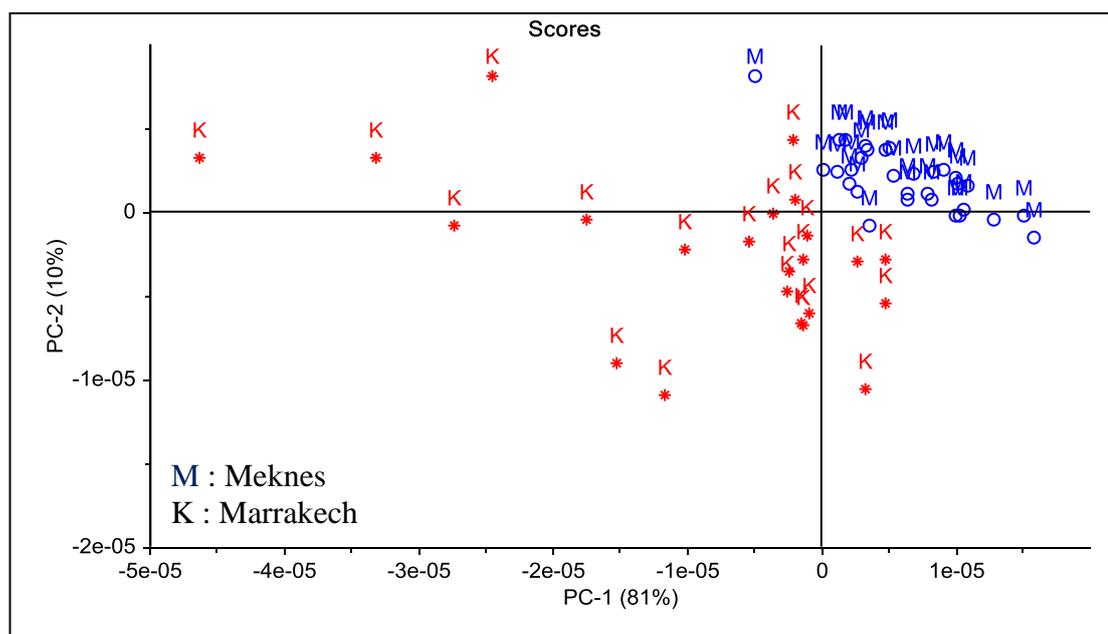
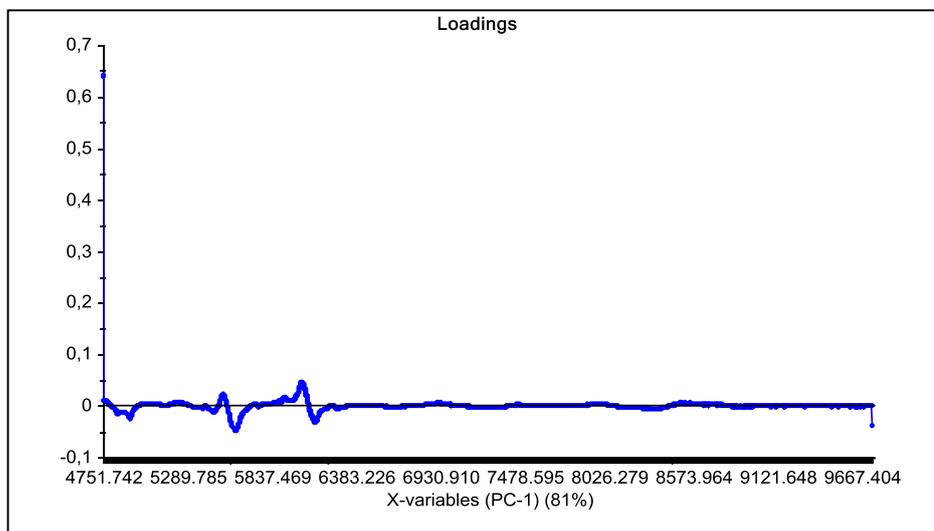
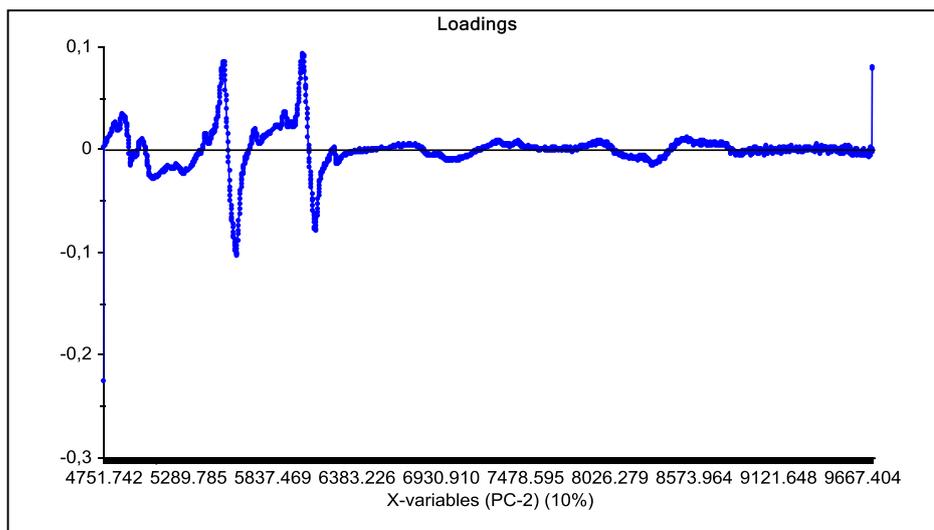


Figure 5. Représentation ACP des spectres PIR des échantillons des huiles d'olives vierges.

M : Meknès; K : Marrakech

L'ACP obtenu sur les spectres en PIR montre une meilleure discrimination entre les échantillons de Meknès (M) d'une part et ceux de Marrakech (K) d'autre part. Il y avait, alors, des informations relatives à l'origine géographique des huiles d'olive vierges sur ces spectres en PIR (fig. 5). Les composantes principales qui permettent de différencier visuellement ces huiles d'olives vierges sont la CP-1 et la CP-2. Ces deux composantes principales expliquent respectivement 81 % et 10 % de la variance, soit 91% de la variance totale. La représentation des échantillons, en fonction de leurs origines géographique, permet la mise en évidence de groupes plus au moins compacts. Les deux figures 6a et 6b présentent l'information discriminante dans chaque composante principale. La figure 6-a montre que ce sont les deux zones ($5474\text{ cm}^{-1} - 5708\text{ cm}^{-1}$) et ($5949\text{ cm}^{-1} - 6178\text{ cm}^{-1}$) qui présentent l'information discriminante.

Effectivement, les deux bandes de la première harmonique (5673 cm^{-1} et 5791 cm^{-1}) apparaissent dans cette première zone. En outre, la composante principale 2 (fig. 6-b) est corrélée avec CP-1.

**a****CP-1****b****CP-2**

Figures 6a et 6b. Composantes principales des spectres PIR ((a) CP-1 ; (b) CP-2).

4. Conclusion

Le présent travail a montré que les huiles d'olives vierges produites dans les unités de trituration de deux régions marocaines, Meknes-Tafilalt et Marrakech-Tansift-Alhaouz, distantes de l'ordre de 500 km présentent des caractéristiques, en termes d'acides gras et de peroxydes, très difficilement détectables directement sur des spectres bruts en proche infrarouge. Cependant l'utilisation de méthodes chimiométriques telles que l'analyse en composantes principales a été déterminante et efficace pour la discrimination de ces huiles. Résultat important vu le fait qu'il n'y a pas de parfaite visibilité variétale de l'olivier au Maroc puisque la question de l'existence de monovariétés autres que la picholine reste loin d'être très élucidée.

La spectroscopie Proche Infrarouge couplée à des techniques chimiométriques appropriées a émergé comme étant une méthode d'analyse rapide et robuste pour des fins d'authentification, notamment afin de garantir l'originalité des huiles alimentaires fonctionnelles. Un tel développement des méthodes, basé sur le couplage entre une méthode analytique d'une part et une méthode statistique d'autre part, assure des résultats avec une précision acceptable dans un minimum de temps simple et avec un coût moindre.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à INRA de Marrakech, pour le fait de nous assurer la collection des échantillons.

References

1. Arana I., Jaren C., Arazuri S. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 13 (2005) 349-357.
2. Brereton R. *Standard for Edible Fats and Oils not Covered by Individual Standards*. (2009).
3. Bertrand D., Dufour E. *Technique & Documentation*. (2nd Edition). (2006).
4. Chang S. K. C., Holm E., Schwarz J., Rayas-Duarte P.. *Food. Analytical Chemistry*. 67 (1995) 127R-153R.
5. Chimi H. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA*. MADREF/DERD. (2001).
6. Christy A. A., Kasemsumran S., Du, Y., Ozaki Y. *Analytical Science*. 20 (2004) 935-940.
7. Collomb M., Butikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O. *International Dairy Journal*. 12 (2002) 649- 659.
8. Cozzolino D., Murray I., Chree A., Scaife J. R. *LWT-Food Science and Technology*. 38 (2005) 821-828.
9. Downey G., McIntyre P., Davies A. N. *Applied spectroscopy*. 57 (2) (2003) 158-163.
10. Dupuy N., Galtier O., Le Dréau Y., Pinatel C., Kister J., Artaud J. *J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 463-475.
11. Dupuy N., Molinet J., Mehl F., Nanlohy F., Le Dréau Y., Kister J. *Industrial Crops and Products*. 43 (2013) 596-601.
12. Elbir M., Moubarik A., Rakib E. M., Grimi N., Amhoud A., Miguel G., Hanine H., Artaud J., Vanloot P., Mbarki M. *Maderas ciencia y tecnologia*. 14 (2012) 361.
13. Eliasson M., Rannar S., Trygg J. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 12 (7) (2011) 996-1004.
14. Etièvant P., Schlich P., Cantagrel R., Bertrand M., Bouvier, J. C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 46 (4) (2006) 421-438.
15. Fang G., Goh J.Y., Tay, M., Lau H.F., Li S.F.Y. *Food Chemistry*. 138 (2012) 1461-1469.
16. Faulstich C., Reniero F., Guillou C. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 38 (6) (2000) 436-443.
17. Galtier O., Dupuy N., Le Dréau Y., Ollivier D., Pinatel C., Kister J., Artaud J. *Analy Chimica Acta*. 595 (2007) 136-144.
18. Galtier O., Le Dréau Y., Ollivier D., Kister J., Artaud J., Dupuy N. *Appl. Spectrosc.* 62 (5) (2008) 583-590.
19. Galtier O., Abbas O., Le Dréau Y., Rebufa C., Kister J., Artaud J., Dupuy N.. *Vib. Spectrosc.* 55 (1) (2011) 132-140.
20. Hernández C. V., Rutledge D. N. *Analyst*. 119 (1994) 1171-1176.
21. Hotelling H. *Journal of Educational Psychology*. 24 (6) (1933) 417-441.

22. Hourant P., Baeten V., Morales M. T., Meurens M., Aparicio R. *Appl. Spectrosc.* 54 (8) (2000) 1168-1174.
23. Iizuka K., Aishima T. *Journal of Food Science.* 62 (1997) 101–104.
24. Karoui R., Dufour E., Pillonel L., Picque D., Cattenoz T., Bosset J. O. *European Food Research and Technology.* 219 (2004a) 184-189.
25. Kim H. J., Rhyu M. R., Kim J. M., Lee S. H. *Cereal chemistry*, 80 (2003) 346-349.
26. Liu L., Cozzolino D., Cynkar W. U., Gishen M., Colby C. B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54 (2006) 6754-6759.
27. MADRPM. Ministère d'Agriculture, de Développement Rural et des Pêches Maritimes. *MAROC*
28. Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J.P., Guerer M. *Food Chemistry.* 97 (2006) 382-393.
29. Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J. P., Guérère M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51 (2003) 5723-5731.
30. Ollivier D., Pinatel C., Dupuy N., Guérère M., Artaud J. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.* 14 (2) (2007) 116-29.
31. Pearson K. *Edinburgh and Dublin Magazine and Journal of Science.* 2 (1901) 559-572.
32. Picque D., Cattenoz T., Corrieu G., Berger J. L. *Sciences des Aliments.* 25 (2005) 207-220.
33. Putzig, C. L., Leugers M. A., McKelvy M. L., Mitchell G. E., Nyquist R. A., Papenfuss R. R. *Analytical Chemistry.* 66 (1994) 26-66.
34. Ruiz del Castillo M. L., Caja M. M., Blanch G. P., Herriaz M. *Journal of Food Protection.* 66 (8) (2003) 1448-1454.
35. Ruoff K., Luginbu hl W., Ku nzli R., Iglesias M. T., Bogdanov S., Bosset J.O. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54 (2006) 6873-6880.
36. Shimoda M., Shibamoto T., Noble A. C. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.* 41 (1993) 1664-1668.
37. Tapp H. S., Defernez M., Kemsley E. K. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51 (2003) 6110-6115.
38. Uccella N. *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2001) 315–327.
39. Wang L., Lee F. S. C., Wang X., He. Y. *Food Chemistry.* 95 (2006) 529-536.

**2. AUTHENTIFICATION CHIMIOMÉTRIQUE DES
HUILES D'OLIVES VIERGES MAROCAINES
(PICHOLINE) PAR CLASSIFICATION
AUTOMATIQUE BASÉ SUR LA COMPOSITION EN
ACIDES GRAS ET EN STÉROLS**

C

HAPITRE 3.

2. AUTHENTIFICATION CHIMIOMÉTRIQUE DES HUILES D'OLIVES VIERGES MAROCAINES PAR CLASSIFICATION AUTOMATIQUE BASÉE SUR LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET EN STÉROLS

Résumé de l'article :

L'authentification par traçabilité des échantillons est une procédure recommandée pour pouvoir garantir l'authenticité de l'huile d'olive. Dans un but de remédier à la problématique du coût du contrôle de la qualité, la classification automatique, grâce à des logiciels, gagne de plus en plus de terrain au sein des oléiculteurs et chercheurs dans le domaine oléicole. Le présent travail s'est consacré à la classification, sur la base de la composition en acides gras et stérols, grâce aux méthodes de PCA, K-means et CAH, des huiles d'olives vierges (HOV). Les diagrammes de dispersion confirment les résultats que nous avons obtenu via l'outil de la base de données. Le fait de ne pas avoir détecté aucune observation assez aberrante confirme que les échantillons ont des provenances similaires, aussi bien variétales que régionales. L'ACP nous a permis de réduire un grand nombre de variables (17 variables) en 9 nouvelles variables en minimisant la perte de l'information. Les résultats de l'application de K-Means et CAH nous ont permis de détecter les échantillons présentant des corrélations entre eux. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a une faible variabilité dans la composition en acides gras et stérols des huiles d'olives vierges produites dans la province marocaine de Meknès.

Mots-clés: Huile d'Olive Vierge, Acides Gras, Stérols, Classification Automatique, PCA, K-Means, CAH.

3.2. Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols)

Cette partie à fait l'objet d'une publication dans le **Journal of Materials and Environmental Science (2013)**.

Elbir, M. Oukrich, J. Moubarik, A. Amhoud, Fakir, M. Berkani, M. Naciri Bennani, M. Mbarki, M. 2014. Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols). *Journal of Materials and Environmental Science*. 5 (1) 101-110.

Abstract

The traceability of the samples is a recommended procedure to ensure the authenticity of virgin olive oil (VOO). The automatic classification is gaining more interest among growers and researchers in the field of olive cultivation, to manage the VOO quality control. The first objective of this work is to characterize, in terms of fatty acids and sterols, virgin olive oil from the Meknes Tafilalt area in Morocco since there is a paucity of research on such a land product as Mediterranean food presenting nutritive and therapeutic values. The second objective is to detect minimal gas chromatographic differences between samples coming from the same cultivar (Moroccan Picholine) and the same geographical area (Meknes Tafilalt). The third objective is to approach the effectiveness and efficiency of the coupling between the gas chromatography on the one hand and on the other chemometric treatment. So, using the Principal Components Analysis (PCA), K-means and Hierarchical Ascendant Clustering (HAC) methods, the present work is devoted to the characterisation and the authentication based on the composition of the Moroccan Picholine VOO variety in terms of fatty acids and sterols. Fatty acids are determined by gas chromatography (GC) after having transformed them to their corresponding metylic esters. The fact of not observing enough aberrant points confirms that the samples have similar varietal and regional origins. The PCA has allowed us to reduce a large number of variables (17 variables) to 7 new ones, respecting the minimization of the information loss. The results of the application of K-Means and HAC on the VOO samples have allowed detecting correlations between them. The results also showed that there is little variability in the content of fatty acids and sterols in the VOO produced in the Moroccan Meknes Tafilalt area.

Keywords: Virgin olive oil; Automatic classification; Principal Components Analysis, K-Means, Agglomerative Hierarchical Clustering.

J. Mater. Environ. Sci. 5 (1) (2014) 101-110
ISSN : 2028-2508
CODEN: JMESC�

Elbir et al.



Chemometric authentication of Moroccan Picholine virgin olive oil by automatic classification based on the composition of fatty acids and sterols

M. Elbir¹, J. Oukrich², A. Moubarik³, A. Amhoud¹, M. Fakir², M. Berkani⁴, M. Naciri Bannani⁵, M. Mbarki^{1*}

¹ Transdisciplinary Team of Analytical Sciences for Sustainable Development, Faculty of Science and Technology, Sultan Moulay Slimane University, PB 523, 23000 Beni Mellal, Morocco

² Team of Processing Information and Communications, Faculty of Science and Technology, Sultan Moulay Slimane University, PB 523, 23000 Beni Mellal, Morocco

³ Institut of Nanomaterials and Nanotechnology, ENSET, Madinat el Irfane, Rabat, Morocco

⁴ Laboratory of Applied Spectrochemistry and Environment, Faculty of Science and Technology, Sultan Moulay Slimane University, PB 523, 23000 Beni Mellal, Morocco

⁵ Laboratory of Chemical Biology Applied to the Environment, Faculty of Sciences, Meknes, Morocco

1- INTRODUCTION

The virgin olive is a natural biochemical complex system presenting a combination of different components that is not easy to be identified only after the difference of the varietal or the geographic origin. Now days, an important role in determining the virgin olive oil (VOO) quality is rising thanks to the automatic classification since it can easily and rapidly identify, characterize and discriminate similar virgin olive oils. Furthermore, such a fast classification is also essential to manage eventual alteration and falsification in VOO [1-3]. The quality of VOO is defined as the set of chemical, physical and sensory parameters, to classify olive oils into different categories according to the effective standards of the International Olive Oil Council [4]. This quality is influenced by a combination of factors such as variety, method of harvesting, extraction process and storage [5-6]. Various works in the world have been invested in the VOO rewarding through analytical methods coupled to chemometrics [7-16]. Moreover, there is a need for fast and simple routine analytical methods to control the quality of the Moroccan Picholine VOO cultivar. PCA, K-Means and HAC methods are coupled to gas chromatography (GC) to obtain a fast, robust and less expensive means for this quality control. In fact, gas chromatography as a still not routine analysis technique should be developed in order that laboratories ensure easily access to such a high cost analysis technique presented as a reference method. Results of analyses of VOOs gas chromatographic characteristics are saved in a data base and one do not need repeat the same analyses for checking each VOO sample whose data are close to some of gas chromatographic characteristics of VOOs in the data base. Coupling a software tool to a sufficient data base of gas chromatographic characteristics leads to results better than those before coupling. So the price/quality ratio would be reduced since the results errors would be at about 2 to 3%. In addition, the analysis time is very small compared to the analysis without such a coupling. Thus, such a coupling would be a profitable investment for routine and industrial laboratories. The present work aims to characterize, in terms of fatty acids and sterols, virgin olive oil from the Meknes Tafilalt area in Morocco and to detect minimal gas chromatographic differences between samples coming from the same variety (Moroccan Picholine) and the same geographical area (Meknes Tafilalt). Other objective of this work is to approach the coupling between the gas chromatography chemometrics. So, we carried out this work on VOO extracted from a Moroccan Picholine olive variety. Moreover, we investigated of fatty acids and sterols contents of Moroccan Picholine VOO in order to develop (GC) method since it remains a relatively expensive analytical means. Chemometrics coupled to GC technique is a way contributing to the easy establishment of different foods mapping. In fact, thanks to the automatic classification anterior studies have discriminated milk, wine and VOO [17-20], according to the geographic origin.

Such fast discrimination, only according to the geographic origin of VOO is very interesting especially for samples coming from the same olive tree variety as the case of the Moroccan VOO since 96% of the olive cultivars are from the same Moroccan Picholine cultivar.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

46 samples of the Moroccan Picholine VOO have been collected in the Meknes Moroccan area, between October 2009 and March 2010. VOO has been extracted by olives mechanical press method, and then stored at 14 °C. We used the International Olive Oil Council [21] and the European Union [22] definitions of the quality of VOO based on the parameters of the quality that are mainly the degree of acidity (expressed as percentage of oleic acid), peroxide value, specific extinction values in the UV absorbance at 232 nm and 270 nm and organoleptic rating. We were especially interested in fatty acids and sterols, two non-volatile chemical constituents classes that we have determined by GC after having transformed them to their corresponding methyl esters that are volatile constituents.

2.2. Gas chromatography

Among all the 46 VOO samples only 20 presented a quality according the International Olive Oil Council (IOOC) standards [21]. So, we prepared methyl esters of fatty acids from these 20 samples of VOO, using the derivation method. The methyl esters were then analyzed by gas chromatograph equipped with a FID. However, the chromatograms coming from the 20 VOOs are so similar that it is very difficult to differentiate between them and so that we proceeded to their automatic classification by algorithms. The chromatograms are then converted into digital data that were processed statistically. We established a database containing the 20 VOO samples that respond to the IOOC standards.

2.3. Analysis of chromatographic data

We analyzed the data to evaluate their dispersion and detect the most aberrant results (Scatterplots) [23].

The principal components analysis (PCA) is a multivariate analysis technique that reduces a large number of original correlated variables to a limited number of new uncorrelated variables with a minimal loss of information. Three steps of PCA were performed, identifying the most aberrant results, calculating a correlation matrix between the original variables and determining factors as new variables.

The main statistical indicators in the extraction of the main factors of inertia, called principal components in PCA, are:

- the eigenvalue λ_i : represents the inertia of the main axis of rank i ;
- the total inertia is equal to the sum of the eigenvalues $I = \sum_{i=1}^n \lambda_i$
- The contribution of each to the total inertia main axis is given by the percentage of inertia

$$\text{CSV}(i) = \frac{\lambda_i}{I} * 100$$

The choice of the number of principal components, to be used to represent data in the new basis of eigen vectors or inertia principal axes, can be done in ways:

Three rules apply:

- Rule Kaiser that retains only factors with eigen values greater than 1
- The number of axes in accordance with the minimum refund information (80%) is chosen
- The "Scree-test" or test of the Coude: It retains only the values that are to the left of the inflection point of the graph eigen values . Graphically, we join the points on a straight line and the components number to retain corresponds to points outside this line.

The linear correlation coefficient R is related to the average by the following relationship:

$$R = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x * \sigma_y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} * \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

If $R = 0$, the variables are not correlated and they are much better correlated if R is far from 0 (close to -1 or 1).

2.4. Classification methods

The main purpose of the clustering methods is to assign to each observation a "tag" class. However, in the case of supervised classification, the available observations would be already a class label, and the objective is to assign a new observation to a class.

2.4.1. K-means [24]

The K-Means algorithm, that has been proposed by Mac-Queen in 1967, is used the present work to classify or group objects based on attributes. The user sets the number of classes to a or k, in principle.

- K classes are constructed with the first k points that are the gravity centers of the classes.
- Among the nk remaining points, we take the first that is assigned to the class whose center of gravity is the closest and then we determine the new gravity center of the class that receives the point.
- The previous step is repeated until exhaustion of all points ($n - (ku) = 0$).
- To obtain the desired partition in a single pass.

2.4.2. Hierarchical ascending classification [25]

The algorithm of hierarchical ascendant clustering (HAC) has been implemented in four stages. The first is an initialization step which consists of the construction of the table of distances regardless of the formula used to construct the algorithm for HAC is independent of the metric. Thus, between each pair of points (x, y) of M , we have a value of $d(x, y)$. The initial partition is finer M . The second step is the grouping that concerns the route table of distances to determine the torque (x^*, y^*) of the most nearby.

$$d(x^*, y^*) \leq \min_{x, y \in M} \{d(x, y)\}$$

It combines the two elements in the same class $A = x^* \cup y^*$ but the other classes remain unchanged. We get a new partition coarser than the previous one. At the third step we draw the table of distances. Class A will be seen as a single point, and then we calculate the distances to the A point in order to have a set cardinality greater than one, and so that all other items, that are not in A, can be singletons. In order ensuring a generality, we note B such as:

$$d(A, B); B \neq A$$

So, we have a new table of distances with one row and one column less than the previous one so that the difference is only by the row and column corresponding to point A.

The fourth and final step is the stop condition that it is achieved when we reached the desired partition level. The partition is generally coarse and has only one class together for all the points. Otherwise, we leave the stage "Combination" from the table of distances that are calculated according the previous grouping.

3. Results

3.1. Gas chromatography

The chromatograms of the 20 VOOs are similar in shape but not identical, and the discrimination between them is very difficult. Figure 1 shows a typical example of these chromatograms. The retention times of the fatty acids from these VOOs are illustrated in table 1.

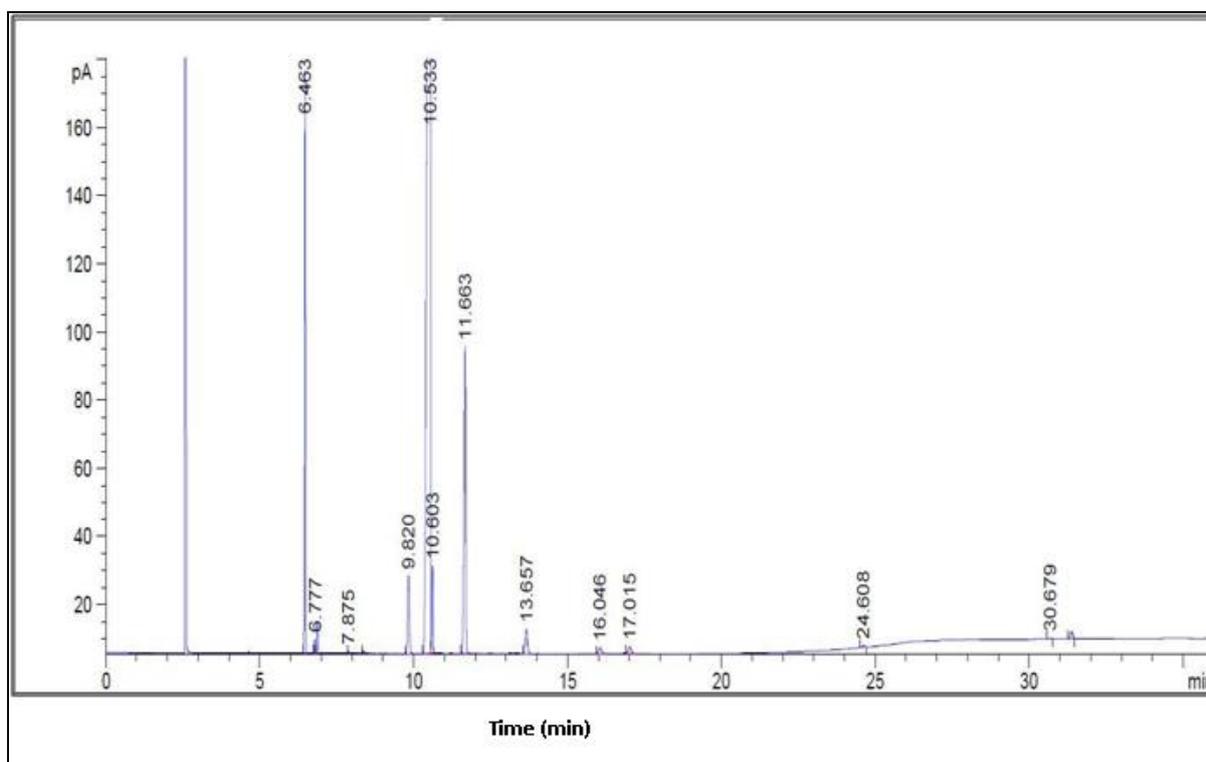


Figure 1. GC chromatogram of VOO from Meknes Moroccan area

Table 1. Main fatty acids in VOO from Meknes Moroccan Regions.

Common name	Palmiti	Stearic	Oleic	Vaccenic	Linoleic	Linoleni.	Arachidi.	Gondoic
Shorthand	16:0	18:0	18:1w9	18:1w7	18:2w6	18:3w3	20:0	20:1w9
Retention time (min)	6.463	9.820	10.533	10.603	11.663	13.657	16.046	17.015

3.2. Principal Components Analysis

The aim of PCA is to reorganise the initial data (table 2) with a large number of variables to a small number of variables obtained by combining the original variables with a relatively high correlation coefficient (table 3). The correlation matrix is shown in the table 3 while the cumulative sum of the variance is presented in the table 4.

Table 2. VOO data base:

MGi and Khj (in lines: samples codes and in columns: fatty acids (Ci) ans sterols (from Chol to Daveno)

	C160	C161	C170	C171	C180	C181	C182	C183	C200	C201	Chol	Brass	Camp	Stigm	CBAS	Dstegm	Daveno
MG04	15	2	0	0.1000	1.5000	62.6000	17.5000	0.3000	0.4000	0.3000	0.2000	0.2000	3.3000	3.3000	94.7000	0.4000	0.6000
MG07	10	0.8000	0	0.1000	2.8000	74.6000	10.7000	0.8000	0.4000	0.4000	0.1000	0	3.3000	0.7000	94.8000	0.4000	0.5000
MG13	8.4000	0.8000	0.1000	0.1000	1.9000	80.2000	7.2000	0.8000	0.3000	0.4000	0.1000	0	3.4000	0.6000	94.6000	0.3000	0.4000
MG23	8.9000	0.7000	0	0.1000	2.2000	76.9000	9.4000	0.8000	0.4000	0.3000	0.3000	0	3.5000	0.6000	94.8000	0.2000	0.2000
MG24	8.7000	0.7000	0	0.1000	2.3000	80.1000	6.1000	0.9000	0.3000	0.4000	0.2000	0	3.2000	1.3000	94.1000	0.4000	0.3000
MG25	8.2000	0.7000	0.1000	0.1000	1.8000	80.7000	7	0.8000	0.3000	0.5000	0.2000	0	3.4000	1.4000	93.5000	0.3000	0.3000
MG34	15.30...	1.8000	0	0.1000	2.9000	63.2000	15.2000	0.8000	0.3000	0.1000	0.2000	0	3.9000	1.4000	93.5000	0.2000	0.3000
MG37	11.30...	0.7000	0	0.1000	2.3000	70.3000	12.3000	1	0.4000	0.1000	0.4000	0	3.5000	1	93.9000	0.5000	0.4000
MG38	11	0.7000	0.1000	0.1000	2.3000	71.2000	12.1000	1	0.4000	0.1000	0.6000	0	3.4000	1.1000	93.9000	0.5000	0.4000
MG59	9.8000	0.8000	0	0.1000	2.5000	75	9.4000	1	0.3000	0.3000	0.1000	0	2.9000	2.8000	93	0.2000	0.3000
Kh05	9.0800	0.5800	0.0400	0.0600	2.6900	77.8200	8.3200	0.7900	0.3200	0.3000	0.1300	0.2100	2.7600	2.0200	90.0800	0.0900	0.2100
Kh14	8.6500	0.5400	0.0400	0.0700	2.2000	81.0200	6.1400	0.7600	0.2900	0.2900	0.2300	0.1700	3.0700	2.0800	92.0100	0.0900	0.1600
Kh21	8.6500	0.5400	0.0400	0.0700	2.2000	81.0200	6.1400	0.7600	0.2900	0.1600	0.2200	0.1500	1.7200	0.3400	87.9800	0.0500	0.1900
Kh23	9.7600	0.6900	0.0400	0.0700	2.1500	76.2600	9.4900	0.9300	0.3000	0.3100	0.2900	0.2900	3.0100	1.9100	91.5000	0.1300	0.1900
Kh24	8.5900	0.6100	0.0300	0.0600	2.5200	77.6100	9.2200	0.7400	0.2800	0.3400	0.0600	0.1000	3.2900	2.6600	92.5400	0.0500	0.2000
Kh25	9.3100	0.5900	0.0400	0.0600	2.2500	78.4300	8.1400	0.7600	0.3000	0.3000	0.1500	0.2300	3.3000	1.2400	92.0400	0.0400	0.3200
Kh27	9.6100	0.5800	0.0300	0.0600	2.5300	77.2800	8.5800	0.7500	0.3000	0.2700	0.0500	0.1300	3.5700	2.4000	88	0.0400	0.0700
Kh38	9.0500	0.6200	0.0300	0.0600	2.4100	76.5700	9.7800	0.8400	0.3100	0.3200	0.1100	0.1100	3.3600	1	92.9300	0.0900	0.2000
Kh43	8.8400	0.6200	0.0400	0.0600	2.7100	75.6000	10.7600	0.7600	0.2800	0.3400	0.1600	0.1400	3.3800	1.2300	93.6300	0.0500	0.1000
Kh46	9.0700	0.6300	0.0300	0.0600	2.5700	76	10.2600	0.7600	0.2800	0.3300	0.7000	0.0800	3.7600	3.8900	90.7700	0.0300	0.2100

The PCA does not give interesting results on tables large enough data: The number of statistical units should be greater than 15 and the number of variables to 4. In this study we have 20 samples and 17 variables.

Table 3. Correlation matrix (for the notations see the table 9 in the glossary)

	C160	C161	C170	C171	C180	C181	C182	C183	C200	C201	Chol	Brass	Camp	Stigm	CBAS	Dstegm	Daveno
C160	1.0000	0.9127	-0.3855	0.4066	-0.0277	-0.9613	0.8974	-0.3501	0.4265	-0.5329	0.1149	-0.0373	0.3203	0.2047	0.2723	0.3882	0.5406
C161	0.9127	1	-0.3308	0.4762	-0.2072	-0.8508	0.8048	-0.5509	0.3059	-0.2169	-0.0488	-0.0685	0.2993	0.2342	0.3880	0.3484	0.5845
C170	-0.3855	-0.3308	1.0000	-0.0805	-0.3345	0.3983	-0.3566	0.1431	-0.2190	0.1834	0.1507	0.0077	-0.0583	-0.2064	-0.0825	0.0031	-0.0704
C171	0.4066	0.4762	-0.0805	1	-0.3121	-0.3870	0.3055	0.1376	0.5898	-0.0615	0.1071	-0.7089	0.1956	-0.2769	0.6928	0.8582	0.7028
C180	-0.0277	-0.2072	-0.3345	-0.3121	1.0000	-0.0472	0.0211	0.3929	-0.2079	-0.2353	-0.0526	-0.1415	0.1518	-0.0150	-0.2096	-0.3188	-0.3945
C181	-0.9613	-0.8508	0.3983	-0.3870	-0.0472	1	-0.9766	0.2882	-0.5042	0.5215	-0.2009	0.1013	-0.4135	-0.2366	-0.3634	-0.4141	-0.5331
C182	0.8974	0.8048	-0.3566	0.3055	0.0211	-0.9766	1.0000	-0.3602	0.5264	-0.4294	0.2198	-0.0479	0.4499	0.2738	0.3896	0.3669	0.5216
C183	-0.3501	-0.5509	0.1431	0.1376	0.3929	0.2882	-0.3602	1.0000	-0.0558	-0.2195	0.2213	-0.4028	-0.0156	-0.3656	0.0158	0.1617	-0.2373
C200	0.4265	0.3059	-0.2190	0.5898	-0.2079	-0.5042	0.5264	-0.0558	1.0000	-0.2891	0.2618	-0.2938	0.1738	-0.2347	0.5041	0.7365	0.6580
C201	-0.5329	-0.2169	0.1834	-0.0615	-0.2353	0.5215	-0.4294	-0.2195	-0.2891	1	-0.3748	0.0164	0.0702	0.1245	0.1977	-0.1293	-0.0271
Chol	0.1149	-0.0488	0.1507	0.1071	-0.0526	-0.2009	0.2198	0.2213	0.2618	-0.3748	1	-0.1502	0.2149	0.1861	0.0363	0.2419	0.0955
Brass	-0.0373	-0.0685	0.0077	-0.7089	-0.1415	0.1013	-0.0479	-0.4028	-0.2938	0.0164	-0.1502	1.0000	-0.3640	0.2949	-0.5195	-0.5697	-0.2988
Camp	0.3203	0.2993	-0.0583	0.1956	0.1518	-0.4135	0.4499	-0.0156	0.1738	0.0702	0.2149	-0.3640	1.0000	0.2130	0.4844	0.2129	0.1419
Stigm	0.2047	0.2342	-0.2064	-0.2769	-0.0150	-0.2366	0.2738	-0.3656	-0.2347	0.1245	0.1861	0.2949	0.2130	1	-0.2270	-0.2613	-0.0529
CBAS	0.2723	0.3880	-0.0825	0.6928	-0.2096	-0.3634	0.3896	0.0158	0.5041	0.1977	0.0363	-0.5195	0.4844	-0.2270	1.0000	0.6704	0.6234
Dstegm	0.3882	0.3484	0.0031	0.8582	-0.3188	-0.4141	0.3669	0.1617	0.7365	-0.1293	0.2419	-0.5697	0.2129	-0.2613	0.6704	1.0000	0.7913
Daveno	0.5406	0.5845	-0.0704	0.7028	-0.3945	-0.5331	0.5216	-0.2373	0.6580	-0.0271	0.0955	-0.2988	0.1419	-0.0529	0.6234	0.7913	1.0000

After the correlation matrix, we observe that several variables are correlated (> 0.5). So, this allows to conclude that the factorization is possible.

Table 4. Cumulative Sum of the variance

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
CSV	36.69	54.94	67.04	75.65	83.39	87.87	91.61	93.84	95.79	97.39	98.33	99.09	99.53	99.92	99.98	99.99	100

The table 4 shows the extraction of the first five principal components that allow taking into account approximately 83.39% of the total inertia.

- Using Kaiser Rule that retain only factors with eigenvalues greater than 1, we can extract five principal components (Figure 2).
- Using the Scree-Test criterion from the eigen values results (Figure 2), the following component numbers 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16 and 17 can be considered on the same straight line. Retained components are the components 1, 2, 3, 4 and 5. They correspond to 83.39% of the initial values of variance (figures 3). The examination of the graph shows a limitation to the extraction of the first five principal components that allow taking into account approximately 83.39% of the total inertia.

The extraction of the principal components from the graphs of the eigen values (Scree test criterion) do not provide the best result, in space. Such situation can be avoided by examining the correlation matrix on the one hand and the other hand by the principal components graph (Figure 4).

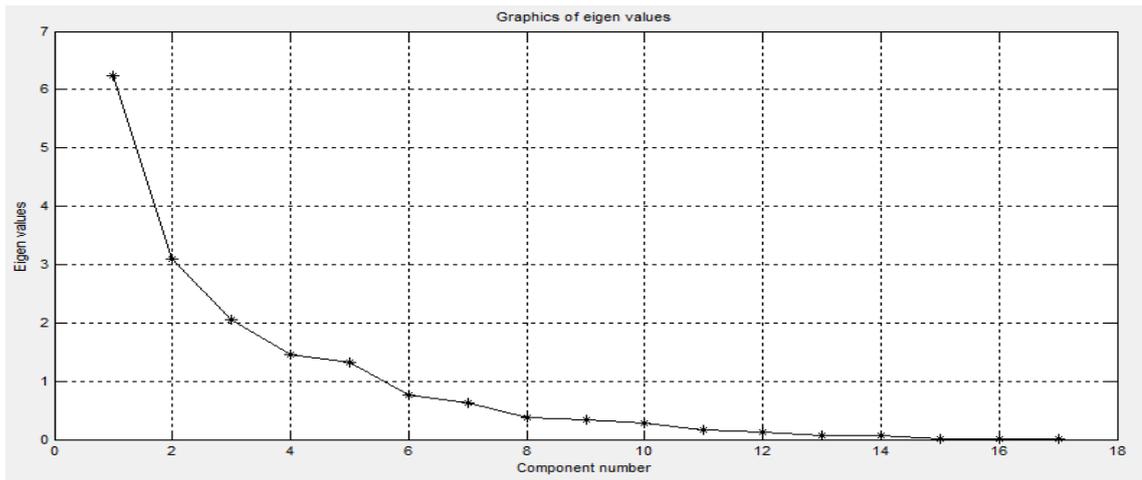


Figure 2. Graph of Eigen values

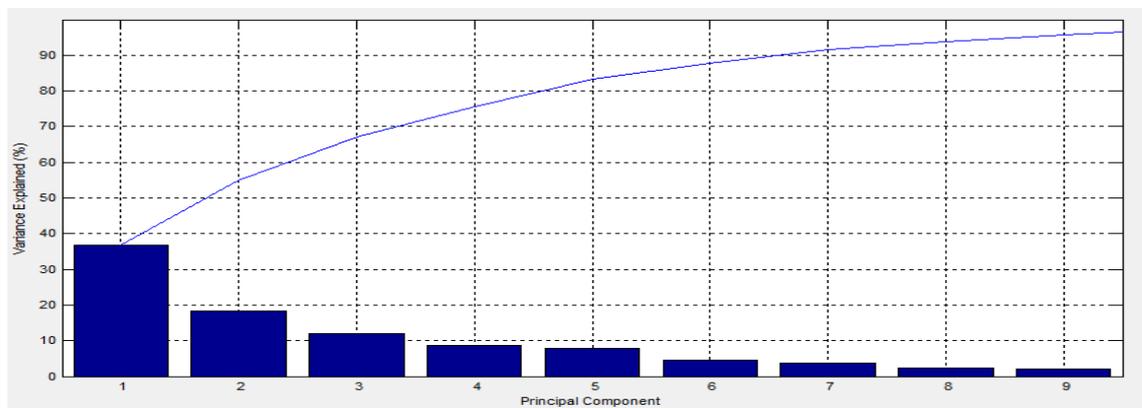


Figure 3. Total variance according to the retained principal components

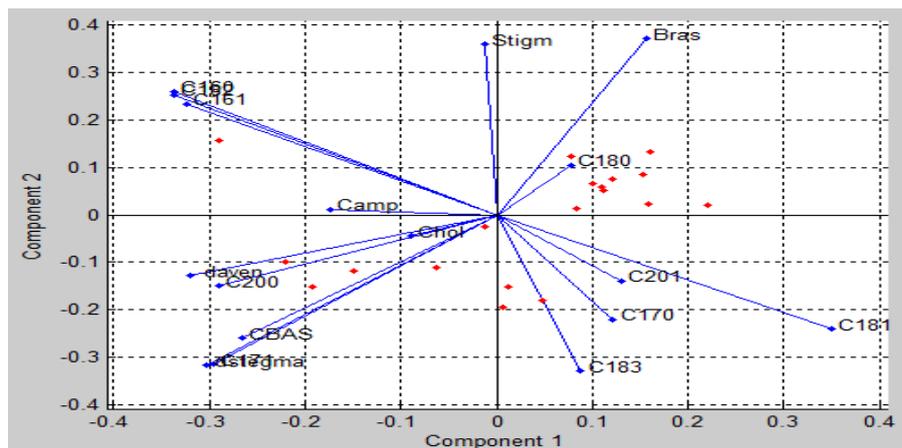


Figure 4. 2 dimensions principal components: PC1 and PC2

The eligible elements for the 7 retained principal components are given in the table 5.

Table 5. Elements of retained principal components

Component	1	2	3	4	5	6	7
Elements	C160,C161,C181,C182,C183	C170, C201	stigm	C180	CHOL	C171,C200,Brass,Cbas, Dstegm,Daveno,	CAMP

3.3. Classification via query (Database)

The execution of the query from database name "oil" (Table 6) gives the results shown in Table 7.

Table 6. Application Selection

Querying a database "olive oil"	SELECT ALL Echantillons,C161,C200,Cholesterol FROM "oil" WHERE C161 BETWEEN 0.3 AND 3.5 AND C170 <= 0.5 AND C171 <= 0.6 AND C180 BETWEEN 0.5 AND 5 AND C181 BETWEEN 55 AND 83 AND C182 BETWEEN 3.5 AND 21 AND C183 <= 1.5 AND C200 <= 0.8 AND Cholesterol <= 0.5
--	--

Table 7. Query Results

Samples	MG04	MG07	MG13	MG23	MG24	MG25	MG34	MG37	MG59
C161	2	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	1.8	0.7	0.8
C200	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3
Cholesterol	0	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	0.2	0.4	0.1
Samples	Kh05	Kh14	Kh21	Kh23	Kh24	Kh25	Kh27	Kh38	Kh43
C161	0.58	0.54	0.54	0.69	0.61	0.59	0.58	0.62	0.62
C200	0.32	0.29	0.29	0.3	0.28	0.3	0.3	0.31	0.28
Cholesterol	0.13	0.23	0.22	0.29	0.06	0.15	0.05	0.11	0.16

The database allows us to conclude that the two samples KH46 and MG38 are not in concordance of the standards of the olive oil quality [4, 21].

3.4. Data dispersion Diagram

The data dispersion diagram is presented in the figure 5 allows us to deduce the most outliers.

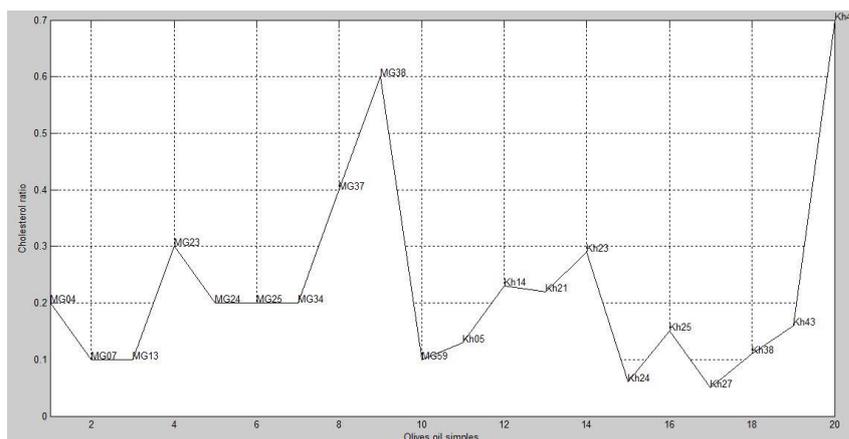


Figure 5. Samples dispersion diagram according to the cholesterol ratio

This diagram, in figure 5, confirms to us to conclude that the two samples KH46 and MG38 are not in concordance of the standards of the olive oil quality.

3.5. Classification by K-Means

The table 8 illustrates the classification results after using a K-means method.

Table 8. Classification by the K-means method (K=2, K=5, K=10 and K=14), K is number of classes.

	2	5	10	14			
	N° Class	N° Class	N° Class	N° Class			
MG04	2	MG04	4	MG04	2	MG04	4
MG07	1	MG07	5	MG07	3	MG07	1
MG13	1	MG13	1	MG13	6	MG13	10
MG23	1	MG23	5	MG23	3	MG23	6
MG24	1	MG24	1	MG24	6	MG24	9
MG25	1	MG25	1	MG25	6	MG25	9
MG34	2	MG34	4	MG34	1	MG34	5
MG37	2	MG37	3	MG37	8	MG37	7
MG38	2	MG38	3	MG38	7	MG38	7
MG59	1	MG59	5	MG59	5	MG59	11
Kh05	1	Kh05	2	Kh05	9	Kh05	3
Kh14	1	Kh14	1	Kh14	6	Kh14	13
Kh21	1	Kh21	2	Kh21	10	Kh21	14
Kh23	1	Kh23	5	Kh23	5	Kh23	11
Kh24	1	Kh24	5	Kh24	4	Kh24	2
Kh25	1	Kh25	1	Kh25	4	Kh25	2
Kh27	1	Kh27	2	Kh27	9	Kh27	8
Kh38	1	Kh38	5	Kh38	3	Kh38	6
Kh43	1	Kh43	5	Kh43	3	Kh43	6
Kh46	1	Kh46	5	Kh46	5	Kh46	12

After the increasing number of the classes and using the Euclidean gap, we observe that elements of classes change from one class to another according to the closest distance. The problem is the virtue of the choice of the number of classes in principle. To remedy this problem, we applied the HAC method.

3.6. Classification by HAC

HAC method overcomes the problem of initialization of the classes number. The classification result is shown in the figure 6.

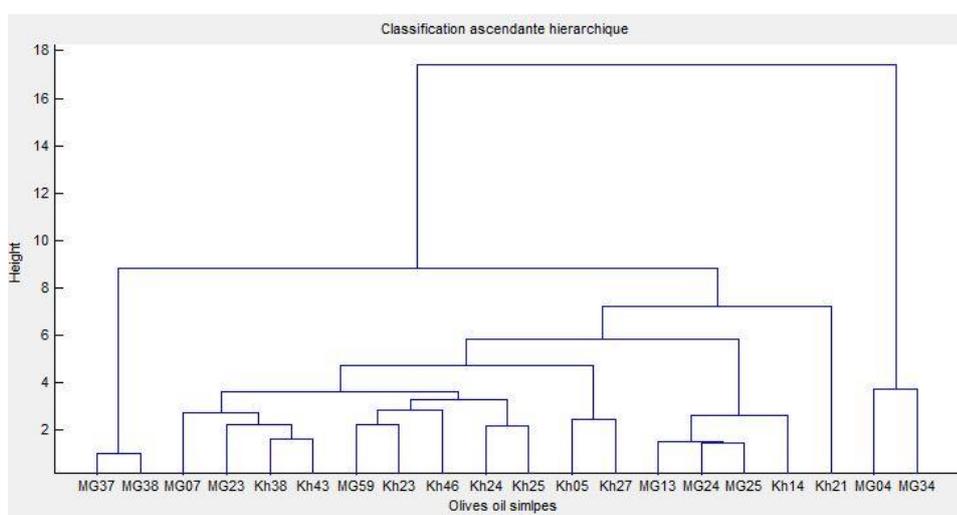


Figure 6. Classification dendrogram the by the HAC method

This dendrogram allows us to deduce that the two samples MG04 and MG34 have similar properties and are somewhat different from other samples such as MG37, KH43 and MG13. This method aims to remedy the problem of initialization of the classes number.

4. Discussion

Several factors affects the quality of the VOO that is known as a food which is very exposed to the degradation, especially because of its oxidation and increasing free fatty acid contents in the vegetal oil. Among the parameters determining the VOO quality there is the variety of olive, maintenance of soil, climate, irrigation, processing plant, olives harvesting method and their conservation before crushing them, mode of extraction and storage of the oil. In the present work, the quality of the VOO is defined according to the IOOC standards and then determined after the procedures of such organism.

Since the initial chromatogram (figure 1) of the samples cannot easily allow discriminating VOOs coming from the same Moroccan Picholine tree cultivar, it is very important that we used a fast robust means like the classification by algorithms. In the present work, the classification tools allowed us to conclude that almost all the 20 samples of the database are according to IOOC standards in terms of the olive oil quality, exception to the Kh46 and MG38 samples. The PCA has, also, allowed us to reduce a large number of variables (17 variables) to 7 new ones respecting the minimization of the information loss (figures 2-4). The diagram in the figure 5 concerning the samples scatterplots based on cholesterol confirm the results we obtained using the tool database. From this diagram, we conclude that the Kh46 and MG38 samples have cholesterol ratio that is greater than 0.5. Effectively, these two samples do not respond to the criteria of the VOO quality according to IOOC standards. Actually, scatterplots of data plays a very important role for the identification of the most aberrant observations and it is an essential step in the principal components analysis (PCA) and other analysis. The fact that we did not detect any aberrant observation confirms that the varietal origin is the same for all the samples. Moreover, the geographic origin is similar for all VOOs since collecting of olives were in a same geographic area, in Morocco.

After the K-Means application (table 8), if we make the number of class increasing successively we see that, using the Euclidean distance, the elements classes change from one class to another according to the closest distance. However, the problem is the virtue in the choice of the class number. To remedy this problem, we applied the CAH method. The results of K-Means application and HAC (figure 6) show that the MG04 sample has proprieties that is similar to those of the MG34. In fact, the HAC dendrogram in the figure 6 allows us to deduce that the two samples MG04 and MG34 have similar properties and that are slightly different compared to other samples such as MG13, MG37, and Kh43. In addition, several previous studies have shown that chemometrics can be coupled to various analytical chemical methods to ensure authentication of foods like the VOOs especially when they present very similar macroscopic and microscopic characteristics. In fact, the Raman spectroscopy was performed, using linear discriminating analysis (LDA), to identify adulteration in VOOs by soybean oil [8]. To discriminate French VOOs that are registered as designations of origin (RDOS) and thanks to chemometrics, Ollivier D. and al. have in 2006 [12], also, used sensory and chromatography characteristics like fatty acid and triacylglycerol compositions. In fact, a linear discriminating analysis on samples that are described by 37 parameters allows them the differentiation of these RDOS VOOs. In 2011, using to the hierarchical ascendant clustering (HAC) analysis, derivative FTIR spectroscopy have allowed De Luca M. and al. [14] the classification of Moroccan VOOs. However, the results shown in the five figures, figure 2 to figure 6, would be original and interesting for studying the Moroccan Picholine olive cultivar.

Actually, the present work allows a tool of coupling gas chromatography and chemometric methods (PCA, K-Means and HAC) for an automatic classification of the Moroccan virgin olive based on its fatty acids and sterols contents. In fact, these constituents are very important since the fatty acids are known for their nutritional and therapeutic values and the sterols present a cholesterol-lowering effect [26-28]. Such a tool is useful to overcome the problematic of finding fast and robust method in all the fields of quality control like in customs service that checks food quality and in routine food analysis laboratory. The coupling between methods, as it is presented in the present work, contributes to the development of the gas chromatography, as initially expensive analysis technique, in order that routine laboratories have easier access to it. Actually, such coupling ensures gain in terms of time and analysis cost. In addition, we are interested in extension of the present work by using other techniques of automatic classification, such as: methods of neural network, SVM, decision tree and Bayesian network method to calculate the probabilities of the elements influence on the quality of VOO.

5. Conclusion

In the present work, the integral results of PCA, K-Means and HAC show that there are concordances and complementarities in the way of minimizing the gas chromatographic information loss. Now days, it is important to discriminate between virgin olive oils having a same varietal origin because such discrimination is not easy as an analysis means eventhough the olive geographic origin is different. In the present work the VOOs have the same varietal origin that is called the Moroccan Picholine and the area in were we collected olives is almost similar since it is the Moroccan Meknes Tafilalt area. Thanks to an automatic classification based on gas chromatographic characteristics in terms of fatty acids and sterols, the present work has allowed to autentificate very similar Moroccan Picholine virgin olives. The coupling between physical or chemical method and chemometrics optimizes the analysis cost in terms of time, human resources, equipment and chemical reagents. Chemometrics opens new horizons to green chemistry and sustainable development as a means of developing analytical methods, in various fields applying the quality control of products like in the fraud prevention.

Acknowledgements

Our thanks go to the "Huilerie Céréales Industries" company in Meknes in Morocco, for ensuring the collection of the virgin olive oils.

Glossary**Table 9.** Notations of the fatty acids and the sterols in the VOO.

	Characteristics	Notations	Common name
Fatty Acids	C16 :1	C161	Palmitic acid
	C17 :0	C170	Margaric acid
	C17 :1	C171	Heptadecenoic acid
	C18 :0	C180	Stearic acid
	C18 :1	C181	Oleic acid
	C18 :2	C182	Linoleic acid
	C18 :3	C183	linolenic acid
	C20 :0	C200	Arachidic acid
Sterols	Cholesterol	Chol	Cholesterol
	Campesterol	Camp	Campesterol
	Brassicasterol	Brass	Brassicasterol
	Delta7avenosterol	DAVEN	Δ7 Avenosterol
	Cholesterol + Betasitosterol + Δ 5Avenosterol + Δ 24 stigmasterol	CBAS	Cholesterol + Betasitosterol + Δ5Avenosterol + Δ24 stigmasterol

References

1. Aguilera M. P., Beltràn G., Ortega D., Fernàndez A., Jiménez A., & Uceda M. *Food Chemistry*. 89 (2005)387.
2. Lai Y. W., Kemsley E. K., Wilson R. H. *J Agri Food Chem*. 42 (1994) 1154.
3. Luna G., Morales M. T., Aparicio R. *Food Chemistry*. 98 (2006) 243.
4. Conseil oléicole international, COI/T15/NC, n° 2/Rev., (1997)
5. Pinatel C., Petit C., Ollivier D., Artaud J. *Oléagineux, corps gras, lipides*. 11(2004) 217.
6. Tsimidou M. Z., Georgiou A., Koidis A., Boskou D. *Food Chemistry*. 93 (2005) 377.
7. Guillén M. D., Uriate P. S. *Food Chemistry*. 134 (2012) 162.
8. Mooeung K., Sanguk L., Kyeol C., Hoeil C., Young M. *J. Analy Chimica Acta*. 748 (2012) 58.
9. Maria L. C., Debora D., Tommaso G., Giancarlo C. *Food Chemistry*. 102 (2007) 571.
10. Pristouri G., Badeka A., Kontominas M.G. *Food Control*. 21 (2010) 412.
11. Elbir M., Moubarik A., Rakib E. M., Grimi N., Amhoud A., Miguel G., Hanine H., Artaud J., Vanloot P., Mbarki M. *Maderas ciencia y tecnologia*. 14 (2012) 361.
12. Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J.P., Guerer M. *Food Chemistry*. 97 (2006) 382-393.
13. Veillet S., Tomao V., Bornard I., Ruiz K., Chemat F. *C. R. Chimie*. 12 (2009) 895.
14. De Luca M., Terouzi W., Ioele G., Kzaiber F., Oussama A., Oliverio F., Tauler R., Ragno G. *Food chemistry* . 124 (2011) 1113.
15. Rubén M. M., Lorenzo C., Emma C., Teodoro S. K., Alessandra B. *Food Control*. 21 (2010) 890.
16. Galtier O., Dupuy N., Le Dréau Y., Ollivier D., Pinatel C., Kister J., Artaud J. *Analy Chimica Acta*. 595(2007) 136.
17. Collomb M., Butikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O. *Inter Dairy J*. 12 (2002) 649.
18. Etièvant P., Schlich P., Cantagrel R., Bertrand M., Bouvier J.C. *J Scie Food Agri*. 46(2006) 421.
19. Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J. P., Guèrère M. *J Agri Food Chem*. 51 (2003) 5723.
20. Shimoda M., Shibamoto T., Noble A. C. *J Agri Food Chem*. 41 (1993) 1664.
21. Conseil Oléicol International, COI/T.15/NC, n° 2/Rév., (2001)
22. EC. Commission regulation (EEC), *Official J L*, 248 (1991) 0001.
23. Selim S. Z., Ismail M. A. *Pattern Analy Mach Intelli*. 6(1984) 81.
24. Ritschard G. *Extraction et gestion des connaissances*. 1(4) (2001)185.
25. Greenacre M.G. *Academic Press, London*, (1984).
26. Turpeinen A.M., Kumpu M., Rönnback M., Seppo L., Kautiainen H., Jauhiainen T., Vapaatalo H., Korpela R. *Journal of Functional Foods*. 1(3)(2009) 260

27. Anne Doggrel S. *Complementary Therapies in Medicine*. 19 (1) (2011) 37

28. Musa-Veloso K., Poon T. H., Ann Elliot J., Chung C. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 85(1) (2011) 9