

Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique
et de la Technologie

*** * ***

Université du Carthage

*** * ***

Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie

*** * ***

Ecole doctorale des sciences de l'ingénieur



THESE

Présentée à

L'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

En

Génie Biologique

Par

Fathia AOUIDI

Etude et Valorisation des Feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans l'Industrie Agro-Alimentaire

Soutenue publiquement le 17/02/2012, devant le jury composé de :

Pr. Mohamed Néjib MARZOUKI	<i>INSAT-Tunis</i>	Président
Pr. Hamadi ATTIA	<i>ENIS-Sfax</i>	Rapporteur
Pr. Mohamed BOUSSAID	<i>INSAT-Tunis</i>	Rapporteur
Pr. Mohamed HAMMAMI	<i>Faculté de Médecine-Monastir</i>	Examineur
Pr. Sevastianos ROUSSOS	<i>IMEP-Marseille</i>	Invité
Pr. Moktar HAMDI	<i>INSAT-Tunis</i>	Directeur de thèse

***“One never notices what has been done;
One can only see what remains to be done”***

Marie Curie

Dédicaces

*A ceux qui m'ont donné sans rien en retour,
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles,
Et ceux à qui je dois tant*

*A mes chers parents pour leur amour et leur support continu,
Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies.
Je suis très heureuse et fière de votre présence à mes côtés.
Et j'espère vous honorer par le titre de Docteur.*

*A mon cher frère,
A mes très chères sœurs et à mes beaux-frères.
A mes adorables nièces et neveu.*

*A toute ma famille,
A tous mes enseignants du primaire, du secondaire et du supérieur,
A tous mes ami(e)s*

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour
tout ce que vous avez fait pour moi
Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et tranquillité.*

Remerciements

C'est autant de plaisir qu'un devoir de présenter tous ceux qui, chacun dans son domaine, m'ont aidé afin que je puisse mener à bien ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

Ce travail a été réalisé en partie en Tunisie (Tunis) au Laboratoire d'Ecologie et de Technologie Microbienne et en partie en France (Marseille) à L'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocécologie (UMR CNRS 6116/IRD UMR 193. Equipe d'Ecologie Microbienne et Biotechnologies) et à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (UMR 6263. Equipe AD²EM. Groupe systèmes chimiques complexes).

Je remercie tout d'abord Mr. Moktar HAMDI, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie et Directeur du Laboratoire d'Ecologie et de Technologie Microbienne, qui m'a accepté de travailler dans son laboratoire et qui m'a encadrée tout au long de ma thèse. Ses conseils pertinents et ses encouragements m'ont beaucoup aidée pour mener à terme ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute reconnaissance et de mon profond respect.

J'assure ma profonde gratitude à Mr Mohamed Néjib MARZOUKI, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, pour l'honneur qu'il m'a fait de présider le jury d'examen de ma thèse.

Mes remerciements vont également à Mr Hamadi ATTIA, Professeur à l'Ecole National des Ingénieurs de Sfax et à Mr Mohamed BOUSSAID, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Merci pour toutes les remarques constructives apportées à ce manuscrit.

Mr Mohamed HAMMAMI, Professeur à la faculté de médecine de Monastir, me fait l'honneur et le plaisir d'avoir accepté d'être examinateur de mon manuscrit de thèse.

Je remercie également Mr. Thierry TATONI, le directeur de l'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocécologie, de m'avoir accueilli au sein de son institut.

Je suis très reconnaissante, en particulier, à Mr. Sevastianos ROUSSOS, Directeur de Recherche à l'IRD et directeur adjoint de l'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocécologie, de m'avoir accepté de travailler dans son laboratoire. Mr. ROUSSOS, je vous remercie énormément pour toutes vos aides, pour vos remarques judicieuses, pour votre gentillesse, pour votre serviabilité, pour m'avoir facilité la participation à des manifestations scientifiques.

Mes profonds remerciements vont également à Mr. Jacques ARTAUD, Professeur émérite à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, qui n'a pas hésité de m'aider dans tous les étapes de préparation de mes deux articles sur l'application de la spectroscopie infrarouge sur les feuilles d'olivier.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à Mme Nathalie DUPUY, Professeur à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, pour ses aides dans les analyses de la spectroscopie infrarouge et les traitements chimiométriques.

Mes remerciements s'adressent à Mme Isabelle PERRAUD-GAIME, chargée de recherche à l'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie, pour sa rigueur scientifique et pour m'avoir appris de marcher avant de courir.

Je remercie aussi Mr. Monji MSALLEM, chef du laboratoire à l'Institut d'Olivier, et son équipe pour ses conseils pertinents et ses aides dans l'échantillonnage des feuilles d'olivier.

J'exprime à M^{elle} Samia AYARI, ingénieur au centre National des sciences et Technologies Nucléaires, mes remerciements les plus amicales pour toutes ses aides, principalement, dans les traitements d'irradiation.

Ma reconnaissance va également à Nada BEN OTHMEN, Taroub BOUZAIAN, Najla BEN MILOUD et Salma HLEL, pour m'avoir fournir des souches microbiennes.

Il m'est agréable aussi de remercier tous les étudiants que j'ai encadré, tout le personnel, tous les chercheurs doctorants et docteurs du Laboratoire d'Ecologie et de Technologie Microbienne et du l'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie (Equipe d'Ecologie Microbienne et Biotechnologies), pour l'ambiance amicale et agréable du travail.

A tous mes enseignants, depuis l'école primaire, qui m'ont bénéficié de leur savoir et leur compétence. Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de mon grand respect.

Enfin, je ne saurais oublier ma famille et mes amies pour leur soutien continu et inconditionnel, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Liste des publications de la thèse

Articles

1. **F. Aouidi**, S. Ayari, H. Ferhi, S. Roussos, M. Hamdi. Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. **Food Chemistry (2011)**, 127, 1105-1113.
2. **F. Aouidi**, N. Dupuy, J. Artaud, S. Roussos, M. Msallem, I. Perraud-Gaime, M. Hamdi. Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves. **Food Chemistry (2012)**, 131(1), 360-366.
3. **F. Aouidi**, N. Dupuy, J. Artaud, S. Roussos, M. Msallem, I. Perraud-Gaime, M. Hamdi. Rapid quantitative determination of Oleuropein in olive *Olea europaea* leaves using Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses. **Industrial Crops and Products (2012)**, 37(1), 292-297.
4. **F. Aouidi**, M. Hamdi. Antioxidant capacity and phenolic content in olive leaves tisane as Affected by Boiling Treatment (**En préparation**).
5. **F. Aouidi**, A. Okba, M. Hamdi. The application of olive leaf extract to control *Salmonella enterica* Zanzibar growth on minced beef meat during refrigerated storage (**En préparation**).

Communications par affiche

1. **F. Aouidi**, A. Okba, M. Hamdi. Augmentation de la DLC des viandes bovines hachées par addition d'extrait phénolique des feuilles d'olivier. 22^{ème} Journées Biologiques et 6^{ème} Journées de Biotechnologie (Mars2011) organisées par l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques.

Liste des Figures

- Fig. 1. Oliveraie à Béja (Nord ouest de la Tunisie).
- Fig. 2. Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde.
- Fig. 3. Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen.
- Fig. 4. Sites et répartition géographique des variétés autochtones et des types locaux d'olivier en Tunisie.
- Fig. 5. Les feuilles d'olivier, sous produit de l'industrie oléicole, engendré en grande quantité lors de la récolte (a et b), en huilerie (c) et après la taille des oliviers (d).
- Fig. 6. Formules brute et chimique d'une fonction phenol.
- Fig. 7. Effets biologiques des polyphenols.
- Fig. 8. Structure chimique de quelques composés phénoliques identifiés dans les feuilles d'olivier.
- Fig. 9. Les différentes formes d'utilisation des feuilles d'olivier pour la consommation humaine.
- Fig. 10. Evolution des préoccupations de l'industrie agroalimentaire.
- Fig. 11. Le positionnement d'un aliment fonctionnel en se basant sur le degré technologique.
- Fig. 12. La flore bactérienne susceptible de se développer sur la viande.
- Fig. 13. Relation entre la forme chimique de la myoglobine et la couleur de la viande.
- Fig. 14. Le spectre électromagnétique.
- Fig. 15. Attribution des bandes d'absorption dans le moyen infrarouge.
- Fig. 16. Schéma de principe d'un spectromètre IR dispersif.
- Fig. 17. Schéma de principe d'un spectromètre IR à transformée de Fourier.
- Fig. 18. Spectromètre moyen infrarouge à transformé de fourrier (Avatar).
- Fig. 19. Photo de la fenêtre d'acquisition des spectres MIR par le logiciel OMNIC.
- Fig. 20. Cellule d'irradiation contenant la source radioactive de ^{60}C .
- Fig. 21. Chromatogramme HPLC d'un extrait des feuilles d'olivier. Détection à 280 nm. Identification des pics : (1) Hydroxytyrosol ; (2) (+)-Catéchine ; (3) Acide caféique ; (4) Verbascoside ; (5) Oleuropéine ; (6) Rutine.
- Fig. 22. Structure chimique des 6 composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier.
- Fig. 23. Cinétique de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* (a) et *Lactobacillus plantarum* (b) dans MRS broth, de *Salmonella enterica zanzibar* (c) dans le bouillon sélénite cystéine, de *Listéria monocytogenes* (d), de *Bacillus Cereus* (e) et de *Pseudomonas Aeruginosa* (f) dans le bouillon nutritif en présence de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.
- Fig. 24. Courbes du survies de 6 souches bactériennes (*Lactobacillus rhamnosus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b), *Salmonella enterica zanzibar* (c), *Listéria monocytogenes* (d), *Bacillus cereus* (e) et *Pseudomonas aeruginosa* (f)) en fonction de la concentration de l'extrait des feuilles d'olivier ; Détermination de la dose de réduction décimale D_{10} .
- Fig. 25. Cinétique du survivants de *Salmonella enterica zanzibar* (a), *Listéria monocytogenes* (b), *Bacillus cereus* (c) et *Pseudomonas aeruginosa* (d) dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C.

Fig. 26. Effet de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier sur la thermorésistance de *Salmonella enterica zanzibar* (a), *Listéria monocytogenes* (b), *Bacillus cereus* (c) et *Pseudomonas aeruginosa* (d) dans la viande bovine hachée.

Fig. 27. Evolution du nombre de la flore mésophile aérobie totale FMAT (a) et des coliformes totaux CT (b), exprimé en \log_{10} UFC/g, dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C.

Fig. 28. Evolution du nombre de la flore mésophile aérobie totale FMAT, exprimé en UFC/g, au cours de la conservation, à 4°C (◆), 30°C (■) et 37°C (▲), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

Fig. 29. Evolution du nombre de la flore mésophile aérobie totale FMAT, exprimé en Ln UFC/g, au cours de la conservation, à 4°C (◆), 30°C (■) et 37°C (▲), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

Fig. 30. Evolution du nombre des coliformes totaux CT, exprimé en UFC/g, au cours de la conservation, à 4°C (◆), 30°C (■) et 37°C (▲), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

Fig. 31. Evolution du nombre de coliformes totaux CT, exprimé en Ln UFC/g, au cours de la conservation, à 4°C (◆), 30°C (■) et 37°C (▲), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

Fig. 32. Régression linéaire entre l'inverse de la température et la vitesse spécifique (en Ln k) de l'évolution du nombre des FMAT au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Fig. 33. Régression linéaire entre l'inverse de la température et la vitesse spécifique (en Ln k) de l'évolution du nombre des CT au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Fig. 34. Les DLC des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait des feuilles d'olivier à différentes doses selon le critère nombre FMAT (a) et nombre CT (b).

Fig. 35. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la capacité de rétention d'eau dans les viandes bovines hachées crues après 12 jours de conservation à 4°C.

Fig. 36. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte à la cuisson des viandes bovines hachées après leur traitement dans un bain marie à 80°C pendant 15 min.

Fig. 37. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte à la décongélation des viandes bovines hachées après une conservation à -10°C pendant 2 semaines.

Fig. 38. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur le rendement technologique de NAPOLE.

Liste des Tableaux

- Tableau 1. Principaux variétés cultivées et leurs utilisations.
- Tableau 2. Techniques de discrimination et d'identification des variétés d'olivier.
- Tableau 3. Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.
- Tableau 4. Composition en acides aminées des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azote total).
- Tableau 5. Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g par Kg de matière sèche).
- Tableau 6. Classification des composés phénoliques.
- Tableau 7. Bibliographie des composés phénoliques identifiés dans les feuilles d'olivier.
- Tableau 8. Données quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier.
- Tableau 9. Bibliographie sur les mécanismes d'action et indications cliniques des extraits des feuilles d'olivier.
- Tableau 10. La teneur en oleuropéine (en mg/g) dans les fruits et feuilles d'olivier de différentes variétés italiennes.
- Tableau 11. Les techniques et conditions du dosage d'oleuropéine et leur teneur dans les feuilles d'olivier.
- Tableau 12. Une revue bibliographique sur les utilisations des feuilles d'olivier.
- Tableau 13. Une revue bibliographique sur les technologies appliquées sur les feuilles d'olivier.
- Tableau 14. Exemples des composés fonctionnels, leurs sources et leurs bienfaits potentiels pour la santé humaine.
- Tableau 15. Exemples d'aliments fonctionnels.
- Tableau 16. Composition des éléments nutritifs (par 100 g) de viande rouge maigre.
- Tableau 17. Genres des bactéries détectées dans la viande et volaille.
- Tableau 18. Exemples d'altération microbienne des viandes et produits carnés et les bactéries impliquées.
- Tableau 19. Les techniques de conservation des viandes et produits carnés.
- Tableau 20. Effet des additifs sur les viandes et produits carnés.
- Tableau 21. Les applications de la spectroscopie MIR.
- Tableau 22. Gradient de la phase mobile de la HPLC.
- Tableau 23. Milieux de culture et conditions d'incubation des germes analysés.
- Tableau 24. Caractéristiques qualitatives et quantitatives des 6 composés phénoliques identifiés, par HPLC, dans un extrait des feuilles d'olivier.
- Tableau 25. Biomasses produites et vitesses maximales de croissance de 6 souches bactériennes en milieux synthétiques liquides supplémentés par d'extrait des feuilles d'olivier à différentes concentrations.
- Tableau 26. Temps de réduction décimale T_{10} (jours) de *Salmonella enterica zanzibar*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C.

Tableau 27. Temps de réduction décimale T_{10} (min) de *Salmonella enterica zanzibar*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans la viande bovine hachée supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et soumis à un traitement thermique à 100°C pendant 30 min.

Tableau 28. Les vitesses spécifiques k et les coefficients de corrélation R^2 relative à la régression linéaire de l'évolution du nombre des FMAT (en Ln UFC/g) au cours de la conservation, à 4°C, 30°C et 37°C, des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Tableau 29. Les vitesses spécifiques k et les coefficients de corrélation R^2 relative à la régression linéaire de l'évolution du nombre des CT (en Ln UFC/g) au cours de la conservation, à 4°C, 30°C et 37°C, des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Tableau 30. Les valeurs de k_0 et E_a relatives à l'évolution du nombre des FMAT et CT au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Tableau 31. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'oxydation de la myoglobine en metmyoglobine dans les viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Tableau 32. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'oxydation des lipides dans les viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Tableau 33. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'évolution du pH des viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Tableau 34. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte d'exsudat à partir viandes bovines hachées crues durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Tableau 35. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur les critères sensoriels des viandes bovines hachées crues et cuites.

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

❖ Etude bibliographique

1. L'olivier	3
1.1. Classe botanique.....	3
1.2. Situation dans le monde.....	3
1.3. Situation en Tunisie.....	4
1.4. Les variétés tunisiennes.....	5
1.5. Techniques d'identification et discrimination des variétés d'olivier.....	6
2. Les feuilles d'olivier	9
2.1. Biomasse énorme.....	9
2.2. Composition	9
2.3. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier.....	11
2.3.1. Généralité sur les composés phénoliques.....	11
2.3.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques.....	11
2.3.1.2. Classification des composés phénoliques.....	11
2.3.1.3. Activités biologiques des composés phénoliques.....	11
2.3.2. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques.....	13
2.3.3. Intérêts des feuilles d'olivier pour la santé humaine.....	18
2.3.4. L'oleuropéine : intérêt, teneur et méthode de sa quantification dans les feuilles d'olivier.....	20
2.4. Les voies de valorisation des feuilles d'olivier.....	23
2.5. Les technologies appliquées sur les feuilles d'olivier.....	26
3. Les aliments fonctionnels et les produits nutraceutiques	29
3.1. Définition	29
3.1.1 Définition des aliments fonctionnels.....	29
3.1.2. Définition des produits nutraceutiques.....	30
3.2. Apparition et rôles des aliments fonctionnels.....	30
3.3. Les facteurs liés à l'apparition des aliments fonctionnels.....	33
3.4. Le positionnement d'un aliment fonctionnel.....	34
3.5. Exemples des aliments fonctionnels.....	34
4. La viande	35
4.1. Composition	35
4.2. Les critères de qualité des viandes.....	35
4.3. Les altérations de la viande.....	36
4.3.1. Les altérations microbiologiques.....	36
4.3.2. Les altérations physicochimiques	39
4.3.3. Les altérations organoleptiques.....	40
4.4. Les méthodes de conservation des viandes.....	41
4.5. Amélioration de la valeur fonctionnelle des viandes.....	44
4.6. Effet des additifs sur les viandes et produits carnées	45

5. La spectroscopie moyen infrarouge et l'analyse chimiométrique.....	47
5.1. Le principe de la spectroscopie moyen infrarouge	48
5.2. Les avantages et les inconvénients de la spectroscopie moyen infrarouge.....	49
5.3. Instrumentation de la spectroscopie moyen infrarouge.....	50
5.4. Analyse chimiométrique.....	53
5.4.1. Définition.....	53
5.4.2. L'apport des méthodes chimiométriques au traitement des spectres infrarouges.....	53
5.4.3. Classification des techniques chimiométriques appliquées sur les spectres MIR.....	54
5.4.4. Etapes de construction des modèles et critères de validation.....	55
5.5. Applications de la spectroscopie moyen infrarouge.....	57

❖ Matériel et méthodes

1. Matériel biologique.....	59
1.1. Feuilles d'olivier	59
1.2. Souches microbiennes.....	59
1.3. Viande bovine hachée.....	59
2. Méthodes physicochimiques.....	59
2.1. Dosage de la concentration en phénols totaux.....	59
2.2. Dosage de la concentration en Ortho-diphénol.....	60
2.3. Dosage de la concentration en flavonoïde.....	60
2.4. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	60
2.5. Détermination de la matière sèche	61
2.6. Mesure du pH.....	61
2.7. Evaluation de la capacité de rétention en eau.....	62
2.7.1. Mesure d'exsudation (Perte à la conservation)	62
2.7.2. Mesure des pertes à la cuisson	62
2.7.3. Mesure des pertes à la décongélation	63
2.7.4. Rendement Technologique du NAPOLE	63
2.8. Mesure de l'oxydation de l'oxymyoglobine	63
2.9. Mesure de l'oxydation des lipides	64
3. Evaluation du l'effet de l'incorporation d'extrait et poudre des feuilles d'olivier sur les paramètres physicochimiques des viandes bovines hachées	64
4. Méthodes analytiques.....	65
4.1. Spectrométrie UV-Visible	65
4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	65
4.3. La Spectroscopie Infra-rouge moyen	66
4.3.1. La description de l'appareil	66
4.3.2. Les conditions d'analyses	67
4.3.3. Traitement chimiométrique des spectres	67
4.4. Chromatographie par filtration sur gel Sephadex G50.....	68
5. Méthodes microbiologiques.....	69
5.1. Dénombrement des germes microbiens	69
5.2. Evaluation de la radiorésistance des flores microbiennes des feuilles d'olivier.....	70
5.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne	70
5.4. Inoculation artificielle des viandes hachées par des bactéries pathogènes.....	71
5.4.1. Préparation des viandes hachées	71
5.4.2. Inoculation et suivi des germes pathogènes dans les viandes hachées.....	71
5.4.3. Etude de la thermorésistance des germes pathogènes dans les viandes hachées.....	71
6. Conduite de l'irradiation des feuilles d'olivier	72

6.1. L'unité d'irradiation.....	72
6.2. Essai préliminaire pour la détermination de débit de dose d'irradiation.....	72
6.3. Préparation et traitement des feuilles d'olivier	73
7. Détermination de la Date Limite de Consommation (DLC) par la méthode de vieillissement accéléré	73
7.1. Loi d'Arrhenius.....	73
7.2. Résolution de l'équation d'Arrhenius.....	74
7.3. Constante de la vitesse apparente de détérioration (k).....	74
8. Analyse sensorielle.....	75
9. Analyse statistique	76

❖ Résultats et discussion

Chapitre 1: Application de la spectroscopie moyen infrarouge, combinée avec des traitements chimiométriques, pour l'analyse qualitative et quantitative des feuilles d'olivier	77
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<i>1. Article n°1 : Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive Olea europaea leaves.....</i>	
1.1 Introduction	
1.2. Materials and methods	
1.2.1. Leaf samples.....	
1.2.2. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) analysis.....	
1.2.2.1. Instrumentation.....	
1.2.2.2. Analysis conditions.....	
1.2.3. Chemometric treatments of FT-MIR spectra.....	
1.2.4. Software for FTIR data treatments.....	
1.3. Results and discussion	
1.3.1. Typical FTIR spectra of olive leaves.....	
1.3.2. Discrimination and classification of olive leaf samples according to their cultivar	
1.4. Conclusion.....	
<i>2. Article n°2 : Rapid quantitative determination of oleuropein in olive Olea europaea leaves using Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses.....</i>	
2.1 Introduction	
2.2. Materials and methods	
2.2.1. Leaf samples.....	
2.2.2. Extraction of oleuropein from olive leaf.....	
2.2.3. HPLC determination of oleuropein content	
2.2.4. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) analysis.....	
2.2.4.1. Instrumentation.....	
2.2.4.2. Analysis conditions.....	
2.2.5. Chemometric treatments of FT-MIR spectra.....	
2.2.6. Software for FTIR data treatments.....	
2.3. Results and discussion	
2.3.1. Reference data of oleuropein content	
2.3.2. Spectral analyses.....	
2.3.3. Calibration and validation	
2.4. Conclusion.....	

Chapitre 2: Incorporation des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées.....78

1. Préparation de poudre et d'extrait des feuilles d'olivier	79
2. Effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la cinétique microbienne.....	81
3. Effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la survie des pathogènes dans les viandes hachées	86
4. Effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la stabilité microbiologique des viandes bovines hachées durant la conservation.....	90
4.1. Suivi microbiologique des viandes bovines hachées au cours de leur conservation réfrigérée.....	91
4.2. Estimation de la Date Limite de la Conservation (DLC) des viandes bovines hachées par la méthode du vieillissement accéléré	91
4.2.1. Détermination de l'ordre et de la vitesse spécifique de la croissance microbienne.....	91
4.2.2. Détermination de l'énergie d'activation	97
4.2.3. Calcul de la Date Limite de la Conservation.....	99
5. Effet des feuilles d'olivier sur la stabilité oxydative des viandes bovines hachées.....	100
5.1. Effet sur l'oxydation de l'oxymyoglobine en metmyoglobine	100
5.2. Effet sur l'oxydation des lipides.....	102
6. Effet des feuilles d'olivier sur les propriétés technologiques des viandes hachées.....	104
6.1. Effet sur le pH	104
6.2. Effet sur la perte d'exsudat durant la conservation	105
6.3. Effet sur la capacité de rétention d'eau (Water Holding Capacity : WHC).....	106
6.4. Effet sur la perte à la cuisson	107
6.5. Effet sur la perte à la décongélation.....	108
6.6. Effet sur le Rendement Technologique de NAPOLE (RTN).....	109
7. Effet des feuilles d'olivier sur les propriétés sensorielles des viandes hachées.....	110

Chapitre 3: Etude du l'effet de certains traitements technologiques sur les composés phénoliques des feuilles d'olivier..... 112**1. Article n°3 : Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Tisane from Air-Dried Olive Leaves as Affected by Boiling Treatment**

1.1. Introduction	104
1.2. Material and methods.....	104
1.2.1. Sample preparation and experimental process	104
1.2.2. Colorimetric determination of Total Phenolic content (TP)	104
1.2.3. Determination of Total antioxidant capacity.....	104
1.2.4. Molecular mass distribution of polyphenols.....	104
1.2.5. HPLC analyses of phenolic compounds.....	104
1.2.6. Statistical analysis.....	104
1.2.7. Chemicals reagents and standards.....	104
1.3. Results and discussion.....	104
1.3.1. Effect of preparation method of an olive leaf tisane on TP content and TEAC.....	104
1.3.2. Effect of boiling time on thermo stability of TP and TEAC in an aqueous extract from olive leaves.....	104
1.3.3. Effect of boiling treatment on mass molecular distribution of polyphenols and on phenolic HPLC profile of olive leaf extract.....	104
1.3.4. Effect of thermal processing on the correlation between TP content and TEAC in an aqueous extract from olive leaves.....	104

1.4. Conclusion	
2. Article n°4 : Gamma irradiation of air-dried olive leaves: effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds.....	
2.1. Introduction.....	
2.2. Materials and methods.....	
2.2.1. Samples preparation and irradiation treatment.....	
2.2.2. Microbial load analyses.....	
2.2.3. Determination of total phenolic, ortho-diphenol and flavonoid contents in olive leaves extract.....	
2.2.4. Determination of total antioxidant capacity.....	
2.2.5. HPLC analyses of phenolic compounds.....	
2.2.6. Molecular mass distribution of polyphenolics.....	
2.2.7. Statistical analyses.....	
2.3. Results and discussion.....	
2.3.1. Effect of gamma irradiation on microbial load of dried olive leaves.....	
2.3.1.1. Microbial load of dried olive leaves.....	
2.3.1.2. Decontamination dose.....	
2.3.1.3. Radioresistance of microbial load in olive leaves.....	
2.3.2. Effect of gamma irradiation on antioxidant capacity of olive leaves extract	
2.3.3. Effect of gamma irradiation on phenolic compounds content in dried olive leaves.....	
2.3.3.1. Total phenolics content	
2.3.3.2. Ortho-diphenols content.....	
2.3.3.3. Flavonoids content.....	
2.3.3.4. Molecular mass distribution of polyphenolics	
2.3.3.5. HPLC analyses of methanol extract.....	
2.4. Conclusion	
C onclusion et perspectives.....	113
Liste des références bibliographiques.....	118
Annexes	139

Introduction Générale

Introduction

La Tunisie est le pays oléicole le plus important du Sud de la Méditerranée. Plus de 30 % de ses terres agricoles sont consacrées à l'oléiculture. La culture de l'olivier est répartie du nord au sud dans des conditions bioclimatiques très variées, avec une grande diversité variétale. Aujourd'hui, le patrimoine oléicole tunisien est estimé à plus de 65 millions d'arbres qui couvrent une superficie de 1680000 hectares. La Tunisie occupe ainsi le quatrième poste au niveau mondial en nombre d'arbres et le second en superficie.

Pour la Tunisie, ce secteur joue un rôle économique, social et environnemental important. Sur le plan national, il contribue à la réalisation des objectifs nationaux de sécurité alimentaire, de création d'emploi, d'équilibre de la balance commerciale, de préservation des ressources naturelles et de limitation de l'exode rural. Sur le plan international, il procure à la Tunisie le rang du quatrième producteur et du troisième exportateur mondial d'huile d'olive.

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile d'olive et les olives de table comme produits principales, des sous produits de type liquide (margines) et solide (grignons, feuilles et brindilles).

Les feuilles d'olivier sont engendrées en grande quantité par l'industrie oléicole. Durant la récolte, des feuilles pourront être cueillies avec les olives. Ces sous produits sont écartés des olives dans les oliveraies mais aussi dans les huileries. Ils sont estimés à 10% de la masse globale des olives récoltés. A cette quantité s'ajoute la biomasse de la taille. En effet, après la récolte des olives, les oliviers subissent en général une taille sévère un an sur deux et une taille légère l'année suivante. Les quantités des produits de la taille ont été estimées à 25 kg de feuille et brindilles (diamètres inférieurs à 3 cm) produites par an et par arbre.

Les feuilles d'olivier, biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranées et en particulier en Tunisie, ne doivent pas être considérées comme un déchet encombrant, mais comme une richesse qu'on doit utiliser. La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

Les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, notamment l'oleuropéine. Ces composés possèdent, entre autres, des pouvoirs antioxydant, anticancéreux, antimicrobien qui les rendent très importants pour les domaines de la santé et l'industrie agroalimentaire.

Le sujet de la présente thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude et la proposition des voies de valorisation des feuilles d'olivier pour un développement durable du secteur oléicole en Tunisie et la contribution à la connaissance scientifique internationale dans ce domaine.

Ce présent mémoire s'articule autour de trois chapitres.

Dans une première partie, nous nous proposons d'analyser qualitativement et quantitativement les feuilles d'olivier par une méthode innovante de spectroscopie moyen infrarouge à transformé de Fourier, combinée avec des traitements chimiométriques.

L'étude de l'effet de l'incorporation des extraits ou poudre des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées sur les qualités microbiologique, biochimique, technologique et sensorielle du produit a fait l'objet de la deuxième partie de la thèse.

La troisième partie de la thèse a été consacrée à l'évaluation de l'effet de certains traitements technologiques sur les composés phénoliques des feuilles d'olivier et sur leurs capacités antioxydantes.

Etude bibliographique

1. L'olivier

1.1. Classe botanique

L'olivier est un arbre cultivé pour son fruit, l'olive, qui donne une huile recherchée « l'huile d'olive ». Cette dernière, mais aussi les olives de table, sont des éléments importants de la diète méditerranéenne et sont consommées en grande quantité dans le monde entier. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon Cronquist (1981) est la suivante :

Règne: *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Oleaceae*

Genre : *Olea*

Espèce: *europaea*

Sous-espèce: *europaea*



Fig. 1. Oliveraie à Béja (Nord ouest de la Tunisie)

1.2. Situation dans le monde

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 26^e et le 45^e degré de latitude nord et sud (Fig. 2), 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.

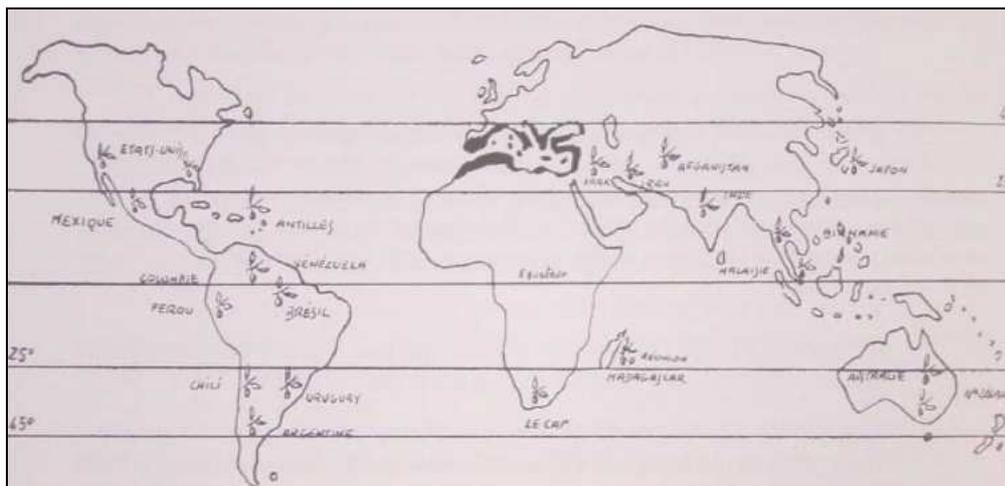


Fig. 2. Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996)

En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. 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. Au Moyen Orient et en Asie, les pays cultivateurs d'olivier sont par ordre d'importance Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine. En Amérique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Argentine, Mexique, Chili, Pérou, Uruguay, Brésil et Etats Unis (Californie). L'Australie fait partie des nouveaux producteurs. Cependant, environ 97% des 850 millions d'oliviers, qui couvrent une superficie de 9500000 hectares, dans le monde poussent en région méditerranéenne (Verdier, 2003). 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 de l'hydrométrie (Fig. 3).

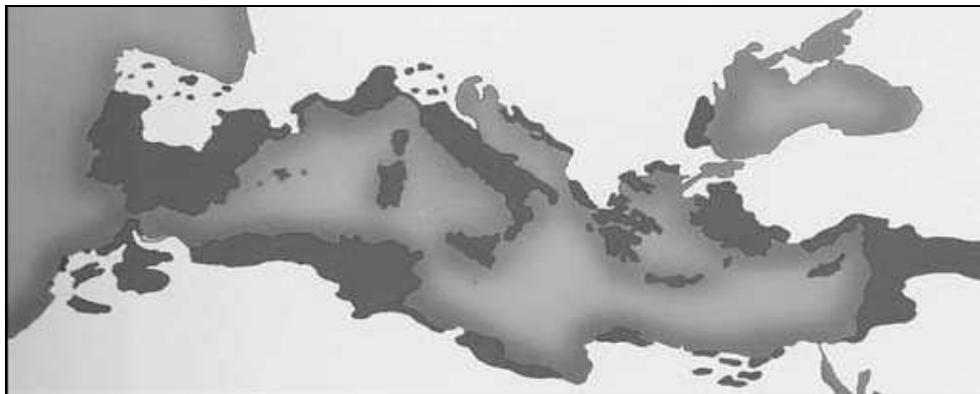


Fig. 3. Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen (Ghedira, 2008)

1.3. Situation en Tunisie

La Tunisie est le pays oléicole le plus important du Sud de la Méditerranée. Plus de 30 % de ses terres agricoles sont consacrées à l'oléiculture. La culture de l'olivier est répartie du nord au sud dans des conditions bioclimatiques très variées. Aujourd'hui, le patrimoine oléicole tunisien est estimé à plus de 65 millions d'arbres qui couvrent une superficie de 1680000 hectares. La Tunisie occupe ainsi le quatrième poste au niveau mondial en nombre d'arbres et le second en superficie (Karray et al., 2009). La production tunisienne en 2004 est évaluée à 280000 tonnes pour l'huile d'olive et à 26000 tonnes pour l'olive de table (COI, 2006). En Tunisie, l'huile d'olive est un produit stratégique d'exportation. Il joue un rôle économique, social et environnemental important. Sur le plan national, il contribue à la réalisation des objectifs nationaux de sécurité alimentaire, de création d'emploi, d'équilibre de la balance commerciale, de préservation des ressources naturelles et de limitation de l'exode rural. Sur le plan international, il procure à la Tunisie le rang du quatrième producteur et du troisième exportateur mondial et des parts non négligeables sur les principaux marchés d'exportation.

1.4. Les variétés tunisiennes

La caractéristique de la culture d'olivier en Tunisie, aussi ancienne que traditionnelle, est l'utilisation actuelle d'un matériel végétal sélectionné naturellement au fil des siècles.

Le patrimoine variétal tunisien est constitué d'une grande variété de cultivars (Fig. 4) réparti du Nord au Sud. Néanmoins, les oliveraies sont constituées essentiellement de deux variétés principales :

- "Chemlali de Sfax", qui occupe 60% de la surface oléicole, est localisée de préférence dans le Nord-Est, dans le centre littoral, au Sud et à l'extrême Sud.
- "Chetoui" est une variété à double aptitude. Elle occupe 35% de la surface oléicole du pays et s'étend surtout sur la bande côtière septentrionale de la Tunisie.

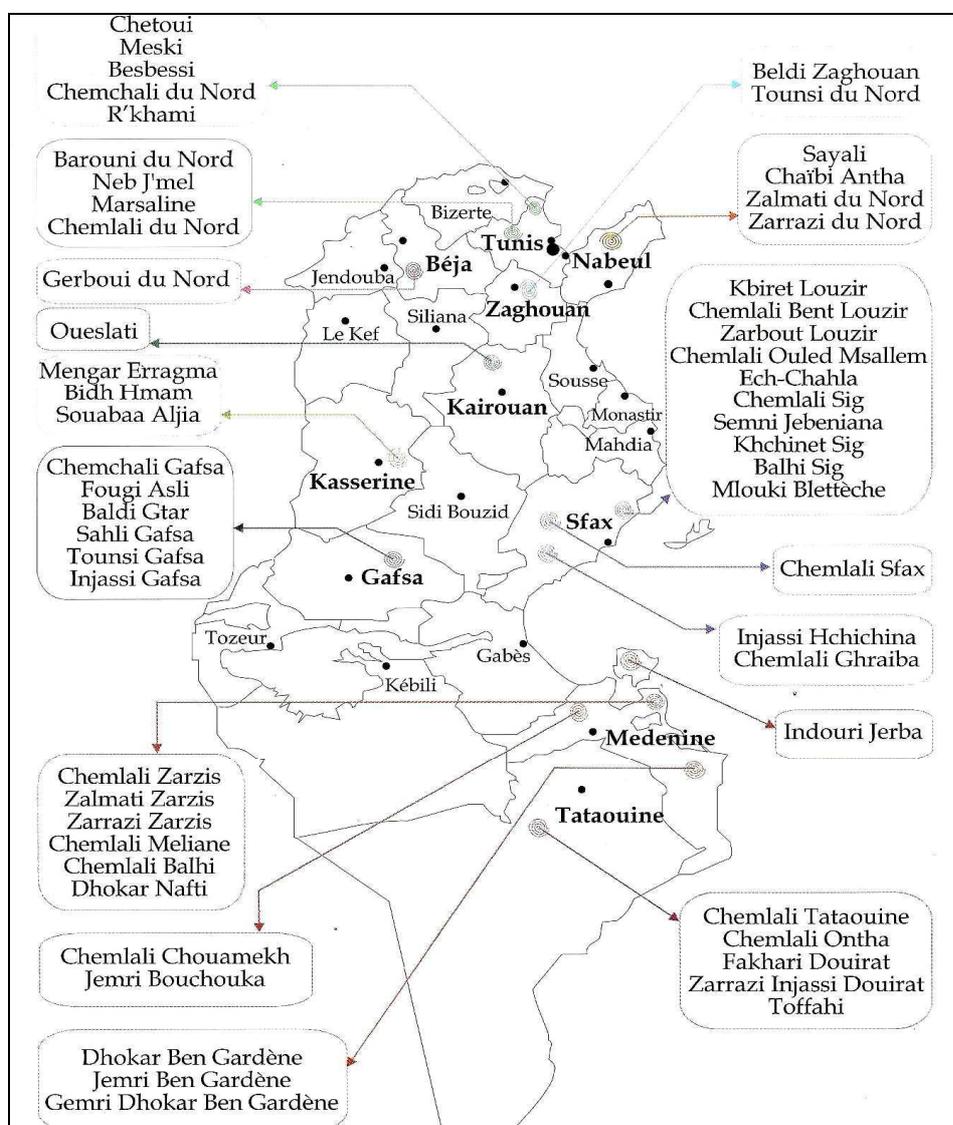


Fig. 4. Sites et répartition géographique des variétés autochtones et des types locaux d'olivier en Tunisie (Trigui, Msallem et collaborateurs, 2002)

La destination de la production des olives (huile d'olive ou olive de table) dépend de la variété (Tableau 1).

Tableau 1. Principaux variétés cultivées en Tunisie et leurs utilisations

Variétés à huile d'olive	Variétés à olive de table	Variétés à double destination
Barouni	Besbessi	Chemcheli
Chemlali	Bidh el Hamam	Chetoui
Chemlali de Gafsa	Limli	Gerboui
Chetoui	Limouni	Oueslati
Gerboui	Meski	Zarrazi
Oueslati		
Sehli		
Zalmati		
Zarrazi		

1.5. Techniques de discrimination et d'identification des variétés d'olivier

L'olivier compte de nombreuses variétés qui se distinguent entre eux par des caractères morphologiques (formes olives, noyaux, feuilles,...), agronomiques et chimiques différents ainsi que par leur adaptation à des conditions climatiques différentes. Une revue de la littérature sur les principales techniques utilisées pour la discrimination et l'identification variétale des oliviers est présentée dans le Tableau 2.

Les premiers travaux de classification et d'identification des variétés d'olivier remontent au XIX^{ème} siècle. Toutefois, Ruby (1917) a été le premier à utiliser les différents organes de l'olivier (feuille, fruit et endocarpe) pour caractériser et classer les variétés de cette espèce. Depuis, divers travaux d'identification variétale ont été élaborés à partir de la combinaison des caractères morphologiques, agronomiques et phénologiques relatifs à l'arbre, au rameau fructifère, au fruit, à l'inflorescence, à la feuille et à l'endocarpe. Ces travaux ont montré la grande utilité des caractères utilisés pour l'inventaire des variétés des différentes régions oléicoles. Ils ont permis aussi de résoudre divers cas d'homonymie et de synonymie.

L'utilisation systématique de caractères morphologiques descriptifs de l'arbre et de ses différents organes a permis la caractérisation primaire et l'identification discriminante des variétés. Outre la caractérisation primaire, le conseil oléicole international (COI) a adopté une méthodologie commune pour la caractérisation secondaire. L'objectif de cette caractérisation (agronomique, phénologique, pomologique et relative à la qualité de l'huile) des variétés d'olivier est de mieux connaître les ressources génétiques en vue d'une utilisation correcte des cultivars dans des conditions pédoclimatiques adaptées qui se traduira par une amélioration de la qualité des produits oléicoles. Une variété adaptée à son milieu est en effet moins susceptible aux facteurs biotiques et abiotiques et cela a une répercussion très directe sur la

qualité de l'huile d'olive. La caractérisation secondaire permet à la communauté scientifique de disposer d'informations fiables sur la manière de classer les cultivars selon différentes caractéristiques agronomiques essentielles : productivité, adaptation aux conditions pédoclimatiques, résistance ou tolérance aux maladies et parasites, etc. Ces informations sont extrêmement utiles pour les travaux d'amélioration génétique et de sélection variétale.

Les caractères morphologiques sont généralement influencés par les conditions environnementales. La nécessité de surmonter les difficultés rencontrées dans la caractérisation morphologique a mené certains chercheurs à entreprendre de nouvelles études d'identification variétale basées sur les marqueurs génétiques (marqueurs enzymatiques et moléculaires). Les marqueurs enzymatiques, considérés généralement comme neutres vis-à-vis des conditions environnementales (Ouazzani et al., 1993), ont été les premiers marqueurs génétiques développés pour identifier les variétés d'olivier. Les études qui ont concerné le polymorphisme enzymatique du pollen (Loukas et Krimbas, 1983 ; Trujillo et Rallo, 1995) et le polymorphisme alloenzymatique des feuilles (Ouazzani et al., 1993) ont révélé une variabilité génétique très importante. Toutefois, ces marqueurs ont montré leurs limites pour l'identification de variétés étroitement apparentées (Ouazzani et al., 1995).

Les marqueurs moléculaires, principalement les RAPD (random amplified polymorphic DNA), ont été très étudiés au cours des dernières années en vue de leur utilisation pour l'identification des variétés d'olivier. Ces marqueurs génèrent un polymorphisme génétique important (Vergari et al., 1996 ; Belaj et al., 2001 ; Besnard et al., 2001). Le caractère dominant et le problème de reproductibilité des résultats caractérisant les marqueurs RAPD justifient le recours récent des chercheurs à l'utilisation des marqueurs SSR (simple sequence repeats) (Rallo et al. 2000 ; Cipriani et al., 2002 ; Doveri et al., 2008) et ISSR (inter simple sequence repeats) (Pasqualone et Caponio, 2001 ; Essadki et Ouazzani, 2003 ; Terzopoulos et al., 2005) pour l'identification des variétés d'olivier.

Récemment, une approche chimiométriques sur la base des données analytiques a été développée pour la discrimination et la classification des variétés d'olivier. La classification variétale a été réalisée par analyse du profil phénolique des feuilles (Japon-Lujan et al., 2006 ; Di donna et al., 2010) ou de la composition en acide gras du fruit (Casale et al., 2010) et de l'huile (Hannachi et al., 2008). Le profil spectral infrarouge des olives (Casale et al., 2010b) et de l'huile d'olive monovariétale (Casale et al., 2010a) peut être aussi utilisé pour la discrimination et classification variétale.

Tableau 2. Techniques de discrimination et d'identification des variétés d'olivier

Technique	Marqueur	Organes	Variétés étudiées	Références
Description du phénotype	Descripteur morphologiques et agronomiques	Arbre, feuille, fruit, noyau	Tunisienne	Trigui and Msallem, 2002
Description du phénotype	Descripteur morphologiques	fruit, endocarpe, feuille et inflorescence	Méditerranéenne	Idrissi et Ouazzani, 2003
Description du phénotype	Descripteur morphologiques	fruit, endocarpe	Portugaise	Pinheiro et Esteves da Silva, 2005
Description du phénotype	Descripteur morphologiques et pomologique	Arbre, feuille, fruit : drupe et noyau, huile d'olive	Tunisienne	Hannachi et al., 2008
Biochimique	Isoenzyme	Feuille	Tunisienne	Kamoun et al., 2002
Moléculaire :	RAPD et AFLP	Feuille	Espagnole et italienne	Belaj et al., 2004
Moléculaire :	RAPD	Feuille	Jordanian	Hdeib et Hassawi, 2006
Moléculaire :	RAPD-PCR	Feuille	Turque	Ergulen et al., 2002
Moléculaire	ISSR	Feuille	Grecque	Terzopoulos et al., 2005
Moléculaire	SSR	Feuille	Italienne	Alba et al., 2009
Moléculaire	SSR	Feuille	Méditerranéenne	Bracci et al., 2009
Moléculaire	SSR	Feuille	Méditerranéenne	Doveri et al., 2008
Moléculaire	SSR	Feuille	Tunisienne	Hannachi et al., 2008
Analytique : CPG	Composition en acide gras	huile d'olive	Tunisienne	Hannachi et al., 2008
Analytique: CPG	Composition en acide gras	Fruit	Méditerranéenne	Casale et al., 2010
Analytique: HPLC	Composition phénolique	Feuille	Espagnol	Japon-Lujan et al., 2006
Analytique: HPLC-ESI-MS	Composition phénolique	Feuille	Italienne	Di donna et al., 2010
Analytique: SPIR	Profil des fonctions chimiques	Fruit	Méditerranéenne	Casale et al., 2010b
Analytique: SPIR et SMIR	Profil des fonctions chimiques	Huile d'olive	Italienne	Casale et al., 2010a

RAPD: randomly amplified polymorphic DNA; AFLP: amplified fragment-length polymorphism; RAPD-PCR: randomly amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction; ISSR: Inter Simple Sequence Repeat; SSR: Simple Sequence Repeat; CPG: Chromatographie phase gazeuse; HPLC: High performance liquid chromatography; HPLC-ESI-MS: high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry; SPIR: Spectroscopie proche infrarouge; SMIR: Spectroscopie moyen infrarouge.

2. Les feuilles d'olivier

2.1. Biomasse énorme

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile d'olive comme produit principal, des sous produits de type liquide (margines) et solide (grignons, feuilles et brindilles).

Durant la récolte, des feuilles pourront être cueillies avec les olives. Ces sous produits sont écartés des olives dans les oliveraies (Fig. 5 a et b) mais aussi dans les huileries (Fig. 5 c). Ils sont estimés à 10% du masse globales des olives récoltés (Bouaziz et al., 2008). A cette quantité s'ajoute la biomasse de la taille (Fig. 5 d). En effet, après la récolte des olives, les oliviers subissent en général une taille sévère un an sur deux et une taille légère l'année suivante. Les quantités des produits de la taille ont été estimées à 25 kg de feuille et brindilles (diamètres inférieurs à 3 cm) produites par an et par arbre, selon Nefzaoui (1995).

La valorisation de ces résidus, engendrés en grande quantité, est devenue une nécessité pour améliorer la rentabilité du secteur oléicole.



Fig. 5. Les feuilles d'olivier, sous produit de l'industrie oléicole, engendré en grande quantité lors de la récolte (a et b), en huilerie (c) et après la taille des oliviers (d).

2.2. Composition des feuilles d'olivier

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le Tableau 3 montre sa composition chimique globale selon différents auteurs.

La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (Nefzaoui, 1995).

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses).

La teneur en protéine est faible dans les feuilles d'olivier. Le Tableau 4 présente sa composition en acides aminées, qui est particulièrement diversifié.

La composition en minéraux des feuilles d'olivier est présentée dans le Tableau 5. Le minéraux le plus abondant dans les feuilles est le fer avec une concentration de 273 g/ Kg de matière sèche.

Tableau 3. Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.

Composition (en %)	Boudhrioua et al., 2009	Erbay et Icier, 2009	Martin-Garcia et al., 2006	Garcia-Gomez et al., 2003	Fegeros et al., 1995
Eau	46,2-49,7 a	49,8 a	41,4 a	nd	44,0 a
Protéines	5,0-7,6 a	5,4 a	7,0 b	nd	nd
Lipides	1,0-1,3 a	6,5 a	3,2 b	6,2 b	nd
Minéraux	2,8-4,4 a	3,6 a	16,2 b	26,6 b	9,2 b
Carbohydrates	37,1-42,5 a	27,5 a	nd	nd	nd
Fibres brutes	nd	7,0 a	nd	nd	18,0 b
Cellulose	nd	nd	nd	19,3 b	11,4 b
Hémicellulose	nd	nd	nd	25,4 b	13,3 b
Lignin	nd	nd	nd	30,4 b	14,2 b
Polyphénols totaux	1,3-2,3 b	nd	2,5 b	nd	nd
Tannins solubles	nd	nd	nd	nd	0,3 b
Tannins condensés	nd	nd	0,8 b	nd	1,0 b

a correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

nd : valeur non déterminée

Tableau 4. Composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azote total) (selon Martin-Garcia et Molina-Alcoide, 2008)

Acides aminés	Concentration
Acide aspartique	27,5
Acide glutamique	35,1
Serine	44,5
Glycine	79,6
Histidine	25,4
Arginine	162,0
Threonine	46,8
Alanine	73,8
Proline	84,2
Tyrosine	32,3
Valine	74,8
Méthionine	5,3
Cysteine	1,6
Isoleucine	58,8
Leucine	104
Phénylalanine	51,8
Lysine	19,1
Acides aminés essentiels	547
Acides aminés non essentiels	379
Acides aminés totaux (sans tryptophane)	926

Tableau 5. Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g par Kg de matière sèche) (selon Fegeros et al., 1995)

Minéraux	Concentration
Calcium (Ca)	12,7
Phosphore (P)	2,1
Manganèse (Mg)	1,9
Potassium (K)	6,3
Fer (Fe)	273,0
Cuivre (Cu)	10,7
Zinc (Zn)	21,3
Magnésium (Mn)	50,0

2.3. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

2.3.1. Généralité sur les composés phénoliques

2.3.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante (Beta et al., 2005). L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993).

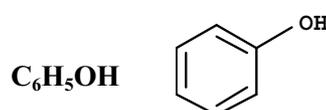


Fig. 6. Formules brute et chimique d'une fonction phénol

Cette définition chimique n'est cependant pas tout à fait satisfaisante car elle inclut d'autres composés dont certaines hormones. Une définition métabolique lui est parfois préférée. Les composés phénoliques des plantes sont alors décrits comme les substances dérivées de la voie métabolique de l'acide shikimique (Robards et al., 1999; Sanoner, 2001). Le terme de polyphénols est souvent consacré par l'usage pour désigner les composés phénoliques.

Dans la cellule, les composés phénoliques sont essentiellement localisés sous forme soluble dans les vacuoles. Ils peuvent également s'accumuler dans les parois végétales : c'est le cas de la lignine (hétéropolymère d'alcools coniférylique, p-coumarylique et sinapylique) ou de certains flavonoïdes (Robards et al., 1999; Macheix et al., 2003).

2.3.1.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques des plantes sont répartis en différentes classes selon la structure de leur squelette de base.

Harborne et Simmonds (1964) ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule (Tableau 6).

Tableau 6. Classification des composés phénoliques (selon Harborne et Simmonds, 1964)

Structure	Classe
C6	Phenols simples
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénonnes et acides phenylacetiques
C6-C3	Acides cinnamiques, aldehydes cinnamyl, alcools cinnamyl, coumarins, isocoumarins et chromones
C15	Chalcones, auronnes, dihydrochalcones, flavans, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins,
C30	Biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzophenones, xanthonnes, stilbenes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Betacyanins
Lignans, neolignans	Dimers ou oligomeres
Lignin	Polymers
Tannins	Oligomeres ou polymers
Phlobaphenes	Polymers

2.3.1.3. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très important aussi bien dans le règne végétal qu'animal. En raison de leur structure, les composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogénèse.

Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores et contre les infections et les agressions microbiennes multiples (Lo Scalzo et al., 1994 ; Uccella, 2001). Outre, les composés phénoliques seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation... (Ozkaya et Celik, 1999 ; Malik et Bradford, 2006). Les composés phénoliques sont aussi responsable des propriétés sensoriels des plantes tel que la couleur, le goût et parfois l'odeur.

En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou partie aux composés phénoliques dans ces plantes. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine (Fig. 7). Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre

de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Leong et Shui, 2002).

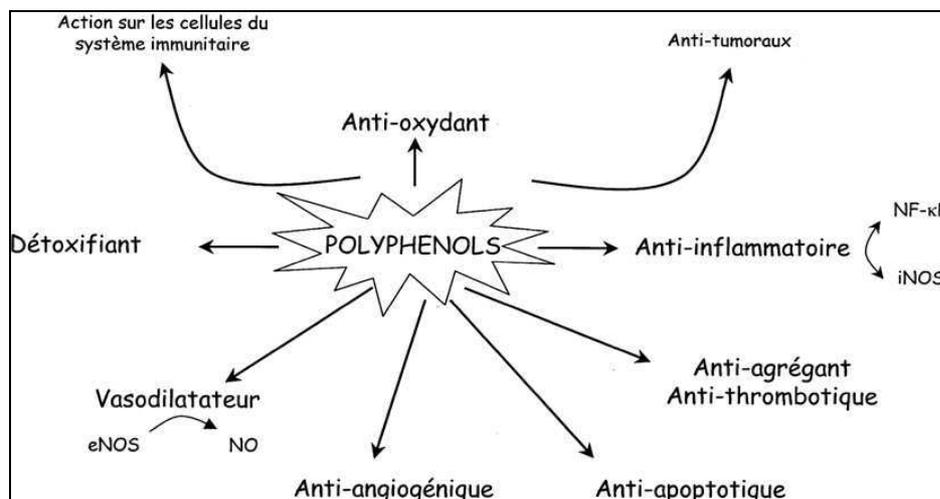


Fig. 7. Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante, cette dernière est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers (Karakaya, 2004). Certains d'entre eux, tel que les coumarines, possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Fylaktakidou et al., 2004). D'autres, tel que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques (Habtemariam, 2003). Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phénoliques, protègent les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété « Vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques. Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques. Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général (Bruneton, 1993).

2.3.2. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie entre 2,8 mg/g de matière sèche (Ahtiok et al., 2008) et 44,3 mg/g de matière sèche (Boudhrioua et al., 2009). Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche (Mylonaki et al., 2008).

La variation de la concentration des composés phénoliques dans les feuilles d'olivier, citée dans la littérature, dépend de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, de l'époque de prélèvement des échantillons des feuilles, de l'âge des plantations et des échantillons des feuilles. En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage), du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables. Les feuilles d'olivier contiennent des monomères et des polymères phénoliques. La composition phénolique des feuilles d'olivier a fait l'objet de nombreuses études. Une bibliographie des composés phénoliques identifiés est présentée dans le Tableau 7. Les structures chimiques des principaux composés identifiés sont synthétisées dans la Fig. 8.

Tableau 7. Bibliographie des composés phénoliques identifiés dans les feuilles d'olivier

Composés phénoliques	Références
Apigenin	Movsumov et al., 1987
Apigenin-glucoside	Rovellini et al., 1997
Apigenin-7-glucoside	Le Tutour and Guedon, 1992; Japon-Lujan et al., 2006; Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Hayes et al., 2009
Apigenin-7-glycosides	Baldi et al., 1995 ; Zunin et al., 1995
Apigenin-7-rutinoside	Le Tutour and Guedon, 1992; Mylonaki et al., 2008
Caffeic acid	Baldi et al., 1995 ; Mourtzinos et al., 2007 ; Altiok et al., 2008 ; Briante et al., 2004 ; Benavente-Garcia et al., 2000
5-Caffeoylquinic acid	Heimler et al., 1992 ; Lavee et al., 1986ab
Catechin	Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000
p-Coumaric acid	Baldi et al., 1995 ; Mourtzinos et al., 2007
Cyanidin-3-glycosides	Baldi et al., 1995
Demethyloleuropein	Baldi et al., 1995 ; Le Tutour and Guedon, 1992
Diosmetin	Benavente-Garcia et al., 2000
Diosmetin-7-glucoside	Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000
Elenolic acid	Baldi et al., 1995
Ferulic acid	Mourtzinos et al., 2007 ; Briante et al., 2004
Gallic acid	Briante et al., 2004
Gentisic acid	Briante et al., 2004
Hesperidin	Baldi et al., 1995
Hydroxytyrosol	Baldi et al., 1995 ; Gariboldi et al., 1986 ; Mourtzinos et al., 2007 ; Altiok et al., 2008 ; Briante et al., 2004 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Hayes et al., 2009
p-hydroxybenzoic acid	Mourtzinos et al., 2007
3,4-Dihydroxy-benzoic acid	Briante et al., 2004
p-hydroxyphenylacetic acid	Mourtzinos et al., 2007
3,4-Dihydroxy phenyl acetic acid	Briante et al., 2004
4-Hydroxy, 3-methoxyphenyl acetic acid	Briante et al., 2004

Tableau 7. Bibliographie des composés phénoliques identifiés dans les feuilles d'olivier (suite).

Composés phénoliques	Références
3,4dihydroxyphenylethyl [(2,6-dimethoxy-3-ethylidene)-tetrahydropyran-4-yl] acetate Ligstroside	Paiva-Martins et Pinto, 2008 Le Tutour and Guedon, 1992 ; Gariboldi et al., 1986 ; Kuwajima et al., 1988 ; Limiroli et al., 1996 and references cited therein; Laguerre et al., 2009
Luteolin	Movsumov et al., 1987 ; Rovellini et al., 1997; Heimler et al., 1992 ; Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000
Luteolin-glucoside	Rovellini et al., 1997; Laguerre et al., 2009 ; Mylonaki et al., 2008
Luteolin-4'-glucoside	Le Tutour and Guedon, 1992; Malik et al., 2008
Luteolin-7-glucoside	Le Tutour and Guedon, 1992 ; Baldi et al., 1995 ; Zunin et al., 1995 ; Heimler et al., 1992 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Altiok et al., 2008 ; Malik et Bradford, 2008; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Laguerre et al., 2009; Hayes et al., 2009
Luteolin-7-glycoside	Heimler et al., 1992
Luteolin-rutinoside	Rovellini et al., 1997; Mylonaki et al., 2008
Luteolin-7-rutinoside	Le Tutour and Guedon, 1992; Zunin et al., 1995
Luteolin diglucoside	Mylonaki et al., 2008
Oleoside	Gariboldi et al., 1986 ; Kuwajima et al., 1988
Oleuropein	Movsumov et al., 1987 ; Le Tutour and Guedon, 1992 ; Baldi et al., 1995 ; Zunin et al., 1995 ; Gariboldi et al., 1986 ; Kuwajima et al., 1988 ; De Nino et al., 1997 ; Mourtzinos et al., 2007 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Altiok et al., 2008 ; Briante et al., 2004 ; Malik et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Laguerre et al., 2009; Bouaziz et Sayadi, 2003; Hayes et al., 2009; Mylonaki et al., 2008
Oleuropein aglycon	Briante et al., 2004
Oleurosides	Le Tutour and Guedon, 1992 ; Kuwajima et al., 1988 ; Gariboldi et al., 1986 ; Laguerre et al., 2009
Protocatechuic acid	Mourtzinos et al., 2007
Quercetin	Movsumov et al., 1987 ; Mourtzinos et al., 2007 ; Laguerre et al., 2009
Quercetin-3-rhamnoside (quercitrin)	Heimler et al., 1992
Rutin (quercetin-3-rutinoside)	Movsumov et al., 1987 ; Le Tutour and Guedon, 1992 ; Heimler et al., 1992 ; Vlahov, 1992 ; Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Mylonaki et al., 2008
Sinapic acid	Briante et al., 2004
Syringic acid	Briante et al., 2004
Tyrosol	Mourtzinos et al., 2007 ; Altiok et al., 2008 ; Briante et al., 2004 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Hayes et al., 2009
Vanillic acid	Altiok et al., 2008 ; Briante et al., 2004 ; Benavente-Garcia et al., 2000
Vanillin	Altiok et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000
Vanilethanediol	Mourtzinos et al., 2007
Verbascoside	Le Tutour and Guedon, 1992; Gariboldi et al., 1986 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Altiok et al., 2008 ; Malik et Bradford, 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Laguerre et al., 2009; Hayes et al., 2009

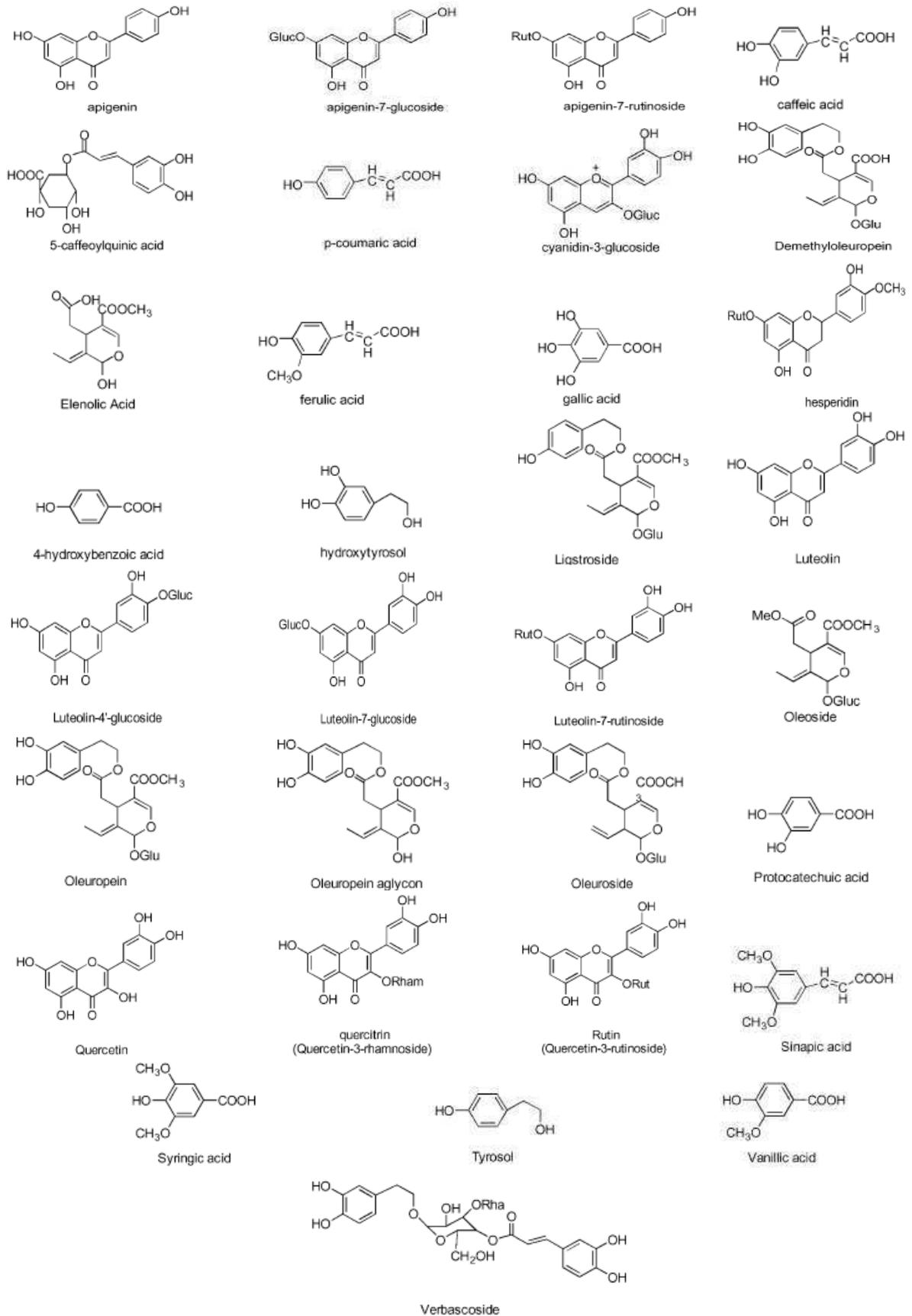


Fig. 8. Structure chimique de quelques composés phénoliques identifiés dans les feuilles d'olivier

Les polymères phénoliques sont représentés par les tannins hydrolysables et condensés et principalement par la lignine. Les teneurs en lignine varient de 14,2% (Fegeros et al., 1995) à 30,4% (Garcia-Gomez et al., 2003) par rapport à la matière sèche. Les tannins condensés sont présents avec un pourcentage de 1% alors que les tannins solubles possèdent une teneur de 0,3% par rapport à la matière sèche (Fegeros et al., 1995). Les monomères phénoliques sont représentés par des acides phénoliques (tel que : l'acide caféique, l'acide syringique et l'acide vanillique), des alcools phénoliques (tel que : tyrosol et hydrotyrosol). Des tritèrènes (tel que l'acide olenolique) et des flavonoïdes (tel que : apigénin, lutéoline, quercétin, rutine et verbascoside) sont aussi présents dans les feuilles d'olivier. L'oleuropéine, un secoiridoïde, est le composé phénolique majoritaire dans les feuilles d'olivier (Benavente-Garcia et al., 2000 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Altiok et al., 2008).

Les données quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier sont présentées dans le Tableau 8. D'après Benavente-Garcia et al. (2000), l'oleuropéine, le composé phénolique majoritaire, constitue 24% des composés d'un extrait des feuilles d'olivier. Altiok et al. (2008) ont trouvé aussi que l'oleuropéine représente 29%, en termes de pourcentage d'abondance dans un extrait des feuilles d'olivier. L'extrait phénolique des feuilles d'olivier est caractérisé par un pouvoir antioxydant important. Cette activité antioxydante est la résultante des synergies et antagonismes des différentes activités des divers composés qui le constituent. Les flavonoïdes (tel que la lutéoline, la rutine) sont les composés qui possèdent les pouvoirs antioxydants les plus élevés.

Tableau 8. Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier (selon Benavente-Garcia et al., 2000).

Composés phénoliques	Temps de rétention (min) en HPLC	Pourcentage d'abondance dans un extrait (%)	Activité antioxydante TEAC (mM)
Hydroxytyrosol	4,80	1,46	1,57
Tyrosol	5,83	0,71	0,35
Catéchine	8,41	0,04	2,28
Acide caféique	11,56	0,34	1,37
Acide vanillique	14,17	0,63	0,67
Vanilline	14,79	0,05	0,13
Rutine	17,22	0,05	2,75
Luteolin-7-glucoside	18,10	1,38	0,71
Verbascoside	20,06	1,11	1,02
Apigénin-7-glucoside	21,28	1,37	0,42
Diosmetin-7-glucoside	21,95	0,54	0,64
Oleuropéine	22,76	24,54	0,88
Lutéoline	28,61	0,21	2,25
Diosmetin	31,59	0,05	1,42
Extrait de feuille d'olivier			1,58

2.3.3. Intérêts des feuilles d'olivier pour la santé humaine

Depuis l'antiquité, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque Grecque, les feuilles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIX^{ème} siècle, on s'en servait pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, les professionnels modernes de la santé ont commencé à utiliser l'extrait de feuille d'olivier, en 1995, les premiers résultats furent très positifs. Depuis, il a été démontré que la feuille d'olivier possède de nombreux avantages thérapeutiques contre de nombreuses maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale.

La feuille d'olivier et son extrait est l'un d'un certain nombre d'espèces de plantes médicinales qui a été et continue d'être étudié volumineusement. Une revue de la littérature sur les mécanismes d'action et les indications cliniques des feuilles d'olivier est présentée dans le Tableau 9.

Par leurs pouvoir antimicrobien et antiviral, les feuilles d'olivier peuvent être bénéfique dans le traitement des affections causées par ou associés à un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un protozoaire. Parmi ces pathologies traitables il y a: la grippe, le rhume, les infections dues aux candidas, la méningite, l'encéphalite, le VIH / ARC / SIDA, la fatigue chronique, l'hépatite B, la pneumonie, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, les infections des voies urinaire et les soins dentaires.

Comme un anti-oxydant, l'extrait de feuilles d'olivier protège les vaisseaux sanguins et améliorer la circulation sanguine. Il a été montré qu'il peut être efficace dans la protection du cœur lors d'une l'occlusion coronaire. Il est recommandé aussi pour prévenir et traiter l'hypertension et l'artériosclérose. Les feuilles d'olivier ont été démontrées aussi possédant des propriétés anti-cancérigènes. Outre, leur richesse en flavonoïdes leur attribue la propriété radio-protective.

Par leurs effets sur certains enzymes métaboliques, les feuilles d'olivier possèdent des propriétés anti-lipidimique et sont aussi indiquées pour le traitement des diabètes.

Les études réalisées sur les effets thérapeutiques des feuilles d'olivier pour la santé sont généralement des études *in vitro*. Quelques études *in vivo* ont été réalisées.

Tableau 9. Bibliographie sur les mécanismes d'action et indications cliniques des extraits des feuilles d'olivier

Mécanismes d'action et indications cliniques	Références
Activité anti-oxydante	Altiok et al., 2008 ; Lee et al., 2009; Lee et al., 2010; Jemai et al., 2008 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Kiritsakis et al., 2010 ; Le tutour et al., 1992 ; Hayes et al., 2010 ; Briante et al., 2002 ; Somova et al., 2003.
Activité anti-microbienne	Sudjana et al., 2009 ; Pereira et al., 2007 ; Lee et al., 2010 ; Markin et al., 2003 ;
Activité anti-viral (contre VHSV)	Micol et al., 2005
Activité anti-viral (contre HIV)	Lee-Hang et al., 2003 ; Bao et al., 2007.
Activité anti-fongique	Korukluoglu et al., 2008
Activité gastro-protective	Dekanski et al., 2009
Activité hypo-glycémiant	Komaki et al., 2003 ; Gonzalez et al., 1992; Takeshi et al., 2007 (brevet)
Activité hypo-tensive	Susalit et al., 2011 ; Somova et al., 2003 ; Perrinjaquet-Mocetti et al., 2008; Khayyal et al., 2002 ; Samuelsson, 1951 ;
Activité anti-athérogène (prévention contre l'athérosclérose)	Somova et al., 2003
Activité hypo-lipidimique	Jemai et al., 2008
Activité anti-allergique	Masataka et al., 2007 (brevet)
Activité anti-inflammatoire	Miljkovic et al., 2009
Activité analgésique (activité anti-nociceptive)	Esmaeili-Mahani et al., 2010
Activité neuro-protective	Mohagheghi et al., 2011
Activité anti-cardiovasculaire	Singh et al., 2008 ; Fonolla et al., 2010 ; Scheffler et al., 2008
Activité vaso-active (contre les maladies cardiovasculaire)	Rauwald et al., 1994
Activité vasodilatateur	Zarzuelo et al., 1991
Activité anti-cancérogène	Kinura et Sumiyoshi, 2009 ; Bouallagui et al., 2011
Activité anti-leucémique (effet anti-prolifératif des cellules leucémiques humaines)	Abaza et al., 2007
Activité radio-protective	Julian Castillo et al., 2010 ; Benavente-Garcia et al., 2002
Action anti-vieillesse	Akemi et al., 2001 (brevet) ; Tadashi, 2006 (brevet) ; Thomas et al., 2006

VHSV : viral haemorrhagic septicaemia virus, a salmonid rhabdovirus;

HIV : Human immunodeficiency virus.

2.3.4. L'oleuropéine : intérêt, teneur et méthode de sa quantification dans les feuilles d'olivier.

L'intérêt thérapeutique des feuilles d'olivier a été corrélé, principalement, à sa teneur en oleuropéine. Ce composé est responsable du goût amer des feuilles d'olivier, de l'huile d'olive et des olives non fermentés.

Enormément de travaux ont étudié le rôle thérapeutique de l'oleuropéine et de ses mécanismes d'action. Des recherches scientifiques poussées ont prouvé que l'oleuropéine possède une activité antioxydante (Visioli et al., 1994 ; Coni et al., 2000 ; Benavente-Garcia et al., 2000), antimicrobienne (Bisignano et al., 1999), anti-inflammatoire (Puel et al., 2006), hypoglycémique (Al Azzawie et Alhamdani, 2006), hypotensive (Panizzi, 1960), hypolipidémique (Andreadou et al., 2006), anti-mycoplasmal (Furneri et al., 2002), immunomodulateur (Giamarellos-Bourboulis et al., 2006) et anti-tumeur (Hamdi et al., 2005).

La concentration en oleuropéine dans les feuilles d'olivier peut atteindre jusqu'à 6,8 g par 100 g de feuilles fraîches (Bouaziz et Sayadi, 2005). Ceci fait que les feuilles d'olivier sont considérées comme source naturelle renouvelable pour l'extraction de l'oleuropéine (Savournin et al., 2001 ; Benavente-Garcia et al., 2000 ; Briante et al., 2002 ; Bouaziz et Sayadi, 2005). Briante et al., (2002) ont comparé les teneurs en oleuropéine dans les fruits et feuilles d'olivier de différentes variétés (Tableau 10). Ces travaux montrent que les feuilles sont plus riches en oleuropéine que les fruits, pour certaines variétés. Toutefois, ils ont trouvé l'inverse chez d'autres variétés.

Les grandes variations des teneurs en oleuropéine dans les feuilles d'olivier trouvées dans la littérature (Tableau 11) peuvent être expliquées par l'effet de variété (Savornin et al., 2001), de l'âge des feuilles (Ranalli et al., 2006), mais aussi des procédés de préparation de l'échantillon et de l'extraction et des méthodes de quantification (Bouaziz et Sayadi, 2005, Japon-Lujan et al., 2006).

Tableau 10. La teneur en oleuropéine (en mg/g) dans les fruits et feuilles d'olivier de différentes variétés italiennes (selon Briante et al., 2002)

Variété de l'olivier	Teneur en oleuropéine (en mg/g)	
	Fruits	Feuilles
<i>Leccino</i>	4,25	1,05
<i>Frantoio</i>	3,48	3,19
<i>Moraiolo</i>	2,32	14,35
<i>N2</i>	2,26	7,06
<i>N3 (Don Carlo)</i>	5,78	8,39
<i>Coratina</i>	1,98	6,10
<i>Kalamata</i>	5,26	2,86
<i>Nociara</i>	9,96	3,70
<i>I-77</i>	6,83	3,03

Tableau 11. Revue de littérature sur les techniques et conditions du dosage d'oleuropéine et sa teneur dans les feuilles d'olivier

Technique analytique	Détecteur	λ (nm)	Conditions analytiques				Régime d'éluion	t (min)	t_r (min)	Teneur de l'OLP	Référence
			Colonne	Débit (ml min ⁻¹)	T (°C)	Phases mobiles					
HPLC	Diode array detector.	280	C18 LiChrospher 100 analytical column (5 μ m, 250mm \times 4mm)	1	30	- (A) acetic acid/water (2,5: 97,5) - (B) acetonitrile	60	22,2	13,4% cad 134,4 mg OLP par g olive leaf extract	Altiok et al., 2008	
HPLC	UV detector (SPD-10Avp)	280	C-18 Shim-pack VP-ODS (4,6 - 250 mm)	0.6	40	- (A) 0,1% phosphoric acid in water - (B) 70% acetonitrile in water	50	37,5	14% (data are reported on a dry mass basis)	Bouaziz et al., 2008	
HPLC	UV detector (SPD-10Avp)	280	C-18 Shim-pack VP-ODS (4,6 - 250 mm)	0.6	40	- (A) 0,1% phosphoric acid in water - (B) 70% acetonitrile in water	50	39	15,13 g of extract containing 6,8 g of OLP per 100g of fresh olive leaves.	Bouaziz et Sayadi, 2005	
HPLC	UV detector (SPD-10Avp)	280	Shim-pack, VP-ODS (4,6mm \times 250mm)	0.5	40	- (A) 0,1% phosphoric acid in water - (B) 70% acetonitrile in water	40	37,5	4,32 g/100 g dry weight	Jemai et al., 2008	
RP-HPLC	Diode array detector	280	a reversed-phase Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 μ m particle size) column	0.9	40	- (A) water/formic acid (19:1) - (B) methanol	40	28	26,47 mg/g in olive leaf lyophilized extract	Pereira et al., 2007	
RP-HPLC	UV-visible detector.	280	Waters Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 μ m particle size) column	1	T° amb	- (A) mixture of 2% acetic acid in water (pH 3,1) - (B) methanol	70	37	11,43 -14,25 (% w/w) of Leaf Extracts	Paiva-martins et al., 2007	
HPLC	Diode array detector.	280	C18 LiChrospher 100 analytical column (250 x 4,6 mm, 5 μ m particle size)	1	30	- (A) acetic acid/water (2,5: 97,5) - (B) acetonitrile.	60	22,7	abundance of OLP in olive leaf extract (absolute content dry basis) :24%	Benavente -Garcia et al., 2000	
RP-HPLC	Mass spectrometer	280	- XTerraR RP18; 3,5 μ m, 4,6 x 10mm x 150mm column,	1	NS	- (A) water/ acetic acid (99,9: 0,1) - (B) acetonitrile/ acetic acid (99,9: 0,1)	80	31,9	3,26 à 8,48 mg/100g leaves	Kiritisakis et al., 2010	

λ : Longueur d'onde ; T° : Température ; amb. : Ambiante ; NS : Non Signalé ; OLP : Oleuropéine ; t : Duré d'analyse ; OLP : Oleuropéine ; t_r : temps de rétention de l'oleuropéine ; HPLC : High Performance Liquid Chromatography ; HRGC : High Resolution Gas Chromatography.

Tableau 11. Revue de littérature sur les techniques et conditions du dosage d'oleuropéine et sa teneur dans les feuilles d'olivier (suite)

Technique analytique	Détecteur	λ (nm)	Conditions analytiques					Régime d'élué	t (min)	t_r (min)	Teneur de l'OLP	Référence
			Colonne	Débit (ml min ⁻¹)	T (°C)	Phases mobiles	Phases mobiles					
HPLC	- tunable absorbance detector - photodiode array detector	280	- a Symmetry C18, 5 μ m, 3,9 x 250 mm column (Waters) - a SentryGuard Symmetry C18, 3,9 x 20 mm insert(Waters)	1	NS	- 79% water acidified (pH 3) with 0,1 M orthophosphoric acid (v/v, 1000: 2,3) -21% acetonitrile acidified with 0,1 M orthophosphoric acid (v/v, 1000: 2,3).	Iso-cratique	35	24	Percent (w/w) of Powdered Leaves : de 9,14 à 14,32%	Savournin et al., 2001	
HPLC	Photodiode array detector	280	Waters Symmetry C18 (5 μ m 0 (3,9 mm x150 mm) column	1	35	- (A) 100% acetonitrile - (B) 0,02% trifluoroacetic acid in water	Gradient	65	NS	in frozen leaves: 36,4 \pm 1,06 mg/g fresh wt,	Maik et Bradford, 2008	
RP-HPLC	Spectrophotometer	280	Reversed silica phase adsorboshere XL C18 90 A column (250 mmx4,6 mm, 5 μ m)	1	T° amb	acetone/nitrile/ water (21: 79) mixture acidified with o-phosphoric acid (up to pH3)	Iso-cratique	35	25	0,9 à 8,55 g/kg fresh weight	Ranalli et al., 2006	
HPLC	Diode array detector	280	- Lichrospher 100 RP-18 (250mmx4 mm, 5 μ m). - Kromasil 5 C-18 column (15mmx4,6 mm, 5 μ m) protected with a steel holder	Different débit	T° amb	- (A) 6% acetic acid, 2 mM sodium acetate, in water) - (B) acetonitrile.	Gradient	45	18	22,61 mg/g dry leaves	Japon Lujjan et al., 2006	
RP-HPLC	UV detector	240	a reverse phase column (Erbasil 100-S-C18, 230mm x 8mm x 4 mm)	1	NS	- (A) H2O/AcOH (99:1) - (B) Methanol.	Gradient	60	NS	37,7 mg/ 100g extract	Briante et al., 2004	
HRGC	NS	NS	30 m x 0,32 mm id, 0,1 μ m HP-1 capillary column coated with dimethylpolysiloxane	Pression colonne: 40 kPa	320	hydrogen	Iso-cratique	NS	NS	0,8 à 8,61 g/kg fresh weight	Ranalli et al., 2006	

λ : Longueur d'onde ; T° : Température ; amb. : Ambiante ; NS : Non Signalé ; t : Duré d'analyse ; OLP : Oleuropéine ; t_r : temps de rétention de l'oleuropéine ; HPLC : High Performance Liquid Chromatography ; HRGC : High Resolution Gas Chromatography.

D'après la revue bibliographique (Tableau 11), la chromatographie en phase liquide (HPLC) est la technique la plus fréquemment utilisée par le comité scientifique pour la quantification de l'oleuropéine. Les phases mobiles utilisées dans cette technique peuvent être phase normale ou phase inverse. Les solvants peuvent être élués en mode isocratique ou en gradient. La détection de l'oleuropéine se fait à la longueur d'onde de 280 nm.

En plus de cette technique, Ranalli et al., (2006) ont aussi utilisé la chromatographie en phase gazeuse (HRGC) pour la quantification de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier et ont montré l'absence de différence entre les résultats obtenus par cette technique et ceux obtenus par la HPLC.

2.4. Les voies de valorisation des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier, biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranéens et en particulier en Tunisie, ne doivent pas être considérées comme un déchet encombrant, mais comme une richesse qu'on doit utiliser.

De nombreux travaux ont été réalisés pour essayer d'utiliser ce sous produit et ainsi améliorer la rentabilité du secteur oléicole. Le Tableau 12 présente une revue bibliographique sur les principaux travaux de valorisation des feuilles d'olivier.

Historiquement, les feuilles d'olivier étaient totalement orientées vers l'alimentation animale. Toutefois, ils sont aussi utilisés en phytothérapie traditionnelle pour le traitement de certaines maladies tel que la malaria et l'hypertension. Dans cette application, les feuilles d'olivier sont consommées sous forme de tisane.

Dans le cadre de la phytothérapie moderne, des compléments alimentaires à base de feuilles d'olivier sont apparus sur le marché. Ces produits sont disponibles en forme de feuilles séchées complètes ou en poudres, d'extrait, de gélules ou d'ampoules buvables (Fig. 9). Les producteurs en vendent leurs vertus pour la santé humaine.

Actuellement, et avec l'évolution de la technologie et l'amélioration des connaissances, les domaines d'utilisation des feuilles d'olivier ont été élargis et diversifiés. Les feuilles d'olivier sont utilisées pour l'extraction des composés d'intérêt tel que le mannitol, les stéroïdes, les alcools gras, les composés phénoliques, principalement l'oleuropéine, les flavonoïdes et les composés triterpéniques,

Outre, les propriétés radio-protectrices et anti-âge, qui caractérisent les feuilles d'olivier, les ont prédestinées à des utilisations dans l'industrie cosmétique. Dans ce domaine, les feuilles d'olivier sont utilisées comme ingrédient dans la formulation d'énormément de produits cosmétiques et diététiques, tel que les savons, les crèmes (Fig. 9).

Les feuilles d'olivier ont aussi trouvées des applications dans l'industrie alimentaire. Elles sont principalement utilisées pour l'amélioration de la qualité et la conservation des aliments tels que les viandes, l'olive de table, les huiles.

D'autres voies de valorisation des feuilles d'olivier, récemment démontrées, concernent le domaine de la dépollution, de la sidérurgie et de la synthèse biochimique.

Tableau 12. Une revue bibliographique sur les utilisations des feuilles d'olivier

Domaine	Applications	références
Alimentation animal	Utilisation dans l'alimentation des moutons	Fegeros et al., 1995
	Utilisation dans l'alimentation des moutons et chèvres	Martin-Garcia et al., 2003 ; Delgado-Pertinez et al., 2000
	Utilisation dans l'alimentation des chèvres	Yanez et al., 2004
	Utilisation dans l'alimentation des dindes pour améliorer la qualité de leurs viandes	Botsoglou et al., 2010 ; Govaris et al., 2010
Thérapeutique	Consommation humaine d'infusion des feuilles d'olivier qui est bénéfique pour la santé	Giao et al., 2007
Pharmaceutique	Extraction des composés phénoliques, notamment l'oleuropéine	Japan-Lujian et al., 2006
	Extraction des composés phénoliques	Lee et al., 2009 ; Altiok et al., 2008; Mylonaki et al., 2008; Haoyuan, 2006 (brevet); Ziqi et al., 2007 (brevet); Leslie, 1998 (brevet); Leslie, 1999 (brevet);
	Production d'hydroxytyrosol	De Leonardis et al., 2008 ; Bouaziz et Sayadi, 2005 ; Briante et al., 2004 ; Briante et al., 2002
	Extraction de l'oleuropéine	Panagiotis, 2007 (brevet)
	Extraction de l'oleuropéine et production d'hydroxytyrosol	Bouaziz et Sayadi, 2003
	Extraction des composés triterpéniques	Sanchez-Avila et al., 2009 ; Somova et al., 2003
	Extraction de tocophérol	De Lucas et al., 2002
Extraction de flavonoïdes	Yuhong et al., 2006 ab	
Extraction de stérols et alcools gras	Orozco-Solano et al., 2010	
Extraction de mannitol	Ghoreishi et al., 2009	

Tableau 12. Une revue bibliographique sur les utilisations des feuilles d'olivier (Suite)

Domaine	Applications	références	
Cosmétique	Utilisation dans la formulation des produits cosmétiques	Tadashi, 2006 ; Thomas et al., 2006 ; Akemi et al., 2001 (brevet); Pinnell-Sheldon et Omar Mostafa, 2003 (brevet) ;	
	Formulation photo protectrice	Pinnell-Sheldon et Omar Mostafa, 2004	
	Formulation à destination cosmétique et/ou diététique contenant un mélange de lycopène et d'extrait de feuille d'olivier : Utilisation de l'extrait pour améliorer la solubilisation de lycopène	Coll et al., 2000 (brevet)	
Industrie Alimentaire	Ajout à la viande hachée bovine	Hayes et al., 2009	
	Ajout à la viande hachée bovine et porcine	Hayes et al., 2009	
	Enrichir l'olive de table	Lalas et al., 2011	
	Ajout à l'huile et effet sur les frites	Chiou et al., 2009	
	Stabilisation de l'huile	Jimenez et al., 2010	
	Stabilisation de l'huile de tournesol	Farag et al., 2007	
	Stabilisation de l'huile d'olive	Bouaziz et al., 2008 ; Paiva-Martins et al., 2007 ; Allouche et al., 2009	
	Ajout d'acide oléanolique à l'huile pour formuler un aliment fonctionnel	Guinda et al., 2004	
	Utilisation dans la formulation de boisson de santé pour consommation humaine	Young Soo, 2005 (brevet)	
	Préparation de tisane pour consommation humaine	Noriyuki et Masato, 2006 (brevet)	
	Préparation de tisane fermentée pour consommation humaine	Kyoji et Kazuo, 1999 (brevet)	
	Formulation d'une tisane	Kiyama, 1991 (brevet) ; Kiyama, 1999 (brevet) ; Hayakawa, 2001 (brevet)	
	Préparation de feuille d'olivier sèches en poudre pour faire une tisane	Uematsu, 2003	
Industrie Alimentaire	Ingrédient dans la formulation d'aliments pour les hyperglycémiques	Komaki, 2002	
	Séchage et broyage et utilisation comme ingrédient dans la formulation d'aliments	Kinoshita, 2006	
	Biochimie	Utilisation d'une hydroperoxydase des feuilles d'olivier pour la synthèse de note verte	Ben Akacha et Gargouri, 2009
		Biosynthèse de nanoparticules d'or	Khalil et al., 2010
Sidérurgie	Inhibition de corrosion acide de l'acier	El-Etre et al., 2007	
Dépollution	Utilisation comme sorbant pour enlever le cadmium de milieu aqueux	Hamdaoui, 2009	



Fig. 9. Les différentes formes d'utilisation des feuilles d'olivier pour la consommation humaine

2.5. Les technologies appliquées sur les feuilles d'olivier

Dans la littérature, on rencontre de multiples voies de valorisation des feuilles d'olivier pour un développement durable du secteur oléicole. Dans ces voies de valorisation, différentes technologies peuvent être appliquées sur les feuilles d'olivier. Une revue bibliographique sur ce sujet est présentée dans le Tableau 13.

Les procédés du traitement appliqués sur les feuilles d'olivier peuvent être classés selon trois catégories, et peuvent être utilisés seuls ou combinés. Il s'agit :

- ✓ des procédés physiques,
- ✓ des procédés chimiques,
- ✓ des procédés biologiques.

Les procédés physiques appliqués sur les feuilles d'olivier sont représentés principalement par le séchage, dont l'objectif est la déshydratation pour la conservation. Le blanchiment et la pulvérisation ont été aussi appliqués sur les feuilles d'olivier. Dans la littérature, on rencontre un procédé d'adsorption qui vise la purification des composés d'intérêt à partir d'extrait des feuilles d'olivier.

Les procédés chimiques renferment essentiellement les procédés d'extraction des composés d'intérêt, tel que : l'oleuropéine, le tocophérol, le mannitol, les flavonoïdes, les composés phénoliques, à partir des feuilles d'olivier. Outre, des traitements acide ou alcaline des feuilles ou de leurs extraits ont été trouvés dans la littérature. Le procédé d'encapsulation a été aussi appliqué sur l'extrait des feuilles d'olivier.

Les procédés biologiques concernent les traitements des feuilles d'olivier par des enzymes et /ou microorganismes endogènes et/ou exogènes. La β -glucosidase, d'origine microbienne, a été utilisé pour hydrolyse enzymatique d'extrait des feuilles d'olivier, dans un objectif de production d'hydroxytyrosol par bioconversion de l'oleuropéine. L'oxydation des polyphénols par polyphénol oxidase endogène des feuilles d'olivier s'est observée lors de séchage à la lumière de soleil. Les traitements microbiens appliqués sur les feuilles d'olivier font intervenir la flore endogène (cas de l'ensilage, compostage) ou une flore exogène inoculée (levures, champignons et bactéries lactiques)

Tableau 13. Une revue bibliographique sur les technologies appliquées sur les feuilles d'olivier

Technologie	Objectif	Références
Procédés physiques		
Séchage solaire	Déshydratation	Boudhrioua et al., 2008
Séchage à l'aire chaude	Déshydratation	Erbay et Icier, 2009; Boudhrioua et al., 2008
Séchage à pression réduite	Déshydratation et préservation d'une haute concentration en oleuropéine	Shuichi et Hiromichi, 2003 (Brevet)
Séchage à l'infrarouge	Déshydratation	Boudhrioua et al., 2009
Blanchiment	Réduction de charge microbienne et désactivation des enzymes et ainsi préservation des composés phénoliques	Boudhrioua et al., 2009
Pulvérisation	Pulvérisation des feuilles d'olivier	Kyoji, 1999 (brevet)
Adsorption sur fibroïne de soie	Purification d'extrait phénolique Purification d'oleuropéine et rutine	Altiok et al., 2008 Bayçin et al., 2007
Procédés chimiques		
Extraction liquide surchauffée	Extraction des composés phénoliques et principalement l'oleuropéine	Japon-Lujan et Luque de Castro, 2006
Extraction assistée par ultrasons dynamique	Extraction des composés phénoliques et principalement l'oleuropéine	Japon-Lujan et al., 2006
Extraction par ultrasons	Extraction des flavonoïdes	Yuhong et al., 2006 a
Extraction par ultrasons	Extraction de composés antioxydants	Carcel et al., 2010
Extraction par fluide supercritique	Extraction de tocophérol Extraction des composés phénoliques Extraction mannitol	De Lucas et al., 2002 Le Floch et al., 1998 Ghoreishi et al., 2009

Tableau 13. Une revue bibliographique sur les technologies appliquées sur les feuilles d'olivier (suite)

Technologie	Objectif	Références
Procédés chimiques		
Extraction assistée par microonde	Extraction des flavonoïdes	Yuhong et al., 2006 b
Extraction successive par solvants à polarité croissante	Extraction des composés phénoliques	Kiritsakis et al., 2010
Fractionnement d'un extrait par différent solvants	Séparation de différentes fractions de composés phénoliques	Lee et al., 2009
Hydrolyse acide par HCl	Production d'hydroxytyrosol par hydrolyse de l'oleuropéine	De Leonardis, 2008 ; Bouaziz et Sayadi, 2003 ; Bouaziz et Sayadi, 2005
Traitement aux alcalis (par soude, par l'ammoniaque)	Amélioration de la valeur nutritive des feuilles sèches d'olivier	Alibes et Berge, 1983 ; Fegeros, 1995
Traitement alcaline de la tisane des feuilles d'olivier par NaOH	Désamérisation	Noriyuki et Masato, 2006 (brevet)
Encapsulation dans β -cyclodextrin	Préservation de l'extrait phénolique	Mourtzinou et al., 2007
Procédés biologiques		
Fermentation des feuilles d'olivier par exposition à la lumière du soleil	Oxydation des polyphénols par polyphénol oxidase endogène des feuilles d'olivier	Kyoji et Kazuo, 1999 (brevet)
Hydrolyse enzymatique par β -glucosidase	Production d'hydroxytyrosol par hydrolyse de l'oleuropéine	Bouaziz et Sayadi, 2003
Hydrolyse enzymatique par β -glucosidase immobilisée		Briante et al., 2004 ; Briante et al., 2002
Bioconversion microbienne par levure	Production de substances antioxydants	Hiroshi et al., 2008 (Brevet)
Fermentation lactique de tisane des feuilles d'olivier	Désamérisation de tisane, augmentation de sa stabilité et amélioration de sa qualité sensorielle.	Noriyuki et Masato, 2006 (brevet)
Bioconversion microbienne par le champignon <i>Trichoderma viride</i> et la levure <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Amélioration de la digestibilité des feuilles d'olivier	Fayed et al., 2009
Fermentation en continue	Étude de la digestibilité chez les moutons et chèvres	Martin-Garcia et al., 2006
Ensilage	Conservation des feuilles d'olivier par voie humide passant par la fermentation lactique anaérobie	Alibes et Berge, 1983
Compostage	Les feuilles d'olivier sont utilisées comme "agent épaississant" lors de la stabilisation biologique des marges par compostage	Garcia-Gomez, et al., 2003

3. Les aliments fonctionnels et les produits nutraceutiques

Les préoccupations de l'industrie agroalimentaire ont évolué au cours de temps (Fig 10). Cette évolution suit les modifications profondes de notre société dans l'approche de la nutrition. Manger était seulement une question de survie. Maintenant, le consommateur cherche une alimentation "optimale" ayant des effets bénéfiques sur la santé et des rôles préventifs contre des maladies dites de civilisation tels que: maladies cardio-vasculaires, obésité, diabète, en particulier, ainsi que certains types de cancer. C'est dans ce contexte qu'est apparu le concept d'aliments fonctionnels et produits nutraceutiques, sur lesquels nous ferons le point dans cette partie de bibliographie.

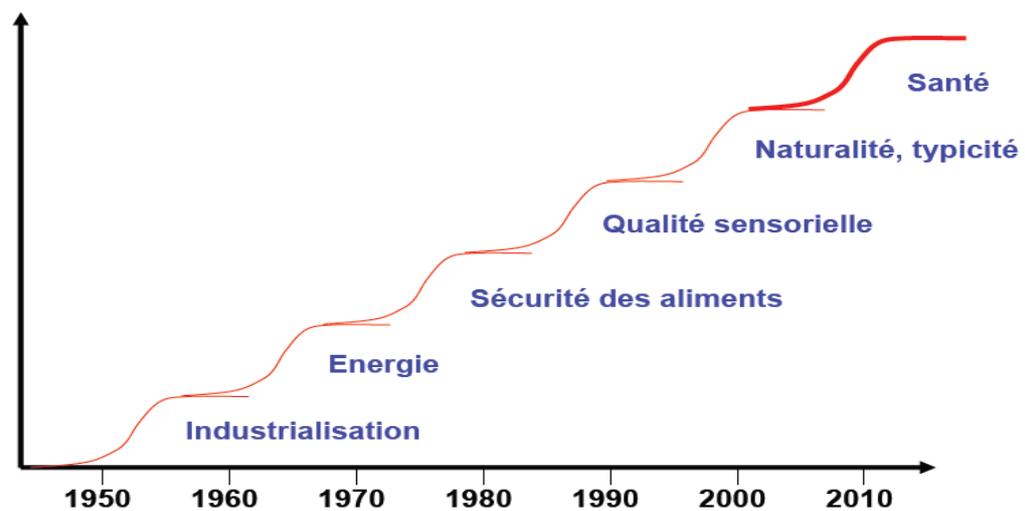


Fig. 10. Evolution des préoccupations de l'industrie agroalimentaire

3.1. Définition

3.1.1 Définition des aliments fonctionnels

Le terme aliment fonctionnel ou encore « alicament » (*functional food* en anglais) comporte plusieurs définitions à travers le monde.

Selon le Bureau des sciences de la nutrition de la Direction des aliments de Santé Canada (1998) : « Un aliment fonctionnel est semblable en apparence aux aliments conventionnels; il fait partie de l'alimentation normale et il procure des bienfaits physiologiques démontrés et (ou) réduit le risque de maladies chroniques au-delà des fonctions nutritionnelles de base ».

Selon Bellisle et al. (1987), un aliment fonctionnel peut être:

✓ Un aliment naturel dont l'un des composants a été naturellement augmenté par le biais de techniques de culture.

Exemple: Variété de fraises plus riches en antioxydants, les œufs oméga-3.

- ✓ Un aliment auquel est ajouté un composé bénéfique.

Exemple : Les jus de fruits enrichis en calcium, les laits enrichis en oméga-3.

- ✓ Un aliment dont on a retiré un composé afin d'en réduire les effets nocifs sur la santé.

Exemple : Les craquelins et biscuits sans gras trans.

- ✓ Un aliment dans lequel on a modifié chimiquement un composé pour obtenir des dérivés ayant des vertus pour la santé humaine.

Exemple : L'hydrolyse des protéines dans les formules pour nourrissons permet d'en réduire le potentiel allergène.

- ✓ Un aliment dans lequel la biodisponibilité d'un ou de plusieurs ingrédients a été augmentée afin d'améliorer l'absorption d'un composé bénéfique.

3.1.2. Définition de produits nutraceutiques

Selon le Bureau des sciences de la nutrition de la Direction des aliments de Santé Canada (1998) : « *Un produit nutraceutique est isolé ou purifié à partir d'aliments, mais vendu sous forme de pilules ou de poudres ou sous d'autres formes médicinales qui ne sont pas généralement associées à des aliments et il s'est avéré avoir un effet physiologique bénéfique ou assurer une protection contre les maladies chroniques* ».

3.2. Apparition et rôles des aliments fonctionnels

L'idée de développement des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques est née suite à des changements démographiques et socio économiques qui indiquent un besoin plus élevé de produits et compléments alimentaires bénéfiques pour la santé. Ainsi, l'augmentation de l'espérance de vie, aboutissant à une augmentation du nombre de personnes âgées et le désir d'améliorer la qualité de vie, en plus, l'augmentation constante des dépenses des soins de santé, a stimulé les gouvernements, les chercheurs, les professionnels de santé et l'industrie alimentaire à voir comment ces changements pouvaient être gérés plus efficacement (Functional Food in Europe, 1998).

Aujourd'hui, on croit qu'il est possible de réduire le risque de maladie et demeurer en bonne santé en adoptant un style de vie saine, et donc une bonne alimentation. Le soutien actuel accordé à la promotion de produits alimentaires, comme les fruits et légumes ou les céréales complètes dans la prévention des maladies, et les dernières recherches sur les antioxydants et les substances phytochimiques protectrices ont donné une véritable impulsion au secteur des aliments fonctionnels (European Commission Community Research, 2000; Scientific Concepts of Functional Foods in Europe, 1999).

Un aliment fonctionnel a pour rôle de procurer des effets physiologiques bénéfiques dépassant ses fonctions nutritionnelles habituelles ou de réduire le risque de maladies chroniques. Il n'est pas susceptible de guérir directement une maladie mais il sert avant tout à diminuer les risques de pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose, le diabète et l'obésité (Ashwell, 2001 ; Ghedira, 2008).

De nombreux composés d'aliments sont réputés pour leurs bienfaits pour la santé. Le Tableau 14 résume quelques exemples de composés fonctionnels des aliments en précisant leurs sources et leurs effets éventuels. Ces composés sont extraits et commercialisés comme produits nutraceutiques, ou bien utilisés comme l'ingrédient actif dans la formulation des aliments fonctionnels. L'enrichissement par des composés actifs concerne, essentiellement, le lait et produits laitiers, les margarines, les œufs, les jus de fruits, le pain, les viandes et les poissons.

Tableau 14. Exemples des composés fonctionnels, leurs sources et leurs bienfaits potentiels pour la santé humaine (International Food Information Conseil)

Composés fonctionnels	Sources	Avantages éventuels
Caroténoïdes		
Alpha-carotène	Carottes	Neutralise les radicaux libres qui peuvent endommager les cellules ; Réduirait probablement les risques de cancer de la prostate
Bêta-carotène	Fruits et légumes	Réduit les risques de dégénérescence maculaire
Lutéine	Légumes verts	Réduit les risques de cancer de la prostate
Lycopène	Produits de tomate (ketchup, sauces)	
Fibres alimentaires		
Fibres insolubles	Son de blé	Réduisent les risques de cancer du sein ou du côlon
Bêta-glucane	Avoines, orge	Réduisent les risques de maladie cardiovasculaire. Protègent contre les maladies du coeur et certains cancers; abaissent le taux de lipoprotéines de basse densité et le cholestérol total
Fibres solubles	Psyllium	Réduisent les risques de maladie cardiovasculaire. Protègent contre les maladies du coeur et certains cancers; abaissent le taux de lipoprotéines de basse densité et le cholestérol total
Minéraux		
Calcium	Yaourt, produit laitiers faibles en gras	Peut réduire le risque d'ostéoporose

Tableau 14. Exemples des composés fonctionnels, leurs sources et leurs bienfaits potentiels pour la santé humaine (International Food Information Conseil) (Suite)

Composés fonctionnels	Sources	Avantages éventuels
Acides gras		
Oméga-3 à longue chaîne Acides gras - acide déhydracétique/acide eicosapentanoïque	Huiles de saumon et d'autres poissons	Réduisent les risques de maladie cardiovasculaire. Protègent contre les maladies du coeur et certains cancers; abaissent le taux de lipoprotéines de basse densité et le cholestérol total
Acide linoléique conjugué (ALC)	Fromage, produits carnés	Améliore la constitution corporelle. Diminue les risques de certains cancers
Composés phénoliques		
Anthocyanidines	Fruits	Neutralisent les radicaux libres; réduisent les risques de cancer
Catéchines	Thé	
Flavonones	Agrumes	
Flavone	Fruits et légumes	
Lignans	Lin, seigle, légumes	Prévient le cancer, l'insuffisance rénale
Tanins (proanthocyanidines)	Canneberges, produits à base de canneberges, cacao, chocolat	Améliore la santé de l'appareil urinaire. Réduit les risques de maladie cardiovasculaire.
Phytostérols		
Ester de stanol	Maïs, soja, blé, huiles de bois	Abaisse la cholestérolémie en inhibant l'absorption du cholestérol
Prébiotiques/probiotiques		
Fructo-oligosaccharides (FOS)	Topinambours, échalotes, poudre d'oignon	Améliorent la qualité de la flore microbienne intestinale; santé gastro-intestinale
Lactobacillus	Yogourt, autres produits laitiers	Améliorent la qualité de la flore microbienne intestinale; santé gastro-intestinale
Phytoestrogènes		
Isoflavones	Soja et aliments à base de soja	Diminuent les symptômes de la ménopause (p. ex., bouffées de chaleur). Préviennent les cardiopathies et certains cancers; abaissent le taux de lipoprotéines de basse densité et le cholestérol total.
Vitamines		
Vit A	Laits, oeufs	Peut contribuer au maintien d'une vision saine, de la fonction immunitaire et de la santé osseuse
Vit B3 (Niacine)	Produits laitiers, volaille, oeufs	Aide à soutenir la croissance osseuse et à réguler le métabolisme
Vit B12 (Cobalamine)	Lait, oeufs	Peut contribuer à maintenir la fonction mentale, aide à réguler le métabolisme
Biotine	Produits laitiers, oeufs	Aide à réguler le métabolisme et facilite la synthèse hormonale

3.3. Les facteurs liés à l'apparition des aliments fonctionnels

L'émergence actuelle des aliments fonctionnels partout dans le monde est le résultat d'une combinaison de plusieurs facteurs.

✓ Les progrès de la recherche scientifique : Bellisle et al. (1987) ont montré qu'il existe un lien entre l'alimentation et les maladies chroniques. C'est au cours des années 1970 que les autorités ont commencé à mettre sur pied des recommandations alimentaires spécifiquement destinées à prévenir les maladies chroniques comme les troubles cardiovasculaires et le cancer.

✓ Les progrès de la recherche sur les aliments : Depuis une vingtaine d'années, les chercheurs ont prouvé que les aliments contiennent bien autre chose que des calories, des protéines, des glucides, des vitamines ou des minéraux. De la graine de lin aux poissons gras sources d'oméga-3, en passant par les petits fruits pleins de bénéfiques polyphénols, les chercheurs n'ont pas fini d'identifier tous les atouts santé des aliments.

✓ L'intérêt des consommateurs : Une étude effectuée par le ministère de santé canadienne en 2002 a montré que cet intérêt augmente avec le vieillissement d'une population qui veut se maintenir en bonne santé plus longtemps. Cet intérêt a aussi été stimulé par les préoccupations santé devant l'augmentation fulgurante des maladies chroniques ainsi que par la tendance sociale à prendre sa santé en main (*self-care*).

✓ L'intérêt de l'industrie : Souvent pointée du doigt parce qu'elle met sur le marché des aliments trop gras, trop sucrés ou trop salés, l'industrie voit dans les aliments fonctionnels une source de profits et un moyen de redorer son blason. Le marché des aliments fonctionnels au Canada représenterait de 1 à 2 milliards de dollars, avec une croissance prévue de 20 % par année. En 2010, le marché mondial est estimé atteindre 35 milliards de dollars.

✓ L'intérêt des autorités publiques : Inégalement développé à travers le monde, cet aspect touche l'augmentation exponentielle des coûts de santé liés aux maladies chroniques comme les troubles cardiovasculaires, le cancer, le diabète et l'obésité.

✓ Les progrès technologiques : Des procédés de traitement industriels de pointe permettent notamment d'incorporer certains composés à des aliments sans nuire à leur goût, à leur texture, à leur conservation, etc ... Il s'agit aussi de s'assurer que l'effet bénéfique des molécules ajoutées résiste au traitement industriel.

3.4. Positionnement d'un aliment fonctionnel

A partir de la Fig. 11, on peut dire que les aliments fonctionnels sont des aliments transformés qui permet d'améliorer l'équilibre nutritionnel de base. Cependant, les médicaments sont définis comme étant des produits transformés sous forme galénique pour restaurer la santé.

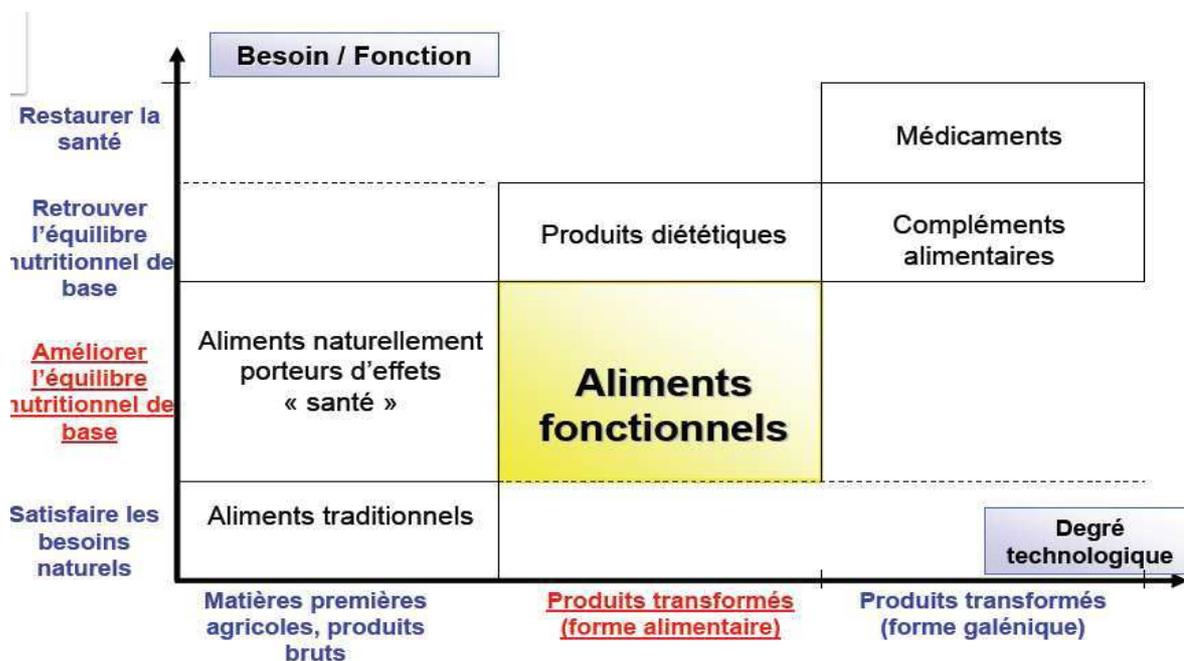


Fig. 11. Le positionnement d'un aliment fonctionnel en se basant sur le degré technologique et la fonction (Coxam et Delzenne, 2008)

3.5. Exemples des aliments fonctionnels

Le Tableau 15 présente quelques travaux scientifiques récents sur les aliments fonctionnels.

Tableau 15. Exemples d'aliments fonctionnels

Aliment de base	Aliments fonctionnels	Référence
Huile	Huile enrichie par caroténoïdes et lycopène, extraits à partir des sous produits de tomate	Benakmoum et al., 2008
Boissons laitiers	Boissons laitiers enrichis par l'huile de graine de lin	Giroux et al., 2010
Pain	Pain enrichi par de l'hémicellulose du son de riz	Hu et al., 2009
Pain	Pain enrichi par d'extrait de pépin de raisin	Peng et al., 2010
Viande	Viande enrichie par des probiotiques (souche de Lactobacillus)	Rebucci et al., 2007
Saucisse de poisson	Saucisse de poisson enrichi par des fibres diétiques de petit pois	Cardoso et al., 2008).
Chocolat	L'oléine de palme rouge dans la formulation de la pâte à tartiner fonctionnelle	El-Hadad et al., 2011

4. La viande

4.1. Composition

Le Codex Alimentarius définit la viande de la manière suivante: «*Toutes les parties d'un animal destinées, ou jugées saines et aptes, à la consommation humaine*». La viande est un aliment très riche en éléments nutritifs. Elle se compose essentiellement d'eau, de protéines, de lipides, d'hydrates de carbone. Des sels minéraux, des vitamines et d'autres composants bioactifs sont aussi présents.

La viande peut être classée comme «rouge» (tel que les viandes bovines, ovines et porcines) ou «blanc» (tel que les viandes des volailles) en fonction de la concentration de myoglobine des fibres musculaires. Une composition typique de la viande rouge de différentes races est présentée dans le Tableau 16.

Tableau 16. Composition des éléments nutritifs (par 100 g) de viande rouge maigre (Williams, 2007)

Constituants	Boeuf	Veau	Agneau	Mouton
Eau (g)	73,1	74,8	72,9	73,2
Protéines (g)	23,2	24,8	21,9	21,5
Lipides (g)	2,8	1,5	4,7	4,0
Cholestérol (mg)	50,0	51,0	66,0	66,0
Thiamine (mg)	0,04	0,06	0,12	0,16
Riboflavine (mg)	0,18	0,20	0,23	0,25
La niacine (mg)	5,0	16,0	5,2	8,0
La vitamine B6 (mg)	0,52	0,8	0,10	0,8
La vitamine B12 (µg)	2,5	1,6	0,96	2,8
Acide pantothénique (mg)	0,35	1,50	0,74	1,33
La vitamine A (µg)	<5	<5	8,6	7,8
Le bêta-carotène (µg)	10	<5	<5	<5
Alpha-tocophérol (mg)	0,63	0,50	0,44	0,20
Sodium (mg)	51	51	69	71
Potassium (mg)	363	362	344	365
Calcium (mg)	4,5	6,5	7,2	6,6
Fer (mg)	1,8	1,1	2,0	3,3
Zinc (mg)	4,6	4,2	4,5	3,9
Magnésium (mg)	25	26	28	28
Phosphore (mg)	215	260	194	290
Cuivre (mg)	0,12	0,08	0,12	0,22
Sélénium (µg)	17	<10	14	<10

4.2. Les critères de qualité des viandes

La recherche de la qualité au sens large est actuellement une préoccupation fondamentale pour l'industrie agroalimentaire. La qualité est définie en tant que : «*L'aptitude du produit ou d'un service à satisfaire les besoins des utilisateurs (ISO 8402)*».

La qualité des viandes renferme 5 critères (Perrin et al., 1992) qui sont :

✓ Qualité nutritionnelle : La viande est un élément qui apporte de nombreux nutriments indispensables à une alimentation équilibrée. C'est une source de protéines, de minéraux (tels que le fer) et des vitamines (notamment du groupe B).

✓ Qualité sanitaire : La viande est un produit riche qui constitue un substrat favorable au développement des microorganismes dont certains sont pathogènes ou de substances toxiques. La présence éventuelle de germes pathogènes doit être strictement surveillée.

✓ Qualité organoleptique : Ceci concerne la couleur, la flaveur, la tendreté et la jutosité. La couleur est, chronologiquement, le premier critère d'appréciation de la viande par le consommateur. C'est un facteur déterminant l'achat ou le rejet par ce dernier. Pour les viandes bovines et ovines, brûlure par le froid et brunissement de la viande doivent être évités.

La flaveur est l'ensemble des propriétés gustatives et olfactives perçus au cours de la dégustation. La flaveur se développe au cours de la cuisson. La flaveur de la viande est déterminée par la composition chimique et les changements apportés à cette dernière lors de la cuisson. De nombreux composants aromatiques volatils sont produits lors de la cuisson par dégradation ou oxydation des lipides, dégradation thermique et interactions entre protéines, peptides, acides aminés, sucres et ribonucléotides.

La tendreté peut être considérée comme le composant mécanique de la texture de la viande. La tendreté mesure donc la facilité avec laquelle une viande se laisse couper.

La jutosité influence la perception de la texture de la viande par le consommateur.

✓ La qualité technologique : Les caractéristiques technologiques représentent l'aptitude de la viande à la conservation et à la transformation.

4.3. Les altérations de la viande

La viande et les produits carnés sont des milieux très riches caractérisés par un risque de sécurité très élevé. En effet, ils sont rapidement susceptibles de subir tous types d'altération microbiologique, physicochimique, organoleptique et nutritionnelle.

4.3.1. Les altérations microbiologiques

La viande, par sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques (activité de l'eau, pH), associées à certains facteurs environnementaux constitue un bon milieu de développement des micro-organismes. Ces derniers peuvent être, soit d'origine endogène (présent dans les tissus de l'animal avant l'abattage), soit d'origine exogène (envahissant la carcasse à la suite de contaminations diverses) (Mackey et Kerridge, 1988).

La flore bactérienne susceptible de se développer sur la viande renferme des germes bénéfiques, des germes d'altération et des germes pathogènes (Fig. 12). Le Tableau 17 présente les principaux genres bactériens détectés dans la viande.

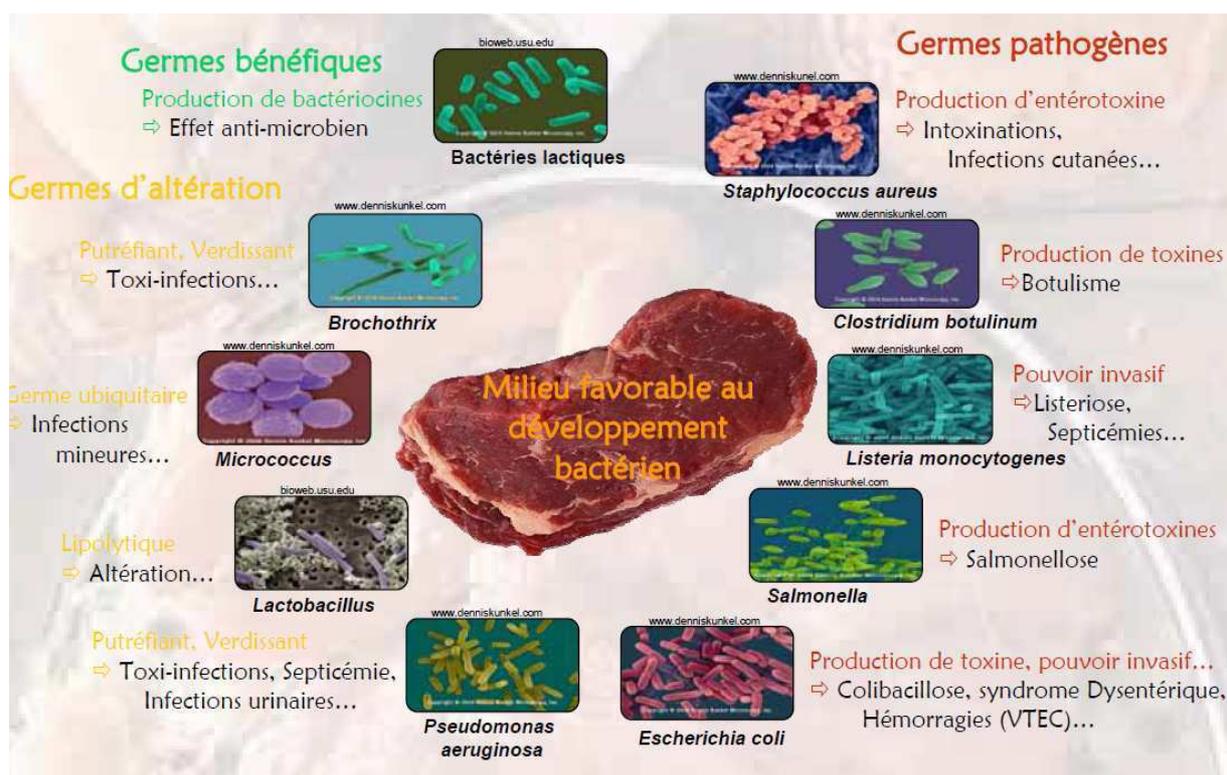


Fig. 12. La flore bactérienne susceptible de se développer sur la viande

Des exemples d'altération microbienne des viandes et produits carnés et les bactéries impliquées sont présentés dans le Tableau 18. L'altération microbienne des viandes se manifeste essentiellement par l'apparition d'odeurs désagréables. Ces odeurs résultent de la production de composés volatils par des bactéries aéro-anaérobies ou anaérobies strictes. Le développement de ces germes sur des viandes conditionnées engendre la production de gaz (CO_2 et H_2S) causant le gonflement des sacs d'emballage. Outre, le phénomène de « putréfaction des viandes » est causé par le développement de bactéries aéro-anaérobies ou aérobies sur les viandes conditionnées. Les premières manifestations de ce phénomène sont discrètes : odeur dite de relent et modification de l'aspect de la viande qui devient poisseuse. Par la suite, lorsque le phénomène s'intensifie, des modifications plus importantes se développent : odeur putride, noircissement et ramollissement des produits en superficie (Bisignano et al., 1999). Les bactéries du genre *Clostridium* interviennent profondément dégradant le glycogène résiduel ou les protéines ; elles dégagent du dioxyde de carbone et provoquent une putréfaction sulfhydrique et ammoniacale. Lorsque la viande reste exposée à une température de 10 à 25°C, la putréfaction peut être superficielle mais elle peut aussi se produire autour des os. À moins de 10°C, se développent des psychrotrophes et d'autres bactéries, surtout Gram négatif, qui forment une enduit visqueux à la surface de la chair et dégagent une odeur désagréable (Vierling, 2008).

En raison des nombreuses manipulations nécessaires à leur préparation, les viandes hachées sont très exposées aux contaminations bactériennes. Par conséquent, elles sont davantage sensibles à la putréfaction que les carcasses et les grosses unités de découpe (Linton et al., 2004).

Tableau 17. Genres des bactéries détectées dans la viande et volaille (Mychas et al., 2008)

Microorganisme	Gram	Abondance dans viande fraîche	Abondance dans viande traité
<i>Achromobacter</i>	-	X	
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	
<i>Alteromonas</i>	-	X	X
<i>Arthrobacter</i>	±	X	X
<i>Bacillus</i>	+	X	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	X
<i>Campylobacter</i>	-	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	
<i>Chromobacterium</i>	-	X	
<i>Citrobacter</i>	-	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebactenum</i>	+	X	X
<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X
<i>Escherchia</i>	-	X	
<i>Flavobacterium</i>	-	X	
<i>Hafnia</i>	-	X	X
<i>Janthinobacterium</i>	-		
<i>Klebsiella</i>	-	X	
<i>Khuyvera</i>	-	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	X
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X
<i>Pantoea</i>	-	X	
<i>Proteus</i>	-	X	
<i>Providencia</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	X
<i>Shewanella</i>	-	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	X
<i>Vibrio</i>	-	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X	

Tableau 18. Exemples d'altération microbienne des viandes et produits carnés et les bactéries impliquées (Mychas et al., 2008)

Défaut	Produit carné	Bactéries impliquées
Bave	Viande	<i>Pseudomonas, Lactobacillus, Enterococcus, Weissella, Brochothrix</i>
H ₂ O ₂ , verdissement	Viande	<i>Weissella, Leuconostoc, Enterococcus, Lactobacillus</i>
H ₂ S, verdissement	Viande conditionné sous vide	<i>Shewanella</i>
H ₂ S production	Viande salée	<i>Vibrio, Enterobacteriaceae</i>
Odeur de sulfure	Viande conditionné sous vide	<i>Clostridium, Hafnia</i>
Odeur de chou	Jambon (salée et fumée)	<i>Providencia</i>
Putréfaction	Jambon	<i>Enterobacteriaceae, Proteus</i>
Gout de l'os	Viande	<i>Clostridium, Enterococcus</i>
Acidification	Jambon	<i>Lactic acid bacteria, Enterococcus, Micrococcus, Bacillus, Clostridium</i>

4.3.2. Les altérations physicochimiques

Au cours de l'entreposage, les viandes peuvent subir une dessiccation proportionnelle au temps de séjour, aux variations de températures subies et à l'étanchéité de leur emballage. Les variations cristallines induites par les fluctuations de la température de stockage génèrent des pertes de masse lors de la décongélation du produit et, par voie de conséquence, une diminution de sa valeur nutritionnelle (Mackey et Kerridge, 1988).

La déshydratation en surface facilite l'oxydation et se traduit par des dénaturations locales. Des taches claires appelées « brûlures de congélation » apparaissent et donnent aux viandes crues un aspect peu engageant. Cette altération de l'aspect des viandes correspond à une sublimation de la glace, qui s'accompagne de la formation de cavités au niveau des couches superficielles, d'où l'aspect blanc grisâtre (Castro et al., 2011). Les « brûlures de congélation » témoignent aussi de variations successives de la température de conservation. Elles peuvent être efficacement limitées par le conditionnement sous vide (du fait de ses propriétés « barrière » aux gaz, ce dernier limite les phénomènes de sublimation) et disparaissent à la cuisson (Bouillet et al., 1982).

Le rancissement des graisses est le principal facteur limitant la durée de congélation, bien qu'il soit possible de s'en prémunir dans une certaine mesure. Il s'explique par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation auxquelles ils sont sensibles les acides gras insaturés, même à très basses températures (jusqu'à -25°C). Il peut se produire à tout moment si les

viandes sont soumises à des variations de température au cours de leur stockage (Castro et al., 2011 ; Bouillet et al., 1982). L'oxygène a une action auto-catalytique, la réaction initiée dans un premier temps se poursuivant, catalysée par les produits formés. En l'occurrence, la réaction commence par la formation de peroxydes, lesquels sont ensuite dégradés pour donner naissance à un grand nombre de composés tels que des aldéhydes, des cétones ou des acides responsables de l'apparition de saveurs désagréables (Bouillet et al., 1982). Or, la formation de peroxydes est considérablement accélérée par une élévation de la température. Cette réaction en chaîne peut donc être initiée ou re-initiée lorsque les viandes sont soumises à des variations de température. Les dégradations qualitatives étant irréversibles et cumulatives, leur répétition finit par conduire à une altération sensible des viandes (Bouillet et al., 1982).

Les réactions de dénaturation des protéines reprennent à la décongélation, dès que la température atteint la plage $-5^{\circ}\text{C}/-1^{\circ}\text{C}$. C'est une phase qu'il importe de maîtriser et de réaliser au froid d'autant qu'une décongélation trop rapide est déconseillée : elle entraîne la rupture des parois cellulaires de la viande avec un taux d'exsudat important. A la cuisson, la viande perd une quantité de jus plus importante et sera plus dure à la dégustation (Bouillet et al., 1982).

4.3.3. Les altérations organoleptiques

Les altérations organoleptiques des viandes concernent la texture, l'odeur et en premier temps la couleur. Les défauts de texture sont liés à la perte en eau et à la modification de la structure des protéines. Des odeurs désagréables peuvent se produire suite au développement des germes microbiennes et /ou oxydation des lipides et des protéines.

La couleur de la viande est facilement et rapidement altérable. Elle est un critère essentiel auquel s'attache le consommateur lorsqu'il doit apprécier l'aspect visuel de la viande. Elle ne doit être ni trop pâle, ni trop foncée et homogène. Elle est due essentiellement à la myoglobine présente dans le muscle ainsi qu'à son état d'oxydation (Santé, 1993 ; Renner, 1988). La myoglobine est une hémoprotéine, composée d'une chaîne polypeptidique et d'un groupement porphyrinique. La partie protéique est fortement liée à l'hème qui possède en son centre un atome de fer qui peut exister aussi bien sous forme ferreux (2+) ou ferrique (3+). La myoglobine est sujette à des modifications biochimiques conduisant à des changements de couleur. Cette dernière dépend de la valence du fer dans l'hème, du type de ligand et des changements dans la molécule (Fig. 13). La couleur est définie par la quantité relative des 3 formes de pigment héminique (la myoglobine réduite, la myoglobine oxygénée ou oxymyoglobine et la myoglobine oxydée ou metmyoglobine) (Sterlie et Lerfall, 2005).

La myoglobine réduite (Mb-Fe²⁺) est le pigment pourpre de la viande en profondeur et de la viande emballée sous vide. Exposée à l'air, la myoglobine se combine à l'oxygène pour former l'oxymyoglobine de couleur rouge vif (MbO₂-Fe²⁺) qui est synonyme de fraîcheur et attractive pour le consommateur de la viande (Sterlie et Lerfall, 2005). La couleur brune, signe d'altération organoleptique, est due à la formation de metmyoglobine.

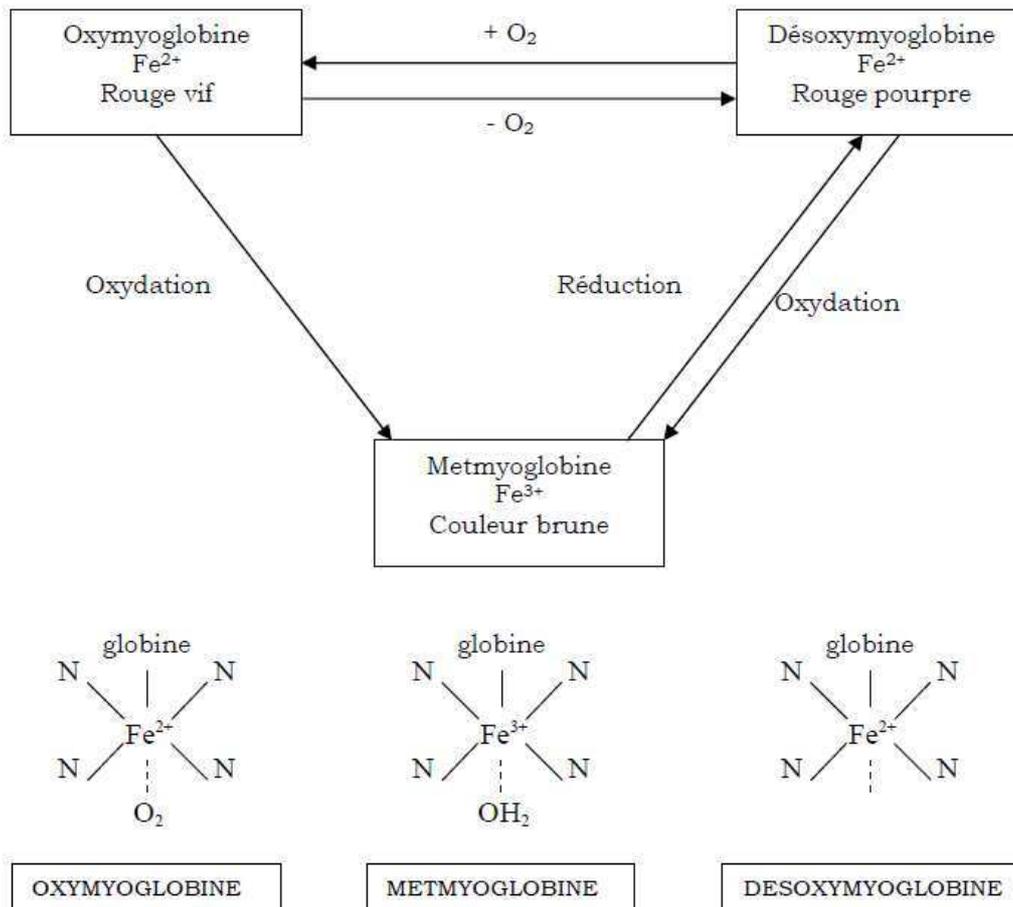


Fig. 13. Relation entre la forme chimique de la myoglobine et la couleur de la viande (adapté de Kijowski, 2001)

4.4. Les méthodes de conservation des viandes

La viande fraîche est un produit sensible et instable au cours du temps en raison de sa composition et ses caractéristiques physicochimiques (pH et aw). La durée de sa conservation dépend de la température, de l'oxygène atmosphérique (O₂), des enzymes endogènes, de l'humidité, de la lumière et, surtout, des micro-organismes initialement présents.

Le déficit de la conservation de la viande remonte à l'antiquité et, actuellement, il s'est accentué avec l'industrialisation des produits carnés. Les techniques de conservation des viandes et des produits carnés sont nombreuses et peuvent être utilisées seules ou combinées. Ces techniques peuvent être classées en procédés chimiques, biologiques et physiques (Tableau 19).

Tableau 19. Les techniques de conservation des viandes et produits carnées

Procédés	Description	Références
Méthodes chimiques		
Le salage	Il consiste en l'incorporation de sel dans la viande. Il permet d'abaisser l'activité de l'eau et ainsi de freiner le développement des microorganismes à la surface du produit et d'éloigner les insectes et autres parasites.	Belkel et al., 2005
Addition de substances chimiques	Ces additifs chimiques possèdent des fonctions antimicrobiennes. Certains additifs maintiennent la coloration rouge de la viande. Exemple : Nitrites, nitrates, orthophosphates de sodium, lactate de potassium, diacétate de sodium, érythorbate de sodium, lutéine, sesamole, acide ellagique...	Reichl et al., 2004 ; Hayes, et al., 2009
Addition des épices, herbes médicinales, leurs extraits ou des huiles essentielles	Ces additifs naturels possèdent des fonctions antimicrobiennes et antioxydantes, en plus de leur contribution dans l'aromatisation des produits dérivés de la viande. Ils repoussent aussi les insectes. Exemple : Les huiles d'eugéno, clove, oregano et du thym, le clou de girofle, le piment et le gingembre, l'ail, l'oignon...	Govaris et al., 2010 ; Dejong et Lanari, 2009
Le conditionnement sous vide	Il s'agit de conserver la viande en ôtant l'air du récipient qui la contient. Ce qui bloque la prolifération microbienne	Parra et al., 2010
Le conditionnement dans une atmosphère modifiée	Le conditionnement sous atmosphère modifiée consiste à remplacer l'air contenu dans l'emballage par un gaz ou un mélange gazeux. Cette technique permet, en réduisant le niveau d'oxygène tout en maintenant le niveau d'humidité, de bloquer la prolifération microbienne et ainsi de prolonger la durée de conservation de la viande tout en préservant ses qualités organoleptiques.	Skandamis et Nychas, 2002; Parra et al., 2010
Méthode biologique		
Bio préservation	Il s'agit d'une conservation par fermentation lactique des viandes. Les espèces bactériennes responsables sont les bactéries lactiques (<i>Lactobacilles</i> , <i>Leuconostoc</i>) et les bactéries du genre <i>Micrococcus</i> . La fermentation inhibe l'altération microbiologique et le développement des bactéries pathogènes en raison de l'abaissement du pH, de la réduction du potentiel d'oxydoréduction, de la production de bactériocine, d'acides organiques et de peroxyde d'hydrogène. En plus, elle préserve la qualité organoleptique (flaveur, couleur etc.) et la valeur nutritionnelle et la digestibilité du produit initial.	Hugas et al., 1998; Schillinger et al., 1991
Méthodes physiques		
Le séchage	Il consiste à éliminer, partiellement ou totalement, l'eau contenue dans les viandes fraîches par l'action combinée de la température, de la ventilation et de l'hygrométrie de l'air. Cette méthode assure la diminution de l'activité de l'eau du produit et ainsi elle inhibe le développement des microorganismes et les réactions enzymatiques. Cependant, cette méthode provoque des modifications physiques, mécaniques et biochimiques entraînant une dénaturation des protéines, l'oxydation des matières grasses et des réactions de brunissement non enzymatique.	Belkel et al., 2005

Tableau 19. Les procédés de conservation des viandes et produits carnés (suite)

Procédés	Description	Références
Méthodes physiques		
Le Fumage	<p>Il consiste à soumettre la viande à l'action directe ou indirecte de la fumée issue de la combustion de certains végétaux. Cette méthode permet une conservation due aux composés volatiles de la fumée, un empêchement de l'infestation de la viande par les insectes, une amélioration de la saveur et la couleur du produit fini. Cependant, Les viandes conservées par le fumage sont le plus souvent exposées à la contamination par certains composés toxiques de la fumée tels que le 3-4 benzopyrène et la dégradation des acides aminés et des vitamines. Ces effets nuisibles se traduisent par une altération des qualités hygiéniques et de la valeur nutritionnelle des produits obtenus. Outre, le fumage entraine une dessiccation se traduisant par une diminution de poids. La viande apparait plus sèche et plus ferme.</p> <p>Il consiste à abaisser la température de conservation des viandes. Ceci solidifie l'eau contenue dans la viande et ainsi l'activité de l'eau diminue. Par conséquence, le froid arrête ou ralentit l'activité cellulaire, les réactions enzymatiques et le développement des microorganismes.</p> <p>Les trois stades de la conservation par le froid sont la réfrigération, la congélation et la surgélation.</p> <p>Il s'agit d'utiliser des hautes températures qui permettent la destruction ou inhibition totalement des enzymes et des microorganismes et leurs toxines.</p> <p>C'est un processus non-thermique qui consiste à exposer la viande à des pressions élevées. Il améliore la durée de vie du produit en réduisant le nombre de microorganismes et l'activité de certaines enzymes.</p> <p>Le chauffage ohmique consiste à chauffer l'aliment par le passage d'un courant électrique directement à travers le produit. La résistance du produit à la circulation de l'électricité provoque l'élévation de sa température. C'est un traitement haute température-temps court (HTST). L'énergie qui sert au chauffage est libérée directement dans la masse du produit plutôt qu'en surface, ce qui en fait un procédé d'une remarquable efficacité. Ce procédé maintient les éléments nutritifs et les caractéristiques organoleptiques du produit traité.</p> <p>Elle repose sur l'exposition de la viande à l'action de rayonnements ionisants électromagnétiques. Elle permet d'assainir et/ou d'augmenter la durée de conservation du produit en réduisant ou éliminant les microorganismes pathogènes et d'altération. Cette méthode garde les qualités organoleptiques du produit.</p> <p>Il s'agit d'appliquer à la viande une énergie non-ionisante à haute fréquence (tel que : microonde, radiofréquence). Il est utilisé pour la cuisson, le séchage, la pasteurisation. Il permet l'inactivation des microorganismes toute en préservant les qualités nutritionnelle et organoleptique du produit traité.</p> <p>Utilisation d'emballage actif qui contient des substances antimicrobiennes. Ces dernières diffusent de l'emballage vers le produit au cours du stockage et ainsi réduit le développement des contaminants microbiens. Cet emballage permet d'augmenter la durée de conservation du produit tout en améliorant la qualité hygiénique et en préservant la qualité sensorielle.</p>	Belkel, et al., 2005.
Conservation par le froid		Belkel, et al., 2005.
Conservation par la chaleur		Santos et al., 2010
La méthode de haute pression (pascalisation) Le chauffage ohmique		Hugas et al., 2002
		Piette et al., 2004
L'irradiation ionisante (ionisation)		Sommers et Boyd, 2006 ; Cava et al., 2005
Chauffage à haute fréquence		Huang et Sites, 2007 ; Yilmaz et al., 2005 ; Orsat et al., 2004.
Emballage actif		Lungu et Johnson, 2005 ; Mauriello et al., 2004

Traditionnellement, les viandes sont conservées par des procédés tels que le salage, le séchage et le froid. Récemment et avec les progrès scientifiques et technologiques, des procédés alternatives, tels que la méthode de haute pression, la biopréservation, l'irradiation, l'emballage actif, le chauffage ohmique et le chauffage à haute fréquence sont utilisés (Aymerich et al., 2008).

4.5. Amélioration de la valeur fonctionnelle des viandes

Les viandes et les produits carnés sont des sources importantes de protéines, matières grasses, acides aminés essentiels, minéraux et vitamines et autres nutriments (Biesalski, 2005). Actuellement, les demandes de consommateur dépassent la satisfaction des besoins nutritifs à la satisfaction de maintenir en main sa santé. Ces dernières années, les demandes de viandes et produits carnés sains, salubres et ayant des effets bénéfiques sur la santé et des rôles préventifs contre des maladies tel que maladies cardio-vasculaires, obésité, sont en haute croissance. Le consommateur demande des viandes et produits carnés avec un niveau réduit de matières grasses et de cholestérol, un contenu faible ou absence de nitrite et de chlorure de sodium, une amélioration de la composition du profil des acides gras, une incorporation d'ingrédients fonctionnels ayant des propriétés bénéfiques pour la santé.

En réponse à ses demandes des consommateurs, beaucoup d'attention est accordé par les chercheurs et les industriels afin de développer des viandes et produits carnés ayant des fonctions physiologiques qui promeuvent la santé et préviennent les risques de maladies.

Trois stratégies sont utilisées, seuls ou combinées, pour améliorer la valeur fonctionnelle des viandes et produits carnés (Zhang et al., 2010).

- ✓ L'amélioration de la valeur fonctionnelle des viandes peut être réalisée en ajoutant des composés fonctionnels dont l'acide linoléique conjugué, la vitamine E, l'acide gras Omega3 et de sélénium à l'alimentation animal. Cet ajout améliore aussi la production animale, la composition de la carcasse et la qualité de la viande fraîche (Formanek et al., 2001; Luciano et al., 2011).
- ✓ Des ingrédients fonctionnels tels que les protéines végétales (les protéines de soja, de lactosérum, de blé...), les fibres alimentaires, les herbes et les épices (ail, sage, origan, clou de girofle, extrait de romarin...), des probiotiques et des bactéries lactiques peuvent être directement incorporés dans les viandes et produits carnés pendant le traitement pour améliorer leur valeur fonctionnelle (Hayes et al., 2011 ; Huang et al., 2005).
- ✓ Des composés fonctionnels, notamment les peptides, peuvent également être générés à partir de viandes et produits carnés au cours de traitement tels que la fermentation, la maturation, et l'hydrolyse enzymatique (Kurt et Zorba, 2009).

4.6. Effet des additifs sur les viandes et produits carnés

Différents additifs peuvent être ajoutés aux viandes et produits carnés. Ces additifs pourraient être de type synthétique (tel que le lactate de potassium) ou naturelle. Ces derniers regroupent les épices, les plantes, les extraits, les huiles essentielles, les bactéries lactiques et les probiotiques. Ces additifs possèdent des effets sur les qualités nutritionnelles, fonctionnelles, technologiques et microbiennes des viandes et produits carnés. Le Tableau 20 présente quelques travaux récents sur l'utilisation et les effets de certains additifs sur les viandes et produits carnés.

Les principaux effets des additifs sur les viandes et produits carnés sont :

- ✓ Amélioration des propriétés sensorielles par effet aromatisant de certains additifs et pouvoir texturant de certains d'autres.
- ✓ Production d'aliment fonctionnel lors d'utilisation d'additifs possédant des vertus pour la santé humaine.
- ✓ Amélioration de la conservation par effet antimicrobien et /ou antioxydant de certains additifs, évitant ainsi la prolifération microbienne et l'oxydation des lipides et de l'oxymyoglobine.
- ✓ Gain technologique par diminution des pertes à la décongélation, à la conservation et à la cuisson.
- ✓ Inhibition des germes pathogènes tels que *Salmonella* et *Listeria*.

Tableau 20. Effet des additifs sur les viandes et produits carnés

Additifs	Concentration	Produits	Effets	Références
Fibres diétiques des pomaces du raisin	(0.5, 1, 1.5 et 2%)	Hamburger de poulet (cru et cuit)	Améliore la stabilité oxydative ; pas d'effet sur les propriétés sensorielles	Sayago-Ayerdi et al., 2009
lutein sesamol ellagic acid Extrait des feuilles d'olivier	lutein (200 mg/g meat), sesamol (250 mg/g meat), ellagic acid (300 mg/g meat), extrait des feuilles d'olivier (200 mg/g meat)	Saucisse de porc (cru et cuite)	Augmente la stabilité des lipides ; production d'aliment fonctionnel ; amélioration de la conservation.	Hayes et al., 2011
Extrait de feuilles de bourrache	340 ppm	Saucisse fermenté sèche	production d'aliment fonctionnel; contrôle l'oxydation des lipides.	García-Iñiguez de Ciriano et al., 2009
Bactéries lactiques	7 log UFC/g	Viande de volaille cru	Effet antimicrobien contre <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella Enteritidis</i>	Maragkoudakis et al., 2009

Tableau 20. Effet des additifs sur les viandes et produits carnées (suite)

Additifs	Concentration	Produits	Effets	Références
Huile essentielle de la sauge (<i>Salvia officinalis</i>) et de grain de poivre sauvage (<i>Schinus molle</i>)	0-3%	Viande hachée bovine	Effet antimicrobien contre <i>Salmonella anatum</i> et <i>Salmonella enteritidis</i>	Hayouni et al., 2008
Huile essentielle d'origan et / ou nisin	Huile essentielle d'origan (0,6-0,9%) et / ou nisin (500-1000 IU/g)	Viande hachée de mouton	Effet antimicrobien contre <i>Salmonella enteritidis</i>	Govaris et al., 2010
Farine de blé, concentré de protéine de lactosérum ou isolat de protéine de soja	0,2%	Boulettes de viandes cuites	Amélioration des propriétés texturales, Réduction de l'oxydation des lipides et de l'oxymyoglobine	Ulu, 2004
Extrait phénolique des margines	50-100 mg phénol/ Kg viande	Viandes hachées porcine et bovine	Amélioration de la stabilité des lipides contre l'oxydation	Dejong et Lanari, 2009
Son de riz	0-15%	Boulettes de viandes de porc	Amélioration des propriétés texturales, production d'aliment fonctionnel	Huang et al., 2005
Lactate de potassium	2,5%	Viande bovine	Stabilisation de la couleur	Kim et al., 2009
Farine de grain de coton	0-3%	Viande hachée cuite de bœuf	Réduction de l'oxydation des lipides	Rhee et al., 2001
Catéchines extraites du thé vert	0-1000 mg/Kg	Viande hachée de bœuf	Réduction de l'oxydation des lipides ; Stabilisation de la couleur	Tang et al., 2006
Tomate séche (riche en lycopène)	0-6%	Hamburger de bœuf (cru et cuite)	Modification des propriétés de texture à cause de la présence de fibre ; modification de la couleur et obtention d'une couleur caractéristique due à la carotène	Luisa Garcia et al., 2009
La gomme brute de Malva Nuts	0,2 g/ 100g	Pate de viande de volaille (cru et cuite)	Amélioration de la texture	Somboonpanyakul et al., 2007
La gomme brute de Malva Nuts	0,6g/ 100g	Saucisses	Faible perte à la cuisson	Somboonpanyakul et al., 2007
Eugenol, Acide rosmarinic	0,05 %	Viande hachée bovine	Stabilité de la couleur	Allen et Cornforth, 2010

5. La spectroscopie moyen infrarouge et l'analyse chimométrique

Les techniques spectroscopiques sont des méthodes physiques de caractérisation et de quantification. La spectroscopie moléculaire peut être définie comme l'étude de l'interaction des ondes électromagnétiques et de la matière (Banwell, 1983) sur un domaine de longueurs d'ondes spécifiques.

L'absorption de radiation électromagnétique par une molécule induit :

- ✓ soit une transition électronique s'il s'agit de visible ou d'ultraviolet. Ceci est à la base de la spectroscopie d'absorption UV-visible.
- ✓ soit une transition vibrationnelle s'il s'agit de radiation infrarouge. Ceci est à la base de la spectroscopie infrarouge (IR).
- ✓ soit une transition d'état de spin nucléaire s'il s'agit d'une onde radio. Ceci est à la base de la spectroscopie Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Chaque technique spectroscopique correspond à une plage spectrale (Fig. 14) :

- ✓ l'ultraviolet-visible dans la région 10 - 700 nm,
- ✓ l'infrarouge dans la région 700 nm - 50 μm ,
- ✓ la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) dans la région des fréquences radio 30 cm-10 m.

Le rayonnement électromagnétique infrarouge se décompose en trois parties: le proche infrarouge (PIR), le moyen infrarouge (MIR) et le lointain infrarouge (LIR) (Fig. 14).

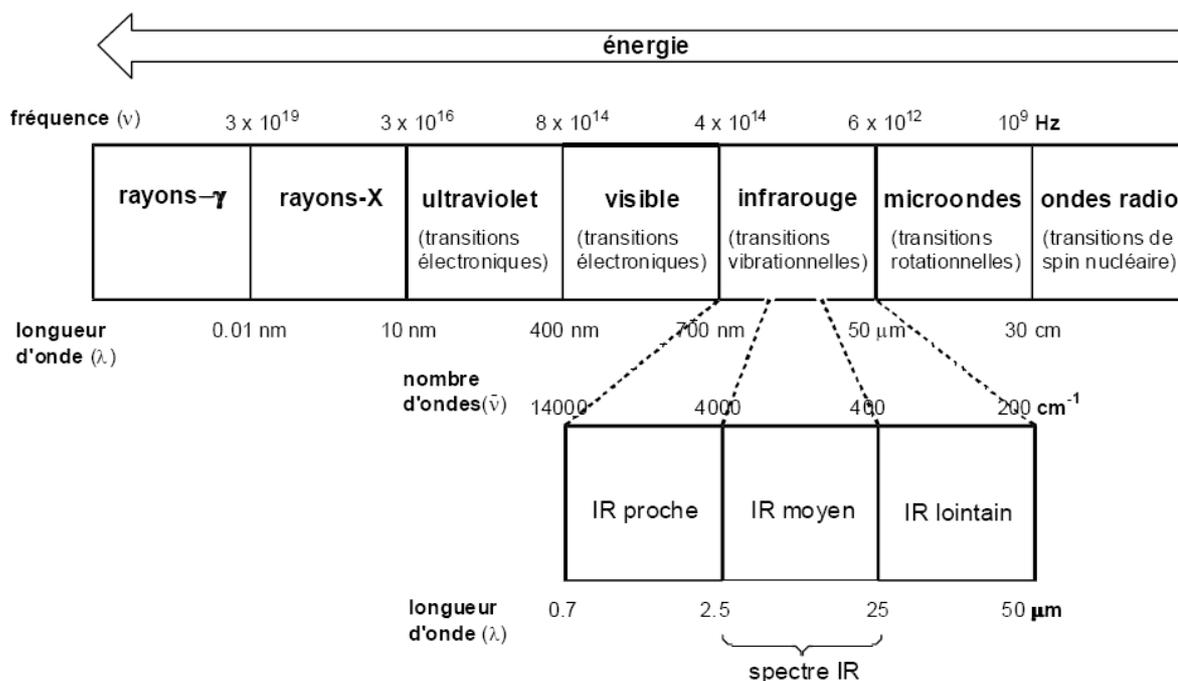


Fig. 14. Le spectre électromagnétique

5.1. Le principe de la spectroscopie moyen infrarouge

La spectroscopie MIR est basée sur l'absorption du rayonnement, dans la région allant de 4000 à 400 cm^{-1} , où tout composé organique possède une signature qui lui est propre. Les bandes d'absorption MIR sont dues essentiellement aux vibrations fondamentales des molécules. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise sera enregistrée.

Plusieurs phénomènes peuvent subvenir lors de l'interaction entre ce type d'énergie (rayonnement MIR) et la matière, dont la modification des distances interatomiques (vibrations de valence ou d'élongation) et les angles de valence (vibrations de déformation). Beaucoup de groupements fonctionnels de composés organiques vont présenter des vibrations caractéristiques. Ainsi, il est possible d'attribuer des absorptions à des entités chimiques spécifiques (exemple : C-H, C=O, N-H). A une matière de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier la matière. Par conséquent, la spectroscopie MIR est très utile pour l'analyse qualitative. Le spectre infrarouge est donc extrêmement important pour l'identification de groupements. Cependant, les spectres des mélanges sont très complexes et on ne peut attribuer toutes les bandes. L'analyse quantitative par spectroscopie MIR est également possible, l'intensité de l'absorption étant proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante.

Un spectre MIR peut être décomposé en deux régions (Fig. 15) :

- ✓ La région 4000-1500 cm^{-1} où se trouvent les bandes d'absorption qui peuvent être attribuées à des groupements fonctionnels particuliers. La plage spectrale, entre 4000-1300 cm^{-1} est appelée la zone des «fréquences de groupe» car des molécules avec le même groupe fonctionnel présentent des bandes d'absorption sensiblement aux mêmes fréquences, indépendamment de la chaîne carbonée principale.
- ✓ La région 1500-400 cm^{-1} qui comprend de nombreuses bandes et caractérise la molécule dans son ensemble. Cette dernière représente l'empreinte de la molécule, nommée « fingerprint ». La région 1300-200 cm^{-1} contient des bandes vibrationnelles plus difficilement attribuables à des groupes fonctionnels spécifiques, du fait que les masses et les forces de liaison de chacune des espèces absorbantes sont très similaires. Pourtant, il y a dans cette région des absorptions importantes et souvent caractéristiques de ce qui est présent dans l'échantillon. C'est pour cette raison que cette région est intitulée le zone des «empreintes digitales».

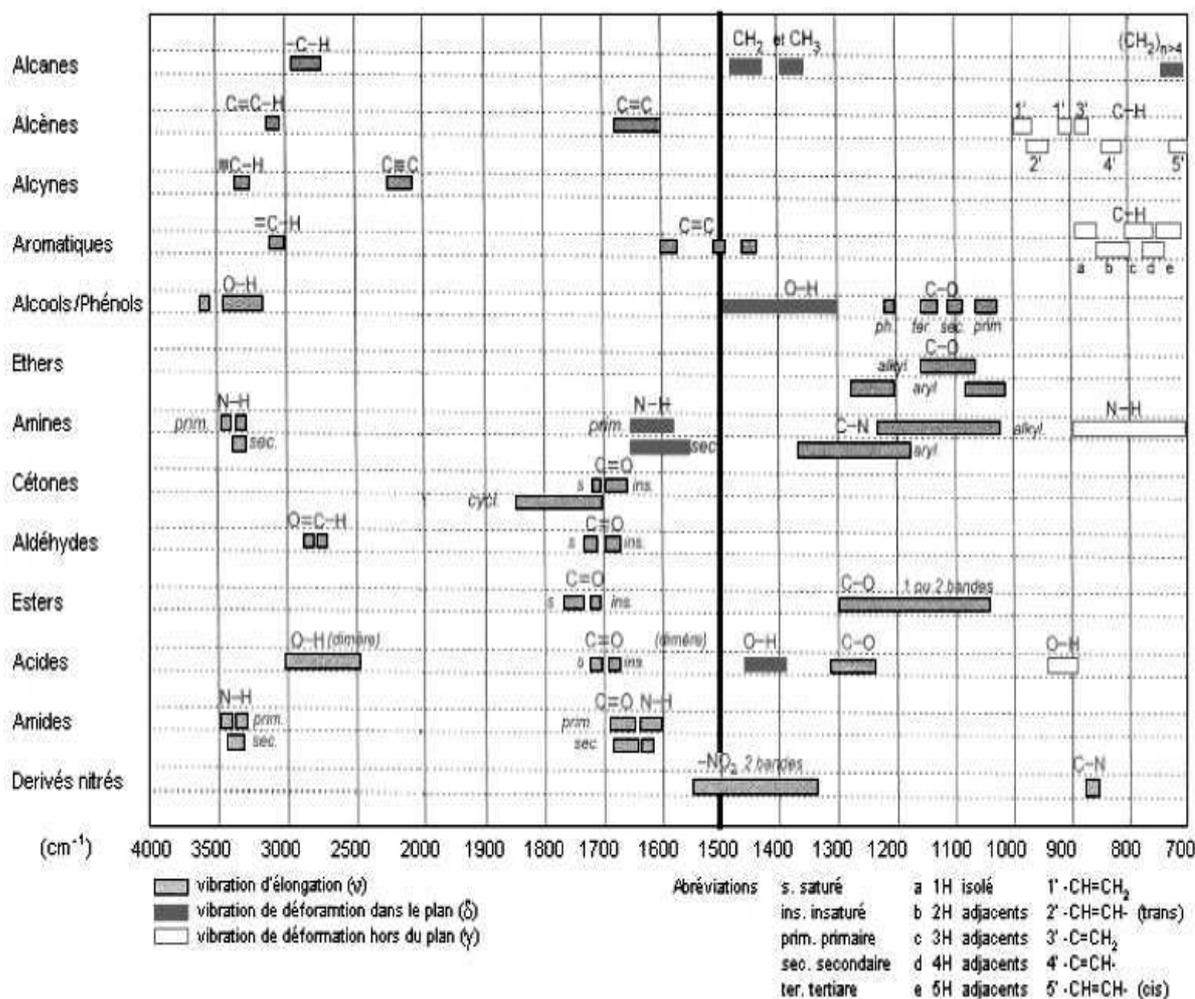


Fig. 15. Attribution des bandes d'absorption dans le moyen infrarouge (Rouessac, 2002)

5.2. Les avantages et les inconvénients de la spectroscopie moyen infrarouge

5.2.1. Les avantages

Comparé à d'autres méthodes classiques d'analyse, la spectroscopie MIR présente de nombreux avantages:

- ✓ Peu ou pas de préparation de l'échantillon : La spectroscopie MIR permet d'analyser directement un échantillon liquide, solide ou pâteux sans aucune préparation ni dilution.

- ✓ Pas de résidus: Cette méthode est appliquée directement sur l'échantillon. Ainsi, l'utilisation de solvants toxiques ou de consommables pour sa préparation n'est pas nécessaire.

- ✓ Rapidité de la mesure: Après calibration, les spectromètres MIR peuvent analyser un échantillon et calculer un résultat en quelques secondes.

- ✓ Analyse non destructrice.

- ✓ Une très faible quantité de matière est suffisante pour l'analyse.

✓ Précision de la technique spectroscopique MIR : (répétabilité de la méthode qui opère par transformée de Fourier et accumulation spectrale) ; Les analyses MIR ne nécessitant pas de préparation d'échantillon, l'erreur liée à l'échantillonnage est considérablement réduite, ce qui augmente ainsi la précision et la reproductibilité des mesures.

✓ Possibilité de caractériser plusieurs propriétés simultanément.

✓ Simplicité de la mise en œuvre de la technique, qui permet d'analyser une large gamme de produits.

✓ Possibilités d'analyse de produits toxiques ou dangereux à distance (plus de 100 m en utilisant les fibres optiques).

✓ Méthode de choix pour le contrôle industriel, analyse et monitoring in situ en temps réel. Installation en ligne sur les unités de fabrication par l'emploi de fibres optiques, permettant l'analyse simultanée de plusieurs produits ; Des fibres optiques sont utilisées pour transmettre le signal IR au travers d'une longue distance, sans perte d'intensité lumineuse. Ces accessoires de mesures sont très robustes et adaptés à une utilisation dans un site de production. En utilisant des sondes à fibres optiques, des échantillons peuvent être mesurés à distance dans de grands récipients ou au sein de réacteurs.

✓ Coût de l'analyse : faible coût d'analyse et de maintenance. En comparaison avec les analyses chimiques classiques, le coût le plus élevé pour la spectroscopie MIR est celui de la mise en place initiale de la méthode d'analyse ; puis, plus le nombre d'échantillons augmente, plus le coût d'une analyse décroît.

5.2.2. Les inconvénients

En plus des avantages cités, la spectroscopie MIR présente de nombreux inconvénients:

✓ Manque de corrélation structurale (difficultés pour l'interprétation des spectres).

✓ Manque de bibliothèques de spectres diversifiés.

✓ N'est généralement pas une technique d'analyse de traces.

✓ Besoin de calibration pour les mélanges (Analyse directe très difficile en général).

Utilisation de méthodes chimiométriques. Phase de l'étalonnage longue et délicate.

✓ Parfois, problèmes de transfert de calibration d'une méthode d'un appareil à l'autre.

5.3. Instrumentation de la spectroscopie moyen infrarouge

Il existe deux grands types d'appareils. Leurs différences résident essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'onde.

✓ Spectromètres dispersifs.

✓ Spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR) (non dispersifs).

• **Spectromètres IR dispersifs :**

Les premiers spectromètres infrarouges sont de type dispersif (de moins en moins utilisés). Ces appareils sont conçus selon le schéma de principe représenté sur la Fig. 16.

Dans ce type de spectromètre «classique», un rayon de lumière infrarouge est produit et scindé en deux faisceaux. L'un passe au travers de l'échantillon, l'autre au travers d'une référence qui est quelquefois le composé dans lequel l'échantillon a été dissous. Les faisceaux sont ensuite réfléchis jusqu'à un détecteur, après être passés par un séparateur qui alterne rapidement les faisceaux entrant dans le détecteur. Les deux signaux sont comparés et le spectre est ainsi obtenu.

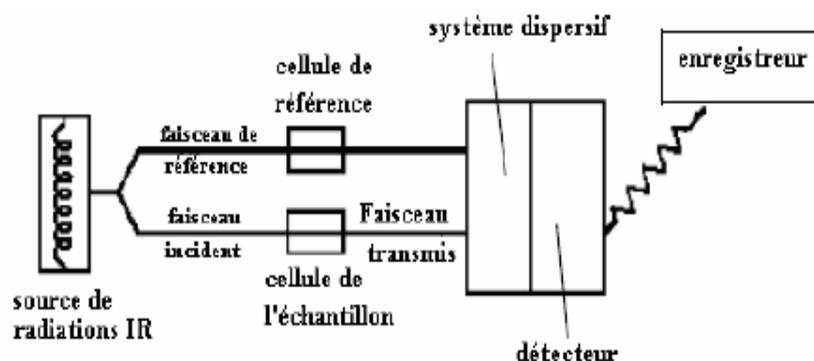


Fig. 16. Schéma de principe d'un spectromètre IR dispersif

Les avantages de ces appareils :

- ✓ L'échantillon est placé entre la source et le monochromateur de façon que l'émission propre de l'échantillon soit éliminée.
- ✓ L'utilisation d'une référence permet :
 - d'éviter les fluctuations de sortie de source qui peuvent affecter les données. Ces fluctuations ont des origines diverses, comme le vieillissement.
 - d'éviter la prise en compte des effets de solvant (la référence est généralement le solvant pur correspondant à celui dans lequel l'échantillon est dissous).

Les inconvénients de ces appareils :

- ✓ La relative lenteur des mesures (étant donné que l'instrument mesure chaque fréquence individuellement, l'enregistrement d'un échantillon prend de 10 à 15 minutes).
- ✓ La relative insensibilité (la détection nécessite une quantité raisonnable de produit pour une analyse exploitable).
- ✓ La complexité mécanique (existence de certaines parties mobiles toutes sujettes à des problèmes de casse mécanique).

• **Spectromètres IR à transformée de Fourier (FT-IR) (non dispersifs) :**

Les spectromètres FT-IR ont été développés pour apporter une réponse aux limitations des spectromètres dispersifs. La difficulté principale à résoudre était celle de la lenteur de l'acquisition. Il était indispensable d'imaginer un dispositif mesurant toutes les fréquences *simultanément*. Ce dispositif est l'*interféromètre*.

La Fig. 17 décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier. Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

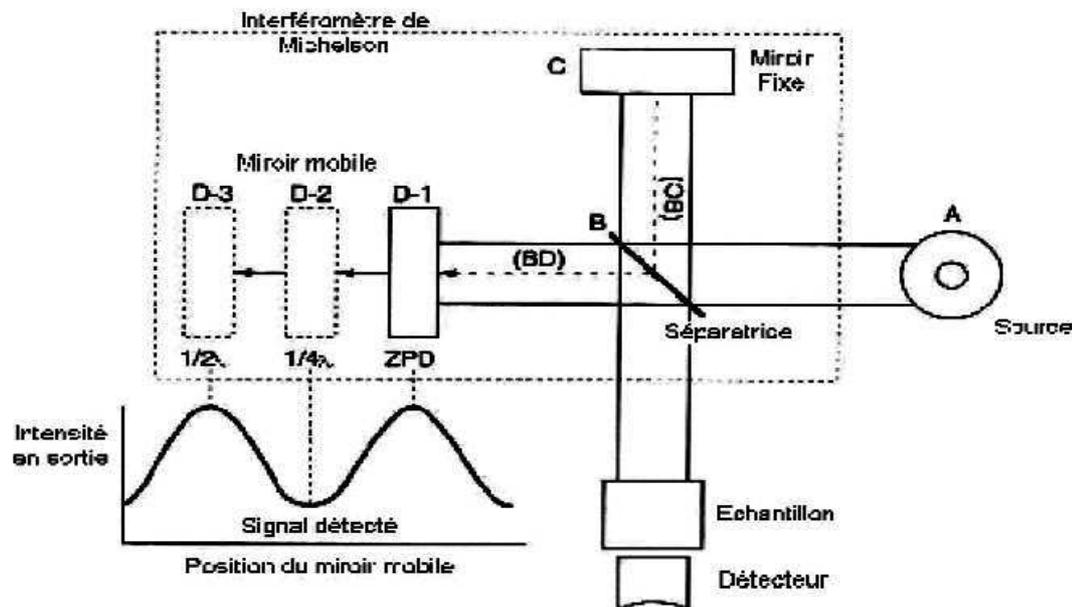


Fig. 17. Schéma de principe d'un spectromètre IR à transformée de Fourier

Les avantages par rapport aux spectromètres dispersifs :

- ✓ Rapidité: du fait d'une mesure simultanée de toutes les fréquences, la mesure dure quelques secondes. Un spectre de 800-8000 cm^{-1} de résolution de 2 cm^{-1} , mesuré en 30 minutes sur un spectromètre dispersif, sera collecté en 1 seconde au même rapport signal/bruit.
- ✓ Une absence d'échauffement de l'échantillon qui peut être soumis beaucoup moins longtemps à la radiation IR que dans le cas d'un dispersif classique.

- ✓ Sensibilité est très largement améliorée par rapport aux systèmes dispersifs. La possibilité de réaliser plusieurs acquisitions permet d'améliorer considérablement le rapport signal/bruit. La très bonne sensibilité permet d'envisager des applications en *contrôle qualité* (identification de contaminants par exemple). Il est en outre possible d'effectuer des *analyses quantitatives* de grande précision avec ce type de spectromètre.
- ✓ Simplicité mécanique : la seule partie mobile de l'instrument est le miroir mobile.
- ✓ Etalonnage interne : basé sur le laser hélium-néon (He-Ne, 632,8 nm). Il est utilisé pour contrôler l'interféromètre et fournir une calibration interne de longueur d'onde. Il constitue la source d'exactitude et de précision élevées en nombre d'onde.
- ✓ On n'observe aucun spectre d'émission de l'échantillon qui est placé optiquement après l'interféromètre. Les radiations IR émises par l'échantillon ne sont pas modulées et par conséquent non détectées.
- ✓ Résolution spectrale élevée : de l'ordre de 2 cm^{-1} , alors qu'en spectroscopie infrarouge classique, on atteint une résolution de 50 cm^{-1} .

5.4. Analyse chimométrique

5.4.1. Définition

La Chimométrie est l'ensemble des méthodes mathématiques appliquées à la genèse, à la collecte et au traitement de l'information expérimentale. Leur mise en œuvre étant rendue possible grâce à l'outil informatique. Cela comprend notamment :

- ✓ Les méthodes multivariées d'analyse de données
- ✓ Les méthodes taxonomiques et de classification
- ✓ Les méthodes de traitement du signal
- ✓ La validation des méthodes de mesures
- ✓ La méthodologie des plans d'expérience

Les sciences analytiques constituent le champ d'application privilégié de la Chimométrie, que ce soit pour l'étude, l'optimisation et la validation des méthodes séparatives, pour l'étalonnage des méthodes spectrales ou bien pour l'analyse et la modélisation des données (classification, constitution de chimiothèques en fonction des propriétés).

5.4.2. L'apport des méthodes chimométriques au traitement des spectres infrarouges

L'interprétation des spectres infrarouges est très difficile. En fait, ces spectres sont complexes en raison de chevauchement des bandes d'absorption de toutes les liaisons chimiques de l'échantillon analysé. C'est pourquoi des méthodes chimométriques sont appliquées afin d'extraire le maximum de l'information quantitative et qualitative contenue dans les spectres IR

Ces méthodes chimiométriques permettent l'analyse multicomposants et l'exploitation de la plus grande partie de l'information sans émettre d'hypothèses trop restrictives sur le plan de la théorie spectrale. En amont, elles permettent l'optimisation des essais en garantissant la qualité spectrale recueillie. En aval, dans le cas des analyses quantitatives, elles permettent la description des données sous forme synthétique (moyennes, variances...) et la quantification des résultats (méthodes prédictives) à l'aide des méthodes de régression permettant la compression des données comme la régression en composantes principales (PCR) et la méthode des moindres carrés partiels (PLS).

Le développement des techniques spectroscopiques IR quantitatives est dû aux possibilités offertes par l'IRTF associées au développement permanent des systèmes informatiques. La qualité des analyses quantitatives a beaucoup progressé en raison d'une meilleure précision des appareils (spectre acquis numériquement, appareils à rapport S/B élevé, bonne linéarité sur un large domaine). C'est cette numérisation des spectres qui autorise l'emploi de toutes les techniques d'analyse de données rendues possibles par l'offre logicielle actuelle. A noter qu'avec cette numérisation, les possibilités de traitements correctifs des spectres (correction de la ligne de base, dérivée d'ordre 1 à 3 ...) sont nombreuses.

5.4.3. Classification des techniques chimiométriques appliquées sur les spectres MIR

Les méthodes chimiométriques appliquées sur spectre MIR s'inscrivent dans le cadre de trois objectifs principaux :

✓ **Méthodes descriptives : exploration des données**

Avant de commencer une étude prédictive ou une étude de classification, il faut observer les données spectrales pour apprécier leur structure et détecter la présence de données aberrantes.

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) peut être réalisée à partir de méthodes exploratoires, non supervisée, telle que l'analyse en composantes principales (ACP).

✓ **Méthodes prédictives :**

Ces méthodes sont utilisées pour la prédiction de la valeur d'une ou plusieurs variables sur de nouveaux échantillons. Les notions utilisées sont très souvent:

- Régression linéaire multiple (MLR, MultiLinear Regression).
- Régression en composantes principales (PCR, Principal Component Regression).
- Régression des moindres carrés partiels (PLS, Partial least Square).

✓ **Méthodes de classification :**

Ces méthodes permettent la classification d'un nouvel échantillon. Il existe deux grands types de méthode de classification :

- La classification non supervisée : 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.

Les méthodes de classification sont :

- La méthode des K plus proches voisins (KNN, K-Nearest Neighbors).
- L'analyse linéaire discriminante (LDA, Linear Discriminant Analysis).
- Les réseaux de neurones (ANN).
- La méthode discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA, Partial least Square-Discriminant analysis).
- SIMCA.

Les objectifs de prédiction et de classification par traitement chimiométriques des spectres IR nécessitent la construction d'un modèle d'étalonnage sur les données disponibles pour prédire des variables.

5.4.4. Etapes de construction des modèles et critères de validation

Les méthodes utilisées pour construire un modèle à partir des données spectroscopiques sont nombreuses. Que ce soit pour les méthodes prédictives ou de classification, l'analyse se divise en trois étapes : l'étalonnage, la validation et la prédiction. L'évaluation de la performance de l'étalonnage et de la validation repose sur plusieurs paramètres statistiques. Cependant, les données spectrales brutes, telles qu'elles sont acquises par un spectromètre, n'ont pas la forme la plus adaptée aux traitements d'une méthode statistique. Elles peuvent être entachées de défauts liés à la présence d'un bruit aléatoire ou à des déformations de la ligne de base. Il est souvent utile d'appliquer un prétraitement aux données avant leur exploitation.

• **Etapes de construction des modèles : Étalonnage, validation, prédiction**

- ✓ L'étape d'étalonnage permet de construire un modèle d'étalonnage c'est-à-dire le modèle mathématique qui relie les absorbances aux différentes longueurs d'onde ($X_{N,K}$) à la propriété à prédire (Y).

- ✓ L'étape de validation vérifie si le modèle obtenu donne des résultats satisfaisants sur un lot d'échantillons différents de celui utilisé lors de la phase d'étalonnage. Les valeurs calculées par le modèle sont comparées aux valeurs de références, dans le cas où l'on prédit une propriété physico-chimique. Dans le cas de prédiction d'une classe, on vérifie que l'échantillon est correctement classé.
- ✓ L'étape de prédiction correspond à l'utilisation en routine de la technique spectroscopique en s'affranchissant de la méthode chimique de référence. L'analyse d'échantillons inconnus se fait directement après l'acquisition du spectre, afin de prédire leurs propriétés physicochimiques ou leur classe d'appartenance.

• **Critères de validation du modèle**

Concernant les méthodes prédictives, deux paramètres permettent de vérifier les performances de l'étalonnage : L'erreur standard d'étalonnage SEC et Le coefficient de détermination R^2 . Un SEC faible par rapport au domaine de variation de la variable à prédire et un R^2 proche de 1 sont des conditions nécessaires mais non suffisantes pour valider un modèle.

L'erreur standard d'étalonnage (SEC : Standard Error of Calibration) : mesure les écarts entre la valeur prédite par le modèle et la valeur de référence.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_i')^2}{(N - 1 - P)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Avec y_i : valeur de référence ; y_i' : valeur prédite par l'équation d'étalonnage ; N : nombre d'échantillons dans l'étalonnage ; P : nombre de variables indépendantes dans la régression.

Le coefficient de détermination R^2 qui correspond au carré du coefficient de corrélation R : estime la variance expliquée par la régression.

$$R = \frac{\text{cov}(y' - y)}{\sigma_{y'} - \sigma_y} \quad (\text{Eq. 2})$$

Avec $\text{cov}(y'-y)$: covariance de y' et de y ; σ_y : écart type de y ; $\sigma_{y'}$: écart type de y' ; y : moyenne des valeurs de références ; y' : moyenne des valeurs prédites.

Alors, après avoir obtenu l'équation d'étalonnage, cette dernière est testée sur des échantillons différents de ceux utilisés pour le calcul du modèle. L'étape de validation permet de contrôler l'équation d'étalonnage. Dans cette étape, l'évaluation de la prédiction se fait par calcul du coefficient de détermination R^2 , de l'erreur standard de prédiction (SEP) et du **biais**. Le biais correspond à la moyenne des écarts entre la méthode de référence et le modèle. Un autre indicateur, l'erreur relative de prédiction (REP), peut être également utilisé.

Si le SEC et le SEP sont faibles par rapport au domaine de variation de la variable à prédire et les R_2 proches de 1, le modèle peut être considéré comme satisfaisant.

L'erreur standard de prédiction (SEP, Standard Error of Prediction) :

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_i - y_i')^2}{(M-1)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Avec M : Nombre d'échantillons en validation.

L'erreur relative de prédiction (REP, Relative Error of Prediction) : correspond à l'erreur, en pourcent, entre la valeur de référence et celle calculée.

$$REP(\%) = \frac{100}{y} \times SEP \quad (\text{Eq. 4})$$

Concernant les modèles de classification, l'évaluation des modèles se fait par rapport au pourcentage d'échantillon bien classé (**%CC**).

$$\%CC = \frac{N_c}{N_c + N_{ic}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Avec N_c : Nombre d'échantillons correctement classés ; N_{ic} : Nombre d'échantillons mal classés.

5.5. Applications de la spectroscopie moyen infrarouge

La spectroscopie infrarouge est particulièrement répandue dans la recherche académique et l'industrie comme technique simple et sûre de mesure, de contrôle de qualité et de mesure dynamique. L'utilisation de cette technique s'est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses : industrie agroalimentaire, industrie pharmaceutique, domaines des matériaux (polymères...), industrie pétrolière, industrie textile, science spatiale, microbiologie, domaine médicinal... Les premières applications industrielles sont apparues dans l'agro-alimentaire pour le dosage de l'eau rémanente, puis se sont rapidement étendues à tous les domaines où les techniques existantes d'analyse en ligne pour le contrôle des procédés n'offraient pas de solutions globalement satisfaisantes. La spectroscopie infrarouge est utilisée pour l'analyse des molécules organiques ou inorganiques, des échantillons simples ou complexes, d'états gazeux, liquide ou solide. Les objectifs des analyses par spectroscopie infrarouge pourraient être qualitatifs ou quantitatifs.

Des exemples d'applications récentes de la spectroscopie moyen infrarouge sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21. Les applications de la spectroscopie MIR

Domaines	Produits analysés	Objectif de l'analyse	Références
Alimentation animal	Produits de fermentation	Estimation de la concentration de l'amidon résiduel	Udén, 2009
Géochimie	Sol	Détermination des concentrations d'élément majeur et mineur de sol	Reeves et Smith, 2009
Pharmaceutique	Préparation médicinale	Analyse de la qualité	Wu et al., 2008
Pharmaceutique	Myrtilles	Evaluation de la qualité et de la quantité des substances nutraceutiques dans Myrtilles	Sinelli et al., 2008
Sciences spatiales	La poussière dans les comètes	La composition de la poussière dans les comètes Jupiter-famille déduite de la spectroscopie infrarouge	Kelley et Wooden, 2009
Textile	Textile historique	Etude de changement structurale des fibres de textile biodégradé	Kavkler et al., 2011
Médicinale	Tissus cellulaires	Détection du cancer	Khanmohammadi et Garmarudi, 2011
Microbiologie	Levures et champignons filamenteux	Identification et caractérisation	Santos et al., 2010
Pétrochimie	Pétrole brute	Classification selon l'origine	Galtier et al., 2011
Polymère	Styrène et isoprène	Suivi de la copolymerization anionique de styrène et isoprène en temps réel	Quinebèche et al., 2009
Alimentaire	Huile d'olive vierge	Prediction de la composition lipidique et la classification des huiles selon leur appellation d'origine contrôlé	Galtier et al., 2008
Alimentaire	Huile d'olive vierge	Identification variétale	Casale et al., 2010 a
Alimentaire	Abricot	Prédiction des concentrations des sucres et acides organiques	Bureau et al., 2009
Alimentaire	Pomme	Evaluation de la qualité de surface	Veraverbeke et al., 2005
Alimentaire	Vin	Analyse quantitative de tannin	Fernandez et Agosin, 2007
Alimentaire	Vin et mout	Détection de problèmes de fermentation	Urtubia et al., 2008
Alimentaire	Jus de mangue	Quantification des sucres	Duarte et al., 2002
Alimentaire	Tomate	Prédiction des concentrations des sucres et acides organiques	Beullens et al., 2006
Alimentaire	Huile d'olive extra-vierge	Détection d'adultération	Gurdeniz et Ozen, 2009
Alimentaire	Purée de fruits	Authentification	Defernez et al. 1995
Alimentaire	Vin	Discrimination et classification selon leur variété	Edelman et al., 2001
Alimentaire	Fromage	Discrimination et classification selon leur origine	Karoui et al., 2007
Alimentaire	Lait	Analyse de la qualité du lait durant la lactation	Maâmouri et al., 2008
Alimentaire	Viande	Analyse de la qualité	Al-Jowder et al., 1997

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Feuilles d'olivier

Les travaux de la présente thèse ont été effectués sur des échantillons de feuilles d'olivier de 5 variétés tunisiennes (Chemlali Nord, Sayali, Meski, Zarrazi et Chétoui) et d'une variété française (Bouteillan).

1.2. Souches microbiennes

Des bactéries lactiques et des bactéries pathogènes ont été utilisées au cours de cette thèse. Les souches microbiennes sont :

- **Les bactéries lactiques**
 - ✓ *Lactobacillus plantarum* (collection des souches du Laboratoire d'Ecologie et de Technologie microbienne, Tunis, Tunisie).
 - ✓ *Lactobacillus rhamnosus* (collection des souches du Laboratoire d'Ecologie et de Technologie microbienne, Tunis, Tunisie).
- **Les souches pathogènes**
 - ✓ *Salmonella enterica sérovar zanzibar* (CNSTN Sidi thabet, Tunis, Tunisie).
 - ✓ *Listéria monocytogenes EGDe* (CNSTN Sidi thabet, Tunis, Tunisie).
 - ✓ *Bacillus cereus* (LSPQ 2872) (Laboratoire de Santé Publique du Québec, Québec, Canada).
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (Institut de Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisie).

Ces souches microbiennes sont conservées à -80°C dans leur bouillons spécifiques (voir Tableau 23) en présence de 20% glycérol.

1.3. Viande bovine hachée

La viande bovine est fournie par une boucherie locale. La viande hachée est fraîchement préparée dans le laboratoire.

2. Méthodes physicochimiques

2.1. Dosage de la concentration en phénols totaux (Skerget et al., 2005)

Les phénols totaux sont dosés par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu avec spectrophotométrie UV-visible.

Le protocole du dosage des phénols totaux consiste à mélanger 0,5 mL d'échantillon avec 2,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). Après 8 min à T° ambiante, 2 mL d'une solution de Na₂CO₃ (75 g L⁻¹) est ajouté. Le mélange est incubé à 50°C pendant 8 min. Après refroidissement, une lecture de la densité optique à 760 nm est effectuée. L'acide gallique est utilisé comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 0 -70

mg L⁻¹ ($Y = 0,0142 X$; Y: Densité optique à 760 nm; X: concentration en acide gallique (mg L⁻¹); $R^2 = 0,9936$).

2.2. Dosage de la concentration en *Ortho*-diphénol (Blekas et al., 2002)

Le protocole de dosage d'*Ortho*-diphénol consiste à mélanger 0,2 mL d'échantillon avec 0,8 mL d'eau distillé, 1 mL de tampon phosphate (0,1M, pH 6.5) et 2 mL d'une solution de sodium molybdate (5%). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, une lecture de la densité optique à 350 nm est effectuée. L'acide caféique est utilisé comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 0 -100 mg L⁻¹ ($Y = 0,0049X$; X: concentration en acide caféique (mg L⁻¹); Y: Densité optique à 350 nm ; $R^2 = 0,9979$).

2.3. Dosage de la concentration en flavonoïde (Lee et al., 2009)

Le protocole de dosage de flavonoïde consiste à mélanger 1 mL d'échantillon avec 10 mL de diethylene glycol et 1 mL d'une solution NaOH (1N). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, une lecture de la densité optique à 420 nm est effectuée. La rutine est utilisée comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 0 - 250 mg L⁻¹ ($Y = 0,0031X$; X: concentration en rutine (mg L⁻¹); Y: Densité optique à 420 nm ; $R^2 = 0,9991$).

2.4. Evaluation du pouvoir antioxydant par mesure de la capacité du piégeage des radicaux libres ABTS^{•+} (Re et al., 1999)

Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin de mesurer le pouvoir antioxydant des extraits et molécules. L'évaluation du pouvoir antioxydant peut se faire par la mesure du pouvoir des échantillons à piéger des radicaux libres. Les plus pratiques pour leur simplicité, rapidité, sensibilité et reproductibilité restent celles basées sur la décoloration de solutions d'un chromogène radicalaire (ABTS^{•+} ou DPPH[•]). La présence d'un composé antioxydant provoque une rupture de la réaction en chaîne de formation de ces radicaux et donc à une décoloration de la solution du radical.

Dans cette thèse, le pouvoir de l'agent antioxydant à piéger des radicaux libres, sous leurs différentes formes, est déterminé par la méthode basée sur la décoloration d'une solution de couleur bleuâtre des cations ABTS^{•+}. La diminution de la coloration bleuâtre est inversement proportionnelle au pouvoir antioxydant de l'agent antioxydant. Le produit original, ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] va générer des cations ABTS^{•+} qui sont des radicaux libres.

Une solution mère (A) d'ABTS^{•+} (7 mM ABTS et 2,45 mM potassium persulfate dans l'eau distillée) a été préparée. La solution (A) est solubilisée pendant 5 min à température

ambiante puis incubée pendant une nuit à T° ambiante à l'abri de la lumière. La solution mère (A) est diluée avec l'éthanol jusqu'à obtenir une $DO_{734} = 0,700 \pm 0,02$. Le blanc étant l'éthanol. La solution diluée est la solution du dosage (B) de couleur bleu. Un volume de 1 mL de la solution (B) est mis dans une cuve pour lire la DO_{734} initiale (DO_i). Ensuite, un volume de 10 μ l de l'échantillon est ajouté dans la cuve et le mélange est homogénéisé. Après 6 min d'incubation à T° ambiante, une lecture de la DO_{734} finale (DO_f) est réalisée.

Le pourcentage d'inhibition PI est calculé selon la formule suivante :

$$PI (\%) = \frac{(DO_i - DO_f) \times 100}{DO_i} \quad (\text{Eq. 6})$$

Avec : I : Le pourcentage d'inhibition (%).

DO_i : Densité optique à 734 nm de la solution (B) au temps t_0 .

DO_f : Densité optique à 734 nm de la solution (B) au temps $t=6$ min en présence de l'échantillon.

Le Trolox est utilisé comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 125 - 312.5 mg L⁻¹ ($Y = 43.21 X$; Y: pourcentage d'inhibition; X: concentration en Trolox (mM); $R^2 = 0.9961$). La capacité d'un extrait ou d'une molécule à piéger les radicaux libres ABTS⁺ est exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Des dilutions des échantillons sont effectuées de telle manière à obtenir des PI (%) entre 20% et 80%. Le calcul de la TEAC est effectué selon la formule suivante :

$$TEAC (\text{mM}) = \frac{PI * dilution}{43.21} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$TEAC (\text{mg L}^{-1}) = MM * TEAC (\text{mM}) \quad (\text{Eq. 8})$$

Avec: MM la masse moléculaire de Trolox ($MM= 250 \text{ g mol}^{-1}$).

2.5. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée par déshydratation d'une masse d'échantillon à 105°C pendant 24 heures.

$$MS (\%) = \frac{m_f}{m_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Avec : MS : matière sèche (en %) ;

m_0 : masse de l'échantillon (en mg) ;

m_f : masse de l'échantillon après déshydratation à 105°C pendant 24 heures (en mg).

2.6. Mesure du pH (ou potentiel d'hydrogène)

La mesure du pH d'un échantillon solide est effectuée sur une suspension de l'échantillon (10 g) dans l'eau distillée (100 mL).

2.7. Evaluation de la capacité de rétention en eau

La mesure de la capacité de rétention en eau permet d'évaluer l'aptitude de la viande à retenir l'eau présente dans le tissu musculaire. Elle peut être évaluée soit par la mesure des pertes en eau par écoulement spontané (perte à la conservation), à la décongélation et à la cuisson soit par la mesure d'un rendement de transformation de la viande (rendement Napole).

2.7.1. Mesure d'exsudation (Perte à la conservation) (Molette, 2004)

L'exsudat est défini comme le liquide qui est libéré par écoulement spontanée durant la conservation de la viande hachée crue. La mesure de l'exsudation renseigne de façon indirecte sur le pouvoir de rétention en eau des échantillons.

La mesure d'exsudation s'effectue par le suivi de la masse d'échantillons de viandes hachées crues placées sous forme de boule de 5g dans des barquettes contenant un papier absorbant filmé (perméable à l'oxygène) et conservées à 4°C pendant 12 jours. La formule utilisée pour le calcul de la perte à la conservation est la suivante :

$$\text{Perte (\%)} = \frac{m_0 - m_t}{m_t} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

Avec : Perte : la perte en eau et composés hydrosolubles durant la conservation à 4°C (%);

m_0 : masse de l'échantillon au temps t_0 de la conservation (mg);

m_t : masse de l'échantillon au temps t (3, 6, 9 ou 12 jours) de la conservation (mg).

Les échantillons de viande hachée crue initialement pesés et qui sont obtenues après 12j à 4°C à l'issue de la mesure d'exsudation sont introduits dans l'étuve 105°C. Après 24h, on pèse les échantillons. Le pourcentage de WHC (Water Holding Capacity (%): La capacité de rétention en eau) est calculé à travers la formule suivante (Lianji et Chen, 1989) :

$$\text{WHC(\%)} = 1 - \frac{B - A}{M} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Avec: WHC: Water Holding Capacity (%): La capacité de rétention en eau.

A : masse de l'échantillon après incubation à 105°C (g);

B : masse de l'échantillon avant incubation à 105°C (g);

M : quantité d'eau dans l'échantillon (g).

2.7.2. Mesure des pertes à la cuisson (Honikel, 1998)

Une masse de 10g d'échantillons de viande hachée crue est placé dans un bain marie thermostaté à 80°C pendant 15min. Après cuisson, les échantillons sont essuyés à l'aide de papier absorbant puis pesés. Pour évaluer la perte à la cuisson, la formule suivante a été utilisée :

$$Perte(\%) = \frac{B - A}{B} \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

Avec: Perte: la perte à la cuisson (%);

A : masse de l'échantillon après cuisson (g);

B : masse de l'échantillon avant cuisson (g).

2.7.3. Mesure des pertes à la décongélation (Molette, 2004)

Les pertes à la décongélation des échantillons de viande hachée crue sont déterminées par pesée avant congélation et après décongélation. La congélation des viandes hachées a duré deux semaines. Les échantillons sont placés à +4°C la nuit précédant la mesure. La formule utilisée pour évaluer la perte à la décongélation est la suivante :

$$Perte(\%) = \frac{B - A}{B} \times 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

Avec: Perte: la perte à la décongélation (%);

A : masse de l'échantillon après décongélation (g);

B : masse de l'échantillon avant congélation (g).

2.7.4. Rendement Technologique du NAPOLE (Naveau et al., 1985)

Le rendement technologique NAPOLE (RTN) consiste à évaluer le rendement de la transformation de la viande à partir d'une faible quantité de matière première. L'aptitude à la transformation de la viande est évaluée par un rendement du saumurage – cuisson, appelé le rendement Napole. Le rendement du saumurage-cuisson est similaire aux produits obtenus lors de la transformation des produits carnés.

Pour estimer le RTN, 100 g de viande bovine hachée sont mélangés avec 20 g de saumure (136 g de sel nitrité /L). Après 24 h du saumurage à 4°C, la préparation est cuite pendant 15 min dans de l'eau bouillante et égouttée pendant 2h 30.

La formule utilisée pour estimer le RTN est la suivante :

$$RTN(\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

Avec: RTN: Le rendement technologique NAPOLE (%);

A : masse de l'échantillon après traitement (g);

B : masse de l'échantillon avant traitement (g).

2.8. Mesure de l'oxydation de l'oxymyoglobine (Ulu, 2004)

Cet essai consiste à évaluer l'oxydation de l'oxymyoglobine. Ce dernier est responsable de la coloration rouge vif de la viande fraîche. Son oxydation, donnant la méthyoglobine, explique la coloration brune des viandes conservées.

Une masse de 5 g de chaque échantillon de viande bovine hachée crue ou cuite est homogénéisée dans 25 mL du tampon phosphate (40 mM, pH 6,8). Après 1h d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 4500 rpm pendant 30min. Le surnageant est récupéré pour mesurer les absorbances aux longueurs d'onde : 572 nm , 565 nm, 545 nm et 525 nm.

Le pourcentage de méthyoglobine est déterminé par la formule suivante (Bekhit et al., 2003):

$$MeMb(\%) = \left\{ (-2.51 \times \frac{DO_{572}}{DO_{525}}) + (0.777 \times \frac{DO_{565}}{DO_{525}}) + (0.8 \times \frac{DO_{545}}{DO_{525}}) + 1.098 \right\} \times 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

Avec: MetMb : pourcentage de Méthyoglobine (%).

DO_x : densité optique à la longueur d'onde x.

2.9. Mesure de l'oxydation des lipides (Buege et Aust, 1978)

L'oxydation lipidique des différents échantillons de viande hachée a été évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Les valeurs de TBARS ont été exprimées en milligramme de malodialdéhyde produit par kilogramme de l'échantillon.

Une masse 1g de viande hachée bovine crue ou cuite est mélangée avec 3 ml de la solution A (0,375% d'acide thiobarbiturique, 15% acide trichloracétique et 0,25 N de HCl). Le mélange est chauffé pendant 10 min à 100°C, une coloration rose est obtenue. Ensuite, le mélange est centrifugé à 4300 rpm pendant 10 min. Le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbituriques (TBARS) se fait à travers la lecture de l'absorbance du surnageant à 532 nm. La valeur TBARS est calculée par la formule suivante sachant que le coefficient d'extinction est égal à 156.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Sinhuber et Yu, 1958).

$$TBARS(\text{mg} / \text{Kg}) = DO_{532} \times \frac{1 \text{Mchromagen}}{156000} \times \frac{\frac{1 \text{mol}}{L}}{M} \times \frac{0,0003L}{1,0 \text{gmeat}} \times \frac{72,07 \text{gMDA}}{\text{mole}} \times \frac{1000 \text{g}}{\text{Kg}} \quad (\text{Eq.16})$$

Avec : TBARS : Substances thiobarbituriques (mg de malodialdéhyde/kg de viande);

DO_{532} : Densité optique à la longueur d'onde 532 nm ;

MDA : Malodialdéhyde

3. Evaluation du l'effet de l'incorporation d'extrait ou poudre des feuilles d'olivier sur les paramètres physicochimiques des viandes bovines hachées

Des portions de viandes bovines hachées, fraîchement préparées, ont été supplémentées par des doses d'extraits (2 lots) ou poudre (2 lots) des feuilles d'olivier (100 et 150 µg de phénol par g de viande). Des quantités des viandes, ainsi préparée, ont subit un traitement de cuisson à 100°C pendant 15 min. Les échantillons préparés crus et cuits ont été conservé à 4°C. Des prélèvements ont été effectués après 0, 3, 6, 9 et 12 jours pour des

analyses physicochimiques. Des suivis du pH, de l'oxydation de l'oxymyoglobine et des lipides ont été effectués pour les viandes cuites. Il s'y ajoute le suivi de la perte à la conservation réalisée pour les viandes crues.

L'effet de l'incorporation d'extrait ou poudre des feuilles d'olivier aux viandes bovines hachées a été aussi évalué sur la capacité de rétention d'eau (WHC), sur la perte à la cuisson, sur la perte à la décongélation et sur le rendement technologique de NAPOLE.

4. Méthodes analytiques

4.1. Spectrométrie UV-Visible

La spectrométrie UV-Visible a été utilisée pour la lecture des densités optiques des échantillons à des longueurs d'onde dans la région de l'UV-Visible.

4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Vinha et al., 2007)

La technique analytique de HPLC a été utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des monomères phénoliques des feuilles d'olivier.

La plateforme HPLC (1200 Series Agilent technologies) est composée de:

- ✓ un dégazeur,
- ✓ une pompe quaternaire,
- ✓ un échantillonneur liquide automatique ou « passeur »,
- ✓ un détecteur à barrette de diodes (DAD),
- ✓ La colonne utilisée était une Atlantis dC₁₈ (5µm, 4,6 x 250 mm) Waters gardée à une température constante (température ambiante de 23°C).

La plateforme est pilotée par le logiciel ChemStation Agilent technologies et les données sont traitées par le même logiciel.

L'élution a été réalisée à température ambiante de 23°C en mode gradient grâce à un mélange de solvants binaire composé d'eau, acidifiée par 5% d'acide formique (solvant A), et de méthanol à 100 % (solvant B). Le gradient utilisé est présenté dans le Tableau 22. Le temps total d'analyse d'un échantillon est de 50 min. La colonne a été rééquilibrée pendant 4 min entre chaque analyse. Le flux de la phase mobile est de 0,9 ml min⁻¹ et le volume d'injection de chaque échantillon était de 10 µl. Les monomères phénoliques ont été détectés à 280 nm.

Les pics des composés phénoliques ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention à ceux des standards et en vérifiant leur spectre caractéristique. Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par calibration linéaire externe avec des solutions étalons des standards correspondants.

Tableau 22. Gradient de la phase mobile de la HPLC

Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B	Flux (ml.min ⁻¹)
0	95	5	0,9
3	85	15	0,9
13	75	25	0,9
25	65	35	0,9
35	55	45	0,9
40	50	50	0,9
45	0	100	0,9
46	95	5	0,9

4.3. La Spectroscopie Infra-rouge moyen

4.3.1. La description de l'appareil

L'appareil utilisé est un spectromètre à transformé de fourrier AVATAR 370 FT-IR de la société Thermo Nicolet (Fig. 18). Il est équipé d'une source moyen infrarouge Ever-Glo. La gamme spectrale théorique de l'appareil s'étend de 9600 à 50 cm⁻¹, et la gamme de travail de 7800 à 375 cm⁻¹, avec une résolution pouvant aller jusqu'à 0,9 cm⁻¹ (résolution standard pour les appareils MIR). Afin d'améliorer la résolution, un ZFF (zero filling factor) de 2 est utilisé par défaut. Le spectromètre est également équipé d'un détecteur constitué de deutérotiglycine sulfate (DTGS) et stabilisé en température. La séparatrice de l'interféromètre est constituée de lames en bromure de potassium et d'un "film" germanium (fenêtre KBr/Germanium). La fonction d'apodisation utilisée par défaut est la fonction Happ-Genzel. Le module d'échantillonnage est une cellule de mesure ATR (Fig. 18). L'échantillon est placé à la surface du cristal type diamant. Le spectre de référence est réalisé sur l'air, avant chaque analyse. L'acquisition des spectres est pilotée par le logiciel OMNIC qui permet entre autre l'enregistrement automatique des spectres (Fig. 19).

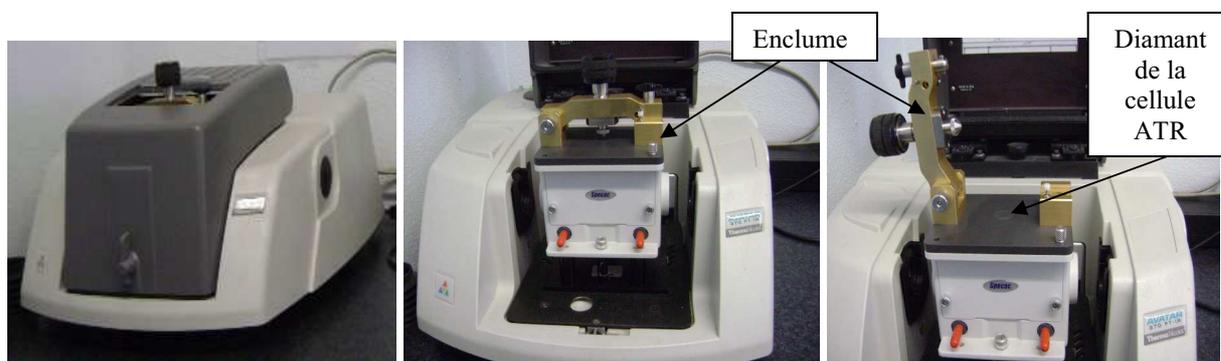


Fig. 18. Spectromètre moyen infrarouge à transformé de fourrier (Avatar).

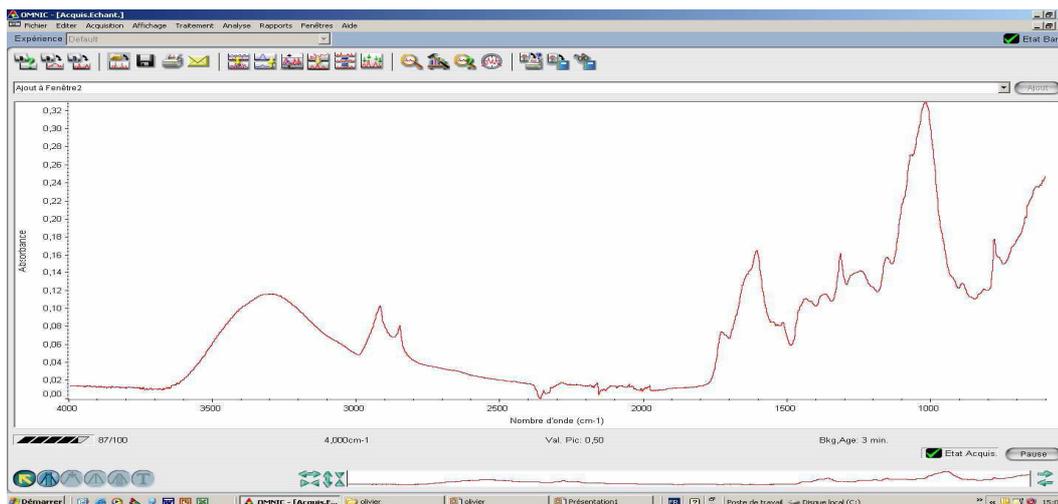


Fig. 19. Photo de la fenêtre d'acquisition des spectres MIR par le logiciel OMNIC

4.3.2. Les conditions d'analyses

Les échantillons de poudre des feuilles d'olivier déshydratées sont analysés par réflexion ATR (diamant) dans une pièce climatisée à 21°C. La poudre est déposée sur l'accessoire ATR et on la presse grâce à l'enclume (Fig. 18). Les conditions d'acquisition des spectres sont les suivantes : acquisition en réflexion totale atténuée, gamme spectrale de 4000 cm^{-1} à 750 cm^{-1} , résolution de 4 cm^{-1} , 100 accumulations de scans. Entre chaque échantillon, les surfaces de l'ATR et de l'enclume sont nettoyées à l'éthanol, puis séchées. Ensuite, un spectre de référence, réalisé sur l'air, est enregistré afin de vérifier la propreté de l'ATR. L'analyse d'un échantillon dure environ 2 à 3 min. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

4.3.3. Traitement chimiométrique des spectres

L'analyse chimiométrique des spectres est réalisée avec le logiciel « The Unscrambler version 9.6 » développé par CAMO (Computer Aided Modelling, Trondheim, Norway).

Les méthodes chimiométriques appliquées sur les spectres MIR dans cette thèse sont :

- ✓ La moyenne effectuée sur un triplicata de spectre d'un même échantillon.
- ✓ La variante normale standard (SNV : standard normal variate): c'est une méthode de prétraitement des spectres. Il permet l'amélioration du signal en réduisant le bruit, en éliminant l'effet de déformation de ligne de base ou en éliminant la variation incontrôlée d'intensité générale. En faite, les données spectrales brutes, telles qu'elles sont acquises par un spectromètre, n'ont pas la forme la plus adaptée aux traitements d'une méthode statistique. Elles peuvent être entachées de défauts liés à la présence d'un bruit aléatoire ou à des déformations de la ligne de base. Il est souvent utile d'appliquer un prétraitement aux données avant leur exploitation.

✓ L'analyse en composantes principales (ACP): cette méthode vise à structurer et simplifier les données issues de plusieurs variables, sans privilégier l'une d'entre elles en particulier. Elle apporte des informations sur les variations du système sans aucune connaissance a priori. En spectroscopie, l'ACP permet de déterminer les caractéristiques principales des spectres, de les comparer entre eux et de mettre en évidence des liens entre les variables descriptives (les absorbances aux différentes longueurs d'onde). Dans cette thèse, l'ACP a été utilisé pour structurer les spectres des échantillons des feuilles d'olivier selon leur origine variétale.

✓ La régression des moindres carrés partiels (PLS, Partial least Square): c'est une méthode de prédiction d'un paramètre inconnu par analyse du spectre IR. Dans cette thèse, La PLS a été utilisée pour la prédiction quantitative de la concentration de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier.

✓ La méthode discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA, Partial least Square-Discriminant analysis): c'est une méthode de classification. Elle a été utilisée, au cours de cette thèse, pour tester la possibilité de la reconnaissance variétale par analyse spectrale des feuilles d'olivier.

Les méthodes PLS et PLS-DA ont été utilisées pour la construction de modèles de prédiction. Les étapes de construction et de validation seront expliquées dans la section résultats et discussion (article 1 et 2). Les critères de validation sont rapportés dans la section étude bibliographique.

4.4. Chromatographie par filtration sur gel Sephadex G50

Une chromatographie par filtration sur gel Sephadex G50 a été utilisée pour analyser la distribution des composés phénoliques des feuilles d'olivier selon leurs masses moléculaires. La phase mobile est une solution de NaNO_3 0,05 M contenant 0,02% sodium azide. A fin de préparer l'échantillon à analyser, une masse de 2 g de poudre de feuilles d'olivier est mélangée avec 20 mL d'eau distillé. Après 5 min d'agitation, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 3500 rpm. Le surnageant est récupéré puis filtré par filtre 0,2 μm avant d'être injecté dans la colonne. Un volume de 3 ml du surnageant est injecté dans la colonne de gel Sephadex G50 préalablement équilibré avec de NaNO_3 0,05 M contenant 0,02% sodium azide. La vitesse d'élution est 0,6 mL min^{-1} . La phase mobile est collectée dans des tubes en verres à raison de 3 mL par tube. Enfin, la densité optique a été mesurée à 280 nm. La colonne de Sephadex est calibrée avec l'acide syringique (MM=198Da), lysozyme (MM=15kDa) et le bleu dextran (MM=200kDa).

5. Méthodes microbiologiques

5.1. Dénombrement des germes microbiens

Le dénombrement des germes microbiens a été réalisé par la méthode des dilutions décimales. Des dilutions successives de l'échantillon solide ou liquide ont été réalisées dans l'eau peptonée stérile (1% peptone + 0.5 % chlorure de sodium). L'ensemencement et l'incubation sont réalisés dans le milieu de culture et les conditions adéquats pour les germes étudiés (Tableau 23). La composition des milieux de culture utilisés est présentée dans l'annexe 1. Le nombre des germes microbiens exprimé en UFC/ml (pour échantillon liquide) ou UFC/g (pour échantillon solide) est déterminé selon la formule:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) \times d} \quad (\text{Eq. 17})$$

Avec : N : nombre des germes

$\sum C$: La somme des colonies comptées dans toutes les boîtes de pétries retenues.

n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution.

n_2 : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution.

n_3 : nombre de boîtes retenues à la troisième dilution.

d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Tableau 23. Milieux de culture et conditions d'incubation des germes analysés.

Germe	Bouillon de culture	Milieu de culture gélosé	Température d'incubation	Temps d'incubation
Bactéries lactiques	Non Effectuée	gélose Man, Rogosa et Sharpe (MRS)	37 °C	24-48 h
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i>	Man, Rogosa et Sharpe (MRS) liquide	gélose Man, Rogosa et Sharpe (MRS)	37 °C	24-48 h
Levures et moisissures	Sabouraud au Chloramphénicol liquide	Sabouraud au Chloramphénicol Agar.	30°C	3 jours
Microflore Aérobie Mésophile Totale	Non Effectuée	gélose Plate Count Agar (PCA)	30°C	3 jours
<i>Listeria monocytogène</i>	Bouillon nutritif	Palkam	37°C	24h
<i>Bacillus cereus</i>	Bouillon nutritif	Gélose nutritif	37°C	24h
<i>Salmonella enterica sérovar zanzibar</i>	Bouillon sélénite cystéine	Le milieu SS agar	37°C	24h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bouillon nutritif	Le milieu <i>Pseudomonas</i> agar	37°C	24h
Coliformes totaux	Non Effectuée	Tryptose Lauryl Sulfate	30°C	24h

5.2. Evaluation de la radiorésistance des flores microbiennes des feuilles d'olivier

Des échantillons de feuilles d'olivier ont subi des traitements d'irradiation au rayonnement gamma à des doses de 0, 5, 10, 15, 20 et 25 kGy. Après irradiation, les flores microbiennes survivantes (flore aérobie mésophile totale, bactéries lactiques, levures et champignons) ont été dénombrées.

Le pourcentage de la fraction survivante a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Fraction survivante (\%)} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 18})$$

Avec: N_0 : le nombre de colonie dans l'échantillon témoin non irradié.

N : le nombre de colonie dans l'échantillon irradié.

La dose de réduction décimale D_{10} a été aussi déterminée pour évaluer la radiorésistance des flores microbiennes des feuilles d'olivier. La valeur de D_{10} est définie comme la dose nécessaire pour produire une réduction de 90 % des cellules viables, autrement dit une inactivation d'un cycle logarithmique ($1 \log_{10}$) de la population initiale. La valeur de D_{10} est déterminée par le calcul de la valeur négative de l'inverse de la pente de la courbe de survie ($\log N = f(\text{dose})$). La courbe de survie a une régression linéaire de type $y = a x + b$.

Avec : y : $\log_{10}(N)$ après irradiation ;

N : le nombre de colonie dans l'échantillon irradié (UFC/g);

x : la dose d'irradiation (kGry) ;

a : la pente $a = \frac{-1}{D_{10}}$

5.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne d'extrait de feuilles d'olivier a été évaluée par la technique de dilution en milieu liquide reposant sur le comptage des colonies issues de germes viables.

Les germes microbiens testés sont :

✓ Deux bactéries lactiques : *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* ;

✓ Quatre bactéries pathogènes :

dont deux sont Gram (+) qui sont *Listeria monocytogène* et *Bacillus cereus*

et deux sont Gram (-) qui sont *Salmonella enterica sérovar zanzibar* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les différents germes ont été cultivés dans leur bouillants appropriés (Tableau 23) en présence de trois doses différentes d'extrait des feuilles d'olivier (50, 250 et 500 μg de phénol par mL du milieu de culture) avec un témoin sans extrait. L'inoculum initial est de l'ordre de

10^6 UFC/mL de milieu de culture. Les cultures ont été incubées pendant 24 h à la température adéquate aux germes relatifs (Tableau 23). Des prélèvements consécutifs chaque 2 h ont été effectués pour le dénombrement des germes viables.

5.4. Inoculation artificielle des viandes hachées par des bactéries pathogènes

5.4.1. Préparation des viandes hachées (Hayouni et al., 2008)

Avant d'effectuer l'opération du broyage, la viande bovine est introduite dans l'eau bouillante (100°C) pendant 5min dans le but de minimiser et réduire les germes de surfaces. Ensuite, la partie supérieure cuite est éliminée par un couteau stérile dans des conditions aseptiques. Enfin, la viande obtenue est broyée à l'aide d'un broyeur MOULINEX.

5.4.2. Inoculation et suivi des germes pathogènes dans les viandes hachées (Carega et al., 2003)

Les mêmes germes pathogènes étudiés précédemment (paragraphe 5.3) sont introduites à raison de 10^8 UFC/g de viandes hachées et en présence d'extrait des feuilles d'olivier à différentes doses (50, 250 et 500 μg de phénol/g de viande hachée) avec un témoin sans extrait. Les lots des viandes ont été conservés à 4°C . Des prélèvements de 5g de viandes hachées ont été réalisés après conservation de 0, 3, 6, 9 et 12 jours pour faire le dénombrement des germes pathogènes viables.

Pour le dénombrement de *Salmonella enterica* sérovar *zanzibar* dans les viandes hachées, une masse de 5 g de viandes hachées est introduites dans 45 mL d'eau peptonée. Après homogénéisation, le mélange est incubé à 35°C pendant 24 h. Ensuite, 1 mL de ce pré-enrichissement est introduit dans 9 mL de bouillon Sélénite cystéine. L'ensemble est incubé à 35°C pendant 24 h. Les dilutions décimales sont effectuées à partir de 1mL de l'enrichissement obtenu précédemment dans le bouillon sélénite cystéine. Pour les autres germes, l'étape de pré-enrichissement n'est pas indispensable. Une masse de 5 g de viandes hachées est introduites dans 45 mL d'eau peptonée. Puis des dilutions décimales sont effectuées (Food and Drug Administration, 1998). La culture des germes est effectuée dans leurs milieux adéquats et selon leurs conditions d'incubations relatives (Tableau 23).

5.4.3. Etude de la thermorésistance des germes pathogènes dans les viandes hachées

L'objectif de cette manipulation est l'évaluation du l'effet d'extrait des feuilles d'olivier sur la thermorésistance des germes pathogènes inoculés artificiellement dans les viandes hachées.

Des lots de viandes hachées ont été préparées, inoculés avec des germes pathogènes et supplémentés par des doses d'extrait des feuilles d'olivier comme décrit précédemment (paragraphe 5.4.1 et 5.4.2). Ensuite, des lots de masse 5 g des viandes préparées ont été

homogénéisés dans 45 mL d'eau peptonée et ont été soumis à un traitement thermique à 100°C pendant 15 min. Un dénombrement des germes pathogènes a été effectué avant et après traitement thermique.

6. Conduite de l'irradiation des feuilles d'olivier

6.1. L'unité d'irradiation

Les essais d'irradiation gamma ont été effectués au sein d'une unité de radio-traitement semi industrielle (Fig. 20) dans le Centre National des Sciences et Technologies Nucléaire (CNSTN) implanté à Sidi Thabet.

Les rayons gamma ont été émis par une source radioactive de Cobalt 60 (^{60}Co). La source radioactive est télescopique et constituée de deux cylindres coaxiaux contenant chacun 4 crayons de cobalt 60 de 45,2 cm de long et sont disposés et encapsulés suivant une symétrie axiale. Le stockage de cette source se fait à sec dans un container cylindrique constitué d'acier et de plomb dans lequel elle a été transportée.



Fig. 20. Cellule d'irradiation contenant la source radioactive de ^{60}Co .

6.2. Essai préliminaire pour la détermination du débit de dose d'irradiation

Cet essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la dose souhaitée et s'assurer de l'homogénéité de la répartition de la dose d'irradiation au sein du produit. Les échantillons préemballés dans des sachets stomachers ont été placés sur plateaux fixes sans retournement et ils ont été soumis au rayonnement d'irradiation à température ambiante. La distribution de dose a été mesurée avec dosimètre de type PMMA (PMMA Instruments, Harwell, UK). Les dosimètres ont été répartis sur deux positions différentes (maximale et minimale) du chacun des échantillons des feuilles d'olivier (des feuilles broyées et feuilles complètes).

Ce test préliminaire consiste à effectuer un essai de traitement et de calculer les paramètres suivant :

- ✓ La dose absorbée minimum (D_{\min}) exprimé en $[\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}]$;
- ✓ La dose absorbée maximum (D_{\max}) exprimé en $[\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}]$;
- ✓ L'indice d'hétérogénéité de dose (H) est le quotient de D_{\max} par D_{\min} ;

- ✓ Le débit de dose est le quotient de la dose absorbée (kGy) par le temps d'exposition (min)

Au cours de cette thèse, les rayons gamma ont été émis avec un débit de dose de 18,2 Gray/min pour les feuilles d'olivier complètes et de 15,64 Gy/min pour la poudre de feuilles d'olivier avec des rapports d'homogénéité de 1,17 et 1,2 respectivement.

6.3. Préparation et traitement des feuilles d'olivier

Avant le traitement d'irradiation, les échantillons des feuilles d'olivier séchées ainsi que la poudre des feuilles d'olivier ont été emballées dans des sachets Stomachers, respectivement, à raison de 20 g et 50 g chacune, puis fermées hermétiquement à l'aide d'une thermocelleuse. Les échantillons ont été placés, à température ambiante, sur des plateaux fixes sans retournement pour subir des traitements d'irradiation à des doses de 5, 10, 15, 20 et 25 kGy avec un témoin non irradié. Immédiatement après l'irradiation, tous les échantillons ont été placés à + 4°C. Des analyses microbiologiques et physicochimiques ont été ensuite effectuées sur les échantillons irradiés et non irradiés (les analyses effectuées sont présentées dans l'article 4).

7. Détermination de la Date Limite de Consommation (DLC) par la méthode de vieillissement accéléré

L'objectif de cette manipulation est l'évaluation de l'effet d'extrait des feuilles d'olivier sur la DLC des viandes bovines hachées. Des lots de viandes hachées ont été supplémentés par des différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier (0, 50, 100 et 150 µg de phénol/g de viandes).

La DLC a été déterminée en se basant sur la méthode de vieillissement accéléré. Il s'agit d'une méthode rapide qui se base sur la provocation d'une altération poussée du produit en ayant recours à des températures élevées. Cette approche est basée sur la loi d'Arrhenius.

Dans notre cas, les lots de viandes ont été conservés à 4°C, 30°C ou 37°C. Un suivi de l'évolution de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) et des coliformes totaux (CT) a été réalisé pendant 12 jours de conservation. Des prélèvements ont été effectués après 0, 3, 6, 9 et 12 jours de conservation pour le dénombrement des germes microbiens FAMT et CT.

7.1. Loi d'Arrhenius

L'estimation de la vitesse de détérioration d'un produit alimentaire nous mène à prédire sa durée de conservation, en particulier, l'étude de l'effet de la température sur les réactions de dégradation s'avère nécessaire et peut donner une mesure globale de la cinétique de détérioration.

La perte de qualité d'un aliment est décrite par l'équation générale d'Arrhenius qui est applicable à n'importe quel facteur A :

$$r = \frac{d[A]}{dt} = k \times [A]^n \quad (\text{Eq. 19})$$

Avec: r : vitesse de la réaction de dégradation, c'est également la vitesse de formation de A ;

A : facteur à suivre : dans notre cas : le Nombre de CT ou FAMT (en UFC /g) ;

k : vitesse spécifique de la réaction de détérioration exprimés en (jours⁻¹) ;

t : temps de la conservation (en jour) ;

n : ordre de la réaction.

7.2. Résolution de l'équation d'Arrhenius

Pour trouver l'ordre de la réaction apparente, différentes valeurs de n (0, 1, 2....) sont assimilées et des graphiques respectivement de la forme $A = f(t)$, $\ln(A) = f(t)$, $1/A = f(t)$ sont tracés. Puis, le coefficient de corrélation R^2 est déterminé pour chaque graphique.

La valeur de n correspondant au graphique ayant le R^2 le plus proche de 1 sera l'ordre de la réaction de détérioration.

Selon l'ordre de la réaction, l'équation d'Arrhenius se présente sous différentes formes :

- Si réaction d'ordre 0 : Elle est caractérisée par une relation linéaire entre le facteur de détérioration et le temps de la réaction.

$$L'équation de la réaction est : (A - A_0) = k \times t. \quad (\text{Eq. 20})$$

- Si réaction d'ordre 1 : Elle est caractérisée par un changement logarithmique de la concentration de A avec le temps.

$$L'équation de la réaction est : \ln\left(\frac{A_0}{A}\right) = k \times t \quad (\text{Eq. 21})$$

- Si réaction d'ordre n : L'équation de la réaction est : $\frac{1}{A^{n-1}} - \frac{1}{A_0^{n-1}} = k \times t$ (Eq. 22)

A_0 étant la valeur initiale du facteur A le jour de la production.

La valeur de k correspond à la pente de la régression linéaire des différents graphiques.

7.3. Constante de la vitesse spécifique de détérioration (k)

Les études de la DLC sont souvent effectuées à des températures élevées dans le but d'accélérer les vitesses de dégradation et la multiplication des microorganismes d'altération.

La relation entre la constante de vitesse spécifique (k) et la température se présente dans

$$l'équation suivante : k = k_0 \times e^{\left(\frac{-E_a}{R \times T}\right)} \quad (\text{Eq. 23})$$

Avec : k : constante de la vitesse spécifique à la température T (jours⁻¹);

k_0 : constante indépendante de la température (jours⁻¹);

E_a : énergie d'activation (J mole⁻¹) ;

R : constante des gaz parfaits (= 8,314 J mole⁻¹K⁻¹) ;

T : température absolue (K).

De l'équation Eq. 23 , l'équation Eq. 24 est déduite:

$$\ln(k) = \left(-\frac{E_a}{R}\right) \times \frac{1}{T} + \ln(k_0) \quad (\text{Eq. 24})$$

Les valeurs de $\left(\frac{E_a}{R}\right)$ et k_0 seront déterminées à partir de l'équation de la droite $\ln(k) = f\left(\frac{1}{T}\right)$, E_a exprime la sensibilité de la réaction à la variation de la température.

Donc, la date limite de consommation est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Pour l'ordre } n = 0 ; \text{ DLC} = \frac{(A - A_0)}{k_0 \times e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}} \quad (\text{Eq. 25})$$

$$\text{Pour l'ordre } n = 1 ; \text{ DLC} = \frac{(\ln A - \ln A_0)}{k_0 \times e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}} \quad (\text{Eq. 26})$$

Avec : DLC : date limite de consommation (en jours);

A : seuil limite acceptable de la flore FAMT ($3 \cdot 10^5$) et CT (10^4) selon la norme européenne;

A_0 : nombre initiale FAMT et CT;

T : température (°K).

8. Analyse sensorielle

Les viandes bovines hachées crues et cuites ont fait l'objet d'une analyse sensorielle. Les viandes hachées sont cuites sous forme des boulettes de 10 g avec addition de sels. Les boulettes sont grillées 3 minutes à chaque surface en absence d'huile.

Les échantillons analysés sont les suivants:

- ✓ Témoin crue et cuite;
- ✓ Viande hachée crue et cuite avec une dose de 100 µg de phénols dans l'extrait des feuilles d'olivier par gramme de viande ;
- ✓ Viande hachée crue et cuite avec une dose de 150 µg de phénols dans l'extrait des feuilles d'olivier par gramme de viande ;
- ✓ Viande hachée crue et cuite avec une dose de 100 µg de phénols dans la poudre des feuilles d'olivier par gramme de viande ;

- ✓ Viande hachée crue et cuite avec une dose de 150 μg de phénols dans la poudre des feuilles d'olivier par gramme de viande.

40 dégustateurs sont invités à analyser les produits et à compléter les fiches d'évaluation sensorielle des viandes hachées crues et cuites (voir annexe 2). Cinq critères ont été évalués : apparence globale, couleur, odeur, texture, élasticité, jutosité et goût. Chaque personne doit attribuer une note entre 1 (inacceptable) et 9 (très apprécié) à chaque critère étudié.

9. Analyse statistique

Les analyses de la variance (ANOVA) ont été réalisées par le logiciel statistique STATGRAPHICS. PLUS Software version 1.4 for Windows. Toutes les analyses ont été faites au moins en duplicata. Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart-type. Les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

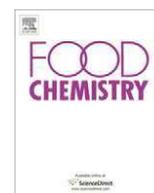
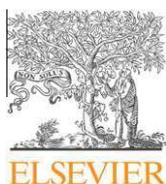
Résultats & Discussion

Chapitre 1: Application de la spectroscopie moyen infrarouge, combinée avec des traitements chimiométriques, pour l'analyse qualitative et quantitative des feuilles d'olivier

Les techniques de la spectroscopie infrarouge jouent un rôle prépondérant en chimie analytique non seulement au laboratoire mais aussi pour les contrôles en lignes. Il s'agit d'une approche rapide et non destructive qui ne nécessite pas ou très peu de préparation de l'échantillon. En comparaison avec les analyses chimiques classiques, la spectroscopie infrarouge a de faible coût d'analyse et de maintenance et n'utilise pas des solvants ou des réactifs. Cette technique analytique a, par conséquent, un très large champ d'application dans plusieurs domaines (la chimie, pétrochimie, biologie et principalement l'agroalimentaire). Une recherche approfondie dans la littérature révèle qu'aucune étude n'a été faite sur les feuilles d'olivier par cette approche novatrice de la spectroscopie moyen infrarouge combinée avec des traitements chimiométriques. Dans ce chapitre, nous avons appliqué la spectroscopie moyen infrarouge à transformé de Fourier (FTMIR), associé à des traitements chimiométriques, pour l'analyse qualitative et quantitative des feuilles d'olivier.

La richesse dans le patrimoine oléicole et les besoins économiques (il est connu que l'aspect qualitatif et quantitatif des productions d'huile d'olive et des olives de table dépend des variétés) exigent des outils de classification et d'identification des variétés d'olivier. Dans ce cadre, nous avons étudié la potentialité de la spectroscopie FTMIR, associé à des traitements chimiométriques, à la discrimination et à la reconnaissance variétale des oliviers en analysant des feuilles sèches en poudre. Ce matériel végétal présente l'avantage d'être persistant toute l'année. Ce travail a été présenté dans l'article n°1.

Un deuxième travail (Article n°2) a été consacré à l'étude de l'éventualité de l'utilisation de la spectroscopie FTMIR, combinée avec des traitements chimiométriques, pour le dosage de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier. Il est à noter que les feuilles d'olivier représentent une source de l'oleuropéine, composé phénolique d'intérêt et majoritairement présent dans cette biomasse végétale.



Analytical Methods

Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves

Fathia Aouidi^{a,c,*}, Nathalie Dupuy^b, Jacques Artaud^b, Sevastianos Roussos^c, Monji Msallem^d, Isabelle Perraud-Gaime^c, Mokhtar Hamdi^a

^aLaboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), Centre Urbain Nord, 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, 1080 Tunis, Tunisia

^bISM², UMR 6263, Equipe AD²EM, Groupe systèmes chimiques complexes, Faculté des Sciences et Technique Saint Jérôme – Université Paul Cézanne, 13397 Marseille Cedex 20, France

^cIMEP UMR CNRS 6116/IRD UMR 193, Faculté des Sciences et Technique Saint Jérôme – Université Paul Cézanne, 13397 Marseille Cedex 20, France

^dInstitut de l'olivier, B.P. 208, 1082 Tunis, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2010

Received in revised form 7 March 2011

Accepted 17 August 2011

Available online 23 August 2011

Keywords:

Olive (*Olea europaea*) leaf

ATR-Mid InfraRed spectroscopy

Chemometric analysis

Cultivar

Discrimination

Chemical fingerprint

ABSTRACT

The high biodiversity of olive tree and the economic needs require tools for the correct classification and identification of the different cultivars. Simple and rapid methods are in increasing demand. In the present work, FT-MIR spectroscopy associated to chemometric treatment is proposed as a direct and rapid tool to discriminate cultivars according to their olive leaves, a persistent tissue the whole year. A set of 75 samples of olive leaves representative of five Tunisian cultivars (Chemlali, Sayali, Meski, Zarrazi and Chétoui) cultivated in the same geographical area was analysed. Discrimination between the five Tunisian cultivars was performed by the chemometric approach, principal component analysis (PCA), based on the FT-MIR spectral data provided by olive leaves. Furthermore, a correct classification (100%) of the five Tunisian cultivars was obtained by the Partial Least Square Discriminate Analysis (PLS-DA) method.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is well known that qualitative and quantitative aspects of the production of olive oils and table olives vary, among others, with the cultivars (Gómez-Rico, Fregapane, & Salvador, 2008; Hannachi et al., 2008; Pinheiro & Esteves da Silva, 2005). Nowadays, the identification of the olive cultivar become a topic of great economic relevance since the demand of table olives and olive oils is increasing and there is a growing commercial interest in high quality products. Furthermore, correct cultivar identification can represent a useful tool for nursery owners who need to certify and patent their plant material.

Until recently, olive cultivars are especially discriminated and classified on the base of morphological and agronomic characteristics (Pinheiro & Esteves da Silva, 2005; Trigui & Msallem, 2002). Identification based on the analysis of isoenzymes has also been cited (Trujillo, Rallo, & Arus, 1995). Although these markers provide useful tools for cultivar identification, their actual limits are the

* Corresponding author at: Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), Centre Urbain Nord, 2 Boulevard de la Terre, University of Carthage, B.P. 676, 1080 Tunis, Tunisia. Tel.: +216 98 326 675.

E-mail address: aouidfathia@yahoo.fr (F. Aouidi).

small number of detected polymorphisms and the influence of environment and of olive growing techniques. The recent development of DNA molecular markers has led to the emergence of new genetic markers for identifying olive cultivars. Molecular markers, such as Simple Sequence Repeat (SSR) (Alba, Montemurro, Sabetta, Pasqualone, & Blanco, 2009; Bracci et al., 2009; Doveri et al., 2008; Hannachi et al., 2008), Random Amplified Polymorphic DNA (RADP) (Zitoun et al., 2008) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Belaj, Rallo, Trujillo, & Baldoni, 2004), are environment-independent and efficient to identify olive varieties. Recently, a chemometric approach based on the analytical data has been developed for discrimination and classification of olive cultivars. Analyses were carried out on a particular olive tissue such as leaves (Di Donna et al., 2010; Japón-Luján, Ruiz-Jimnez, & Luque de Castro, 2006) or olive fruits (Casale et al., 2010; Dupuy et al., 2010) or on olive oil (Casale, Sinelli, Oliveri, Di Egidio, & Lanteri, 2010; Dupuy, Galtier, Ollivier, Vanloot, & Artaud, 2010; Sinelli et al., 2010). The discrimination between varieties of olives trees cultivated in the same geographical area can be performed by chemotaxonomic markers, such as secondary metabolites of phenolic structure identified by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectroscopy (HPLC–ESI–MS) (Di Donna et al., 2010), peak areas from a high performance liquid chromatography–diode array (HPLC–DAD) analysis of biophenols (Japón-Luján et al.,

2006), oleuropein content determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and high resolution gas chromatography (HRGC) (Ranalli et al., 2006).

Most of analyses used for discriminating cultivars are time-consuming, expensive and involve a considerable amount of manual work. Very often, complex chemical treatment of the sample and the use of sophisticated instruments are required.

Recently, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy has become an emerging well-accepted analytical technique, due to its simplicity with advantages in terms of cost per sample. It achieves high analysis speed and requires little or no sample preparation.

FT-IR spectroscopy has been widely used as an analytical tool in various laboratories and industrial sectors such as food agricultural (Galtier et al., 2008; Hennessy, Downey, & O'Donnell, 2009), petrochemical (Abbas, Rebufa, Dupuy, Permanyer, & Kister, 2008; Roman & Ravilya, 2008), textile (Durand, Devos, Ruckebusch, & Huvette, 2007; Langeron, Doussot, Hewson, & Duchêne, 2007) and pharmaceutical (Blanco, Cueva-Mestanza, & Peguero, 2010; Wu, Sun, Zhou, & Leung, 2008).

Up to date, a lot of studies have been published on the utilisation of Near and Mid FT-IR for authentication, identification or classification of many agro-foods, notably olive oils (Casale, Sinelli, et al., 2010; Dupuy, Galtier, Olliver, et al., 2010; Galtier et al., 2008; Sinelli et al., 2010) and table olives (Casale et al., 2010; Dupuy et al., 2010) by multivariate statistical analysis of spectral data. Near FT-IR (FT-NIR) has been applied on olive leaves to discriminate between the juvenile and adult leaves (Leon & Downey, 2006) and for prediction of nutritive composition (Fernandez-Cabanias, Garrido-Varo, Delgado-Pertinez, & Gomez-Cabrera, 2008). To our knowledge, no work has been conducted on olive leaves by application of Mid FT-IR (FT-MIR) spectroscopy in association with chemometric treatments.

The aim of this study was to develop by FT-MIR spectroscopy associated to chemometric treatment, a direct and rapid tool to discriminate five Tunisian cultivars according to their olive leaves.

2. Materials and methods

2.1. Leaf samples

Experiments were carried out on 75 samples of olive leaves from five Tunisian cultivars (Chemlali (A), Sayali (B), Meski (C), Zarrazi (D) and Chétoui (E)). Well-expanded leaves, from the current season, were collected in 19th October 2009 from 15 olive trees. All trees were cultivated in the same experimental field and cultural conditions of the collection of olive trees varieties (RESGE CFC/COI/03) – Oued Souhil – Nabeul 2004 (Tunisia). For each of the five cultivars, the samples were obtained from three different trees (coded (1), (2) and (3)). From each tree, leaves were harvested from the five orientations of tree (Centre (C), North (N), South (S), East (E) and West (W)). In all cases, every sample contains about 100 healthy leaves. A morphological characteristic of five cultivar leaves is presented in Table 1.

Table 1
Morphological characteristics of five cultivar leaves.

Cultivar leaves	Length (mm)	Width (mm)	Form = length/width
Chemlali	52,93 ± 8,84 ^a	10,70 ± 1,76 ^a	5,03 ± 1,06 ^{bc}
Chétoui	54,97 ± 5,34 ^a	12,37 ± 1,45 ^b	4,49 ± 0,57 ^a
Meski	62,07 ± 6,68 ^b	11,63 ± 1,40 ^b	5,38 ± 0,65 ^c
Sayali	79,60 ± 8,81 ^c	11,87 ± 1,50 ^b	6,79 ± 1,00 ^d
Zarrazi	65,97 ± 10,34 ^b	13,52 ± 1,88 ^c	4,89 ± 0,48 ^b

Results were expressed as mean ± standard deviation.

Values in each column with different letters differs significantly (*p*-Values < 0.05).

All samples were dried on site in a microwave two times for 2 min at maximum power 800 W (2450 MHz). Dried leaves were powdered in a blender IKA Labortechnik A10 and stored at 4 °C in the dark until use.

2.2. Fourier transform infra-red (FTIR) analysis

2.2.1. Instrumentation

Mid-Infrared spectra of samples were obtained using a Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR spectrometer equipped with a deuterio-triglycine sulphate (DTGS) detector, an Ever-Glo Mid-Infrared source and a KBr/germanium beam splitter. The InfraRed spectrometer was situated in an air-conditioned room (21 °C).

2.2.2. Analysis conditions

Dried powdered olive leaf samples were analysed by Mid-Infrared spectroscopy. Around 30–50 mg of powder is sufficient to perform Mid-Infrared spectral analysis.

Samples were deposited on attenuated total reflection (ATR) cell equipped with a diamond crystal prism (monoreflexion). Mid-Infrared spectra were recorded between 4000 and 700 cm⁻¹. The nominal resolution was 4 cm⁻¹, and 100 scans were co-added. Air was taken as reference for the background spectrum before collection of each sample spectrum. Between each spectrum, the ATR plate was cleaned in situ by scrubbing with ethanol solution, which made it possible to dry the ATR. Cleanliness was verified by collecting a background spectrum and comparing it to the previous background spectrum.

Each sample was scanned with three replicates. The scans of each sample were examined visually for consistence, and the average spectrum of each sample was used for further analyses.

2.3. Chemometric treatments of FT-MIR spectra

The FT-MIR data were transformed with standard normal variate (SNV) to remove slope variation and to correct for scatter effects. The spectral variation was analysed by principal component analysis (PCA) on the average of the spectral data for each sample in order to discriminate olives leaf samples on the basis of their cultivars. Partial Least Square Discriminate Analysis (PLS-DA) method was performed with the purpose of olive cultivar identification.

PLS-DA was carried out using an exclusive binary coding scheme with one bit per cultivar, providing a quintuplet {a;b;c;d;e} since the aim of this work was to discriminate between five cultivar. Each number represents a “membership value” for each cultivar, e.g., a response encoded {0;1;0;0;0} means that the sample belongs to cultivar B (Sayali). During the calibration process, the PLS-DA method was trained to compute the five “membership values”, one for each cultivar; the sample was then assigned to the cultivar showing the highest membership value.

The whole spectral collection included 75 spectra, each corresponding to one sample. In order to carry out a validation test, the data set was divided into two groups: two third of the samples (50 observations) were used for calibration and one third (25 observations) was used for validation.

The model was built by the block cross validation method during the calibration developments. Each block contained 10 samples. The evaluation of the errors in the calibration was carried out by computing the standard error of calibration (SEC) after comparing the real “membership value” with the computed one for each cultivar. The formula for the standard error of calibration is:

$$SEC = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - C'_i)^2}{N - 1 - p}\right)} \quad (1)$$

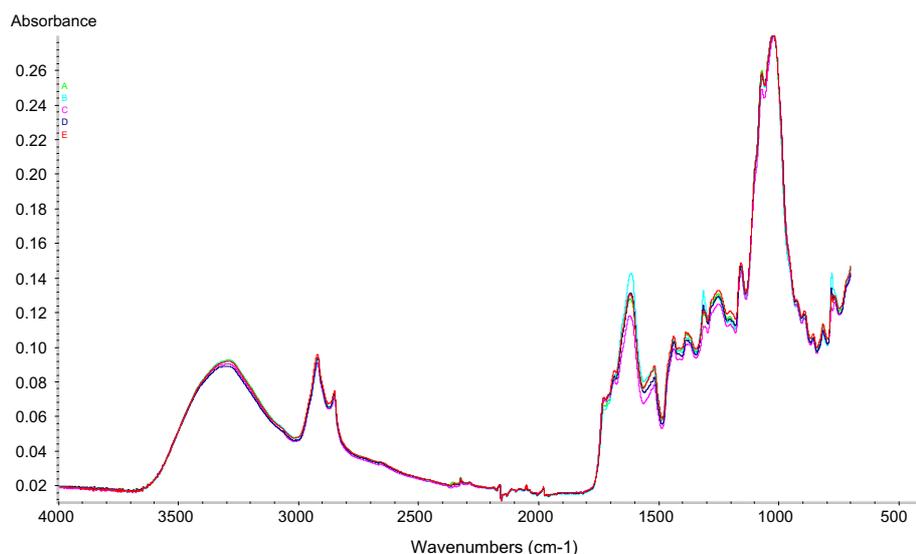


Fig. 1. The typical Mid FTIR-ATR spectra of powdered olive leaf samples recorded for the five different cultivars.

where C_i is the known value, C'_i is the value calculated by the calibration equation, N is the number of samples and p is the number of independent variables in the regression optimised by cross-validation. The standard error of prediction (SEP) gives an estimation of the prediction performance during the step of validation of the calibration equation:

$$SEP = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^M (C_i - C'_i)^2}{M}\right)} \quad (2)$$

where M is the number of samples in the prediction set. Acceptable models should have low SEC and SEP, and high Coefficient of correlation R^2 between predicted and reference value.

2.4. Software for FTIR data treatments

FTIR-ATR spectra have been recorded by the instrument software OMNIC 4.1b (Thermo Nicolet). UNSCRAMBLER software the version

9.6 from CAMO (Computer Aided Modelling, Trondheim, Norway) has been used for chemometric treatment of FTIR-ATR data spectra.

3. Results and discussion

3.1. Typical FTIR spectra of olive leaves

The Mid-FTIR spectra obtained for all samples of dried powdered olive leaves were similar by visual inspection. Typical average spectra from each cultivar were presented in Fig 1. All spectra are characterised by common absorption bands. Many overlapped bands appear at the spectra region between 700 and 1750 cm^{-1} . A large band was observed at 3000–3600 cm^{-1} . An intense absorbance was recorded for two bands at 2800–3000 cm^{-1} .

Despite the similarity of the general pattern, some differences in the relative intensities of spectral absorbance were observed between samples from various cultivars. Direct molecular interpretation of the spectra is very difficult for complex sample matrices especially for samples such as olive leaves.

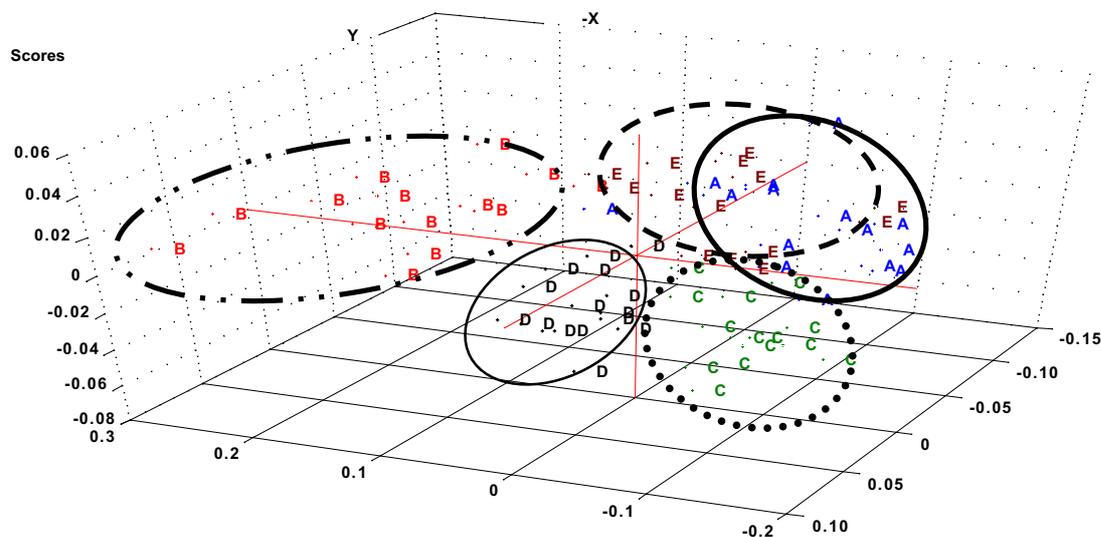


Fig. 2. Discrimination of five Tunisian cultivars (Chemlali (A), Sayali (B), Meski (C), Zarrazi (D) and Chétoui (E)): Three dimensional plots of powdered olive leaf samples investigated in principal component analysis using the Mid-Infrared spectra of samples analysed in triplicate (74% of variance explained).

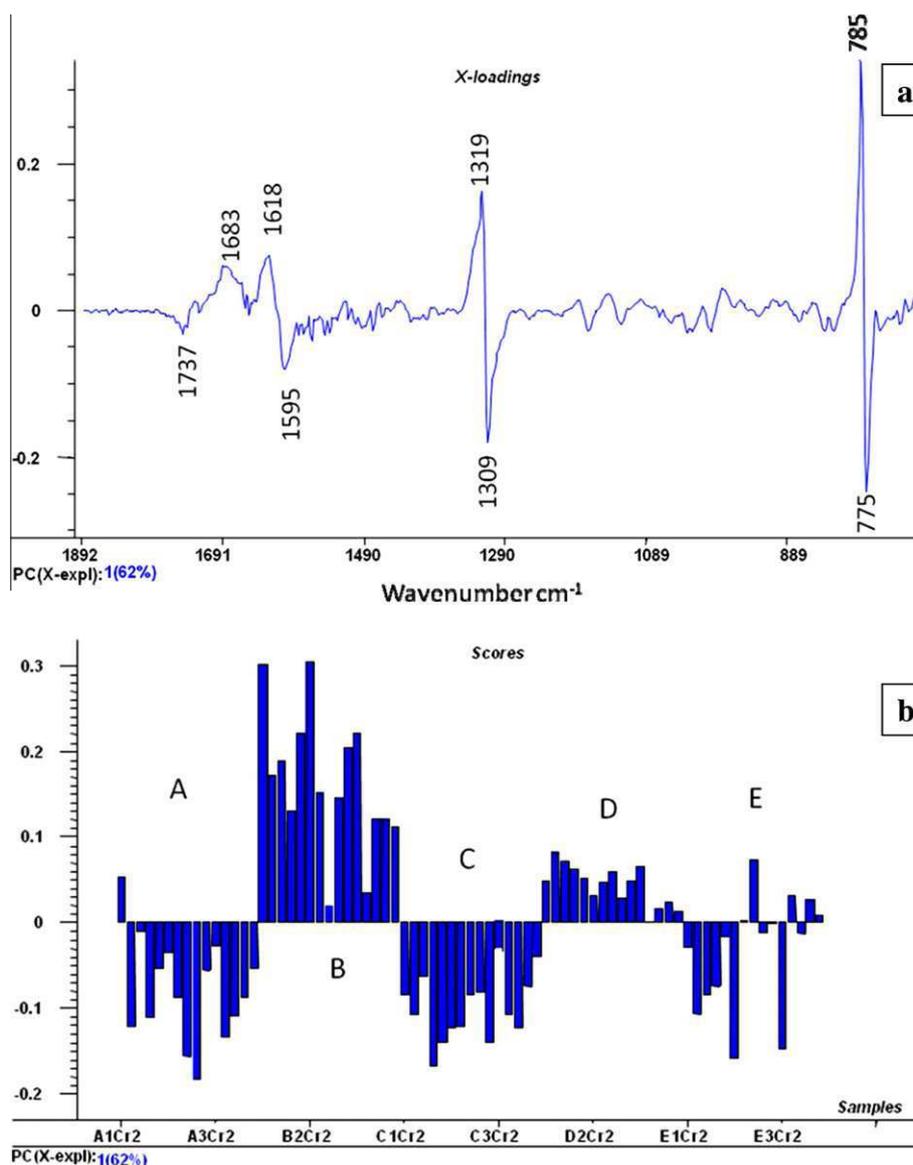


Fig. 3. (a) First loading obtained in principal component analysis. (b) Scores obtained on the first loading.

Because each chemical compound in the olive leaf sample contributes to the absorbance spectrum, the MIR spectrum of olive leaf sample contains information for the compounds which are present. Thus, the olive leaf spectrum may be considered to represent its overall chemical composition and therefore has the potential to characterise leaves and acts as a fingerprint.

The visual examination of the spectral variations did not permit to apprehend clearly the difference of chemical structure and chemical species concentration in olive leaves depending on cultivar. Chemometric treatments are, often, applied in order to extract information from the spectral data set.

3.2. Discrimination and classification of olive leaf samples according to their cultivar

Today, multivariate analysis is an essential chemometric tool to study data came from many observations made on several variables. Its aim is to resume information contained in data with a reduced number of dimensions to characterise as well as possible the differences or similarities between observations and variables.

Olive leaf samples were powder's solids in the experiments. Effect on scatter of MIR light existed when passing powder sample.

Therefore, SNV preprocessing method was applied on all spectra in order to remove physical spectral information (due to particle size), so that discrimination and predicted models will be performed based on mainly chemical spectral information.

Then, the spectral data set of olive leaf samples was subjected to the basic tool for data analysis: principal component analysis (PCA). PCA is very important especially in the preliminary steps of a multivariate analysis to perform an exploratory analysis in order to have an overview of data. It allows describing data set without a priori knowledge of the data structure.

PCA has been carried out on Mid-FTIR spectra in order to assay to discriminate olive leaf samples according to their cultivar. It was performed on the 75 spectra: 15 average spectra recorded in triplicate for each one of the five cultivars.

Fig 2 shows the 3D plot of principal component scores. This plot represents a 74% of total variance in the spectral data. The first principal component accounts for 62% of the variance. It is clear that there was information related to the varietal origin in the MIR spectra of olive leaf samples but there is an overlay between Chemlali leaves (A) and Chétoui one (E). The examination of the first loading (Fig. 3a) and the associated scores (Fig 3b) shown the wavenumbers highly correlated with the species. The Fig 3b

Table 2
Determination of calibration and prediction parameters of cultivars by chemometric treatment of MIR spectra.

Cultivars	Calibration				Prediction			
	Samples Numbers	R ²	SEC	Bias	Samples Numbers	Q ²	SEP	Bias
Chemlali	50	0.98	0.054	0.000	25	0.88	0.193	0.004
Chétoui	50	0.98	0.047	−0.000	25	0.88	0.193	−0.045
Meski	50	0.97	0.064	−0.001	25	0.89	0.182	−0.010
Sayali	50	0.98	0.053	0.000	25	0.85	0.216	−0.019
Zarrazi	50	0.96	0.073	0.001	25	0.85	0.209	0.083

Spectral rang (cm^{−1}): 4000–700; R²: correlation coefficient between calibrated and reference value; SEC: standard error of calibration; Q²: correlation coefficient between predicted and reference value; SEP: standard error of prediction; bias: difference between an estimator's expectation and the true value of the parameter being estimated.

Table 3
Prediction of leaf cultivars by chemometric analysis of MIR spectra.

Cultivars	Samples	Chemlali		Chétoui		Meski		Sayali		Zarrazi	
		Pred.	Ref.	Pred.	Ref.	Pred.	Ref.	Pred.	Ref.	Pred.	Ref.
Chemlali	A1N	0.965	1	−0.180	0	−0.047	0	−0.155	0	0.477	0
	A2C	0.587	1	0.160	0	−0.074	0	−0.074	0	0.140	0
	A2S	0.911	1	−0.133	0	−0.074	0	−0.152	0	0.186	0
	A3E	1.047	1	−0.280	0	−0.163	0	0.184	0	0.174	0
	A3W	0.981	1	−0.210	0	−0.029	0	0.081	0	0.043	0
Chétoui	E1N	0.043	0	0.882	1	0.186	0	−0.099	0	0.124	0
	E2C	0.164	0	0.916	1	−0.035	0	−0.042	0	0.032	0
	E2S	−0.165	0	0.825	1	0.183	0	0.118	0	−0.025	0
	E3E	0.228	0	0.780	1	−0.106	0	0.196	0	0.171	0
	E3W	0.314	0	0.702	1	0.085	0	0.007	0	−0.052	0
Meski	C1N	−0.142	0	0.035	0	0.690	1	0.033	0	0.419	0
	C2C	0.211	0	−0.122	0	1.078	1	−0.131	0	0.072	0
	C2S	−0.144	0	0.226	0	0.722	1	0.128	0	0.067	0
	C3E	0.111	0	−0.019	0	0.617	1	0.172	0	0.070	0
	C3W	0.230	0	−0.409	0	0.798	1	0.032	0	0.256	0
Sayali	B1N	0.367	0	−0.293	0	−0.001	0	0.702	1	0.450	0
	B2C	0.094	0	−0.069	0	0.071	0	0.608	1	0.464	0
	B2S	−0.138	0	0.151	0	0.062	0	0.862	1	−0.039	0
	B3E	0.064	0	0.272	0	0.061	0	0.984	1	−0.172	0
	B3W	−0.300	0	0.003	0	0.469	0	1.122	1	−0.141	0
Zarrazi	D1N	0.097	0	0.158	0	0.170	0	0.054	0	0.775	1
	D2C	−0.273	0	0.166	0	0.036	0	−0.037	0	1.011	1
	D2S	−0.125	0	−0.093	0	−0.103	0	0.072	0	0.995	1
	D3E	−0.051	0	0.192	0	−0.186	0	0.065	0	0.750	1
	D3W	−0.189	0	0.200	0	0.023	0	0.107	0	0.836	1

Pred.: predicted; Ref.: reference; **0.000**: suspicious results; spectral rang (cm^{−1}): 4000–700.

shows that the species B and D are positively correlated to the first loading positive part (1683, 1618, 1319, and 785 cm^{−1}) and negatively correlated to the negative part. The species A and C are negatively correlated to the first loading positive part and positively correlated to the negative part (1737, 1595, 1309 and 775 cm^{−1}). The species E do not present correlation on this loading. The chemical information associated is difficult to interpret because olive leaves are very complex systems, even if the difference in spectral data may be attributed to the difference in chemical composition, with qualitative and quantitative aspects.

Olive tree cultivars have been previously separated according to their chemical composition, such as DNA (Bracci et al., 2009; Zitoun et al., 2008), isoenzyme (Trujillo et al., 1995), phenolic compounds (Di Donna et al., 2010; Japón-Luján et al., 2006).

In the same framework, Casale et al. and Dupuy et al. have investigated IR spectroscopy as a tool for olive cultivars discrimination by analysing table olive fruits (Casale et al., 2010; Dupuy et al., 2010) and extra virgin olive oil (Casale et al., 2010; Dupuy, Galtier, Olliver, et al., 2010; Sinelli et al., 2010).

Therefore, five classification models (Chemlali, Sayali, Meski, Zarrazi and Chétoui) have been built, using a PLS-DA method as a chemometric treatment of spectra. The performance of models was evaluated in term of correlation coefficient (R²), standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP) and bias.

Results of calibration and prediction models were presented in Table 2. The five models are acceptable. In fact, they have low SEC (0.047–0.073), low SEP (0.182–0.216), high R² (0.96–0.98), low bias (−0.019–0.083) between predicted and reference spectrum.

Results obtained for all samples used in prediction set of the five cultivars are presented in Table 3. The predicted cultivars are never given by 0 or 1 results because the chemical composition in the samples varies according to the olive leaf cultivars. As a matter of fact, there is a natural variation of the chemical composition which can notably be a function of tree age, olive leaf age.

Considering the difficulty to calibrate and predict the cultivar with binary variables, it was necessary to discriminate the results between the initial values 0 or 1. We considered that all the values between negative value and 0.49 conduce to a non recognised sample and the ones between 0.51 and high positive one to a recognised sample. With those limits, 100% of the samples from the Tunisian cultivars were well predicted. The results between 0.45 and 0.55 were suspicious because they were very close to the threshold 0.5. The 0.45 and 0.55 limits have been chosen because they express 10% of error in the results. With those limits four samples have been detected as having suspicious origin that represents 16% of all samples.

100% of the samples from “Chétoui”, “Zarrazi” and “Meski” cultivars were well predicted. But, only 80% and 40%, respectively of

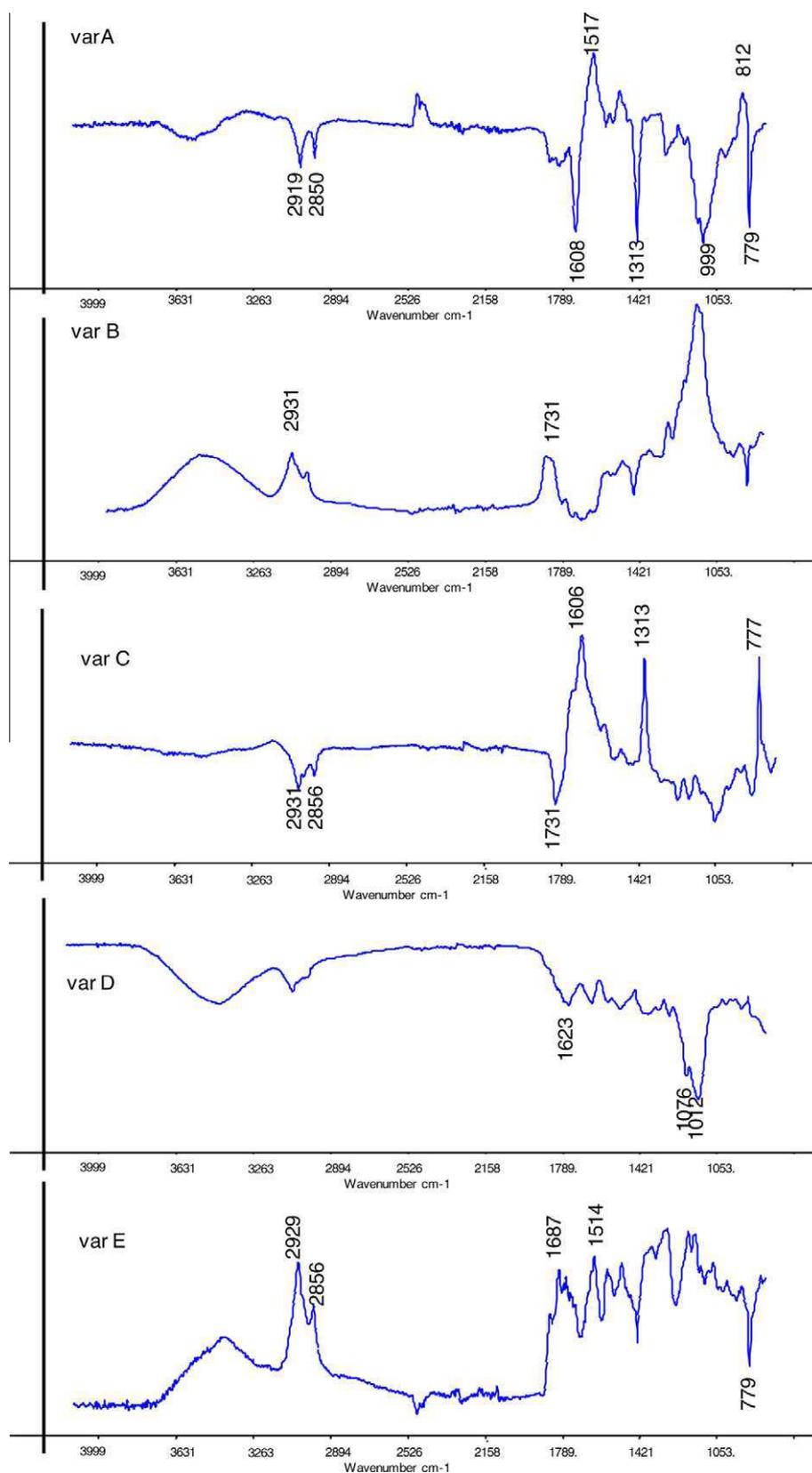


Fig. 4. First regression coefficient obtained for the five determinations of cultivars (Chemlali (A), Sayali (B), Meski (C), Zarrazi (D) and Chétoui (E)).

the samples from “Chemlali” and “Sayali” cultivars were well predicted. Some samples were not reliable to their cultivars: one sample for “Chemlali” cultivar (A1N) has some characteristics with

“Zarrazi” cultivar; three samples for “Sayali” cultivar (B1N, B2C and B3W) are identified as “Sayali” cultivar but they have some characteristics with “Meski” and “Zarrazi” cultivar. As it was

possible to classify samples as a function of their origin, it is interesting to understand how this classification was carried out on the basis of MIR spectra. In the case of PLS regression between spectra and compounds, it is well known that the first loading (noted “B”) was a good approximation of the pure compound spectrum (Haaland & Thomas, 1988). Thus, loadings obtained for all the origins provide an approximation of the original feature of olive leaves (Fig. 4). The A variety is correlated at 1517 and 812 cm^{-1} , the B one to 2931, 1731 and 1016 cm^{-1} , the C one to 1606, 1313 and 777 cm^{-1} , the D one is anti correlated to 1623, 1076 and 1012 cm^{-1} and the E one is correlated to 2929, 2856, 1687 and 1514 cm^{-1} . Each variety is identified on different spectral information.

The rapidity of analyses, the availability of leaves all the year and the feasibility of the technique, among other, allow the chemometric treatment of FT-MIR spectra of olive leaves to be a promising approach for olive tree cultivar discrimination and identification.

4. Conclusion

The discrimination between five Tunisian cultivars of olive trees cultivated in the same geographical area can be performed by a chemometric approach based on the FT-MIR spectral data provided by olive leaves, a persistent tissue the whole year. Furthermore, MIR spectroscopy presents high potential for cultivar differentiation and prediction by PLS-DA method. Therefore, a simple, rapid and reliable overall characterisation of olive cultivar may be obtained at a low cost. It might be an application for rapidly classification of olive cultivar.

However, this study presents some limitation and further work is necessary to obtain more robust classification rules, able to account in a better way both for the regional and for the time variability. It should analyse a larger number of samples representative of wide variability (geographical origin, harvesting period and years).

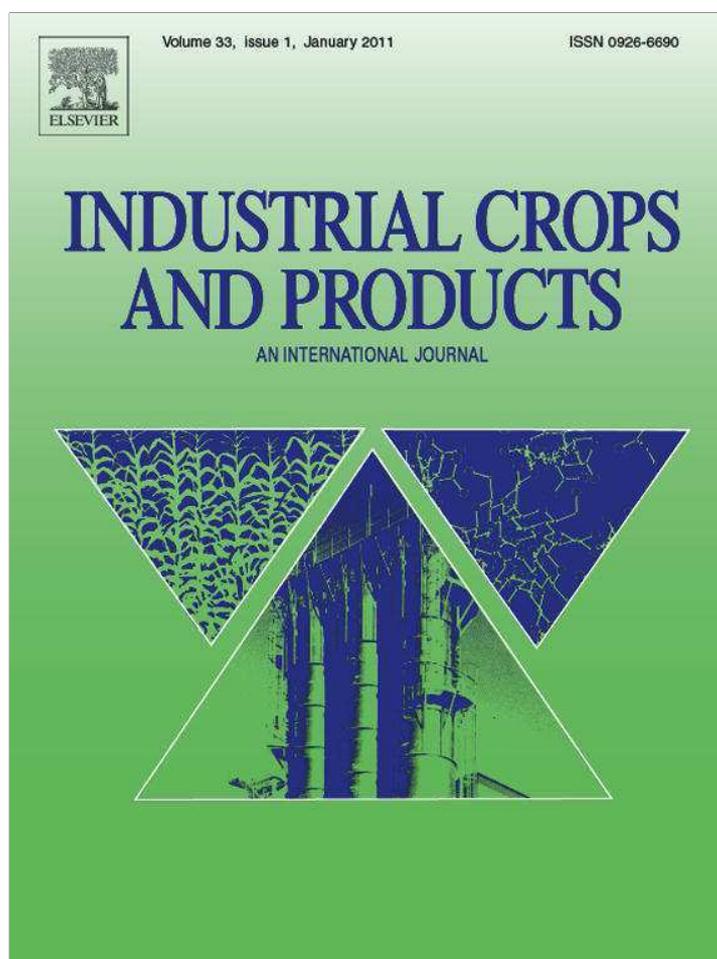
Acknowledgements

Fathia Aouidi is thankful to the Tunisian Ministry of Scientific Research, Technology and Competences Development for providing grant. We also thank Dr. Ali Ben Diah from Olive Institute for technical assistance in sample collection.

References

- Abbas, O., Rebufa, C., Dupuy, N., Permanyer, A., & Kister, J. (2008). Assessing petroleum oils biodegradation by chemometric analysis of spectroscopic data. *Talanta*, *75*, 857–871.
- Alba, V., Montemurro, C., Sabetta, W., Pasqualone, A., & Blanco, A. (2009). SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. *Scientia Horticulturae*, *123*, 11–16.
- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., & Baldoni, L. (2004). Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of Arbequina and Manzanilla de Sevilla olive. *HortScience*, *39*, 1566–1570.
- Blanco, M., Cueva-Mestanza, R., & Peguero, A. (2010). Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(4), 797–804.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., & Trujillo, I. (2009). SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, *122*, 209–215.
- Casale, M., Sinelli, N., Oliveri, P., Di Egidio, V., & Lanteri, S. (2010). Chemometric strategies for feature selection and data compression applied to NIR and MIR spectra of extra virgin olive oils for cultivar identification. *Talanta*, *80*, 1832–1837.
- Casale, M., Zunin, P., Cosulich, M.-E., Pistarino, E., Perego, P., & Lanteri, S. (2010). Characterisation of table olive cultivar by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, *122*(4), 1261–1265.
- Di Donna, L., Mazzotti, F., Naccarato, A., Salerno, R., Tagarelli, A., Taverna, D., et al. (2010). Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. *Food Chemistry*, *121*, 492–496.
- Doveri, S., Gil, F. S., Diaz, A., Reale, S., Busconi, M., Camara Machado, A., et al. (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, *116*, 367–373.
- Dupuy, N., Galtier, O., Le Dréau, Y., Pinatel, C., Kister, J., & Artaud, J. (2010). Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*, 463–475.
- Dupuy, N., Galtier, O., Ollivier, D., Vanlout, P., & Artaud, J. (2010). Comparison between NIR, MIR, Concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oils analysis. *Analytica Chimica Acta*, *666*, 23–31.
- Durand, A., Devos, O., Ruckebusch, C., & Huvenne, J. P. (2007). Genetic algorithm optimisation combined with partial least squares regression and mutual information variable selection procedures in near-infrared quantitative analysis of cotton-viscose textiles. *Analytica Chimica Acta*, *595*, 72–79.
- Fernandez-Cabanias, V. M., Garrido-Varo, A., Delgado-Pertinez, M., & Gomez-Cabrera, A. (2008). Nutritive evaluation of olive tree leaves by near-infrared spectroscopy: Effect of soil contamination and correction with spectral pretreatments. *Applied Spectroscopy*, *62*(1), 51–58.
- Galtier, O., Le Dréau, Y., Ollivier, D., Kister, J., Artaud, J., & Dupuy, N. (2008). Lipid compositions and French Registered Designations of origins of virgin olive oils predicted by chemometric analysis of Mid-infrared spectra. *Applied Spectroscopy*, *62*(5), 583–590.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, *41*, 433–440.
- Haaland, D. M., & Thomas, E. V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analysis. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, *60*, 1193–1202.
- Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., & Bervillé, A. (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae*, *116*, 280–290.
- Hennessy, S., Downey, G., & O'Donnell, C. P. (2009). Confirmation of food origin claims by fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics: Extra virgin olive oil from Liguria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1735–1741.
- Japón-Luján, R., Ruiz-Jimnez, J., & Luque de Castro, M. D. (2006). Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(26), 9706–9712.
- Langeron, Y., Doussot, M., Hewson, D. J., & Duchêne, J. (2007). Classifying NIR spectra of textile products with kernel methods. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, *20*, 415–427.
- Leon, L., & Downey, G. (2006). Preliminary studies by visible and near-infrared reflectance spectroscopy of juvenile and adult olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 999–1004.
- Pinheiro, P. B. M., & Esteves da Silva, J. C. G. (2005). Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L. *Analytica Chimica Acta*, *544*, 229–235.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 434–440.
- Roman, M. B., & Ravilya, Z. S. (2008). Gasoline classification by source and type based on near infrared (NIR) spectroscopy data. *Fuel*, *87*, 1096–1101.
- Sinelli, N., Casale, M., Di Egidio, V., Oliveri, P., Bassi, D., Tura, D., et al. (2010). Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. *Food Research International*, *43*, 2126–2131.
- Trigui, A., & Msallem, M. (2002). Oliviers de Tunisie. In *Catalogue des variétés autochtones et types locaux, identification variétale et caractérisation morphologique des ressources génétiques oléicoles de Tunisie* (Vol. 1). (Fr) Ministère de l'Agriculture, IRESA, Institut de l'Olivier, Tunisia.
- Trujillo, I., Rallo, L., & Arus, P. (1995). Identifying olive cultivars by isoenzyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *120*, 318–324.
- Wu, Y. W., Sun, S. Q., Zhou, Q., & Leung, H. W. (2008). Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *46*(3), 498–504.
- Zitoun, B., Branzini de Caraffa, V., Giannettini, J., Breton, C., Trigui, T., Maury, J., et al. (2008). Genetic diversity in Tunisian olive accessions and their relatedness with other Mediterranean olive genotypes. *Scientia Horticulturae*, *115*, 416–419.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

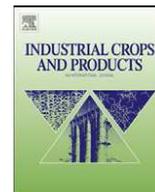
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses

Fathia Aouidi^{a,c,*}, Nathalie Dupuy^b, Jacques Artaud^b, Sevastianos Roussos^c, Monji Msallem^d, Isabelle Perraud Gaime^c, Moktar Hamdi^a

^a Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), Centre Urbain Nord, 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, University of Carthage, 1080 Tunis, Tunisia

^b ISM², UMR 6263, Equipe AD²EM, Groupe Systèmes Chimiques Complexes, Faculté des Sciences et Technique Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, 13397 Marseille cedex 20, France

^c IMEP UMR CNRS 6116/IRD UMR 193 Case 441, Faculté des Sciences et Technique Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, 13397 Marseille cedex 20, France

^d Institut de l'olivier, BP 208, 1082 Tunis, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2011

Received in revised form

15 December 2011

Accepted 16 December 2011

Keywords:

Oleuropein

Olive leaf (*Olea europaea*)

Mid-infrared spectroscopy

HPLC analysis

Chemometric analysis

ABSTRACT

Oleuropein, the major active compound in olive leaf, is well known for its benefits for human health. Oleuropein is classically quantified by HPLC, which is time and chemical consuming, laborious and expensive. The aim of this work was to examine the potential of mid-infrared spectroscopy, as a rapid tool, to predict oleuropein content in olive leaf from five Tunisian cultivars (*Chemlali*, *Chetoui*, *Meski*, *Sayali* and *Zarrazi*) and one French cultivar (*Bouteillan*). The reference data of oleuropein content were obtained by the HPLC method. Hundred five samples were analyzed by HPLC and mid-infrared spectroscopy. Samples were randomly divided in a calibration set (73 samples) and in a validation set (32 samples). The spectral data sets were correlated with reference data of oleuropein content by using partial least squares (PLS) regression algorithm. The results showed that the PLS model gave satisfactory model for quantitative prediction of oleuropein content in olive leaf (relative error of prediction = 8.5%). The correlation coefficient was 0.91 and 0.74 for calibration set and validation set, respectively. It can be concluded that mid-infrared spectroscopy constitutes a promising technique for rapid quantification of oleuropein in olive leaf.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oleuropein (Fig. 1), a secoiridoid compound, is present in the whole *Olea europaea* L. olive tree and its derivatives (olive oil, olive mill wastewater and pomace). It is the most abundant biophenol and the major bioactive compound in olive leaves. Olive leaves, resulting with huge amount from pruning or defoliation of olive fruits before processing, were showed be useful source for oleuropein extraction (Savournin et al., 2001; Bouaziz and Sayadi, 2003; Jâpon-Lujan et al., 2006).

It has been reported that oleuropein possesses many beneficial effects on human health, such as antioxidative (Benavente-Garcia et al., 2000), antimicrobial (Pereira et al., 2007), antiviral (Micol et al., 2005), anti-ischemic (Andreadou et al., 2006), anti-inflammatory (Visioli et al., 1998) and hypolipidemic (Jemai et al., 2008) properties. In addition, oleuropein has shown

cardioprotective (Andreadou et al., 2006) and neuroprotective (Omar, 2010) effects. In vitro studies have demonstrated that oleuropein acts as an antitumor compound (Hamdi and Castellon, 2005), inhibits platelet-activating factor activity (Andrikopoulos et al., 2002) and might be a modulator of metabolism. It improves lipid metabolism to protect against obesity problems (Polzonetti et al., 2004). Furthermore, oleuropein intervenes in the developmental processes of olive fruits and tree. It also defends olive tree against the attack of pathogens and insects (Malik and Bradford, 2006).

The quantification of oleuropein in olive leaves is usually carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) (Savournin et al., 2001; Jâpon-Lujan et al., 2006; Ranalli et al., 2006). High-resolution gas chromatography (HRGC) has also been used (Ranalli et al., 2006). These analytical techniques are time-consuming, expensive and involve a considerable amount of manual work. Very often, complex chemical treatment of the sample and the use of sophisticated instruments are required.

Recently, mid-infrared (MIR) spectroscopy has become an emerging well-accepted analytical technique, due to its simplicity with advantages in terms of cost per sample. It achieves high analysis speed and requires little or no sample preparation. MIR spectroscopy has been widely used as an analytical tool in

* Corresponding author at: Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), Centre Urbain Nord, 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, University of Carthage, 1080 Tunis, Tunisia. Tel.: +216 98 326 675.

E-mail address: aouidfathia@yahoo.fr (F. Aouidi).

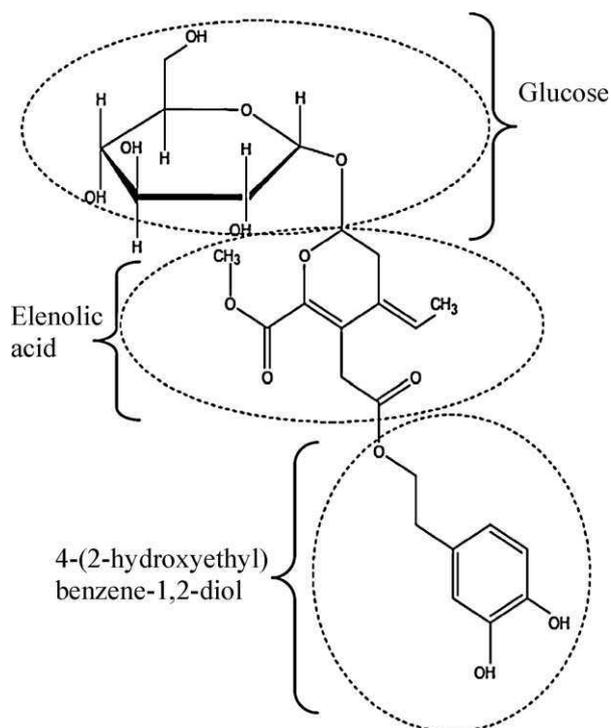


Fig. 1. Molecular structure of oleuropein.

various laboratories and industrial sectors such as food agricultural (Irudayaraj and Tewari, 2003; Käuper and Ferri, 2004; Bureau et al., 2009), pharmaceutical (Wu et al., 2008), petrochemical (Galtier et al., 2011), geochemical (Reeves and Smith, 2009), planetary and space science (Kelley and Wooden, 2009). Up to date, a lot of studies have been published on the utilization of MIR spectroscopy for predictive quantification of constituents in many agro-foods, such as lipid composition in virgin olive oils (Galtier et al., 2008); polymethoxylated flavone content in orange oil residues (Manthey, 2006); sugars and organic acids contents in apricot fruit (Bureau et al., 2009), in apple juice (Irudayaraj and Tewari, 2003) and in tomatoes (Beullens et al., 2006); total phenol, total flavonoids, total anthocyanin and ascorbic acid content in blueberries (Sinelli et al., 2008); residual starch from in vitro fermentations (Udén, 2009). However, to our knowledge, no work with quantitative approach has been conducted on olive leaves by application of MIR spectroscopy.

The aim of this study was to develop by mid-infrared spectroscopy associated to chemometric treatment, a direct and rapid tool to quantitative determination of oleuropein in olive leaves.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Oleuropein standard was obtained from Extrasynthèse (Geney, France). Formic acid and methanol of HPLC grade were purchased from Sigma–Aldrich.

2.2. Olive leaf samples

Experiments were carried out on 105 samples of olive leaves from six cultivars (*Chemlali* (A), *Sayali* (B), *Meski* (C), *Zarrazi* (D) and *Chetoui* (E) from Tunisia and *Bouteillan* (AL) from France). All Tunisian trees were cultivated in the same experimental field and cultural conditions of the collection of olive trees varieties (RESGE CFC/COI/03) – Oued Souhil – Nabeul 2004 (Tunisia). *Bouteillan*

cultivar trees were cultivated in Saint-Cyr-sur-Mer (France). Sampling from French trees was done in January 2010 as following: young leaves (coded A1L) were harvested from the fruiting zones on small branches (diameter < 2 mm) and mature leaves (coded A2L) were harvested from large branches (diameter > 4 mm). Young leaves from Tunisian trees were collected in October 2009. For each of the 6 cultivars, the samples were obtained from 3 different trees (coded (1), (2) and (3)). From each Tunisian tree, leaves were harvested from the 5 orientations of tree (Centre (C), North (N), South (S), East (E) and West (W)). In all cases, every sample contains about 100 healthy leaves. Tunisian samples were dried on site in a microwave two times for 2 min at maximum power 800 W (2450 MHz). French samples were lyophilized. Dried leaves were powdered in a blender IKA Labortechnik A10 and stored at 4 °C in the dark until use.

2.3. Extraction of oleuropein from olive leaves

Powdered samples (1g) were extracted by 30 mL of methanol/water (4/1, v/v) for 24 h under agitation. The resulted extracts were centrifuged at 4500 rpm for 15 min. The supernatants were recovered and used for HPLC analyses.

2.4. HPLC determination of oleuropein content

HPLC analyses were performed with an analytical HPLC unit (Agilent technologies 1200 series), equipped with a diode array detector. The stationary phase was an Atlantis® Waters dC18 column (5 µm particle size; 250 mm; 4.6 mm). The mobile phases were formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% B and installing a gradient to obtain 15% B at 3 min, 25% B at 13 min, 35% B at 25 min, 45% B at 35 min, 50% B at 40 min, 100% B at 45 min, 5% B at 46 min, finally, reequilibration in 4 min to initial composition. The flow rate was 0.9 mL min⁻¹ with elution at room temperature. The injection volume was 10 µL and chromatograms were recorded at 280 nm. The data were processed on the ChemStation Agilent technologies software. Oleuropein in olive leaf extract was identified by matching the retention time and the UV spectra of a peak in the extract chromatogram with the peak of the oleuropein standard. Identifications were confirmed by analyzing a sample supplemented by the oleuropein standard.

2.5. Mid-infrared analyses

2.5.1. Instrumentation

Mid-infrared spectra of samples were obtained using a Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR spectrometer equipped with a deuterotriglycine sulfate (DTGS) detector, an Ever-Glo mid-infrared source and a KBr/germanium beam splitter. The infrared spectrometer was situated in an air-conditioned room (21 °C).

2.5.2. Analysis conditions

Dried powdered olive leaf samples (30–50 mg) were analyzed by mid-infrared spectroscopy. Samples were deposited on attenuated total reflection (ATR) cell equipped with a diamond crystal prism (monoreflexion). Mid-infrared spectra were recorded between 4000 cm⁻¹ and 700 cm⁻¹. The nominal resolution was 4 cm⁻¹, and 100 scans were co-added. Air was taken as reference for the background spectrum before collection of each sample spectrum. Between each spectrum, the ATR plate was cleaned in situ by scrubbing with ethanol solution, which made it possible to dry the ATR. Cleanliness was verified by collecting a background spectrum and comparing it to the previous background spectrum. Each sample was scanned with three replicates. The scans of each sample were

examined visually for consistence, and the average spectrum of each sample was used for further analyses.

2.6. Chemometric treatments of MIR spectra

The MIR data were transformed with standard normal variable (SNV) and first derivative to remove slope variation and to correct for scatter effects. The partial least square (PLS) regression method was used to develop models for predicting the oleuropein content in olive leaf. PLS (Fuller and Griffiths, 1978; Haaland and Thomas, 1988) was initially built for quantitative analysis, but now it is also used for pattern recognition. This supervised analysis is based on the relation between spectral intensity and sample characteristics (Martens and Naes, 1989). Interference and overlapping of the spectral information may be overcome using powerful multicomponent analysis such as PLS regression. The ability of this algorithm is to mathematically correlate spectral data to a property matrix (Dupuy et al., 2005). Mean centering is applied before modeling. The number of latent variables selected for the PLS model was obtained by cross validation on the calibration set.

The whole spectral collection included 105 spectra, each corresponding to one sample. In order to carry out a cross-validation test, the data set was randomly divided into two groups: two third of the samples ($n = 73$) were used for calibration and one third ($n = 32$) was used for validation. The model was built by the cross validation method during the calibration developments. The evaluation of the errors in the calibration was carried out by computing the standard error of calibration (SEC) after comparing the real oleuropein content with the computed one for each sample. The formula for the standard error of calibration is:

$$SEC = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - C'_i)^2}{N - 1 - p} \right)} \quad (1)$$

where C_i is the known value, C'_i is the value calculated by the calibration equation, N is the number of samples, and p is the number of independent variables in the regression optimized by cross-validation.

The standard error of prediction (SEP) gives an estimation of the prediction performance during the step of validation of the calibration equation:

$$SEP = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^M (C_i - C'_i)^2}{M} \right)} \quad (2)$$

where M is the number of samples in the prediction set.

The root mean square errors of calibration (RMSEC) and of prediction (RMSEP) were also calculated. The two values were obtained using cross validation and they were expressed in the same units as the original response values. RMSEC can be interpreted as the average calibration error and RMSEP can be interpreted as the average prediction error.

Another useful parameter is the relative error of prediction (REP), which shows the predictive ability of the model, calculated from the equation

$$REP = \frac{SEP}{\bar{y}} \times 100 \quad (3)$$

where \bar{y} is the mean of the observed values of crop variables.

Acceptable models should have low SEC, RMSEC, SEP, RMSEP and REP, and high coefficient of correlation between predicted and reference value.

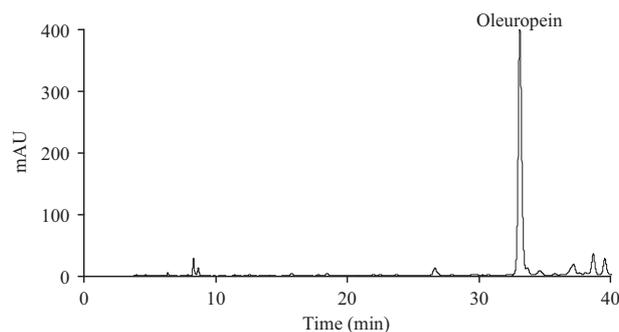


Fig. 2. HPLC chromatogram of an extract of olive leaf sample. Peak oleuropein ($t_R = 33.07$ min). Detection was at 280 nm.

2.7. Software for MIR data treatments

FTIR-ATR spectra have been recorded by the instrument software OMNIC 4.1b (Thermo Nicolet). UNSCRAMBLER software the version 9.6 from CAMO (Computer Aided Modelling, Trondheim, Norway) has been used for chemometric treatment of FTIR-ATR data spectra.

3. Results and discussion

3.1. Reference data of oleuropein content

The reference data of oleuropein content in olive leaves were obtained by the classical technique of HPLC (Savournin et al., 2001; Bouaziz and Sayadi, 2005; Jâpon-Lujan et al., 2006). The oleuropein was eluted at $t_R = 33.07$ min (Fig. 2). It was found to be the major phenolic compound in olive leaves as reported by many authors (Benavente-Garcia et al., 2000; Bouaziz and Sayadi, 2005; Jâpon-Lujan et al., 2006).

The calibration curve of oleuropein standard was linear ($R^2 = 1.000$) in the amount range from 4 to 120 μg . The least-square regression line was: $Y = 0.0032X$, where Y is the mass of the oleuropein standard (μg) and X is the area of corresponding peak. The linearity of the HPLC method was also studied by injecting various volumes of an olive leaf extract. The plotted curve, correlating the peak area of oleuropein in olive leaf extract versus the corresponding injected volume, was linear ($R^2 = 0.9998$) in the volume range from 2 to 20 μL . The least-square regression line was: $Y = 1190.1X - 212.37$, where Y is the area of oleuropein peak and X is the injected volume (μL).

Values of oleuropein content, expressed in percentage (w/w) (gram oleuropein per 100 g dry matter of olive leaves), ranged between 8.72% and 17.95% as shown in Table 1. These data confirm why olive leaves are a source of oleuropein (Savournin et al., 2001; Bouaziz and Sayadi, 2003; Jâpon-Lujan et al., 2006). The obtained oleuropein contents were within the range of levels reported by Bouaziz and Sayadi (2005). They got 12.4–14.2% on a dry mass basis, depending to the harvesting time. Similarly, Savournin et al. (2001)

Table 1
Oleuropein content in both calibration and validation sample sets of olive leaves.

	Calibration set (g/100 g DM ^a)	Validation set (g/100 g DM)
Numbers	73	32
Min	8.72	10.92
Max	17.95	17.17
Mean	13.61	13.70
Median	13.31	13.79
Standard deviation	1.90	1.71

^a DM, dry matter.

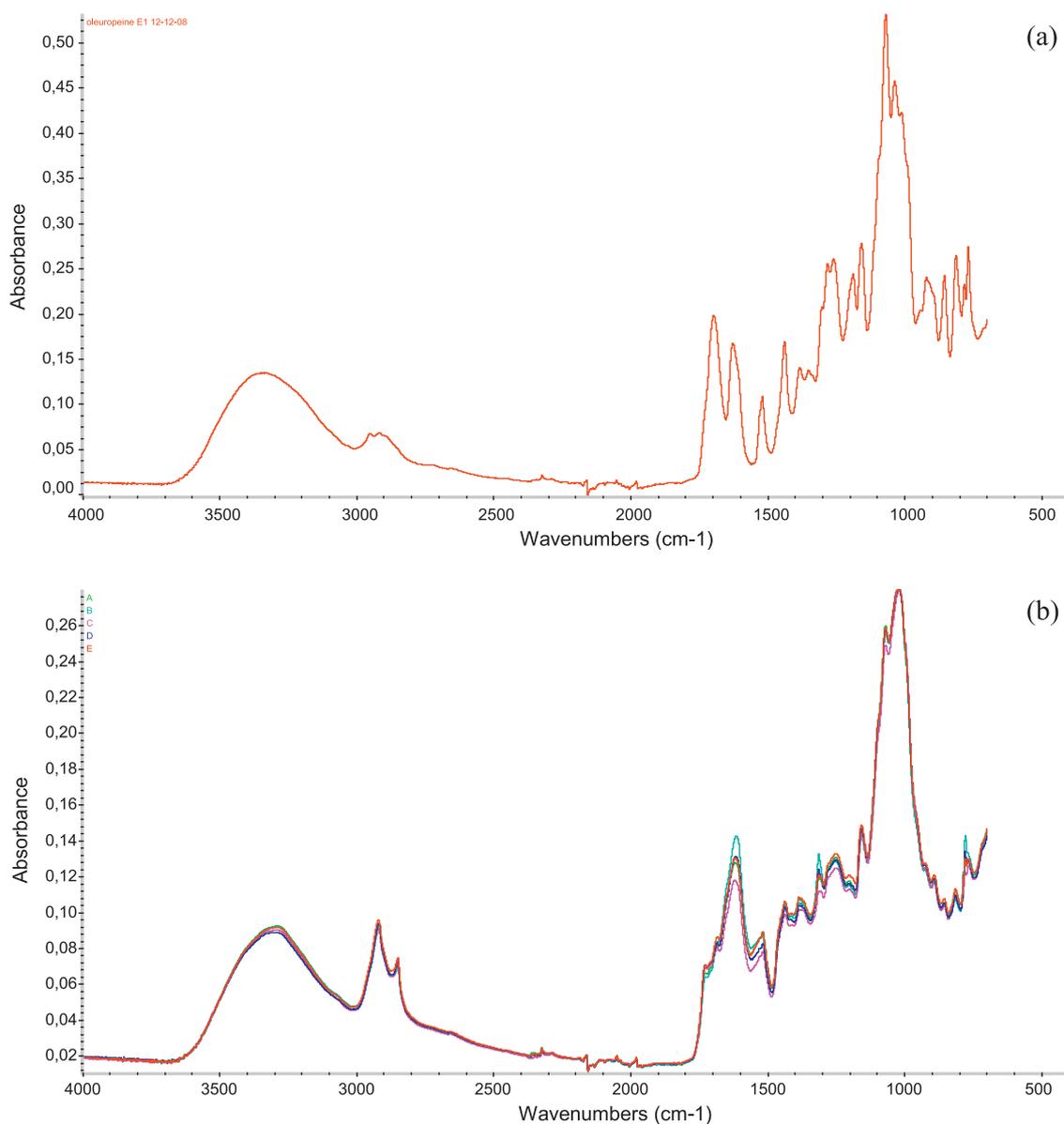


Fig. 3. MIR spectrum of oleuropein standard (a) and MIR spectra of various powdered olive leaf samples (b).

found about 9–14.3% of oleuropein for 14 cultivars. However, values obtained in our study were higher than reported by Jemai et al. (2008) who only extracted 4.32 g of oleuropein per 100 g dry matter of olive leaves. Also, Jâpon-Lujan et al. (2006) only extracted up to 23 mg of oleuropein per 1 g of dried olive leaves.

The descriptive statistic for the reference data of oleuropein content in both calibration and validation sample sets of olive leaf samples are shown in Table 1. The ranges and standard deviations for oleuropein content in both calibration and validation sets indicate high diversity in this parameter. It could be due to genetic diversity (6 cultivars), drying process (lyophilization and microwave) and/or harvesting time (October and January) of olive leaf samples. According to Table 1, the small differences in means (13.61% and 13.70%), median (13.31% and 13.79%), range (8.72–17.95% and 10.92–17.17%) and standard deviation (1.90% and 1.71%) between the calibration and the validation sets indicated that both sets represented the whole variation of all the olive leaf samples used. Therefore, the distribution of the samples is appropriate both in the calibration and in the prediction sets.

3.2. Spectral analyses

MIR spectrum performed for oleuropein was shown in Fig. 3a and has similarities with the spectra of dried olive leaves. Typical average spectra from leaves of each cultivar were presented in Fig. 3b. MIR analysis was performed on homogenate samples obtained by milling a lot of dried olive leaves. The MIR spectra obtained for all samples were similar by visual inspection, indicating that no noticeable qualitative difference was existed between leaf samples. All spectra are characterized by common absorption bands. However, the spectra present some weak differences between 1750 and 700 cm^{-1} in the relative intensities of absorbance from various cultivars. A broad band (3700–3000 cm^{-1}) is due to OH stretching vibrations (νOH) (oleuropein, cellulose, organic acids, etc.) and the two bands (3000–2800 cm^{-1}) from symmetric and asymmetric CH stretching vibrations (νCH , alkyl). The 1800–1500 cm^{-1} region corresponds to C=O and C=C stretching vibrations (esters, acid, carboxylate, aromatic ring). The 1500–1200 cm^{-1} range is very complex with especially CH (δCH , alkyl), and OH deformation vibrations as CO stretching vibrations

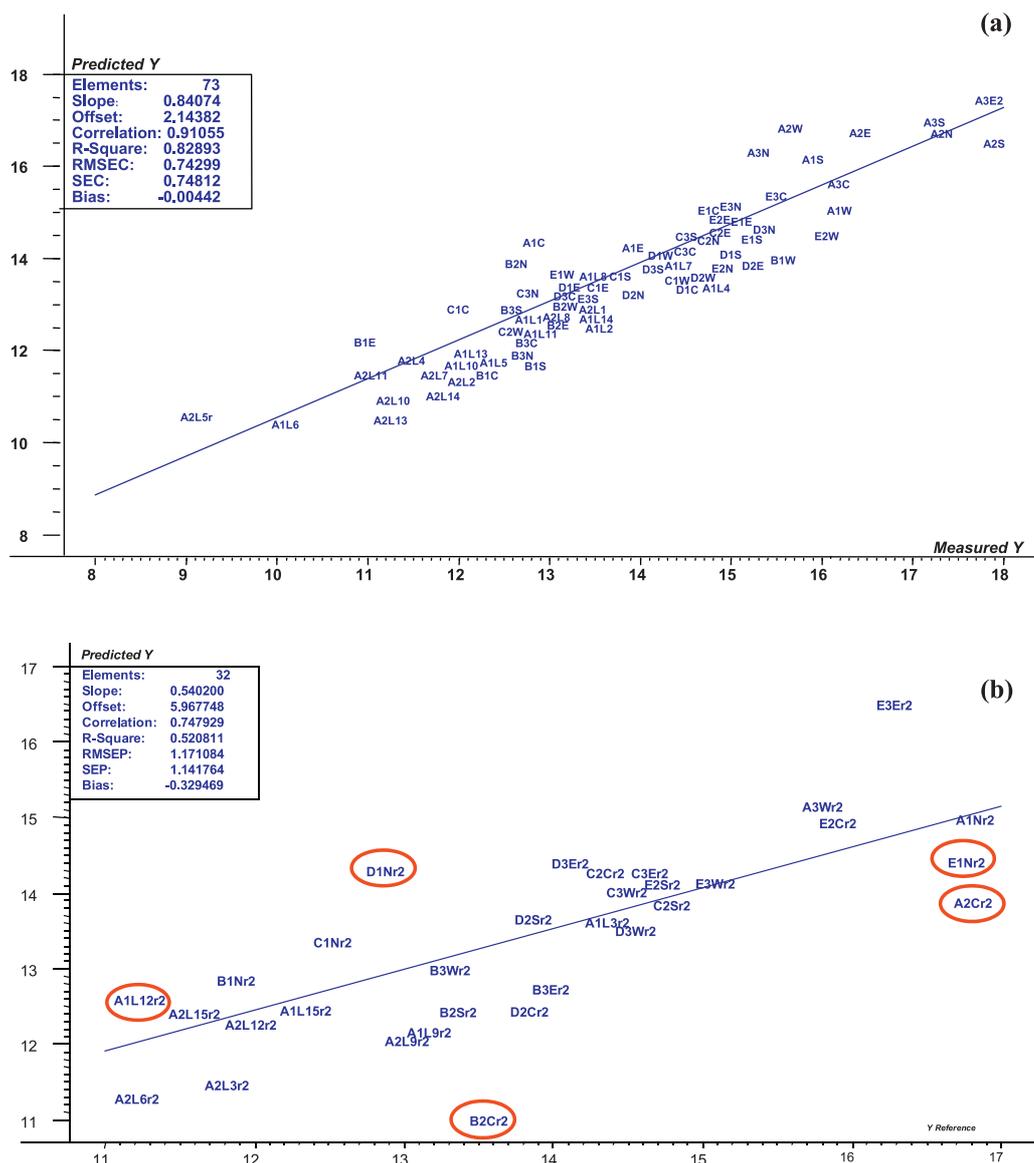


Fig. 4. Prediction of oleuropein content in olive leaves using MIR. Regression line of PLS models of oleuropein content: calibration set (a), prediction set (b). Circulated samples have an error >10%. RMSEC, root mean square error of calibration; SEC, standard error of calibration; RMSEP, root mean square error of prediction; SEP, standard error of prediction.

(phenols). The intense bands between 1150 and 950 cm^{-1} corresponds mainly to the endocyclic and exocyclic C–O stretching vibrations of carbohydrates.

3.3. Calibration and validation

A calibration model (Fig. 4) for predicting oleuropein content of olive leaves was built using the PLS method from MIR spectra. The calibration ($n = 73$) set was used for building model, while the validation set ($n = 32$) was used for testing the robustness of the developed model. The performance of the PLS model was evaluated in terms of standard error of calibration (SEC), root mean square error of calibration (RMSEC), standard error of prediction (SEP), root mean square error of prediction (RMSEP), correlation coefficient (R) and relative error of prediction (REP). Different spectral treatments were tested (SNV, MSC, second derivative, baseline correction) but no improved the results. Finally, the best model was obtained using first derived spectra and SNV correction on 1800–700 cm^{-1} spectral range.

Good correlation of calibration was found between MIR spectra and content of oleuropein with a coefficient of correlation around 0.91 (Fig. 4a). The prediction results were faintly good with a coefficient of correlation around 0.74 (Fig. 4b). Besides, the SEC (0.748%), the RMSEC (0.742%), the SEP (1.141%) and the RMSEP (1.171%) for oleuropein content are relatively low. The ability of MIR spectroscopy in prediction of oleuropein content was confirmed by the faintly good value of REP. In fact, REP, the relative error of prediction, represented about 8.5%.

The error values in absolute terms in the validation set ranged from 0.86% to 19.34%. An error of 10% in absolute term between the reference and the predicted values was considered as the limit of the significance of the difference. With this limit, five samples (A2C, E1N, B2C, D1N, A1L12) in the validation set were bad predicted for their oleuropein content. The samples coded A2C and E1N were bad predicted but their oleuropein contents were high (respectively 17.13 and 17.17%) which correspond to the high part of the calibration line. When the five samples (A2C, E1N, B2C, D1N, A1L12) were not in the prediction set, the SEP is equal to 0.73% with a R^2 to 0.88 which is satisfactory.

The developed PLS model can be considered satisfactory for rapid predictive oleuropein content in olive leaves.

4. Conclusion

Mid-infrared spectroscopy presents potential for a rapid quantification of oleuropein in olive leaves. MIR analysis could be an alternative to chromatographic analysis. This preliminary attempt is promising technique. The error of the assay is acceptable (<10%) for a rapid assessment of the oleuropein content of leaves.

Acknowledgments

Fathia AOUIDI is thankful to the Tunisian Ministry of Scientific Research, Technology and Competences Development for grant. We also thank Dr. Ali BEN DIAH from Olive Institute for technical assistance in sample collection.

References

- Andreadou, I., Iliodromitis, E.K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, D.T., 2006. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.* 136, 2213–2219.
- Andrikopoulos, N.K., Antonopoulou, S., Kalliora, A.C., 2002. Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35, 479–484.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. *Food Chem.* 68 (4), 457–462.
- Beullens, K., Kirsanov, D., Irudayaraj, J., Rudnitskaya, A., Legin, A., Nicolaï, B., 2006. The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sens. Actuators B* 116, 107–115.
- Bouaziz, M., Sayadi, S., 2003. High yield extraction of oleuropein from chemlali olives and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols Actual.* 23, 11–15.
- Bouaziz, M., Sayadi, S., 2005. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 497–504.
- Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J.M., Renard, C.M.G.C., 2009. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chem.* 115, 1133–1140.
- Dupuy, N., Le-Dréau, Y., Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Kister, J., 2005. Origin of French virgin olive oil RDOs predicted by chemometric analysis of excitation–emission fluorescence spectra. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9361–9368.
- Fuller, M.P., Griffiths, P.R., 1978. Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry. *Anal. Chem.* 50, 1906–1910.
- Galtier, O., Le Dréau, Y., Ollivier, D., Kister, J., Artaud, J., Dupuy, N., 2008. Lipid compositions and French registered designations of origins of virgin olive oils predicted by chemometric analysis of mid-infrared spectra. *Appl. Spectrosc.* 62 (5), 583–590.
- Galtier, O., Abbas, O., Le Dréau, Y., Rebufa, C., Kister, J., Artaud, J., Dupuy, N., 2011. Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. *Vib. Spectrosc.* 55 (1), 132–140.
- Haaland, D.M., Thomas, E.V., 1988. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* 60, 1193–1202.
- Hamdi, K.H., Castellon, R., 2005. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 769–778.
- Irudayaraj, J., Tewari, J., 2003. Simultaneous monitoring of organic acids and sugars in fresh and processed apple juice by Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 57, 1599–1604.
- Jàpon-Lujan, R., Luque-Rodríguez, J.M., de Castro, M.D.L., 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A* 1108 (1), 76–82.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 176, 88–98.
- Käuper, P., Ferri, D., 2004. From production to product: part 2, FT-IR spectroscopy as a tool for quality control in the preparation of alkaline solutions of bagasse lignin. *Ind. Crops Prod.* 20 (2), 159–167.
- Kelley, M.S., Wooden, D.H., 2009. The composition of dust in Jupiter-family comets inferred from infrared spectroscopy. *Planet. Space Sci.* 57 (10), 1133–1145.
- Malik, N.S.A., Bradford, J.M., 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Sci. Hort.* 110 (3), 274–278.
- Manthey, J.A., 2006. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the poly-methoxylated flavone content of orange oil residues. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3215–3218.
- Martens, H., Naes, T., 1989. *Multivariate Calibration*. John Wiley, Chichester, UK.
- Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Mas, V., Pérez, L., Estepa, A., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.* 66, 129–136.
- Omar, S.H., 2010. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.* 18, 111–121.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Polzonetti, V., Egidio, D., Vita, A., Vincenzetti, S., Natalini, P., 2004. Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem.* 88, 11–15.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54 (2), 434–440.
- Reeves III, J.B., Smith, D.B., 2009. The potential of mid- and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy for determining major- and trace-element concentrations in soils from a geochemical survey of North America. *Appl. Geochem.* 24 (8), 1472–1481.
- Savourin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., Balansard, G., 2001. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 49, 618–621.
- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I., Casiraghi, E., 2008. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 50 (1), 31–36.
- Udén, P., 2009. Estimating residual starch from in vitro fermentations by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152 (1–2), 133–140.
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C., 1998. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62, 541–546.
- Wu, Y.W., Sun, S.Q., Zhou, Q., Leung, H.W., 2008. Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (3), 498–504.

Chapitre 2: Incorporation des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées

Les propriétés thérapeutiques des feuilles d'olivier sont largement étudiées dans la littérature. Les constituants des feuilles d'olivier, notamment les composés phénoliques, possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes (activité antioxydante, antimicrobienne, antiviral...) qui procurent à ce matériel végétal ces vertus bénéfiques pour la santé humaine. C'est ainsi que les feuilles d'olivier et leurs dérivées (extraits, gélules, tisane, poudre ou feuilles sèches entières) sont considérées comme des produits nutraceutiques et les producteurs en vendent leurs vertus pour la santé humaine.

L'incorporation des feuilles d'olivier dans un aliment peut se révéler comme une voie prometteuse pour la valorisation de ce sous-produit agricole dans le domaine agroalimentaire. Une telle application puise sa force dans le fait de développer « un aliment fonctionnel », qui représente une image de marque. Outre ce rôle « commercial », les feuilles d'olivier se présentent comme un sérieux candidat pour la préservation des produits auxquels elles sont ajoutées, due à leurs propriétés techno-fonctionnelles (tel que l'activité antimicrobienne et antioxydante). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés, dans ce chapitre de la thèse, à la proposition des feuilles d'olivier comme additif alimentaire. La viande bovine hachée a été utilisée comme modèle alimentaire. Nous avons étudié l'effet de l'incorporation des feuilles d'olivier (sous forme de poudre et/ou d'extrait) sur la préservation contre les pathogènes, sur la date limite de conservation, sur la stabilité oxydative, sur les critères sensoriels et sur les propriétés technologiques des viandes bovine hachées crues et cuites.

1. Préparation de poudre et d'extrait des feuilles d'olivier

Des feuilles d'olivier, de variété *chemlali*, ont été déshydratées sous microonde pendant 2 min à 800 W. Les feuilles sèches ont été broyées. La poudre obtenue sera utilisée dans la suite des travaux, comme additif alimentaire mais aussi pour la préparation d'extrait. L'extraction a été réalisée par macération de la poudre des feuilles d'olivier dans le solvant méthanol/eau 80% sous agitation pendant 24h. Après séparation des débris par centrifugation et après évaporation du solvant par Rota-vapeur, le résidu obtenu représente l'extrait qui sera utilisée dans la suite des travaux. Le rendement obtenu d'extraction est en moyen 80%, en termes de masse d'extrait par rapport à la masse de poudre des feuilles d'olivier.

Une analyse chromatographique, par HPLC, a été effectuée afin d'étudier la composition phénolique dans l'extrait des feuilles d'olivier.

Le chromatogramme HPLC (Fig. 21) montre plusieurs pics correspondants à des composés phénoliques. Six composés phénoliques ont été identifiés dans ce présent travail. Les résultats quantitatifs des 6 composés identifiés (Tableau 24) montrent que l'oleuropéine est le composé majoritaire, avec un pourcentage d'abondance de 64%, parmi les composés phénoliques dans l'extrait des feuilles d'olivier. Ce résultat appui ceux des travaux précédant de Benavente-Garcia et al. (2000) et Altiok et al. (2008).

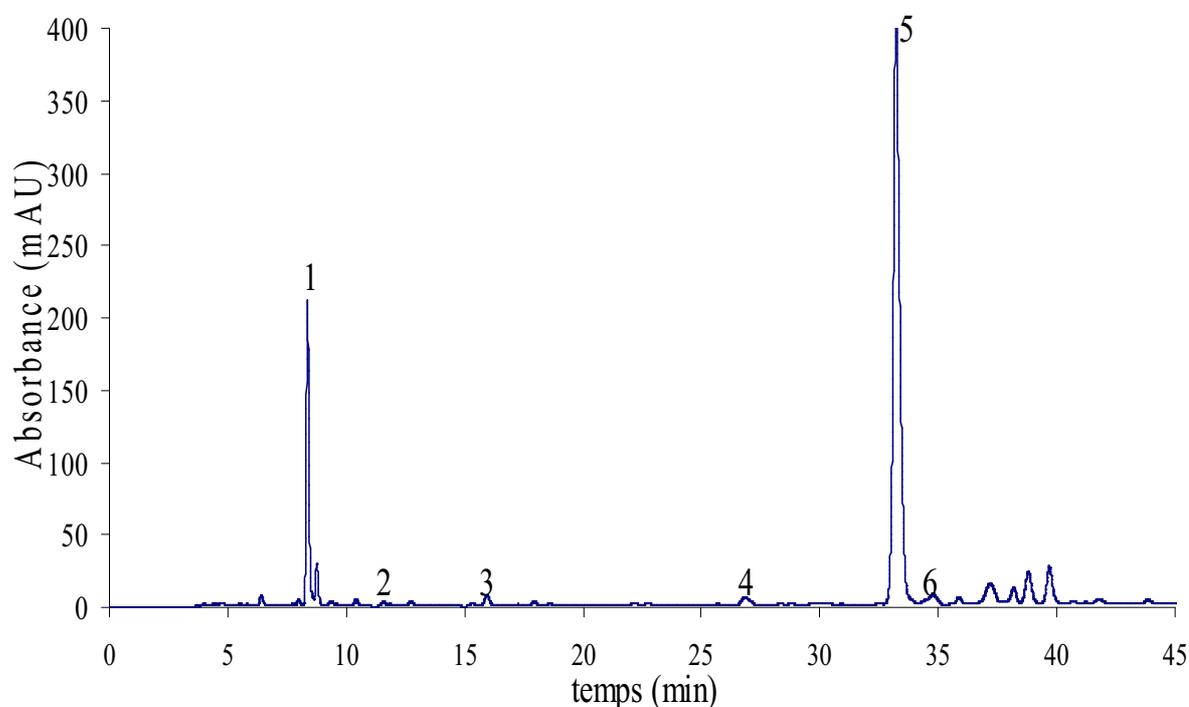


Fig. 21. Chromatogramme HPLC d'un extrait des feuilles d'olivier. Détection à 280 nm. Identification des pics : (1) Hydroxytyrosol ; (2) (+)-Catéchine ; (3) Acide caféique ; (4) Verbascoside ; (5) Oleuropéine ; (6) Rutine.

En plus de l'oleuropéine dans l'extrait des feuilles d'olivier, nous avons identifié d'autres composés phénoliques qui appartiennent aux classes suivantes :

- Classe des flavonoïdes : (+)-Catéchine, Verbascoside, Rutine.
- Classe des acides phénoliques : Acide caféïque.
- Classe des alcools phénoliques : Hydroxytyrosol.

Les structures chimiques des 6 composés identifiés sont présentées dans la Fig. 22.

Tableau 24. Caractéristiques qualitatives et quantitatives des 6 composés phénoliques identifiés, par HPLC, dans un extrait des feuilles d'olivier.

Pic n°	t _R (min)	Composé identifié	λ _{max}	Formule brute	Abondance (%)
1	8,3	Hydroxytyrosol	280	C ₈ H ₁₀ O ₃	13,89
2	11,5	(+)-Catéchine	230 ; 276	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	0,45
3	15,9	Acide Caféïque	218; 322	C ₉ H ₈ O ₄	0,91
4	26,8	Verbascoside	330	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1,33
5	33,2	Oleuropéine	280	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	64,67
6	34,7	Rutine	254; 356	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1,80

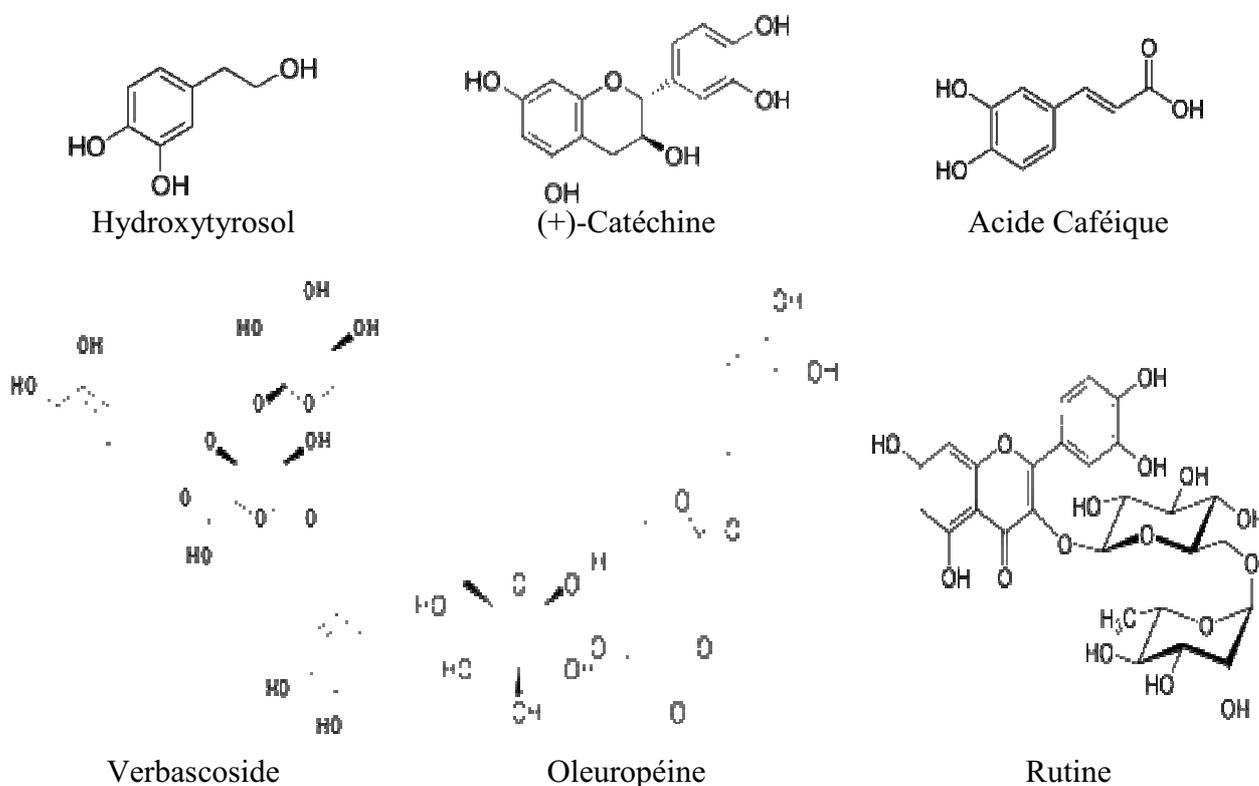


Fig. 22. Structure chimique des 6 composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier.

2. Effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la cinétique microbienne

L'effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la cinétique de croissance microbienne a été évalué pour 6 souches bactériennes cultivées dans des milieux synthétiques liquides. Deux souches lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*), deux souches pathogènes Gram+ (*Listeria monocytogène* et *Bacillus cereus*) et deux souches pathogènes Gram – (*Salmonella enterica sérovar zanzibar* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été testées. Les cultures microbiennes ont été effectuées dans des milieux broth supplémentés d'extrait des feuilles d'olivier à 3 concentrations différentes (50 µg, 250 µg ou 500 µg de phénol dans l'extrait / mL du milieu), avec un témoin sans extrait.

L'évolution des cellules viables, exprimées en Log UFC/mL, au cours du temps est représentée dans la Fig. 23.

Les résultats dans la Fig. 23 montrent que la cinétique microbienne des 6 souches testées a été affectée par la présence de l'extrait des feuilles d'olivier dans les milieux de culture. Une augmentation importante de l'UFC au cours de temps est observée en absence de l'extrait. Cependant, une inhibition de la croissance a été notée chez les 6 germes étudiés lorsque l'extrait est ajouté au milieu de culture. L'effet antimicrobien, observable sur l'allure de la croissance microbienne, augmente avec la concentration de l'extrait. D'après la Fig. 23, une diminution de l'UFC est notée durant les 2 premières heures d'incubation des 6 souches testées lors d'utilisation de l'extrait des feuilles d'olivier à une concentration de 500 µg de phénol dans l'extrait/mL du milieu. La diminution de l'UFC n'implique pas une absence de croissance mais plutôt une vitesse de croissance très faible par rapport à la vitesse de mortalité des cellules par effet bactéricide du l'extrait des feuilles d'olivier. L'effet antimicrobien du l'extrait des feuilles d'olivier reporté dans ce travail confirme les travaux précédents de Pereira et al. (2007), Sudjana et al. (2009) et Lee and Lee (2010) qui ont utilisé des tests *in vitro* appliqués sur une large gamme de microorganismes. Cependant, des ces travaux antérieurs, *Lactobacillus rhamnosus* et *Salmonella enterica zanzibar* n'ont pas été testé.

L'effet antimicrobien des feuilles d'olivier est du à sa composition phénolique, comme il a été reporté par Lee and Lee (2010). Ces auteurs ont trouvé aussi qu'un mélange de composés phénoliques des feuilles d'olivier possède une activité antimicrobienne plus importante que celles des composés phénoliques testés individuellement. Ils démontrent ainsi la présence d'effet antimicrobien synergique entre les composés phénoliques des feuilles d'olivier.

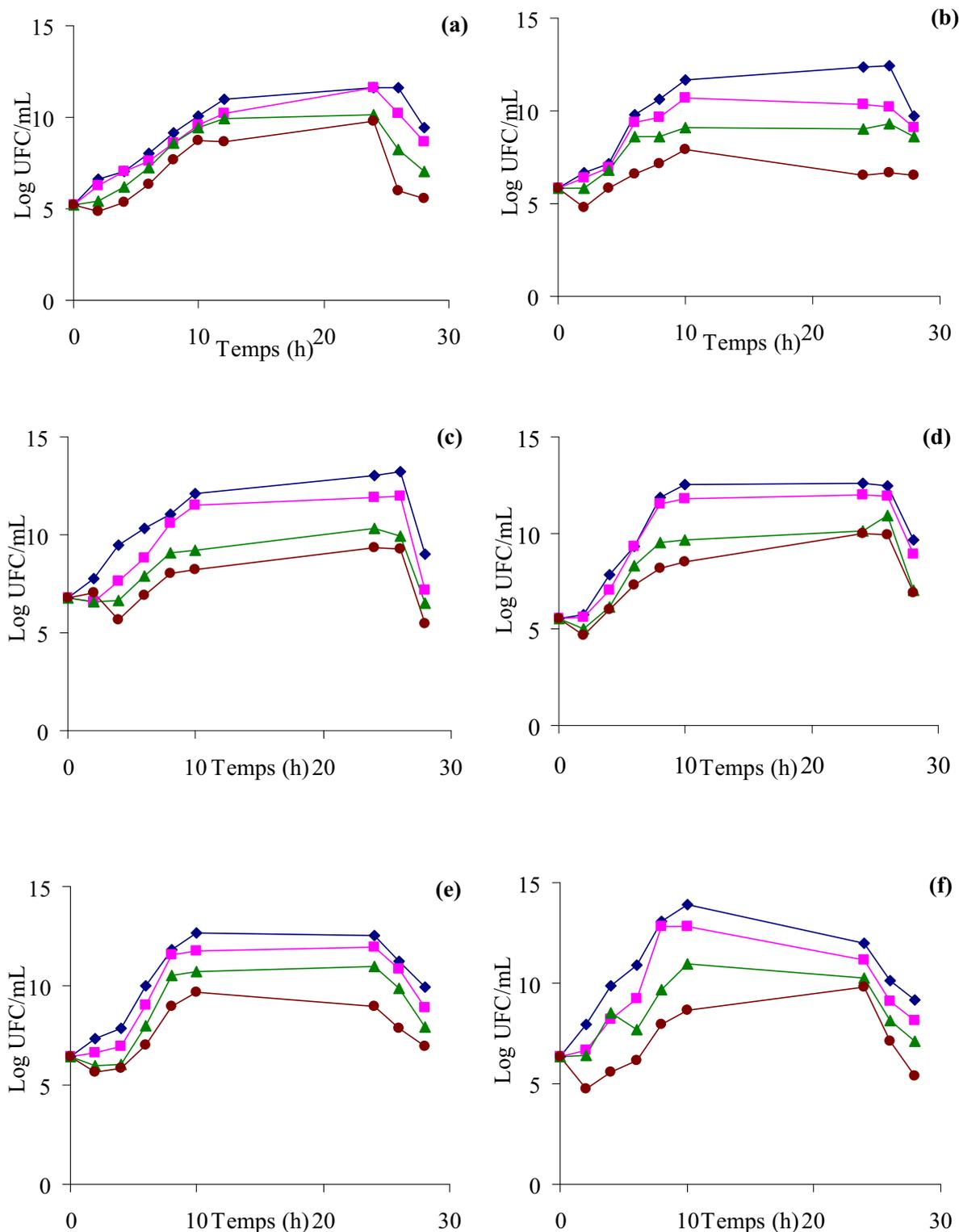


Fig. 23. Cinétique de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* (a) et *Lactobacillus plantarum* (b) dans MRS broth, de *Salmonella enterica zanzibar* (c) dans le bouillon sélénite cystéine, de *Listeria monocytogenes* (d), de *Bacillus Cereus* (e) et de *Pseudomonas Aeruginosa* (f) dans le bouillon nutritif en présence de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

Témoin : sans extrait (—◆—) ; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait / mL du milieu (—■—) ;

D2 : Dose 250 µg de phénol dans l'extrait / mL du milieu (—▲—) ; D3 : Dose 500 µg de phénol dans l'extrait / mL du milieu (—●—).

Indépendamment de la souche testée et de la dose utilisée, l'UFC augmente au cours de temps et son évolution suit l'allure de la cinétique dans les échantillons témoins sans extrait. Cependant, les rendements en biomasse et les vitesses de croissance ont été influencés par la présence de l'extrait des feuilles d'olivier (Tableau 25).

Au bout de 24 h d'incubation dans les milieux témoins (en absence d'extrait), la biomasse microbienne viable augmente par 6,42 ; 6,53 ; 6,25 ; 7,07 ; 6,05 et 5,63 unités logarithmiques pour *Lactobacillus rhamnosus* ; *Lactobacillus plantarum* ; *Salmonella enterica zanzibar* ; *Listeria monocytogène* ; *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. Cependant, une inhibition de la croissance s'observe en présence de l'extrait des feuilles d'olivier. Cette inhibition se manifeste au niveau de la diminution du rendement de biomasse viable. En effet, uniquement une élévation de l'UFC de 4,59 ; 0,68 ; 2,59 ; 4,45 ; 2,50 et 3,44 unités logarithmiques est obtenue, respectivement, pour *Lactobacillus rhamnosus* ; *Lactobacillus plantarum* ; *Salmonella enterica zanzibar* ; *Listeria monocytogène* ; *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* lorsque l'extrait des feuilles d'olivier est ajouté à une dose de 500 µg de phénol dans l'extrait/mL du milieu.

Selon les résultats du rendement de biomasse viable, la souche de *Lactobacillus plantarum* représente la souche la plus sensible à l'extrait des feuilles d'olivier, parmi les souches étudiées. En faite, l'UFC augmente de 6,53 ; 4,53 ; 3,15 et uniquement de 0,68 unités logarithmiques en présence de l'extrait aux doses respectives 0, 50, 250 et 500 µg de phénol dans l'extrait/mL du milieu, après 24 h d'incubation. Les valeurs de la dose de réduction décimale D_{10} (Fig. 24) confirment ce résultat. En faite, la souche de *Lactobacillus plantarum* possède une valeur de D_{10} de 85 µg de phénol dans l'extrait/mL du milieu. Cette valeur est la plus faible par rapport à celles des autres souches. Par la valeur de D_{10} , le classement des 6 souches par ordre décroissante de sensibilité à l'extrait des feuilles d'olivier sera le suivant : *Lactobacillus plantarum* ($D_{10} = 85 \mu\text{g/mL}$) > *Listeria monocytogène* ($D_{10} = 101 \mu\text{g/mL}$) > *Salmonella enterica zanzibar* ($D_{10} = 144 \mu\text{g/mL}$) > *Bacillus cereus* ($D_{10} = 147 \mu\text{g/mL}$) > *Lactobacillus rhamnosus* ($D_{10} = 158 \mu\text{g/mL}$) > *Pseudomonas aeruginosa* ($D_{10} = 161 \mu\text{g/mL}$). Dans ce cadre, Pereira et al. (2007) ont montré que *Bacillus cereus* (avec $IC_{25} = 0,63 \text{ mg extract/mL}$) est plus sensible à l'extrait des feuilles d'olivier que *Pseudomonas aeruginosa* (avec $IC_{25} = 3,22 \text{ mg extract/mL}$). Sudjana et al. (2009) ont aussi trouvé que *Bacillus cereus* (avec $MIC = 12,5 \% \text{ v/v}$) est plus sensible à l'extrait des feuilles d'olivier que *Pseudomonas aeruginosa* (avec $MIC = 25-50 \% \text{ v/v}$) et *Listeria monocytogène* (avec $MIC = 25 \% \text{ v/v}$). Ces travaux sont en accordance avec nos résultats.

L'effet de l'extrait des feuilles d'olivier sur la vitesse maximale de croissance diffère selon la souche testée. Une diminution remarquable de μ_{\max} est observée à partir de la dose 50 μg de phénol dans l'extrait/mL du milieu, pour *Lactobacillus plantarum* la souche la plus sensible à l'extrait des feuilles d'olivier. Les doses 50 et 250 μg de phénol dans l'extrait/mL du milieu n'affectent pas μ_{\max} de *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'effet réducteur apparaît lorsque l'extrait est ajouté à la dose 500 μg de phénol dans l'extrait/mL du milieu. Par ailleurs, l'extrait des feuilles d'olivier augmente μ_{\max} de *Salmonella enterica zanzibar*, indépendamment de la dose ajoutée. Pour cette souche, la vitesse maximale de croissance est de 0,44 h^{-1} pour le témoin, alors qu'elle est de l'ordre de 0,60 h^{-1} en présence de l'extrait.

Tableau 25. Biomasses produites et vitesses maximales de croissance de 6 souches bactériennes en milieux synthétiques liquides supplémentés par d'extrait des feuilles d'olivier à différentes concentrations

Souches bactériennes	Gram	$\Delta \text{Log UFC/mL}$				$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$			
		T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	6,42	6,37	4,92	4,59	0,51	0,50	0,55	0,59
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	6,53	4,53	3,15	0,68	0,72	0,58	0,33	0,33
<i>Salmonella enterica zanzibar</i>	-	6,25	5,16	3,59	2,59	0,44	0,67	0,60	0,60
<i>Listeria monocytogène</i>	+	7,07	6,45	4,55	4,45	1,00	1,11	0,84	0,54
<i>Bacillus cereus</i>	+	6,05	5,50	4,50	2,50	0,81	0,84	0,83	0,67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	5,63	4,77	3,90	3,44	0,80	0,86	0,80	0,54

$\Delta \text{Log UFC} = \text{Log UFC}_{(\text{après } 24\text{h})} - \text{Log UFC}_{(\text{initial})}$; μ_{\max} : vitesse maximale de croissance; T : Témoin sans extrait; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /mL du milieu; D2 : Dose 250 μg de phénol dans l'extrait / mL du milieu; D3 : Dose 500 μg de phénol dans l'extrait / mL du milieu.

Considérant le grand nombre de différents groupes chimiques des composés présents dans la l'extrait des feuilles d'olivier, il est plus probablement que leur activité antibactérienne n'est pas attribuée à un seul mécanisme spécifique mais il y a plusieurs cibles dans la cellule (Carson et al., 2002).

L'activité antimicrobienne est justifiée par plusieurs phénomènes et par plusieurs chercheurs.

Parmi les mécanismes, nous pouvons citer :

- Dégradation de la paroi cellulaire (Helander et al., 1998);
- Altération de la membrane cytoplasmique (Sikkema et al., 1994 ; Oosterhaven et al., 1995 ; Ultee et al., 2002) ;
- Détérioration des protéines membranaire (Juven et al., 1994 ; Ultee et al., 1999) ;

- Fuite du contenu de la cellule (Oosterhaven et al., 1995 ; Helander et al., 1998 ; Lambert et al., 2001) ;
- Coagulation du cytoplasme (Gustafson et al., 1998) ;
- Epuisement de la force proton motrice (Ultee et al., 1999).

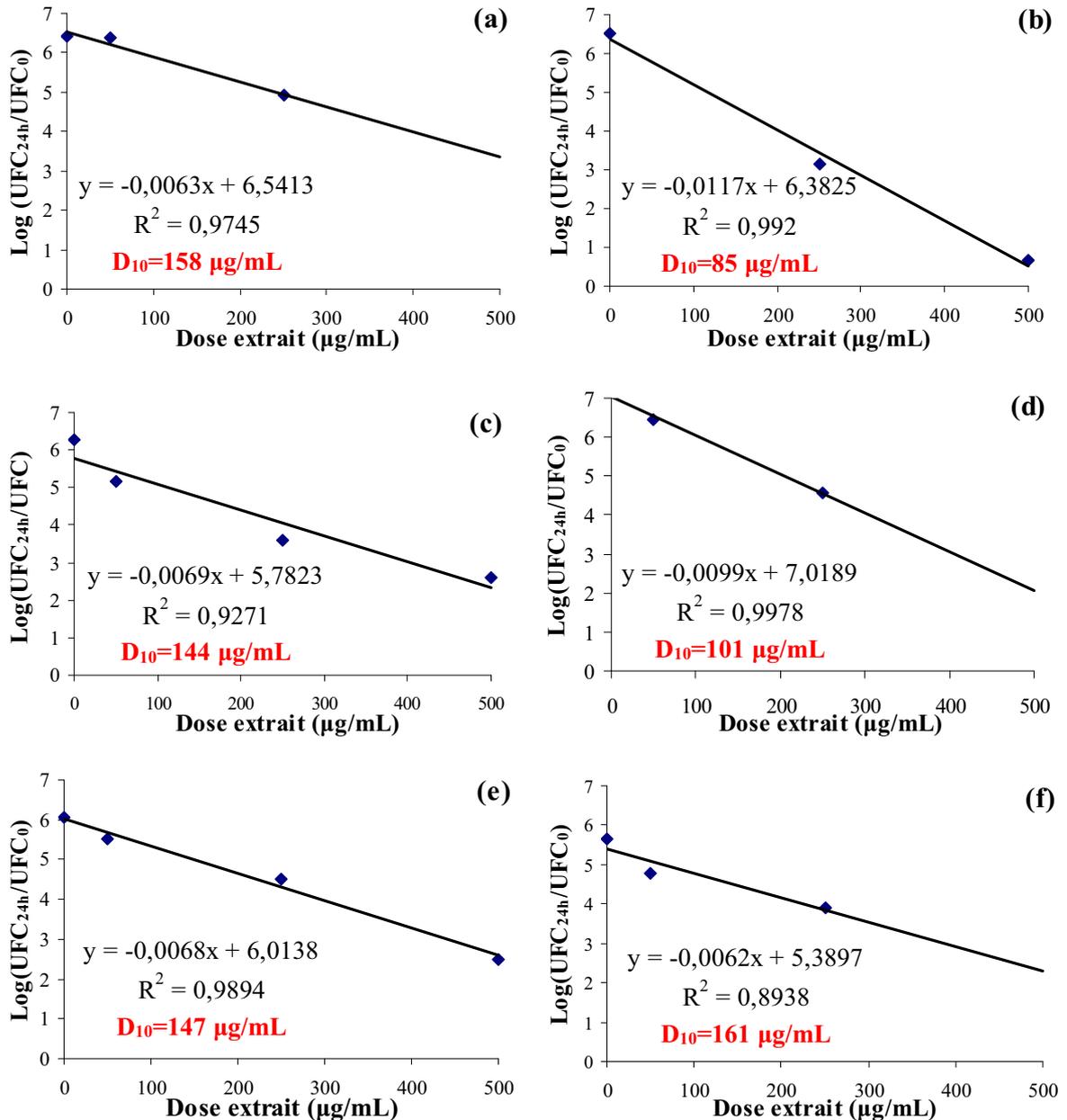


Fig. 24. Courbes de survies de 6 souches bactériennes (*Lactobacillus rhamnosus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b), *Salmonella enterica zanzibar* (c), *Listeria monocytogenes* (d), *Bacillus cereus* (e) et *Pseudomonas aeruginosa* (f) en fonction de la concentration de l'extrait des feuilles d'olivier ; Détermination de la dose de réduction décimale D_{10} .

3. Effet de l'extrait des feuilles d'olivier sur la survie des pathogènes dans les viandes hachées

L'objectif de cette partie consiste à étudier l'effet antimicrobien de l'extrait des feuilles d'olivier dans une matrice alimentaire : la viande bovine hachée. Des viandes bovines hachées, inoculées artificiellement par des souches pathogènes (*Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ou *Pseudomonas aeruginosa*) et supplémentées d'extrait des feuilles d'olivier (à raison de 0, 50, 250 et 500 µg de phénol dans l'extrait/g de viande), ont été conservées à 4°C pendant 12 jours.

La Fig. 25 représente l'évolution du nombre des cellules viables des 4 souches pathogènes, exprimé en Log UFC/g, au cours de la conservation des viandes bovines hachées crues.

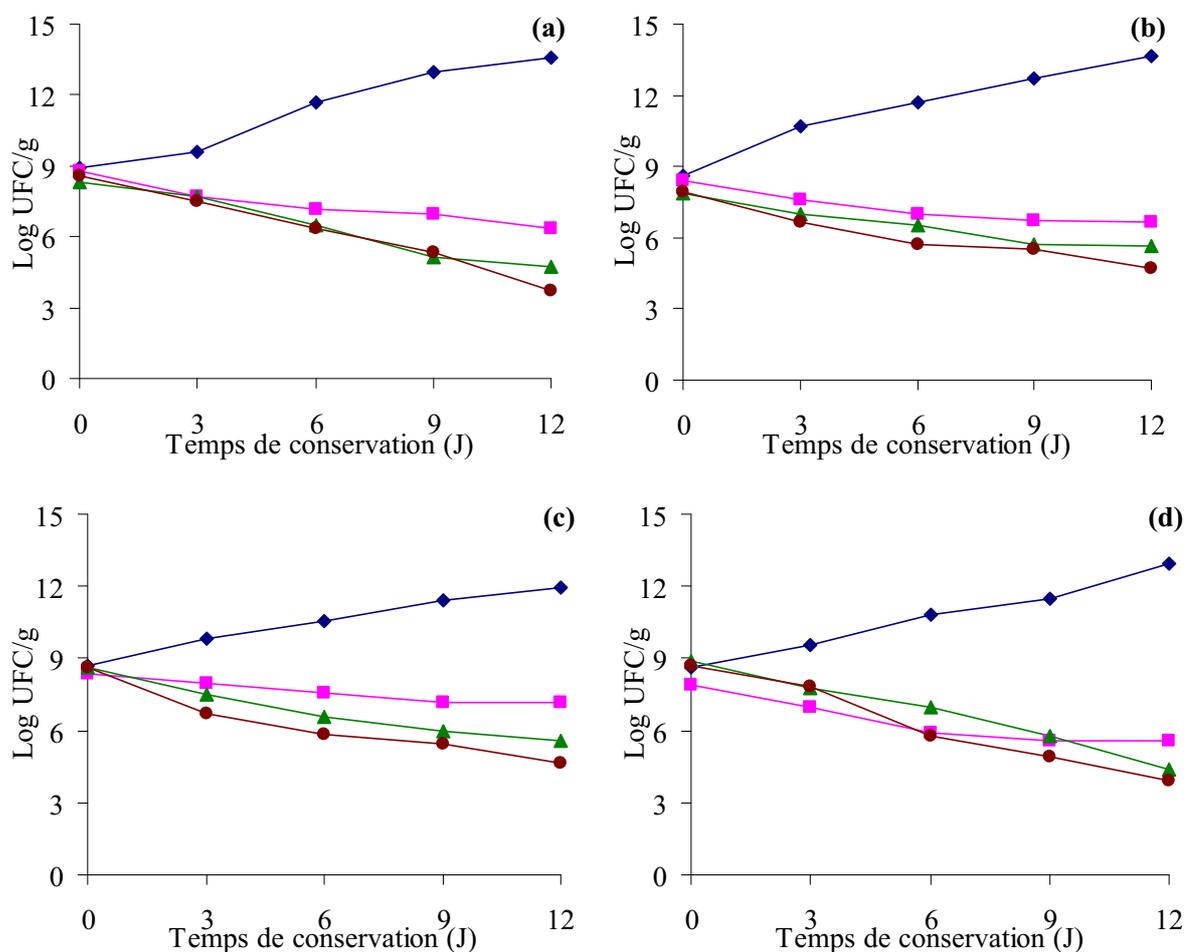


Fig. 25. Cinétique du survivants de *Salmonella enterica zanzibar* (a), *Listéria monocytogenes* (b), *Bacillus cereus* (c) et *Pseudomonas aeruginosa* (d) dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C

Témoin : sans extrait (◆); D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande (■);
D2 : Dose 250 µg de phénol dans l'extrait /g de viande (▲); D3 : Dose 500 µg de phénol dans l'extrait /g de viande (●).

En absence de l'extrait des feuilles d'olivier, l'UFC augmente au cour de temps. Une élévation de l'ordre de 4,6 ; 5 ; 3,2 et 4,3 unités logarithmiques est obtenue, respectivement, pour *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* après 12 jours de conservation des viandes bovines hachées à 4°C. Un effet bactéricide du l'extrait des feuilles d'olivier sur les 4 souches pathogènes est remarqué dans la Fig. 25. En faite, l'UFC diminue au cours du temps de conservation. Au bout des 12 jours, un abaissement de l'ordre de 4,8 ; 3,27 ; 3,94 et 4,71 est noté respectivement, pour *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* lorsque l'extrait des feuilles d'olivier est supplémenté à raison de 500 µg de phénol dans l'extrait/g de viande.

Enormément du travaux scientifiques ont traité l'application d'extrait des plantes et des épices pour le control des pathogènes dans les viandes hachées crues. A titre d'exemple, Hayouni et al. (2008) ont démontré l'effet antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Schinus molle* contre *Salmonella anatum* et *Salmonella enteriditis*. Ils ont noté un effet bacteriostatique à des doses inférieurs à 0,1%. Un effet bactériocide remarquable à partir de 3 jours de conservation à 4°C a été observé pour des doses supérieurs à 1%.

D'après Tableau 26, *Bacillus cereus* est la souche qui a résisté le plus à une dose de 50 µg de phénol dans l'extrait des feuilles d'olivier/g de viande, parmi les 4 pathogènes testés. En faite, le temps de réduction décimale (T₁₀) de cette souche est 7,50 jours, alors que ceux de *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa* sont, respectivement, 5,36 ; 4,16 ; et 3,00 jours. L'utilisation du l'extrait des feuilles d'olivier à une dose de 500 µg de phénol dans l'extrait /g de viande a abaissé le temps de réduction décimale des 4 souches pathogènes à environ 2 jours.

Tableau 26. Temps de réduction décimale T₁₀ (jours) de *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C

Souches bactériennes	D1	D2	D3
<i>Salmonella enterica zanzibar</i>	5,36	3,11	2,53
<i>Listeria monocytogène</i>	4,16	4,29	2,69
<i>Bacillus cereus</i>	7,50	3,89	2,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,00	2,75	2,43

D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 250 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 500 µg de phénol dans l'extrait /g de viande,

Nous remarquons que, pour les mêmes concentrations utilisées, l'effet antimicrobien du l'extrait des feuilles d'olivier est plus prononcé dans les viandes bovines hachées que dans les milieux synthétiques liquides. Contrairement à ce qui a été observé, Piskernik et al. (2011) trouvent que l'effet antimicrobien du l'extrait du romarin contre *Campylobacter jejuni* est 4 fois plus important dans le milieu de culture du laboratoire que dans un jus de viande. Burt (2004) aussi a reporté que plusieurs extraits de plantes et huiles essentielles sont plus efficaces, concernant leur activité antimicrobienne, lorsqu'ils sont testés *in vitro* que dans une matrice alimentaire.

L'effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la thermorésistance microbienne dans la viande bovine hachée a été évalué. Un traitement thermique à 100°C pendant 30 min a été effectué pour des viandes bovines hachées inoculées artificiellement par *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, en présence du l'extrait des feuilles d'olivier à différentes doses (0, 50, 250 et 500 µg de phénol dans l'extrait /g de viande).

La Fig. 26 représente l'UFC des 4 souches pathogènes avant et après traitement thermique, en absence et en présence du l'extrait des feuilles d'olivier.

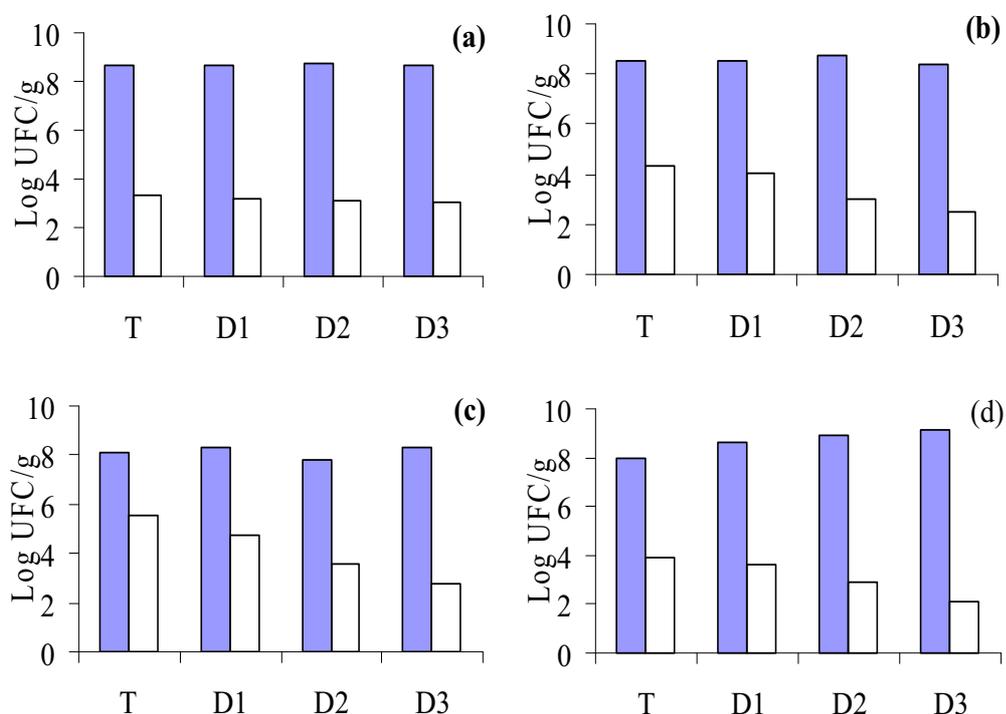


Fig. 26. Effet de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier sur la thermorésistance de *Salmonella enterica zanzibar* (a), *Listéria monocytogenes* (b), *Bacillus cereus* (c) et *Pseudomonas aeruginosa* (d) dans la viande bovine hachée

Log UFC/g sans traitement thermique (■) ; Log UFC/g après traitement thermique à 100°C pendant 30 min (□).
 T : Témoin sans extrait ; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 250 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ;
 D3 : Dose 500 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

D'après Fig. 26, le traitement thermique abaisse le nombre des cellules viables, exprimé en Log UFC/g. Cette diminution de l'UFC devient plus prononcée lorsque l'extrait des feuilles d'olivier est supplémenté à la viande bovine hachée. Ceci s'explique par une diminution de la thermorésistance microbienne par effet d'extrait des feuilles d'olivier. Ce résultat s'observe pour *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, la thermorésistance de *Salmonella enterica zanzibar* a été faiblement affectée par la présence de l'extrait des feuilles d'olivier. Les valeurs de temps de réduction décimale T_{10} par effet du traitement thermique (Tableau 27) montrent que *Bacillus cereus* est la souche la plus thermorésistante et que *Salmonella enterica zanzibar* est la souche la moins thermorésistante, parmi les 4 souches étudiées. Les valeurs de T_{10} , en absence d'extrait des feuilles d'olivier, sont 5,6 ; 7,09 ; 11,83 et 7,44 min respectivement pour *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le temps de réduction décimale T_{10} diminue lorsque la dose de l'extrait des feuilles d'olivier augmente. L'effet le plus important de l'extrait sur la thermorésistance microbienne est noté chez *Bacillus cereus*, dont les valeurs de T_{10} sont 11,83 ; 8,34 ; 7,06 et 5,39 min respectivement pour les doses 0, 50, 250 et 500 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

Nos résultats montrent l'effet synergique entre l'extrait des feuilles d'olivier et le traitement thermique pour le contrôle des germes pathogènes dans la viande bovine hachée. Dans le même cadre, Ogihara et al. (2009) montre l'effet synergique de certains additifs alimentaires et du traitement à haute pression hydrostatique pour l'inactivation de *Salmonella enteritidis*. D'après Mahour et al. (2003), l'utilisation du thym, romarin et jus du citron comme un traitement de marinade avant l'irradiation présente un effet additif dans la réduction de la croissance bactérienne durant le stockage de la viande du poulet fraîche sous réfrigération et ce traitement est capable de réduire la dose d'irradiation nécessaire pour l'élimination complète de *Salmonella*.

Tableau 27. Temps de réduction décimale T_{10} (min) de *Salmonella enterica zanzibar*, *Listéria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans la viande bovine hachée supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et soumis à un traitement thermique à 100°C pendant 30 min

Souches bactériennes	T	D1	D2	D3
<i>Salmonella enterica zanzibar</i>	5,60	5,52	5,33	5,27
<i>Listeria monocytogène</i>	7,09	6,66	5,23	5,07
<i>Bacillus cereus</i>	11,83	8,34	7,06	5,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,44	6,02	4,99	4,24

T : Témoin sans extrait ; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 250 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 500 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

4. Effet du l'extrait des feuilles d'olivier sur la stabilité microbiologique des viandes bovines hachées durant la conservation

4.1. Suivi microbiologique des viandes bovines hachées au cours de leur conservation réfrigérée

Un suivi microbiologique a été effectué dans l'objectif d'évaluer l'effet du l'extrait des feuilles d'olivier, supplémenté à différentes doses (50, 100 et 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande), sur la qualité microbiologique des viandes bovines hachées au cours de leur conservation à 4°C. Les flores dénombrées sont la flore mésophile aérobie totale (**FMAT**) et la flore des coliformes totaux (**CT**). Les résultats (Fig. 27) montrent des valeurs d'UFC faibles lorsque l'extrait des feuilles d'olivier est incorporé dans les viandes bovines hachées, en comparaison par rapport au témoin sans extrait. Ainsi, il est possible de suggérer que l'extrait des feuilles d'olivier permet la préservation de la qualité microbiologique des viandes bovines hachées crues, matrice alimentaire particulièrement sensible aux altérations microbiennes, au cours de leur conservation réfrigérée.

En accordance avec nos résultats, Hayes et al. (2010) montrent aussi l'effet antimicrobien du l'extrait des feuilles d'olivier contre la flore microbienne totale des viandes bovines hachées emballées en condition aérobie ou en atmosphère modifié et conservées à 4°C. Par ailleurs, Botsoglou et al. (2010) ont prouvé que l'addition d'extrait des feuilles d'olivier à l'alimentation des dindes aboutie à une amélioration de la qualité microbiologique des viandes issues.

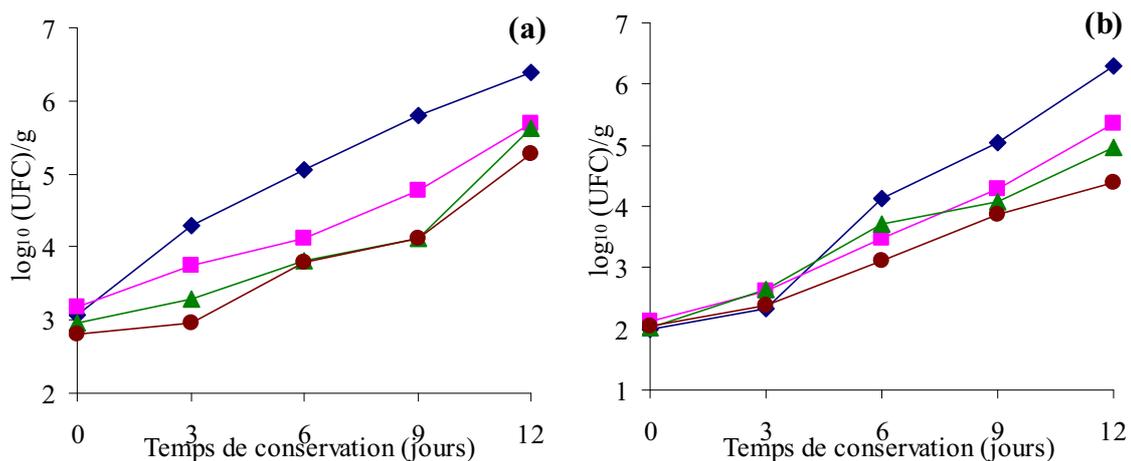


Fig. 27. Evolution du nombre de la flore mésophile aérobie totale **FMAT** (a) et des coliformes totaux **CT** (b), exprimé en \log_{10} UFC/g, dans la viande bovine hachée crue supplémentée de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier et conservée à 4°C

T : Témoin sans extrait (—◆—); D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande (—■—);
D2 : Dose 100 μg de phénol dans l'extrait /g de viande (—▲—); D3 : Dose 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande (—●—).

4.2. Estimation de la Date Limite de la Conservation (DLC) des viandes bovines hachées par la méthode du vieillissement accéléré

Dans cette partie de la thèse, l'effet de l'incorporation de l'extrait des feuilles d'olivier, à 3 doses différentes (50, 100 et 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande), sur la DLC des viandes bovines hachées a été évalué.

La DLC a été estimée en appliquant la méthode du vieillissement accéléré. Les nombres de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et des coliformes totaux (CT) ont été utilisés comme critère de l'altération de la qualité microbiologique des viandes bovines hachées. La méthode du vieillissement accéléré consiste à une provocation d'une altération poussée du produit en ayant recours à des températures élevées. Dans notre travail, les échantillons des viandes bovines hachées ont été conservés à 4°C, 30°C et 37°C pendant 12 jours.

Le modèle d'Arrhenius a été appliqué pour décrire la cinétique de la multiplication microbienne des FMAT et CT dans les viandes bovines hachées bovines supplémentées ou non par d'extrait des feuilles d'olivier. L'équation générale d'Arrhenius s'écrit :

$$r = \frac{d[A]}{dt} = k \times [A]^n \quad (\text{Eq. 19})$$

Avec: r : vitesse de la réaction de dégradation, c'est également la vitesse de formation de A ;

A : facteur à suivre : dans notre cas : le Nombre de CT ou FAMT (en UFC /g) ;

k : vitesse spécifique de la réaction de détérioration exprimés en (jours⁻¹) ;

t : temps de la conservation (en jour) ;

n : ordre de la réaction.

L'intégration de cette équation donne deux types de fonction selon la valeur de n :

* Pour n=0, on a $(A - A_0) = k \times t$; (Eq. 20)

* Pour n=1, on a $\text{Ln}\left(\frac{A_0}{A}\right) = k \times t$; (Eq. 21)

Avec : A₀ représente le nombre initial de CT et FMAT (UFC/g) mesuré au temps initial (t=0) de la conservation.

4.2.1. Détermination de l'ordre et de la vitesse spécifique de la croissance microbienne

La détermination de l'ordre de la réaction d'altération microbiologique nécessite le traçage des représentations linéaires des nombres de FMAT et CT, exprimé en UFC/g et en Ln UFC/g, en fonction de la durée de conservation des échantillons des viandes bovines hachées (Fig. 28, 29, 30 et 31).

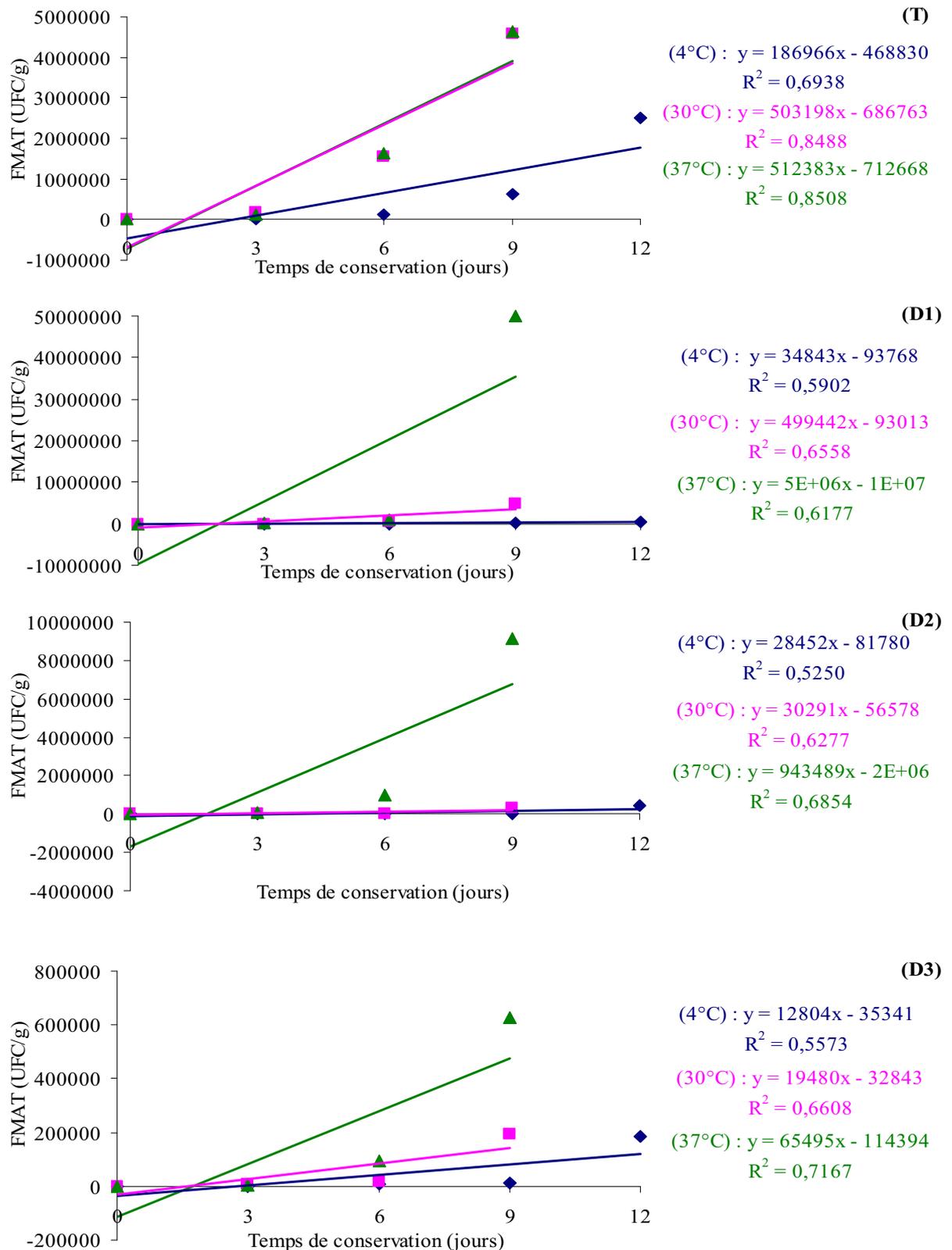


Fig. 28. Evolution du nombre de la **flore mésophile aérobie totale FMAT**, exprimé en **UFC/g**, au cours de la conservation, à 4°C (—◆—), 30°C (—■—) et 37°C (—▲—), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

T : Témoin sans extrait; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

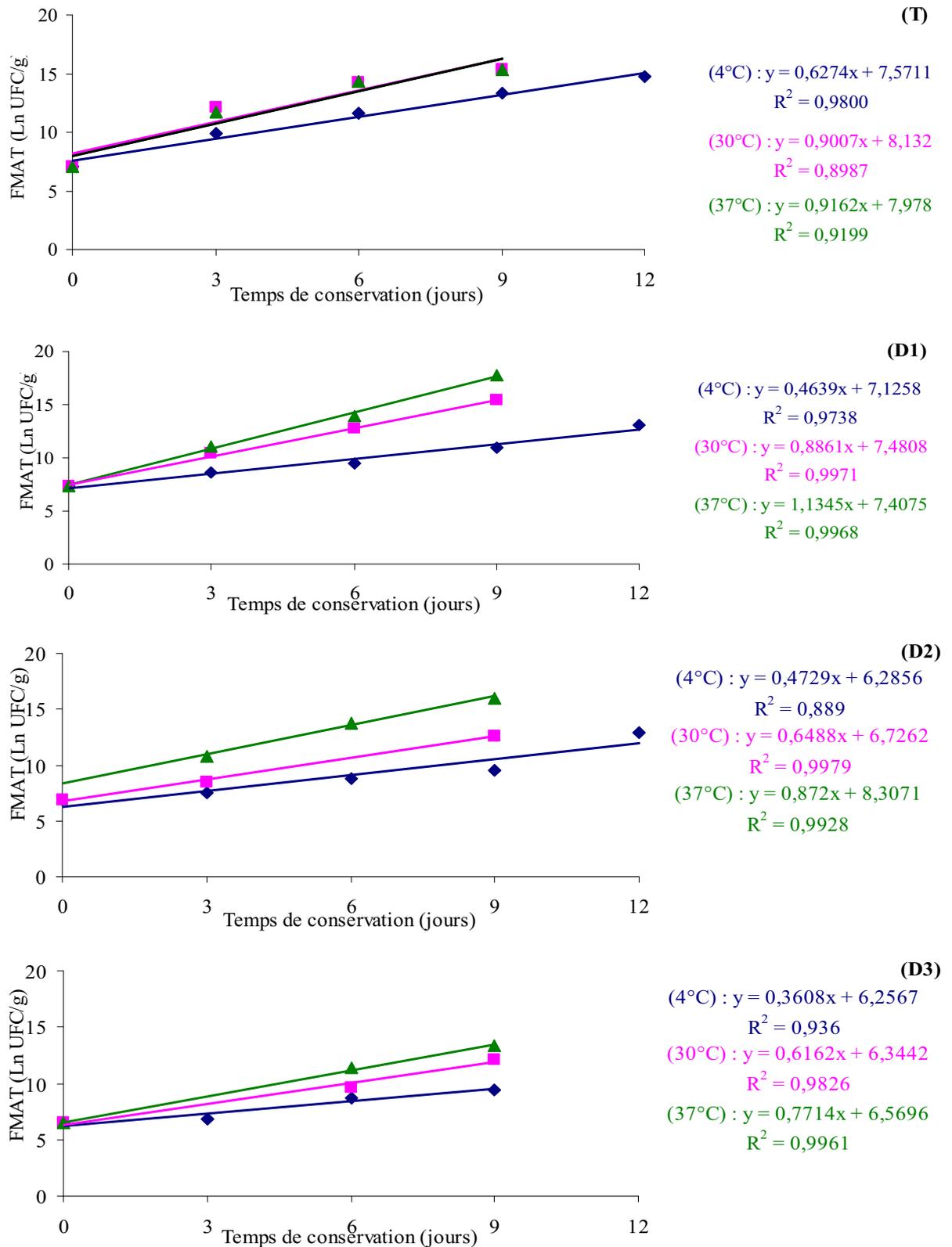


Fig. 29. Evolution du nombre de **la flore mésophile aérobie totale FMAT, exprimé en Ln UFC/g**, au cours de la conservation, à 4°C (◆), 30°C (■) et 37°C (▲), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

T : Témoin sans extrait; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

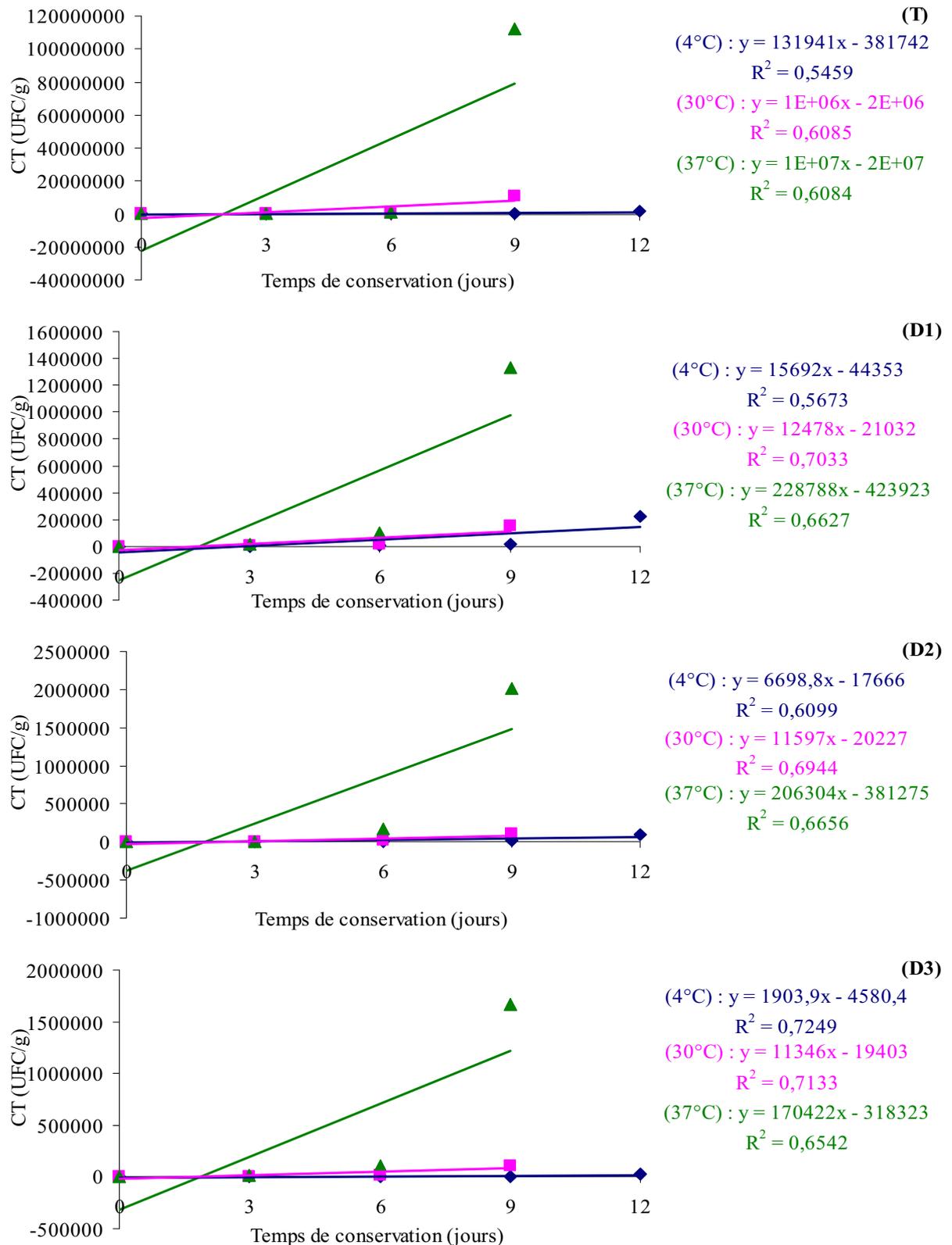


Fig. 30. Evolution du nombre des **coliformes totaux CT**, exprimé en **UFC/g**, au cours de la conservation, à 4°C (—◆—), 30°C (—■—) et 37°C (—▲—), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

T : Témoin sans extrait; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

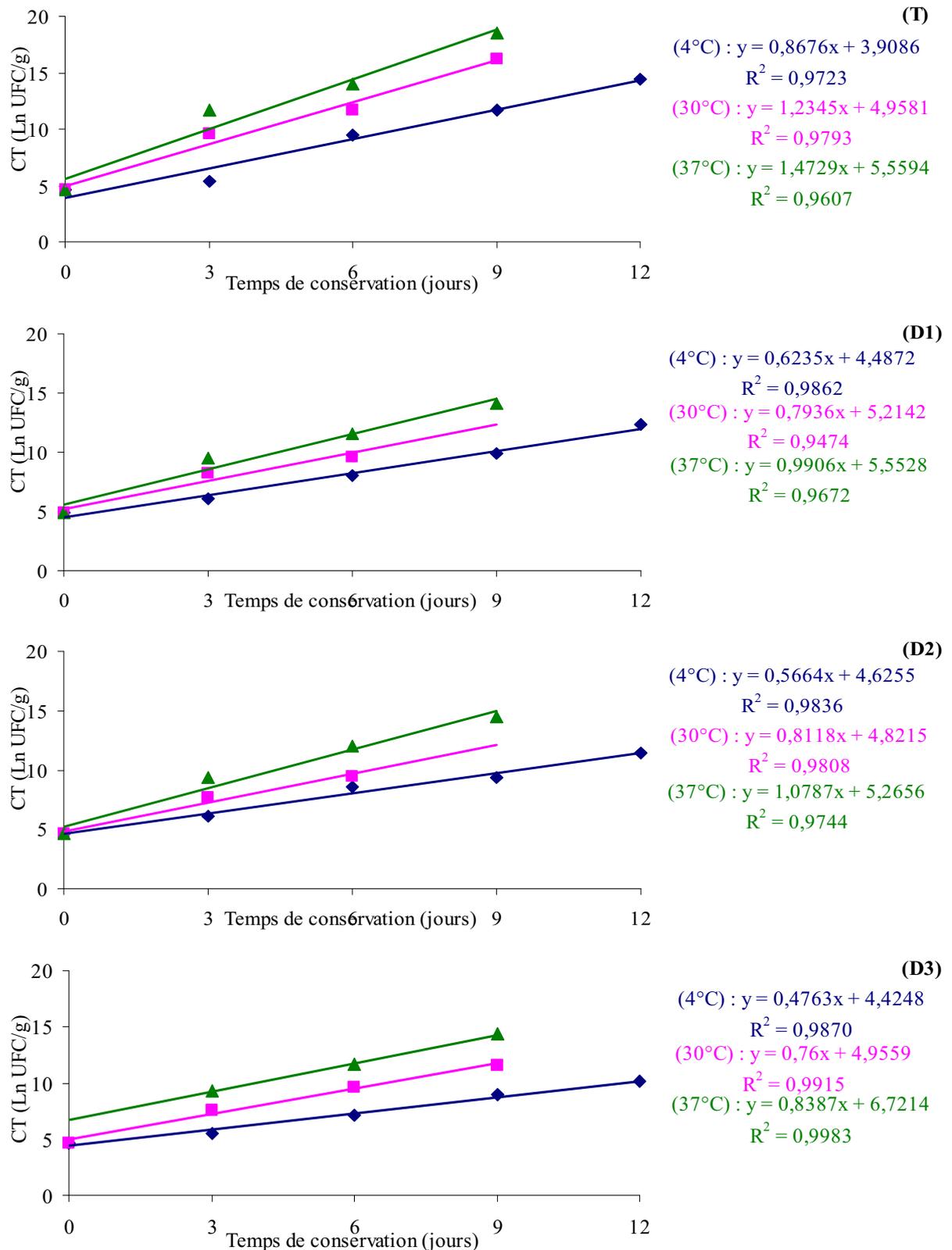


Fig. 31. Evolution du nombre de **coliformes totaux CT**, exprimé en **Ln UFC/g**, au cours de la conservation, à 4°C (—♦—), 30°C (—■—) et 37°C (—▲—), des viandes bovines hachées crues supplémentées de différentes doses d'extrait des feuilles d'olivier.

T : Témoin sans extrait; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

La valeur de n correspondant au graphique ($UFC = f(t)$ ou $\ln UFC = f(t)$) ayant le R^2 le plus proche de 1 sera l'ordre de la réaction d'altération microbiologique. D'après les équations 20 et 21, la pente de la régression linéaire de l'évolution de l'UFC au cours du temps représente la vitesse spécifique de la croissance microbienne (k), indépendamment de l'ordre n .

Les résultats des valeurs de k et R^2 , pour tous les essais et pour les 2 valeurs de n assimilées, sont regroupés dans le Tableau 28 pour le critère FMAT et dans Tableau 29 pour le critère CT. Les résultats montrent bien que la cinétique de croissance des deux germes FMAT et CT suit l'ordre 1. En fait, les valeurs de R^2 sont entre 0,87 et 0,99 pour FMAT et entre 0,94 et 0,99 pour CT lorsque l'ordre est assimilé à 1. Les régressions linéaires donnent des faibles valeurs de R^2 lors de l'assimilation de l'ordre à 0. Les valeurs de R^2 sont inférieures à 0,85 pour FMAT et à 0,72 pour CT. L'équation de l'altération microbiologique des viandes bovines hachées, en suivant l'ordre 1, s'écrit : $\ln(A) = \ln(A_0) - k \times t$ (Eq. 27)

Les valeurs de la vitesse spécifique k sont entre 0,36 et 1,13 jours⁻¹ pour FMAT et entre 0,47 et 1,47 jours⁻¹ pour CT. Indépendamment de la température, il est observable que la valeur de k diminue dans les viandes bovines hachées supplémentées de l'extrait des feuilles d'olivier, en comparaison par rapport au témoin sans extrait. Ce résultat montre que l'extrait des feuilles d'olivier diminue la vitesse spécifique de la multiplication microbienne de la FMAT et CT dans les viandes bovines hachées.

Tableau 28. Les vitesses spécifiques k et les coefficients de corrélation R^2 relative à la régression linéaire de l'évolution du nombre des **FMAT** (en $\ln UFC/g$) au cours de la conservation, à 4°C, 30°C et 37°C, des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Echantillon		4°C		30°C		37°C	
		k	R^2	k	R^2	k	R^2
Témoin	Ordre 0	18,69 10 ⁴	0,69	50,31 10 ⁴	0,84	51,23 10 ⁴	0,85
	Ordre 1	0,62	0,98	0,90	0,89	0,91	0,91
D1	Ordre 0	3,48 10 ⁴	0,59	49,94 10 ⁴	0,65	500 10 ⁴	0,61
	Ordre 1	0,46	0,97	0,88	0,99	1,13	0,99
D2	Ordre 0	2,84 10 ⁴	0,52	3,02 10 ⁴	0,62	94,34 10 ⁴	0,68
	Ordre 1	0,47	0,88	0,64	0,99	0,87	0,99
D3	Ordre 0	1,28 10 ⁴	0,55	1,94 10 ⁴	0,66	6,54 10 ⁴	0,71
	Ordre 1	0,36	0,93	0,61	0,98	0,77	0,99

Témoin : sans extrait ; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande,

Tableau 29. Les vitesses spécifiques k et les coefficients de corrélation R^2 relative à la régression linéaire de l'évolution du nombre des **CT** (en Ln UFC/g) au cours de la conservation, à 4°C, 30°C et 37°C, des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Echantillon		4°C		30°C		37°C	
		k	R^2	k	R^2	k	R^2
Témoin	Ordre 0	13,19 10 ⁴	0,54	100 10 ⁴	0,60	1000 10 ⁴	0,60
	Ordre 1	0,86	0,97	1,23	0,97	1,47	0,96
D1	Ordre 0	1,56 10 ⁴	0,56	1,24 10 ⁴	0,70	22,87 10 ⁴	0,66
	Ordre 1	0,62	0,98	0,79	0,94	0,99	0,96
D2	Ordre 0	0,66 10 ⁴	0,60	1,15 10 ⁴	0,69	20,63 10 ⁴	0,66
	Ordre 1	0,56	0,98	0,81	0,98	1,07	0,97
D3	Ordre 0	0,19 10 ⁴	0,72	1,13 10 ⁴	0,71	17,04 10 ⁴	0,65
	Ordre 1	0,47	0,98	0,76	0,99	0,83	0,99

Témoin : sans extrait ; D1 : Dose 50 µg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 µg de phénol dans l'extrait /g de viande; D3 : Dose 150 µg de phénol dans l'extrait /g de viande.

4.2.2. Détermination de l'énergie d'activation

La vitesse spécifique k est corrélée à la température T par l'équation suivante :

$$k = k_0 \times e^{\left(-\frac{E_a}{R \times T}\right)} \quad (\text{Eq. 23})$$

Avec : k : constante de la vitesse spécifique à la température T (jours⁻¹);

k_0 : constante indépendante de la température (jours⁻¹);

E_a : énergie d'activation (J mole⁻¹) ;

R : constante des gaz parfaits (= 8,314 J mole⁻¹K⁻¹) ;

T : température absolue (K).

De l'équation précédente, l'équation suivante est déduite:

$$\ln(k) = \left(-\frac{E_a}{R}\right) \times \frac{1}{T} + \ln(k_0) \quad (\text{Eq. 24})$$

Des représentations graphiques linéaires, établies entre $\ln k$ et $1/T$, permettent d'en déduire les valeurs de E_a et de k_0 . Les graphiques relatifs au critère FMAT et CT sont représentés, respectivement, dans la Fig. 32 et 33. La valeur $(-E_a/R)$ représente la pente de l'équation des régressions linéaires de $\ln k = f(1/T)$ et la valeur $\ln k_0$ représente l'ordonnée à l'origine de cette droite. Les valeurs de E_a et de k_0 ont été déterminées et regroupées dans le Tableau 30. Ces valeurs ont été utilisées pour le calcul de la DLC.

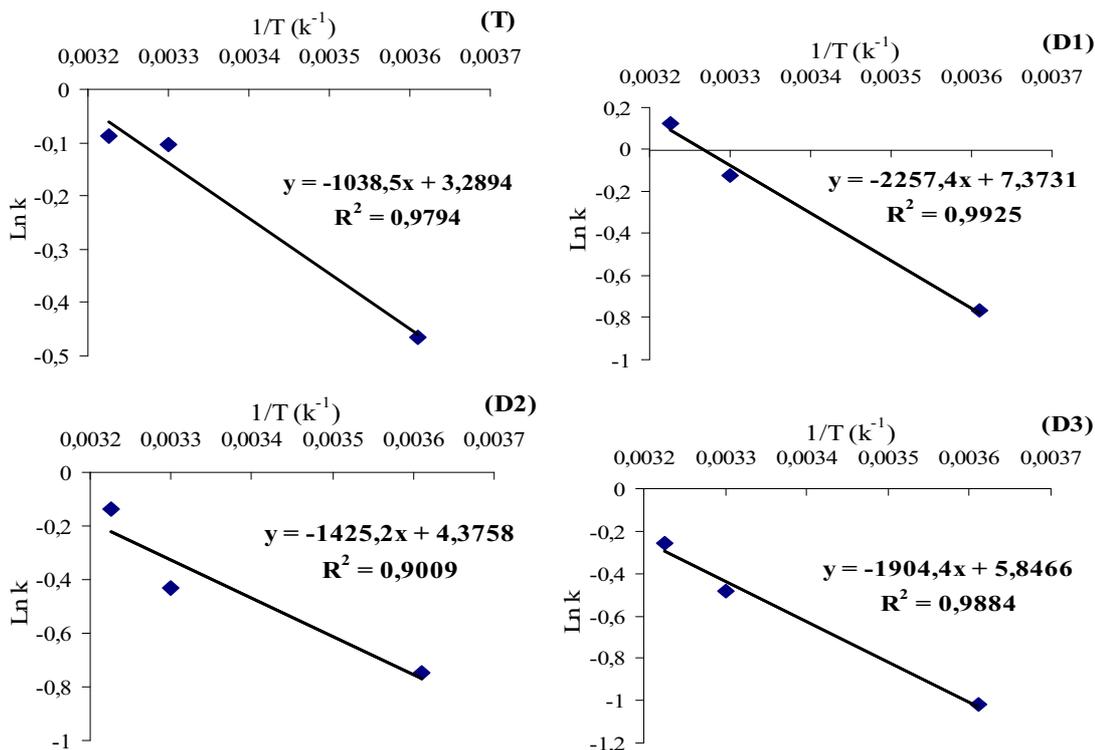


Fig. 32. Régression linéaire entre l'inverse de la température et la vitesse spécifique (en Ln k) de l'évolution du nombre des FMAT au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

T : Témoin sans extrait ; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

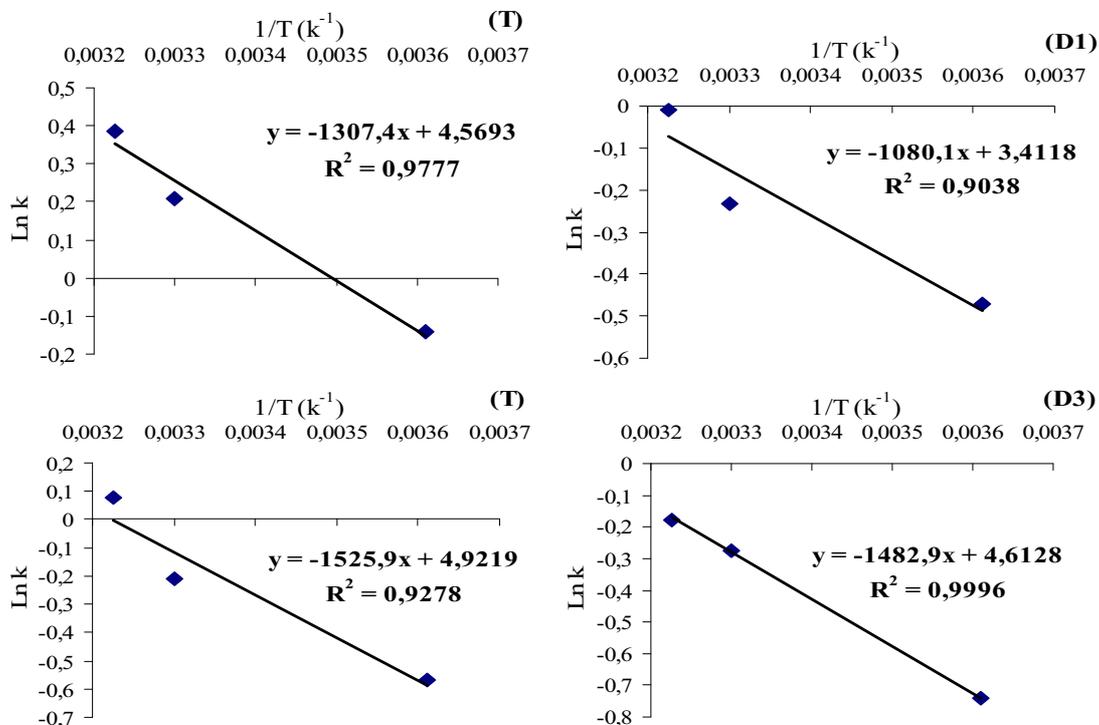


Fig. 33. Régression linéaire entre l'inverse de la température et la vitesse spécifique (en Ln k) de l'évolution du nombre des CT au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

T : Témoin sans extrait ; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D3 : Dose 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

Tableau 30. Les valeurs de k_0 et E_a relatives à l'évolution du nombre des **FMAT** et **CT** au cours de la conservation des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait de feuille d'olivier à différentes doses.

Echantillon	FMAT				CT			
	Ln k_0	$-E_a/R$	k_0	E_a	Ln k_0	$-E_a/R$	k_0	E_a
Témoin	3,28	-1038	26,57	8634	4,56	-1307	95,58	10866
D1	7,37	-2257	1587,63	18764	3,41	-1080	30,26	8979
D2	4,37	-1425	79,04	11849	4,92	-1525	137,00	12686
D3	5,84	-1904	343,77	15833	4,61	-1482	100,48	12328

Témoin : sans extrait ; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 250 μg de phénol dans l'extrait /g de viande; D3 : Dose 500 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

4.2.3. Calcul de la Date Limite de la Conservation

$$\text{La DLC s'exprime selon l'équation suivante : } \text{DLC} = \frac{(\text{Ln}A - \text{Ln}A_0)}{k_0 \times e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}} \quad (\text{Eq. 26})$$

Avec : A_0 : nombre initiale FAMT et CT;

A : seuil limite acceptable de la flore FAMT ($3 \cdot 10^5$) et CT (10^4) selon la norme européenne;

Les résultats de la DLC à 4°C des viandes bovines hachées crues supplémentées ou non d'extrait des feuilles d'olivier sont représentés sous forme d'histogramme dans la Fig. 34. Indépendamment du critère microbiologique utilisé, il est remarquablement observable que l'extrait des feuilles d'olivier augmente la DLC des viandes bovines hachées crues. La DLC augmente lorsque la dose de l'extrait augmente. En tenant compte de FMAT, la DLC est 8,8 j pour le témoin sans extrait. Elle s'élève à 11,49 ; 12,47 et 17,13 j , respectivement, lorsque l'extrait est ajouté à des doses de 50, 100 et 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande. Le Témoin possède un DLC de 5,37 j lorsque le critère CT est choisi. La DLC s'améliore à 7,03 8,24 et 9,45 j , respectivement, en présence d'extrait à des doses de 50, 100 et 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande. En conclusion, l'extrait des feuilles d'olivier possède un effet préservatif contre l'altération microbienne des viandes bovines hachées crues.

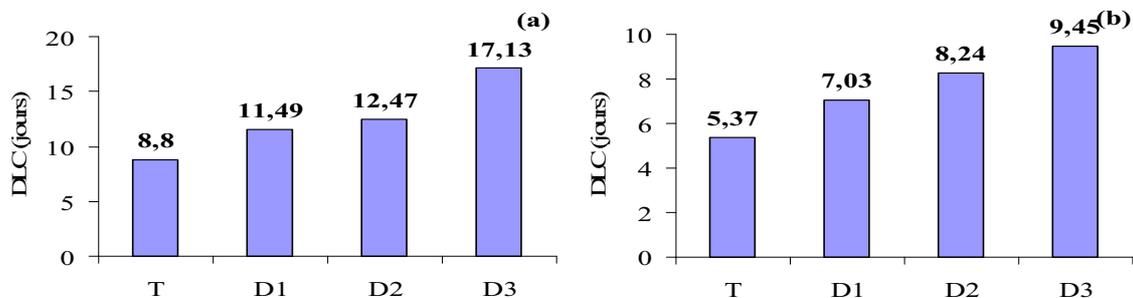


Fig. 34. Les DLC des viandes bovines hachées supplémentées ou non d'extrait des feuilles d'olivier à différentes doses selon le critère nombre **FMAT** (a) et nombre **CT** (b).

T : Témoin sans extrait ; D1 : Dose 50 μg de phénol dans l'extrait /g de viande ; D2 : Dose 100 μg de phénol dans l'extrait /g de viande; D3 : Dose 150 μg de phénol dans l'extrait /g de viande.

5. Effet des feuilles d'olivier sur la stabilité oxydative des viandes bovines hachées

Au cours de leur conservation, les viandes bovines subissent des changements dans leurs compositions biochimiques. Les changements non appréciés sont responsables des altérations de la qualité organoleptique du produit. Les principaux critères du rejet des viandes bovines hachées crues par le consommateur sont le brunissement de la couleur et le goût du rancissement. Ces deux phénomènes sont dus, respectivement, à des réactions d'oxydation des protéines et de la matière grasse dans les viandes bovines. Ils s'accroissent lorsque les viandes sont hachées.

Afin de limiter ce problème de l'altération oxydative, l'addition d'un agent à pouvoir antioxydant pourrait présenter une solution prometteuse. Dans notre travail, nous proposons d'appliquer les feuilles d'olivier sous deux formes (extrait et poudre complète) et en deux concentrations (100 et 150 μg phénols /g viande) afin d'évaluer leur effet antioxydant dans une matrice alimentaire « les viandes bovines hachées ». La stabilité oxydative a été étudiée pour les viandes crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

5.1. Effet sur l'oxydation de l'oxymyoglobine en metmyoglobine

La couleur de la viande reste un facteur important de qualité pour le consommateur. Elle dépend essentiellement de la concentration en pigments hémiques et de leurs états chimiques. L'oxymyoglobine est la protéine hémique responsable de la couleur rouge vif qui est synonyme de fraîcheur et attractive pour le consommateur. L'oxydation de l'oxymyoglobine en metmyoglobine aboutit à une coloration brune de la viande, signe d'altération organoleptique.

Les résultats de l'évolution du pourcentage de metmyoglobine au cours de la conservation des viandes bovines hachées crues et cuites supplémentées ou non de feuilles d'olivier sont présentés dans le Tableau 31.

Le pourcentage de metmyoglobine augmente significativement au cours de la conservation, indépendamment de l'échantillon étudié. Cependant, la présence des feuilles d'olivier a limité l'oxydation d'oxymyoglobine en metmyoglobine au cours de l'entreposage des viandes bovines hachées aussi bien crues que cuites. En fait, après 12 jours de conservation à 4°C, une formation de 65% de metmyoglobine est obtenue dans le témoin cru. Uniquement 43% et 35% de metmyoglobine sont obtenues dans les viandes bovines hachées crues supplémentées d'extrait des feuilles d'olivier à 100 et 150 μg phénols /g viande, respectivement. La forme poudre complète des feuilles d'olivier a montré un effet stabilisant plus important que celui de l'extrait. Le pourcentage de metmyoglobine formé après 12 jours de conservation des viandes bovines hachées crues supplémentées de poudre des feuilles d'olivier à 100 et 150 μg phénols /g viande sont respectivement 37% et 21%.

Antérieurement, Hayes et al. (2010) ont aussi prouvé l'effet stabilisant de l'extrait des feuilles d'olivier par le suivi de l'évolution du pourcentage d'oxymyoglobine durant la conservation des viandes bovines hachées crues emballées aérobiquement ou sous atmosphère modifiée. Cet effet protecteur de l'extrait des feuilles d'olivier pour l'oxymyoglobine a été étudié, auparavant, dans un système modèle du muscle bovin et porcine (Hayes et al., 2009). Dans le même contexte, les propriétés antioxydantes des catéchines du thé contre l'oxydation de l'oxymyoglobine ont été mises en évidence dans la matrice des viandes bovines hachées (Tang et al., 2006).

La comparaison des résultats initiaux entre les échantillons crus et cuits montre que la cuisson augmente le pourcentage de metmyoglobine de 22%, pour les viandes crues, à environ 50% pour les viandes cuites. Cette augmentation explique la couleur brune qui apparaît suite à la cuisson des viandes bovines hachées.

Tableau 31. Effet de l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'oxydation de l'oxymyoglobine en metmyoglobine dans les viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Temps de conservation	T ²	E1 ³	E2 ⁴	P1 ⁵	P2 ⁶	<i>p-value</i>
Viandes bovines hachées crues						
0	22,10 ± 1,68 ^{aE}	22,00 ± 0,50 ^{aE}	22,70 ± 0,07 ^{aE}	23,50 ± 0,83 ^{aE}	22,80 ± 0,85 ^{aE}	0,5829
3	41,90 ± 0,90 ^{bD}	31,40 ± 0,83 ^{bD}	27,60 ± 0,91 ^{bD}	34,00 ± 1,05 ^{bD}	23,20 ± 0,04 ^{bD}	0,0000
6	52,20 ± 0,08 ^{cC}	47,20 ± 0,88 ^{cC}	35,80 ± 0,38 ^{cC}	44,40 ± 0,14 ^{cC}	32,40 ± 0,04 ^{cC}	0,0000
9	65,20 ± 0,98 ^{dB}	53,50 ± 0,60 ^{dB}	45,70 ± 1,01 ^{dB}	49,80 ± 0,43 ^{dB}	38,40 ± 0,37 ^{dB}	0,0000
12	87,40 ± 0,34 ^{eA}	65,11 ± 0,95 ^{eA}	58,50 ± 0,08 ^{eA}	61,30 ± 0,96 ^{eA}	43,90 ± 0,12 ^{dA}	0,0000
<i>p-value</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
(ΔMetMb*)¹	65,31	43,08	35,8	37,88	21,18	
Viandes bovines hachées cuites						
0	51,50 ± 4,84 ^{aA}	50,80 ± 5,38 ^{aA}	49,40 ± 2,08 ^{aA}	49,90 ± 1,71 ^{aA}	47,80 ± 1,85 ^{aA}	0,8500
3	56,40 ± 3,34 ^{abA}	59,50 ± 3,02 ^{ba}	54,00 ± 4,48 ^{abA}	58,90 ± 2,26 ^{ba}	54,00 ± 0,76 ^{abA}	0,0136
6	66,20 ± 5,16 ^{baB}	63,50 ± 1,40 ^{bcAB}	56,60 ± 5,72 ^{abAB}	62,30 ± 4,10 ^{bcAB}	55,70 ± 0,13 ^{ba}	0,1608
9	90,50 ± 1,08 ^{cbB}	65,10 ± 3,37 ^{bcB}	60,10 ± 1,20 ^{abAB}	64,10 ± 0,43 ^{bcB}	56,20 ± 1,23 ^{ba}	0,0066
12	94,50 ± 6,80 ^{ca}	69,70 ± 0,12 ^{ca}	63,40 ± 5,05 ^{ca}	65,40 ± 1,26 ^{ca}	73,00 ± 5,20 ^{ca}	0,0014
<i>p-value</i>	0,8500	0,3403	0,1599	0,0006	0,0051	
(ΔMetMb*)¹	43,0	18,9	14,0	16,5	25,2	

* MetMb: pourcentage de metmyoglobine (%); ¹ ΔMetMb = MetMb₁₂ - MetMb₀; MetMb₀: % initial de MetMb; MetMb₁₂: % de MetMb après 12 jours de conservation; ² T: Témoin sans feuilles d'olivier; ³ E1: extrait à 100 µg phénols /g viande; ⁴ E2: extrait à 150 µg phénols /g viande; ⁵ P1: poudre à 100 µg phénols /g viande; ⁶ P2: poudre à 150 µg phénols /g viande; ^{abcde} Les valeurs de la même colonne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01); ^{ABCDE} Les valeurs de la même ligne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type. Tous les résultats sont les moyennes de 2 replicata.

5.2. Effet sur l'oxydation des lipides

Les viandes bovines hachées contiennent de la matière grasse. Cette matière est impliquée dans de nombreux aspects de la qualité de la viande, et en particulier dans l'arôme et le goût. Cependant, une altération oxydative de ces lipides mène à un goût de rancissement désagréable non apprécié par le consommateur.

Nous visons à étudier l'effet des feuilles d'olivier sur la stabilité oxydative des lipides dans les viandes bovines hachées au cours de leur conservation réfrigérée. L'oxydation lipidique des différents échantillons de viandes bovines hachées a été évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ces substances sont des composés de faible masse moléculaire formées suite à la décomposition de certains produits primaires et secondaires de peroxydation lipidique. Les valeurs de TBARS ont été exprimées en milligramme de malodialeldéhyde produit par kilogramme de l'échantillon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 32.

Les valeurs de TBARS de tous les échantillons augmentent en fonction du temps de conservation. Cela signifie qu'il y a un phénomène d'oxydation des lipides qui s'accroît proportionnellement à la durée de l'entreposage des viandes bovines hachées.

La présence des feuilles d'olivier, comme additif alimentaire aux viandes bovines hachées, a limité l'oxydation des lipides. Ce résultat se manifeste au niveau de la diminution des valeurs de TBARS formés. En fait, 13 mg MDA/100 g de viande ont été formés après 12 jours de conservation de l'échantillon témoin cru. Les viandes bovines hachées crues contenant des feuilles d'olivier possèdent au maximum 9,8 mg MDA/100 g de viande.

L'effet inhibiteur de l'oxydation lipidique par l'extrait des feuilles d'olivier à une concentration de 200 µg/g viande a été reporté sur des viandes bovines hachées crues emballées en condition aérobie ou sous atmosphère modifiée (Hayes et al., 2010) et sur les saucisses crues et cuites de porc (Hayes et al., 2011). Cet effet a été précédemment démontré aussi dans des systèmes modèles de muscle bovin et porcine (Hayes et al., 2009).

Les valeurs initiales de TBARS pour les échantillons crues et cuites montrent que la cuisson entraîne la formation de TBARS suite à des réactions d'oxydation lipidique. Des résultats similaires ont été observés pour les saucisses de porc (Hayes et al., 2011). Broncano et al., (2009) ont montré que la cuisson des viandes porcines ne modifie pas la quantité des lipides totaux mais induit significativement une forte oxydation lipidique.

D'après nos résultats, la cuisson a été aussi trouvée défavorable pour la stabilité oxydative des lipides au cours de l'entreposage des viandes bovines hachées. Au bout de 12

jours de conservation réfrigérée, les valeurs de TBARS formés sont de l'ordre de 64-94 mg MDA/100 g de viandes cuites. Elles sont nettement supérieures à celles des viandes crues. Ces dernières contiennent des TBARS de l'ordre de 4,6-13 mg MDA/100 g. Dans le cas des viandes bovines hachées cuites, les feuilles d'olivier à une dose de 100 µg phénols /g viande sont insuffisantes pour limiter l'oxydation des lipides au cours de la conservation réfrigérée. Ces résultats sont en accord avec les études de Castro et al. (2011) qui ont aussi trouvé que l'oxydation des lipides dans les viandes cuites est plus importante que celle dans les viandes crues. Dejong et al., (2009) a utilisé l'extrait des margines, du thé et du vin pour limiter l'oxydation lipidique et la formation de TBARS dans les viandes bovines et porcines cuites. Ces auteurs ont montré l'implication des composés phénoliques, par leurs propriétés antioxydante, dans le processus du control de l'oxydation lipidique dans les viandes.

Tableau 32. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'oxydation des lipides dans les viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Temps de conservation	T ²	E1 ³	E2 ⁴	P1 ⁵	P2 ⁶	<i>p-value</i>
Viandes bovines hachées crues						
0	0,23 ± 0,00 ^{aA}	0,90±0,00 ^{aBC}	0,75 ± 0,00 ^{aB}	0,96 ± 0,00 ^{aC}	0,57±0,00 ^{aAB}	0,0058
3	1,53 ± 0,00 ^{bA}	5,40 ± 0,07 ^{bA}	1,63 ± 0,00 ^{aA}	6,14 ± 0,00 ^{bA}	2,01 ± 0,00 ^{bA}	0,1904
6	5,10 ± 0,01 ^{cB}	2,78 ± 0,00 ^{cA}	2,84 ± 0,00 ^{bA}	7,97 ± 0,00 ^{cC}	3,69 ± 0,00 ^{cA}	0,0000
9	8,70 ± 0,00 ^{dC}	3,30 ± 0,00 ^{dA}	4,49 ± 0,00 ^{cA}	9,48 ± 0,00 ^{bC}	5,90 ± 0,00 ^{bB}	0,0000
12	13,23 ± 0,01 ^{eD}	5,50 ± 0,01 ^{eA}	7,54 ± 0,00 ^{dB}	10,78 ± 0,01 ^{eC}	7,42 ± 0,00 ^{eB}	0,0000
<i>p-value</i>	0,0000	0,3101	0,0000	0,0000	0,0000	
(Δ TBARS*) ¹	13,00	4,60	6,79	9,82	6,85	
Viandes bovines hachées cuites						
0	1,09 ± 0,00 ^{aB}	0,90± 0,00 ^{aA}	2,94 ± 0,00 ^{aD}	1,71 ± 0,00 ^{aC}	1,71 ± 0,00 ^{aB}	0,0050
3	19,26 ± 0,01 ^{bA}	37,86±0,02 ^{bC}	37,86 ± 0,03 ^{bC}	35,39 ± 0,04 ^{bC}	26,11± 0,06 ^{bB}	0,1900
6	45,18 ± 0,14 ^{cA}	66,01± 0,03 ^{cC}	60,01 ± 0,60 ^{cBC}	49,71± 0,03 ^{cAB}	43,29± 0,07 ^{cA}	0,0000
9	67,42±0,03 ^{dB}	71,97± 0,09 ^{cC}	68,60 ± 0,68 ^{cBC}	58,51±0,04 ^{dB}	45,87± 0,12 ^{cA}	0,0000
12	90,02±0,05 ^{eBC}	95,73±0,02 ^{dC}	74,59 ± 0,74 ^{cAB}	87,24±0,05 ^{eBC}	65,40±0,14 ^{dA}	0,0000
<i>p-value</i>	0,0000	0,3100	0,0000	0,0000	0,0000	
(Δ TBARS*) ¹	88,95	94,83	71,65	85,52	64,30	

* TBARS : valeur TBARS (mg malodialdéhyde /kg viande) ; ¹ Δ TBARS = TBARS₁₂ - TBARS₀; TBARS₀ : TBARS initial ; TBARS₁₂: TBARS après 12 jours de conservation ; ² T: Témoin sans feuilles d'olivier ; ³ E1: extrait à 100 µg phénols /g viande ; ⁴ E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; ⁵ P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; ⁶ P2: poudre à 150 µg phénols /g viande ; ^{abcde} Les valeurs de la même colonne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01) ; ^{ABCDE} Les valeurs de la même ligne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type. Tous les résultats sont les moyennes de 4 replicata.

6. Effet des feuilles d'olivier sur les propriétés technologiques des viandes hachées

Les propriétés technologiques étudiées sont le pH, la perte d'exsudat durant la conservation, la capacité de rétention d'eau (Water Holding Capacity : WHC), la perte à la cuisson, la perte à la décongélation et le Rendement Technologique de NAPOLE (RTN)

6.1. Effet sur le pH

L'évolution du pH au cours de la conservation des viandes bovines hachées crues et cuites supplémentées ou non de feuilles d'olivier est présentée dans le Tableau 33.

La variation du pH au cours du temps est statistiquement significative pour tous les échantillons crues et cuites. Toutefois, cette variation dans le témoin est plus importante que celle dans les échantillons contenant des feuilles d'olivier que ce soit en forme d'extrait ou de poudre complet. Il est notable aussi que le pH diminue de 6,8 à 5,2 pour les viandes témoin. Cependant, l'addition des feuilles d'olivier entraîne une augmentation du pH au cours de la conservation aussi bien dans les viandes bovines hachées crues que cuites. Cette augmentation du pH est plus importante lorsque les viandes sont cuites. Toutefois, les valeurs du pH restent proches de la neutralité (6,8 à 7,2). Nous observons aussi que la cuisson n'avait pas d'effet sur l'évolution de pH dans l'échantillon témoin.

La diminution du pH peut être expliquée par le développement des bactéries de contamination au cours de la conservation. En effet, Bo Huang et al. (2009) ont montré que la croissance des bactéries spécifiques telles que le *Clostridium*, favorisée par le pH initial des viandes qui est proche à la neutralité et la teneur en eau qui varie entre 60% à 65%, entraîne la glycolyse et la transformation de glycogène en acide lactique et ainsi mène à l'acidification des viandes. Chéret et al. (2005) ont rapporté que l'acidification des viandes entraîne la dénaturation des protéines et rend la viande tendre, juteux, de couleur pale et de faible rendement technologique.

L'application des feuilles d'olivier pour empêcher l'acidification des viandes bovines hachées crues et cuites au cours de leur conservation réfrigérée est donc très intéressant pour la préservation de la qualité des viandes.

Nos résultats sur l'augmentation du pH des viandes par effet des feuilles d'olivier au cours de leur conservation sont en accordance avec les travaux de Bo Huang et al. (2011). Ces auteurs ont supplémenté les viandes bovines hachées par *Lotus Rhizome Knot* et feuilles de *Lotus*. Ils ont trouvé une augmentation du pH statistiquement significative ($p < 0.01$) par rapport au témoin à la 6^{ème} jours de conservation.

Tableau 33. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur l'évolution du pH des viandes bovines hachées crues et cuites durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Temps de conservation	T ²	E1 ³	E2 ⁴	P1 ⁵	P2 ⁶	p-value
Viandes bovines hachées crues						
0	6,80 ± 0,01 ^{aB}	6,75 ± 0,02 ^{aA}	6,79±0,01 ^{bAB}	6,82 ± 0,02 ^{abB}	6,80 ± 0,03 ^{aB}	0,0463
3	6,61 ± 0,03 ^{bA}	6,83 ± 0,02 ^{aD}	6,66 ± 0,02 ^{aB}	6,76 ± 0,01 ^{aC}	6,80 ± 0,01 ^{aD}	0,0000
6	6,22 ± 0,08 ^{cA}	6,98 ± 0,01 ^{bC}	6,68 ± 0,02 ^{aB}	6,92 ± 0,05 ^{bcC}	7,00 ± 0,02 ^{bC}	0,0000
9	5,81 ± 0,11 ^{dA}	7,15 ± 0,08 ^{cC}	6,79 ± 0,08 ^{bB}	7,03 ± 0,06 ^{cC}	7,09 ± 0,05 ^{bcC}	0,0000
12	5,52 ± 0,12 ^{eA}	7,21 ± 0,09 ^{cC}	6,92 ± 0,04 ^{eB}	7,22 ± 0,12 ^{dC}	7,11±0,10 ^{cC}	0,0000
p-value	0,0000	0,0000	0,0004	0,0001	0,0002	
 ΔpH ¹	1,28	0,46	0,13	0,39	0,31	
Viandes bovines hachées cuites						
0	6,86 ± 0,01 ^{aAB}	6,83 ± 0,03 ^{aAB}	6,82 ± 0,02 ^{aA}	6,85 ± 0,01 ^{aAB}	6,90 ± 0,01 ^{aB}	0,1261
3	6,53 ± 0,05 ^{bA}	6,96 ± 0,07 ^{bB}	7,09 ± 0,09 ^{bC}	6,93 ± 0,06 ^{abB}	7,20 ± 0,00 ^{bc}	0,0000
6	6,27 ± 0,03 ^{cA}	7,07 ± 0,06 ^{bB}	7,18 ± 0,04 ^{bC}	7,02 ± 0,03 ^{bcB}	7,40 ± 0,06 ^{bcD}	0,0000
9	5,87 ± 0,10 ^{dA}	7,21 ± 0,05 ^{dB}	7,26 ± 0,10 ^{bB}	7,06 ± 0,05 ^{bcB}	7,30 ± 0,21 ^{bcB}	0,0000
12	5,58 ± 0,08 ^{eA}	7,41 ± 0,03 ^{eBC}	7,50 ± 0,16 ^{cC}	7,31 ± 0,10 ^{dB}	7,50 ± 0,04 ^{cBC}	0,0000
p-value	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0004	
 ΔpH ¹	1,27	0,58	0,68	0,45	0,58	

¹ |ΔpH| = |pH₁₂ - pH₀| ; pH₀ : pH initial; pH₁₂: pH après 12 jours de conservation ; ² T: Témoin sans feuilles d'olivier ; ³ E1: extrait à 100 µg phénols /g viande; ⁴ E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; ⁵ P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; ⁶ P2: poudre à 150 µg phénols /g viande ; ^{abcde} Les valeurs de la même colonne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01) ; ^{ABCD} Les valeurs de la même ligne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type. Tous les résultats sont les moyennes de 3 replicata.

6.2. Effet sur la perte d'exsudat durant la conservation

Les résultats de l'étude de l'effet de l'incorporation des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées crues sur le pourcentage d'exsudat perdu durant 12 jours de conservation à 4°C sont présentés dans le Tableau 34.

Tableau 34. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte d'exsudat à partir viandes bovines hachées crues durant leur conservation à 4°C pendant 12 jours.

Temps de conservation	T ¹	E1 ²	E2 ³	P1 ⁴	P2 ⁵	p-value
3	26,20 ± 1,60 ^{aC}	21,50 ± 0,92 ^{aB}	14,30 ± 1,84 ^{aA}	21,40 ± 0,76 ^{aA}	15,40 ± 2,31 ^{aA}	0,0000
6	36,00± 1,95 ^{bC}	28,90± 0,70 ^{bB}	20,80 ± 0,68 ^{bA}	28,70 ± 0,61 ^{bA}	21,20 ± 0,68 ^{bA}	0,0000
9	46,30 ± 2,64 ^{cC}	32,30 ± 1,80 ^{cB}	22,80± 2,22 ^{bcA}	30,60 ± 4,50 ^{bA}	24,00 ± 3,12 ^{bA}	0,0000
12	61,00± 4,98 ^{dD}	34,80± 1,79 ^{dC}	24,00 ± 2,74 ^{bA}	37,40 ± 1,68 ^{cB}	29,40 ± 1,86 ^{cB}	0,0000
p-value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

¹ T: Témoin sans feuilles d'olivier ; ² E1: extrait à 100 µg phénols /g viande; ³ E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; ⁴ P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; ⁵ P2: poudre à 150 µg phénols /g viande ; ^{abc} Les valeurs de la même colonne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01) ; ^{ABCD} Les valeurs de la même ligne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type. Tous les résultats sont les moyennes de 5 replicata.

Les viandes bovines crues libèrent par écoulement spontanée un liquide, appelé exsudat, au cours de leur conservation. Le liquide contient des éléments nutritifs hydrosolubles qui seront perdues. Cette perte provoque des changements de la qualité gustative et technologique des viandes. Ce phénomène d'exsudation est plus prononcé lorsque les viandes sont hachées en raison de la destruction de leurs réseaux protéiques.

D'après le Tableau 34, la perte d'exsudat augmente au cours du temps du stockage. Toutefois, les échantillons des viandes contenant les feuilles d'olivier ont montré des pertes d'exsudat, au cours de la conservation à 4°C pendant 12 jours, significativement inférieures par rapport à celles du témoin dépourvu de feuilles d'olivier. Nous avons noté aussi l'effet dose sur la perte d'exsudat. En faite, les pertes sont minimisées lors d'utilisation d'une dose de 150 µg phénols /g viandes, par rapport à la dose 100 µg phénols /g viandes.

Les pertes d'exsudat au cours de l'entreposage peuvent être inversement reliées aux valeurs du pH des viandes. En faite, nous observons que les échantillons témoin possèdent un pH acide ou proche de l'acidité et présente une perte très importante (de l'ordre de 61%) au cours de la conservation. Quant' aux échantillons additionnés des feuilles d'olivier, leurs pH sont proches à la neutralité et montrent des pertes plus faibles par rapport à celles du témoin. Les valeurs de la perte sont inférieures à 37%. La corrélation entre le pH et la perte d'exsudat a été précédemment rapportée par Molette (2004).

6.3. Effet sur la capacité de rétention d'eau (Water Holding Capacity : WHC)

Les résultats de l'étude de l'effet de l'addition des feuilles d'olivier sous forme de poudre et extrait aux viandes bovines hachées sur la capacité de rétention d'eau sont présentés dans la Fig. 35.

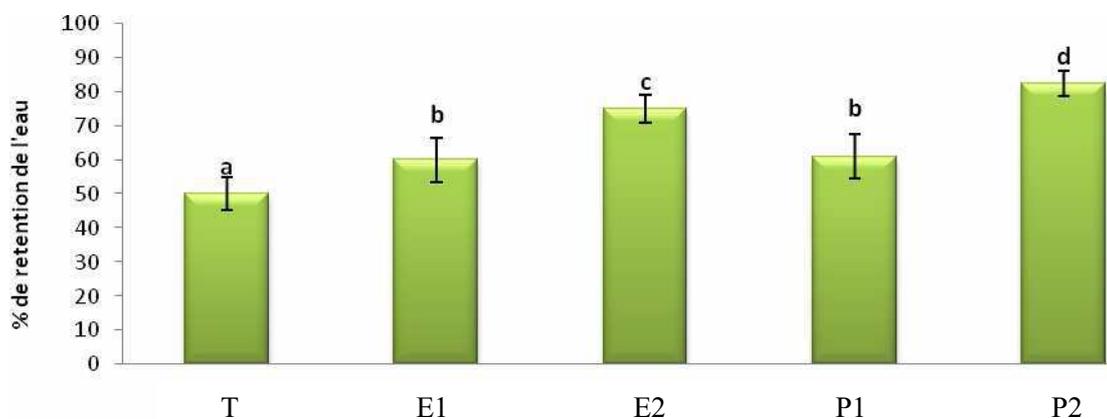


Fig. 35. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la capacité de rétention d'eau dans les viandes bovines hachées crues après 12 jours de conservation à 4°C
 T: Témoin sans feuilles d'olivier ; E1: extrait à 100 µg phénols /g viande; E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; P2: poudre à 150 µg phénols /g viande.

Les valeurs des histogrammes suivies par différentes lettres (a, b, c, d) sont significativement différentes ($p \leq 0,01$).

Les feuilles d'olivier, incorporées sous 2 formes différentes, améliorent significativement la capacité de rétention d'eau des viandes bovines hachées. Cette amélioration est proportionnelle à la dose utilisée. D'après nos résultats, le témoin possède un WHC de 49%, alors que les valeurs WHC sont respectivement 58%, 72%, 68% et 78% pour les échantillons E1, E2, P1 et P2 contenant les feuilles d'olivier. Le résultat concernant l'effet des feuilles d'olivier sur la capacité de rétention d'eau confirment celui de la perte d'exsudat. Une corrélation directe entre le pH et WHC est aussi noté. En faite, l'échantillon témoin, ayant un pH acide, possède une faible capacité de rétention d'eau par rapport à celles des échantillons contenant des feuilles d'olivier et caractérisés par des pH neutres.

La capacité de rétention d'eau est liée à la capacité des protéines à conserver leurs liaisons avec l'eau et donc leurs propriétés hydrophiles. D'après Chéret (2005), une baisse du pH entraîne une diminution des liaisons entre les protéines et l'eau et ainsi une baisse du pouvoir de rétention de l'eau. Au point isoélectrique, les protéines ont un minimum de charges et le réseau est relâché ce qui correspond au minimum du pouvoir de rétention d'eau. Quand le pH évolue vers la zone acide ou zone basique, l'apparition des charges du même signe provoque le rapprochement du réseau, correspondant à l'augmentation du pouvoir de rétention d'eau constaté de part et d'autre du point isoélectrique.

6.4. Effet sur la perte à la cuisson

L'étude de l'effet de l'incorporation des feuilles d'olivier sur la perte à la cuisson des viandes bovines hachées est présenté dans la Fig. 36.

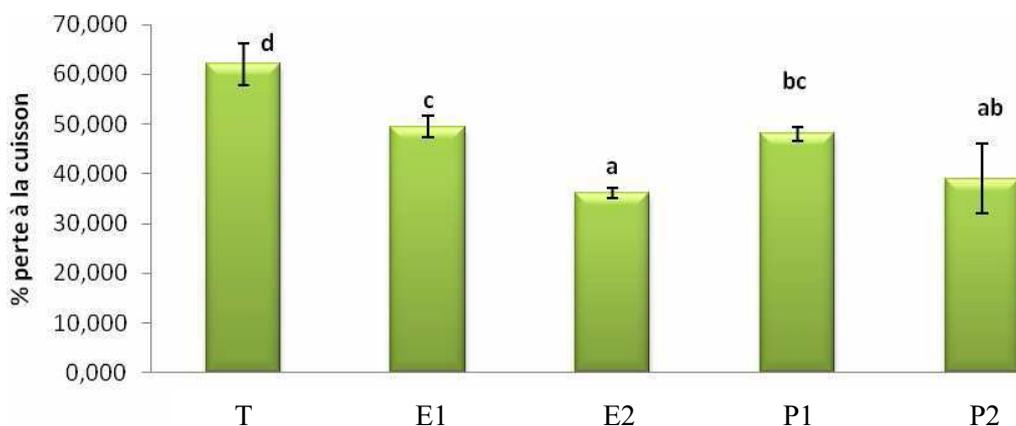


Fig. 36. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte à la cuisson des viandes bovines hachées après leur traitement dans un bain marie à 80°C pendant 15 min. T: Témoin sans feuilles d'olivier ; E1: extrait à 100 µg phénols /g viande ; E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; P2: poudre à 150 µg phénols /g viande.

Les valeurs des histogrammes suivies par différentes lettres (a, b, c, d) sont significativement différentes ($p \leq 0,01$).

L'élévation de la température lors de la cuisson entraîne une destruction totale de la paroi cellulaire des tissus musculaires ce qui provoque une libération des quantités très importantes des liquides ou exsudat. Une perte élevée entraîne une dureté de produit lors de la dégustation (Bouillet et al., 1982).

L'incorporation des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées limitent significativement les pertes à la cuisson. Dans l'échantillon témoin, la perte enregistrée est de 65% et elle est moins importante dans les échantillons E1, E2, P1 et P2 contenant les feuilles d'olivier. Les pertes à la cuisson sont 49,5% ; 36% ; 48% et 39% respectivement dans les échantillons E1, E2, P1 et P2. Dans le même contexte, Bouillet et al. (1982) ont reporté que l'addition des huiles essentielles extraites de menthe aux viandes hachées diminue les pertes à la cuisson de 67% (pour le témoin) à 32% et 41% lors d'utilisation de doses de 200 mg et 400 mg/g de viande, respectivement.

6.5. Effet sur la perte à la décongélation

La décongélation est une étape critique susceptible d'influencer la qualité et l'aptitude technologique des viandes bovines hachées. Elle s'accompagne des pertes qui peuvent dénaturer la qualité du produit, essentiellement la saveur et la valeur nutritive (diminution de la concentration en minéraux et en protéines hydrosolubles). L'effet de la présence des feuilles d'olivier, sous forme d'extrait ou de poudre, dans les viandes bovines hachées sur la perte à la décongélation a été évalué. Les résultats sont présentés dans la Fig. 37.

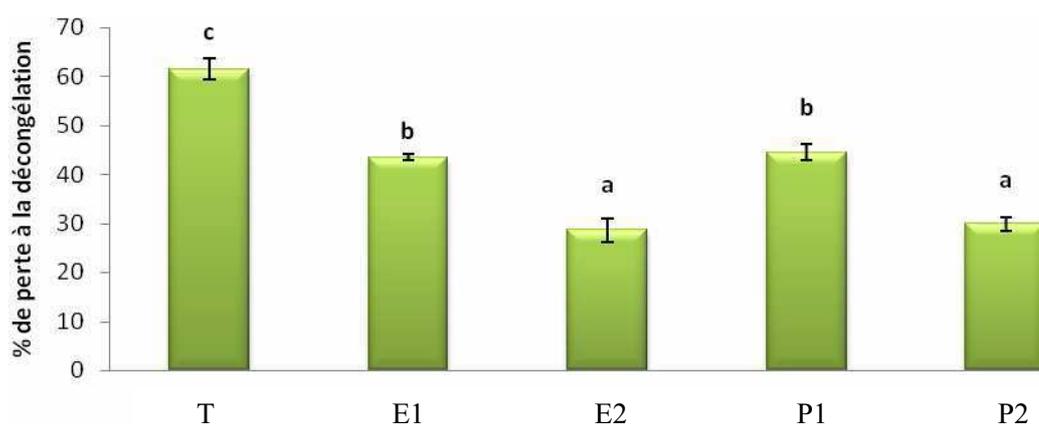


Fig. 37. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur la perte à la décongélation des viandes bovines hachées après une conservation à -10°C pendant 2 semaines.

T: Témoin sans feuilles d'olivier ; E1: extrait à 100 μg phénols /g viande; E2: extrait à 150 μg phénols /g viande ; P1: poudre à 100 μg phénols /g viande ; P2: poudre à 150 μg phénols /g viande.

Les valeurs des histogrammes suivies par différentes lettres (a, b, c, d) sont significativement différentes ($p \leq 0,01$).

Dans l'échantillon témoin, la perte à la décongélation est énorme (de l'ordre de 60% en masse). La présence des feuilles d'olivier a minimisé significativement ces pertes jusqu'à environ 40% après ajout d'une dose de 100 μg phénols /g viande et jusqu'à environ 30% après ajout d'une dose de 150 μg phénols /g viande. Il est notable que l'effet dose est significatif.

Une cristallisation partielle des molécules d'eau par effet des composés des feuilles d'olivier pourrait expliquer la diminution des pertes à la décongélation (Bouillet et al., 1982).

6.6. Effet sur le Rendement Technologique de NAPOLE (RTN)

Nous avons cherché à approcher l'aptitude à la transformation par saumurage-cuisson des viandes bovines hachées additionnées ou non de feuilles d'olivier. Pour cela, nous avons déterminé les rendements technologiques de NAPOLE (RTN) des différents échantillons. L'effet du l'extrait et poudre des feuilles d'olivier, supplémentés à 2 doses 100 et 150 μg phénols /g viande, sur le RTN est représenté dans la Fig. 38.

Les résultats montrent une amélioration significative de RTN des viandes bovines hachées par effet de la présence des feuilles d'olivier. Le RTN augmente de 20% pour le témoin pour atteindre 30% lorsque 100 μg phénols /g viande est ajouté. L'addition de 150 μg phénols /g viande multiplie par 3 le RTN qui devient 60%. La forme utilisée des feuilles d'olivier (extrait ou poudre) n'influe pas l'aptitude des viandes bovines hachées à la transformation par saumurage-cuisson.

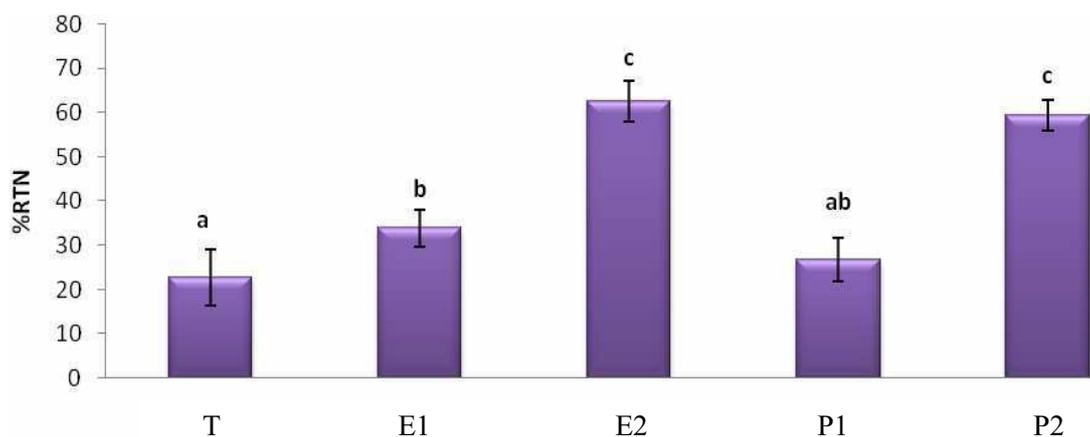


Fig. 38. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur le rendement technologique de NAPOLE.

T: Témoin sans feuilles d'olivier ; E1: extrait à 100 μg phénols /g viande; E2: extrait à 150 μg phénols /g viande ; P1: poudre à 100 μg phénols /g viande ; P2: poudre à 150 μg phénols /g viande.

Les valeurs des histogrammes suivies par différentes lettres (a, b, c, d) sont significativement différentes ($p \leq 0,01$).

7. Effet des feuilles d'olivier sur les propriétés sensorielles des viandes hachées

Les résultats de l'analyse sensorielle des viandes bovines hachées crues et cuites supplémentées ou non par des feuilles d'olivier (sous forme d'extrait ou poudre) sont présentés dans le Tableau 35.

Selon nos résultats, les feuilles d'olivier n'ont pas d'effet statistiquement significatif sur tous les critères sensoriels étudiés des viandes bovines hachées crues. L'analyse sensorielle des viandes bovines hachées cuites montre aussi l'absence d'effet statistiquement significatif sur tous les critères étudiés, à l'exception du critère goût. Les dégustateurs ont appréciés le goût des viandes supplémentées par la poudre des feuilles d'olivier, par rapport à celui du témoin. En faite, la note attribuée au témoin est 4,7 alors qu'elle est 6,7 et 5,7 respectivement pour les échantillons P1 et P2 contenant de la poudre des feuilles d'olivier à des doses de 100 et 150 µg phénols /g viande.

Tableau 35. Effet du l'extrait et de la poudre des feuilles d'olivier sur les critères sensoriels des viandes bovines hachées crues et cuites.

Critères sensoriels ¹	T ²	E1 ³	E2 ⁴	P1 ⁵	P2 ⁶	<i>p-value</i>
Viandes bovines hachées crues						
Apparence globale	5,87± 1,91 ^{ab}	5,95 ± 1,64 ^{ab}	6,25 ± 0,00 ^b	5,75 ± 2,22 ^{ab}	5,25 ± 1,91 ^a	0,005
Couleur	5,72± 2,18 ^{ab}	6,02 ± 1,74 ^b	6,12 ± 1,86 ^b	5,35 ± 2,28 ^{ab}	5,07 ± 2,20 ^a	0,1202
Odeur	5,25 ± 2,33 ^a	5,55 ± 1,90 ^c	5,22 ± 2,06 ^a	5,27 ± 2,24 ^a	4,97 ± 2,38 ^a	0,8465
Texture	5,12 ± 2,13 ^a	5,70 ± 2,12 ^a	5,50 ± 2,06 ^a	5,62 ± 2,43 ^a	5,75 ± 2,15 ^a	0,7184
Elasticité	4,52 ± 2,24 ^a	4,75± 2,26 ^{ab}	5,20± 2,24 ^{ab}	5,70 ± 2,20 ^b	5,10 ± 2,31 ^{ab}	0,1763
Jutosité	5,25 ± 1,99 ^a	5,35 ± 1,80 ^a	5,17 ± 1,98 ^a	5,25 ± 2,22 ^a	5,60 ± 1,94 ^a	0,8933
Viandes bovines hachées cuites						
Apparence globale	5,30 ± 1,95 ^a	5,57 ± 2,09 ^{ab}	5,62± 2,21 ^{ab}	5,87 ± 1,78 ^{ab}	6,32 ± 1,60 ^b	0,1829
Couleur	5,92 ± 1,96 ^a	5,92 ± 2,08 ^a	5,95 ± 1,98 ^a	5,55 ± 1,98 ^a	5,65 ± 1,96 ^a	0,8455
Odeur	5,17 ± 2,33 ^a	5,00 ± 1,96 ^a	5,42 ± 2,06 ^a	5,92 ± 2,24 ^a	5,82 ± 2,03 ^a	0,2177
Texture	5,70 ± 1,92 ^a	5,85 ± 1,80 ^a	5,80 ± 2,09 ^a	5,67 ± 2,06 ^a	5,87 ± 2,17 ^a	0,9889
Elasticité	5,67 ± 2,21 ^a	5,57 ± 2,14 ^a	5,20 ± 1,98 ^a	5,62 ± 2,12 ^a	5,75 ± 1,97 ^a	0,7945
Jutosité	5,75 ± 2,19 ^a	5,32 ± 2,10 ^a	5,50 ± 1,75 ^a	6,12 ± 2,20 ^a	5,97 ± 2,03 ^a	0,4003
Goût	4,70 ± 2,51 ^a	ND ⁷	ND ⁷	6,70 ± 1,77 ^b	5,77 ± 2,36 ^b	0,0006

¹ Echelle : Apparence Globale (1 = non acceptable, 9 = extrêmement acceptable) ; Couleur (1 = marron, 9 = rose) ; Odeur (1 = désagréable, 9 = agréable) ; Texture (1 = très tendre, 9 = très ferme) ; Elasticité (1 = faible élasticité, 9 = forte élasticité) ; Jutosité (1 = très sec, 9 = très juteux) ; Goût (1 = désagréable, 9 = très agréable) ; ² T: Témoin sans feuilles d'olivier ; ³ E1: extrait à 100 µg phénols /g viande; ⁴ E2: extrait à 150 µg phénols /g viande ; ⁵ P1: poudre à 100 µg phénols /g viande ; ⁶ P2: poudre à 150 µg phénols /g viande ; ⁷ ND : Non Déterminé ; ^{abc} Les valeurs de la même ligne suivies par différentes lettres sont significativement différentes (p < 0.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type.

Statistiquement, la couleur n'a pas significativement distingué l'échantillon témoin de ceux contenant les feuilles d'olivier. Pourtant, des dégustateurs ont remarqué la coloration verte de la poudre des feuilles d'olivier, décrite comme indésirable. D'ailleurs, les notes sur la couleur attribuées aux échantillons supplémentés par la poudre des feuilles d'olivier sont inférieures à celles des échantillons témoin, que ce soit pour les viandes bovines hachées crues que cuites. Outre, l'odeur des viandes bovines hachées cuites s'est améliorée positivement lors de l'incorporation de la poudre des feuilles d'olivier. Les notes attribuées sont 5,9 et 5,8 respectivement pour les échantillons P1 et P2, alors qu'elle est 5,1 pour le témoin. La différence de ces notes n'est statistiquement significative.

En résumant, l'incorporation des feuilles d'olivier à des concentrations jusqu'à 150 μg phénols /g viande, en forme d'extrait ou de poudre, n'influe pas la qualité sensorielle des viandes bovines crues et cuites, à l'exception d'un effet positif sur le goût.

Chapitre 3: Etude du l'effet de certains traitements technologiques sur les composés phénoliques des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier sont commercialisées dans certains pays (tel que : Canada, l'Australie...) en tant que matériel phytothérapeutique et source naturelle de substances nutraceutiques (tel que : les composés phénoliques, les flavonoïdes...). Différentes formes de ce matériel (feuilles sèches complètes, feuilles en poudre, extrait, gélules, tisane...) sont mises sur le marché. Les producteurs en vendent leurs propriétés fonctionnelles et leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine. Ces propriétés sont généralement attribuées aux composés phénoliques. Ce matériel végétal peut subir certains traitements technologiques avant utilisation humaine. Dans ce contexte, nous nous sommes consacré, dans cette 3^{ème} partie de la thèse, à l'évaluation de l'effet de deux exemples des traitements technologiques (traitement thermique et traitement d'irradiation) sur les composés phénoliques des feuilles d'olivier et leurs capacités antioxydantes.

La tisane des feuilles d'olivier est la forme la plus répandue pour l'usage humain de ce matériel phytothérapeutique. Pour la préparation des tisanes, l'ébullition est l'un des traitements appliqués. L'étude de l'effet de ce type de traitement thermique sur la composition phénolique et le pouvoir antioxydant des tisanes des feuilles d'olivier a été présentée dans l'article n°3.

Dans un second travail (Article n° 4), nous avons proposé l'irradiation ionisante comme technique de décontamination des feuilles sèches d'olivier (en forme de poudre ou complètes) afin de garantir une bonne qualité microbiologique de ce matériel, vue son utilisation en phytothérapie. Nous avons évalué l'effet décontaminant de l'irradiation ionisante par la détermination de la dose nécessaire de décontamination. Un examen de la radiorésistance de la flore microbienne des feuilles d'olivier a été aussi mené. En plus de ce volet microbiologique, nous avons étudié l'effet de l'irradiation ionisante sur les composés phénoliques et les propriétés antioxydantes des feuilles d'olivier.

1 **Antioxidant Capacity and Phenolic Content**
2 **in Olive Leaf Tisane as Affected by Boiling Treatment**

3 **Fathia AOUIDI*, Moktar HAMDI**

4 *Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering,*
5 *National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), 2 Boulevard de la terre, B.P. 676, 1080 Tunis,*
6 *Tunisie. Tel: 00 216 98 326 675. Fax: 00 216 71 704329.*

7
8 **(Article en préparation)**

9
10 * Corresponding author.

11 *E-mail address: aouidifathia@yahoo.fr (F. AOUIDI).*

12 *Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering,*
13 *National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), 2 Boulevard de la terre, B.P. 676, 1080 Tunis,*
14 *Tunisie. Tel: 00 216 98 326 675. Fax: 00 216 71 704329.*

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25 **Abstract:**

26 This paper described the influence of the extraction procedure (Temperature, time, dose) on
27 phenolic content and antioxidant potential of olive leaf tisane. Secondly, it aimed at
28 evaluating and understanding the effect of boiling treatment on phenolic compounds and
29 antioxidant capacity of an aqueous extract from olive leaves. The Phenolic content was
30 determined by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant capacity was assessed by ABTS⁺
31 method. The Phenolic content and antioxidant capacity depended on extraction procedure of
32 olive leaf tisane. The phenolic content ranged from $39.75 \pm 6.02 \text{ mg L}^{-1}$ to $370.62 \pm 17.98 \text{ mg}$
33 L^{-1} . The antioxidant capacity ranged from $303.33 \pm 13.76 \text{ mg L}^{-1}$ to $4496.66 \pm 40.41 \text{ mg L}^{-1}$. A
34 decoction of 10 g of powdered olive leaves in 100 mL water during 60 min gave tisane with
35 the highest phenolic content and the highest antioxidant capacity. Besides, it was found that
36 boiling leads to a decrease of the phenolic content and a rise of antioxidant capacity of
37 aqueous extract from olive leaves. The mass molecular distribution of the polymeric aromatic
38 fraction was analyzed by gel filtration chromatography on Sephadex G50. Results suggested
39 the hydrolysis of phenolic polymers following boiling. Moreover, HPLC analyses showed an
40 increase in rutin, oleuropein and caffeic acid levels in treated sample. These changes could
41 explain the decrease of phenolic content and the rise of antioxidant capacity of aqueous
42 extract from olive leaves, following boiling. Despite all these changes, correlation between
43 phenolic content and antioxidant capacity in olive leaf tisane wasn't affected by thermal
44 processing. As conclusion, thermal processing could be useful for enhancing the antioxidant
45 capacity and the extractability of phenolic compounds in olive leaf tisane.

46

47 **Keywords:** Olive leaf; Tisane; Antioxidant capacity (TEAC); Total phenolic content (TP);
48 Thermal treatment.

49

50 **1. Introduction**

51 In recent years, researchers and consumers have been interesting in biologically active
52 compounds, notably polyphenols, in foods and beverages. These compounds are known by
53 their beneficent effects for human health. Only small amounts of food and beverages are
54 consumed in their raw state. However, most of them need to be processed for safety, quality
55 and economic reason. Processing methods could affect chemical constituents of treated foods
56 and beverages. Thus, they could modify the biological activities of functional compounds
57 (Faller & Fialho, 2009; Kim et al., 2010; Kusznierevich et al., 2008; Rakic et al., 2007;
58 Zhang et al., 2010). The evaluation of the influence of food processing is a key factor while
59 establishing technological conditions that enable to preserve or improve original activity and
60 bioavailability of naturally occurring functional compounds. To obtain food and beverages of
61 consumption quality, it is important to understand the effect of processing on the biological
62 active components. Moreover, understanding the consequences of food processing on food
63 composition is one of the important steps to a correct interpretation of study results regarding
64 dietary habits, nutrition and human health (Nicoli et al., 1999).

65 Olive leaves from *Olea europaea* tree, native Mediterranean, have been reported to
66 contain biological active constituents, especially, phenolic compounds. The main active
67 phenolic compounds in olive leaves are oleuropein, verbascoside, luteolin-7-glucoside and
68 rutin, among others (Benavente-Garcia et al., 2000; Lee et al., 2009). Phenolic compounds in
69 olive leaves are well known by their antioxidative (Benavente-Garcia et al., 2000; Lee et al.,
70 2009), antimicrobial (Sudjana et al., 2009), antiviral (Micol et al., 2005), anti-inflammatory
71 (Miljkovic et al., 2009), hypolipidimic (Jemai et al., 2008) and hypotensive properties (Susalit
72 et al., 2010). These properties make olive leaves a nutraceutical material which benefits human
73 health. Historically, olive leaves have been used as a folk medicine for fever and malaria.
74 Nowadays, this vegetable material is proved and recommended for treating many diseases,

75 such as diabete, cardiovascular diseases, viral and microbial infections (Micol et al., 2005;
76 Sudjana et al., 2009; Susalit et al., 2010). Therefore, several forms and preparations of olive
77 leaves (powder, intact leaves...) and their extracts are commercialized as phytotherapeutic
78 medicines for human uses. Tisane is the most known and widespread form of preparation
79 from olive leaves for human use.

80 The objective of the present research was to determine the effect of preparation
81 method of olive leaf tisane on phenolic compounds and antioxidant capacity. Secondly, this
82 work aimed at evaluating and understanding the effect of boiling treatment on phenolic
83 compounds and on antioxidant capacity of an aqueous extract from olive leaves.

84 **2. Material and methods**

85 *2.1. Chemical reagents and standards*

86 ABTS [2, 2'-azinobis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] and
87 gallic acid were purchased from Sigma. Oleuropein and hydroxytyrosol were obtained from
88 Extrasynthèse (Geney). Sodium carbonate was purchased from Riedel-de Haën. Folin-
89 Ciocalteu phenol reagent, Trolox, potassium persulfate and syringic acid were obtained from
90 Fluka. Acetonitril and methanol were of HPLC grade. All other reagents were of analytical
91 grade.

92 *2.2. Sample preparation and experimental process*

93 Olive leaves (*Olea europaea L. var Chemlali North*) were randomly hand harvested
94 from tree grown in National Institute of Applied Sciences and Technology (Tunis, Tunisia) at
95 August 2008. Collected leaves were washed with tap water and dried at ambient temperature
96 for three days in the dark under ventilation. Dried leaves were milled and homogenized. Olive
97 leaf powder was passed through a sieve with mesh size of 18-35 (1-0.5 mm), then it was
98 employed to prepare tisanes using an aqueous extraction procedure. Extraction procedure was

99 carried out in 150 mL glass bottles hermetically sealed. The volume of the extraction was 100
100 mL.

101 A complete experimental design (Table 1) was developed to evaluate the influence of
102 preparation method of an olive leaf tisane on Total Phenolic content (TP) and on Trolox
103 Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). The applied design investigated three independent
104 variables. The experimental design included a set of 8 variable combinations. Analytical
105 parameters (TP content and TEAC) were measured in supernatants obtained by centrifuging
106 samples at 3000 rpm during 5 min. Multiple linear regressions of data were done in order to
107 evaluate individual and interactive effects of the tested independent variables. Coefficients of
108 estimated effects were determined using STATGRAPHICS PLUS Software Version 1.4 for
109 Windows and subjected to the analysis of variance (ANOVA) for detecting significance at 95
110 % level (p -value < 0.05).

111 A second experiment was carried out in order to investigate the effect of heating time
112 on phenolic compounds and TEAC of an aqueous extract from olive leaves. In this frame,
113 olive leaf powder (1 g) was macerated in 100 mL of distilled water for 5 min. The aqueous
114 extract was separated from the solid phase by means of centrifugation at 3000 rpm during 5
115 min. The extract was heated until boiling, which was maintained for a desired period of time
116 (0, 5, 30, 60 and 120 min). Independent samples were used for each test.

117 *2.3. Colorimetric determination of Total Phenolic content (TP)*

118 TP content in the samples was determined by UV spectrophotometry, based on a
119 colorimetric oxidation/reduction reaction. The oxidizing agent used was Folin–Ciocalteu
120 reagent (Tabart et al., 2007). Appropriately diluted centrifuged samples (3.6 mL) were mixed
121 with 0.2 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 3 min later, 0.8 mL of sodium carbonate (20 %
122 w/v) was added. The mixture was heated at 100 °C during 1 min. After cooling, absorbance at

123 750 nm was measured against distilled water. Gallic acid was used as an external standard to
124 prepare calibration curve. All determinations were performed in triplicate for each sample.

125 2.4. Determination of Total antioxidant capacity

126 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assessment of the samples was
127 determined in terms of radical scavenging ability by using improved ABTS⁺ radical cation
128 decolourization assay (Re et al., 1999). Stock solution of ABTS⁺ radical cation was prepared
129 by mixing 7 mM ABTS [2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
130 Diammonium salt] and 2.45 mM potassium persulfate. The ABTS⁺ solution was diluted with
131 ethanol to an absorbance of 0.70 (\pm 0.02) at 734 nm and equilibrated at 30 °C. Ten microliters
132 of sample were added to 1 mL ABTS⁺ solution and absorbance decrease at 734 nm was
133 recorded after 6 min. Percentage inhibition of oxidation (PI) was calculated for each sample
134 according to the following equation (Eq. 1):

$$135 \quad \text{PI (\%)} = \frac{(OD_0 - OD_{6\text{min}}) \times 100}{OD_0} \quad (\text{Eq. 1})$$

136 Where: OD_0 denotes the initial absorbance of diluted ABTS⁺,

137 $OD_{6\text{min}}$ denotes the absorbance of the sample after 6 min of reaction.

138 Series of dilutions were prepared such that they produced between 20 % and 80 % inhibition
139 of the blank absorbance. TEAC calculation was performed as follows (Eq. 2):

$$140 \quad \text{TEAC (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{PI} \times \text{dilution}}{43.21} \times \text{MM} \quad (\text{Eq. 2})$$

141 Where: MM denotes the mass molecular of Trolox (MM= 250 g mol⁻¹).

142 Trolox was used as an external standard to prepare calibration curve. The results were
143 expressed as milligrams Trolox equivalent antioxidant capacity per 1L (mg L⁻¹ TEAC) in the
144 aqueous extract. All determinations were performed in triplicate for each sample.

145 2.5. Molecular mass distribution of polyphenols

146 Chromatography gel filtration on Sephadex G-50 was used to analyze the polymeric
147 aromatic fraction present in aqueous extract from olive leaf. Three milliliters of the extract
148 were filtered and placed on a Sephadex coarse G-50 column (2.5 - 60 cm) previously
149 equilibrated with NaNO_3 0.05 M containing 0.02 % sodium azide at a flow rate of 0.6 mL
150 min^{-1} . Sample was collected on the basis of 3 ml per tube. Optic density of these fractions was
151 measured spectrometrically at 280 nm. The column was calibrated with syringic acid (MM =
152 198 Da), lysozym (MM = 15 kDa) and blue dextran (MM = 200 kDa) (Asses et al., 2009).

153 *2.6. HPLC analyses of phenolic compounds*

154 HPLC analyses were performed with an analytical HPLC unit (Agilent technologies
155 1200 series), equipped with a diode array detector. The stationary phase was an Atlantis®
156 Waters dC18 column (5 μm particle size; 250 mm; 4.6 mm). The mobile phases were formic
157 acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% B and installing a gradient to obtain 15%
158 B at 3 min, 25% B at 13 min, 35% B at 25 min, 45% B at 35 min, 50% B at 40 min, 100% B
159 at 45 min, 5% B at 46 min, finally, reequilibration in 4 min to initial composition. The flow
160 rate was 0.9 mL min^{-1} with elution at room temperature. The injection volume was 20 μL and
161 chromatograms were recorded at 280 nm. The data were processed on the ChemStation
162 Agilent technologies software. Phenolic compounds in samples were identified by matching
163 the retention time and the UV spectra of a peak in the sample chromatogram with the peak of
164 a known standard compound. Identifications were confirmed by analyzing a sample
165 supplemented by the corresponding standard.

166 *2.7. Statistical analysis*

167 All measurements were carried out at least in duplicate. The mean values and standard
168 deviations were determined by Excel Software Version 2003 for Windows. The ANOVA
169 analyses, Simple and Multiple Linear Regression were performed using STATGRAPHICS

170 PLUS Software Version 1.4 for Windows. For all analyses, parameters were considered
171 significant at 95 % level when $p\text{-value} < 0.05$.

172 **3. Results and discussion**

173 *3.1. Effect of preparation method of an olive leaf tisane on TP content and TEAC*

174 Tisane is a beverage with medicinal effects. It is obtained using aqueous extraction
175 procedure, which consists of a solid-liquid extraction of hydrosoluble compounds. A previous
176 study showed that powder was the best form for obtaining the most active and richest tisane in
177 terms of TP content and TEAC, in comparison with intact leaves. Hence, an increase of
178 specific area seems to significantly influence the extraction of antioxidants and phenolic
179 compounds, because of the much higher specific area of the former that is available for mass
180 transfer (Giao et al., 2007). Therefore, it was decided in the present work to use powder form
181 for the preparation of olive leaf tisane.

182 Various extraction conditions could be used in order to make a tisane. A complete
183 experimental design (Table 1) was developed in order to study simultaneously the effects and
184 interactions between three variables conditions - 1) extraction mode (maceration- decoction),
185 2) extraction time (5- 60 min) and 3) powder dose (1 %- 10 %)- on TP content and TEAC of
186 prepared olive leaf tisanes. This experimental design was also used to find optimized
187 conditions to obtain olive leaf tisane with the highest nutraceutical value.

188 Results collected from tests planned according to the complete experimental design were
189 presented in table 1. The most active and richest olive leaf tisane in terms of TP content
190 ($370.62 \pm 17.98 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA eq}$) and in terms of TEAC ($4496.66 \pm 40.41 \text{ mg L}^{-1} \text{ Trolox eq}$)
191 was obtained by decoction during 60 min of 10 g powder in 100 mL water. On the other hand,
192 1 g powder decocted during 5 min in 100 mL water was shown sufficient to get the most
193 efficient extractability of TP content with a yield of $5.15 \pm 0.34 \text{ mg GA eq. g}^{-1} \text{ Dry Powder}$.

194 When considering the antioxidant capacity per mg of TP, the most active phenolic

195 composition (14.52 ± 2.75 mg Trolox eq. mg^{-1} TP) was found in tisane prepared by decoction
196 during 60 min of 1 g powder in 100 mL water. In all cases, optimal results of TP content and
197 TEAC were obtained by decoction (i.e. thermal treatment at 100 °C). In the same context,
198 heat treatment was previously observed to increase the extractability of overall content of free
199 polyphenolic compounds from various products such as tea (Horzic et al., 2009), citrus peels
200 (Jeong et al., 2004), dictamnus, olive and orange tree leaves (Tsakona et al., 2010). The
201 disruption of the plant cell wall following thermal treatment is one among many mechanisms
202 that could explain the rise of TP content. The cellular disruption leads to the release of
203 polyphenolic compounds which were bound to cellular structures such as lignin and
204 polysaccharides (Bernhart & Schlich, 2005). Besides, exposure to higher temperatures could
205 alter the chemical composition of polyphenolic compounds, causing them to be more
206 extractable (Faller & Fialho, 2009). Heat treatment could also deactivate endogenous
207 oxidative enzymes (Lo Scalzo et al., 2004). Therefore, another reason for increased TP
208 contents could be explained by preventing enzymatic oxidation, which causes loss of the TP
209 compound in the raw plant materials (Choi et al., 2006; Nicoli et al., 1999).

210 Complicated changes in the qualitative and quantitative chemical composition, notably
211 phenolic compounds, could be occurring during the extraction procedure. Phenolic
212 constituents may interact to produce synergistic or antagonistic antioxidant effects with each
213 other and with other compounds (Gawlik-Dziki, 2008). Thus, the presence of various
214 phenolic compounds could cause diversity in antioxidant behavior of the extract (Horzic et
215 al., 2009).

216 Statistical analyses (Table 2) of results obtained with the experimental design proved a
217 significant effect of powder dose on TP content. All other estimated effects were not
218 statistically significant, and neither was the combined effect (i.e. interaction) of the studied

219 variables. The coefficient for TP content was negative, indicating that increasing the powder
220 level decreased the yield of extractability of TP.

221 *3.2. Effect of boiling time on thermo stability of TP and TEAC in an aqueous extract from* 222 *olive leaves*

223 In this section, the authors aimed at evaluating and understanding the effect of thermal
224 treatment on phenolic compounds and antioxidant capacity of an aqueous extract from olive
225 leaves. Within this framework, aqueous extract from olive leaves, freshly prepared by
226 maceration, was heated until boiling, which was maintained for a desired period of time (0, 5,
227 30, 60 and 120 min). TEAC, TP content and OD at 280 nm were determined for the control
228 and the treated samples. All results are shown graphically in Fig. 1.

229 A significant increase in TEAC ($p < 0.05$) was observed after boiling, in comparison with the
230 control ($322.75 \pm 3.92 \text{ mg L}^{-1}$ Trolox eq). The thermal treatment leads to an 11 % gain in
231 TEAC, which rises up to $377.16 \pm 14.79 \text{ mg L}^{-1}$ Trolox eq. Significant difference between the
232 control and treated samples was observed for TP content, as well as for TEAC. However,
233 unlike TEAC, the boiling of an aqueous extract from olive leaves resulted in a loss of TP
234 content when compared to the control ($52.8 \pm 2.59 \text{ mg L}^{-1}$ GA eq). The significant decrease in
235 TP content was noted beyond 5 min of boiling time. TP content was maintained at $46.66 \pm$
236 $0.74 - 48.2 \pm 2.71 \text{ mg L}^{-1}$ GA eq (non significant difference) within 5 to 60 min of boiling
237 time. The loss rate of TP content was 9 %, by comparing to the control. However, the
238 decrease was more pronounced after 120 min of boiling, with a loss rate of 21 %, leading to a
239 TP content of $41.29 \pm 3.87 \text{ mg L}^{-1}$ GA eq. On the other hand, OD 280nm increased
240 significantly ($p < 0.05$) with increasing time of boiling. It raised from 7 ± 0.1 to 7.49 ± 0.06 .
241 Our findings are in agreement with the findings of Faller and Fialho (2009), who reported that
242 domestic cooking of broccoli led to a reduction in TP content and an increase in antioxidant
243 capacity. The changes in the TP content and the overall antioxidant properties as a

244 consequence of heat treatment were depending on the treated materials, among other factors.
245 Rakic et al. (2007) reported that thermally treated samples of *Quercus robur* and *Quercus*
246 *cerris* acorn kernels possess higher antioxidant capacity and higher TP content than do the
247 native ones. Like *Quercus robur* and *Quercus cerris* acorn kernels, the TP contents and
248 antioxidant activities in the extracts from Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom increased as
249 heating temperature and time increased (Choi et al., 2006). While a decrease in the
250 antioxidant potential of sauerkraut juice was found for short heat treatments, a partial
251 recovery of these properties was observed by prolonging heating periods (Kusznierewicz et
252 al., 2008). On another side, the study of Zhang et al. (2010) showed that thermal treatment of
253 whole-meal flour from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) caused a decrease
254 in TP content and antioxidant capacity. Similarly, domestic cooking of carrot and white
255 cabbage were also found to lead to reductions in TP content and antioxidant capacity (Faller
256 & Fialho, 2009). Li et al. (2007) noted that the heat treatment did not markedly change
257 antioxidant capacity of purple wheat bran. However, there was a significant reduction in TP
258 contents. Furthermore, Gawlik-Dziki (2008) reported that boiling significantly decreased the
259 amounts of phenolic compounds and the antiradical capacity in fresh broccoli (*Brassica*
260 *oleracea var. botrytis italica*) florets. In the case of frozen broccoli, boiling increased the TP
261 content and retained the antiradical capacity (Gawlik-Dziki, 2008). Besides, domestic cooking
262 of onion was found to raise TP content; however, it decreases antioxidant capacity of the
263 treated material (Faller & Fialho, 2009).

264 The decrease in TP content in olive leaf extract following boiling could be explained
265 by modification of chemical structures and decomposition of polymers of phenolic
266 compounds (Kim et al., 2010; Rakic et al., 2007), leading to the formation of compounds with
267 lowest reactivity with the Folin–Ciocalteu reagent. Qualitative changes in chemical
268 composition could explain the alteration of TEAC in treated olive leaf extract, since different

269 chemical structures have distinct radical scavenging properties. Besides, synergistic or
270 antagonistic antioxidant effects could occur in a mixture of antioxidant compounds.
271 During thermal treatment in the present studies, the increase of TEAC was correlated with an
272 increase in OD280. This result suggests the formation of novel antioxidant compounds with
273 maximum absorbance at 280 nm. Positive correlation between the intensity of the colour and
274 antioxidant properties has been found in the case of the development of Maillard reactions in
275 heated food products, such as honey (Turkmen et al., 2006), white cabbage (Kusznierewicz et
276 al., 2008) and tartary buckwheat flour (Zhang et al., 2010). In our study, the rise of TEAC
277 could be explained by the formation of Maillard products frequently occurring in the thermal
278 processing. The formation of these products would mask the real decrease of TP content.

279 *3.3. Effect of thermal treatment on mass molecular distribution of polyphenols and on*
280 *phenolic composition of olive leaf aqueous extract*

281 The present section aimed at evaluating the qualitative changes of phenolic
282 compounds in olive leaf aqueous extract, which could occur following boiling treatment. The
283 mass molecular distribution of the polymeric aromatic fraction was analyzed by gel filtration
284 chromatography on Sephadex G50. The results of the control and heated samples for 120 min
285 are shown in Fig. 2. The elution pattern of the control sample showed two peaks. A small
286 peak (peak I) corresponds to a family of aromatics with molecular mass higher than 200 kDa.
287 A large peak (peak II) represents a family of aromatics with lowest molecular mass (< 200
288 kDa). Some modifications were observed in the elution pattern of heated sample, in
289 comparison with the control. Peak I was disappeared. It has been also observed the increase in
290 the intensity of peak II, indicating the rise of the fraction with lowest molecular mass.
291 According to this result, it could be suggest that heating of olive leaf extract causes
292 hydrolyses of polyphenolic compounds with high molecular mass, leading to the formation of
293 compounds with lowest molecular mass. Within this frame, Faller & Fialho (2009) noted that

294 the conversion of insoluble phenolic compounds into more soluble forms could occur after
295 domestic cooking of vegetables. Heating could release phenols from polymer such as lignin
296 and polysaccharide, as explained by Choi et al. (2006) and Faller & Fialho (2009). As for
297 Rakic et al. (2007), they observed that hydrolysable tannins were degraded during thermal
298 treatment of oak acorns. As the result of this degradation, it was noted an increase of non-
299 tannin phenolic content, especially gallic acid, after thermal processing. Thus, thermally
300 treated samples possess higher antioxidant capacity than do the native ones. Accordingly,
301 Rakic et al. (2007) believe that presence of gallic acid and its low molecular mass derivatives
302 caused the potent antioxidant capacity of the investigated samples. Similarly, Kim et al.
303 (2010) showed that thermally processed tannic acid for 15 min had about 67% higher
304 antioxidant capacity. Kim et al. (2010) explained the enhanced antioxidant capacity of
305 processed tannic acid by hydrolyzed gallic acid and the hydroxyl groups newly formed on the
306 galloyl group as a result of thermal hydrolysis.

307 Our results of HPLC analyses of the main phenolic compounds in olive leaf aqueous
308 extract, as affected by boiling treatment for different durations, are shown in Table 3. Six
309 phenolic compounds, namely, hydroxytyrosol, catechin, caffeic acid, verbascoside,
310 oleuropein and rutin, were identified and quantified in olive leaf aqueous extract. The most
311 abundant compound is oleuropein, as found by several authors (Benavente-Garcia et al.,
312 2000; Lee et al., 2009). Our results showed that the boiling treatment affected the content of
313 some phenolic compounds. In fact, caffeic acid, oleuropein and rutin levels in treated samples
314 were significantly higher than those in the control. This effect was noted from 5 min of
315 boiling time. However, hydroxytyrosol, catechin and verbascoside contents were maintained
316 during thermal treatment. The observed variations of the contents of these compounds were
317 not significant.

318 *3.4. Effect of thermal processing on the correlation between TP content and TEAC in an*
319 *aqueous extract from olive leaves*

320 Fig. 3 shows the correlation between TP content and TEAC in aqueous extract from
321 olive leaves before and after boiling treatment. A strong linear positive correlation (Pearson
322 coefficient of 0.995) was observed with a significance level ($p < 0.05$) for untreated extract.
323 After thermal treatment, the correlation remained good with a Pearson coefficient of 0.993 (p
324 < 0.05). Although the complexity of the qualitative and quantitative changes occurring during
325 boiling, it appeared that the correlation between TP content and TEAC in aqueous extract
326 from olive leaves was not affected.

327 **4. Conclusion**

328 This is the first time where the effect of thermal processing on phenolic content and
329 antioxidant capacity was investigated on an aqueous extract from olive leaves. This
330 processing decreases phenolic content while it increases antioxidant capacity. The novelty of
331 this work concerns also his contribution for explaining the effect of thermal processing on
332 antioxidant compounds and capacity in a natural matrix. Using a combination of HPLC and
333 gel chromatography analysis, we proved the hydrolysis of phenolic polymers and the
334 increases of rutin, oleuropein and caffeic acid levels, which could explain the antioxidant
335 capacity increase and the phenolic content decrease, following thermal processing of an olive
336 leaves aqueous extract.

337

338 **Acknowledgments**

339 The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Tunisian
340 Ministry of Scientific Research, Technology and Competences Development.

341

342

343 **References**

- 344 Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Ben Rejeb, I., Gargouri, M., & Hamdi M. Use of
345 *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture,
346 *Bioresource Technology* 100 (2009), pp. 2182-2188.
- 347 Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio J.A. Antioxidant
348 activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chemistry* 68 (2000), pp.
349 457-462.
- 350 Bernhart, S., & Schlich, E. Impact of different cooking methods on food quality: Retention of
351 lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables, *Journal of Food Engineering* 17 (2005),
352 pp. 327-333.
- 353 Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., & Lee, J. Influence of heat treatment on the
354 antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom,
355 *Food Chemistry* 99 (2006), pp. 381-387.
- 356 Faller, A.L.K., & Fialho., E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and
357 conventional retail vegetables after domestic cooking, *Food Research International* 42
358 (2009), pp. 210-215.
- 359 Gawlik-Dziki, U. Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli
360 (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets, *Food Chemistry* 109 (2008), pp. 393-401.
- 361 Giao, M. S., Gonzalez-Sanjose, M. L., Rivero-Perez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., &
362 Malcata, F. X. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant
363 capacity and phenol content on extraction features, *Journal of Science Food & Agriculture* 87
364 (2007), pp. 2638-2647.
- 365 Horzic, D., Komes, D., Belščak, A., Kovacevic Ganic, K., Ivekovic, D., & Karlovic, D. The
366 composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions, *Food*
367 *Chemistry* 115 (2009), pp. 441-448.

368 Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. Hypolipidimic and antioxidant
369 activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves,
370 *Chemico-Biological Interactions* 176 (2008), pp. 88-98.

371 Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.C.
372 Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels, *Journal of*
373 *Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004), pp. 3389-3393.

374 Kim, T.J., Silva, J.L., Kim, M.K., & Jung Y.S. Enhanced antioxidant capacity and
375 antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing, *Food Chemistry* 118 (2010), pp.
376 740-746.

377 Kuszniereicz, B., Smiechowska, A., Bartoszek, A., & Namiesnik, J. The effect of heating
378 and fermenting on antioxidant properties of white cabbage, *Food Chemistry* 108 (2008), pp.
379 853-861.

380 Lee, M. H., Jeong, J. H., & Oh, M. J. Antioxidative activity of gallic acid in acorn extract,
381 *Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi* 21 (1992), pp. 693-700.

382 Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., Shetty, K., Kim, Y. C.
383 Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant
384 activities, *Bioresource Technology* 100 (2009), pp. 6107-6113.

385 Li, W., Pickard, M. D., & Beta, T. Effect of thermal processing on antioxidant properties of
386 purple wheat bran, *Food Chemistry* 104 (2007), pp. 1080-1086.

387 Lo Scalzo, R., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., & Rapisarda P. Effect of thermal
388 treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice, *Food Chemistry* 85
389 (2004), pp. 41-47.

390 Micol, V., Catarla, N., Perez-Fons, L., Mas, V., Perez, L., & Estepa, A. The olive leaf extract
391 exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV),
392 *Antiviral Research* 66 (2005), pp. 129-136.

393 Miljkovic, D., Dekanski, D., Miljkovic, Z., Momcilovic, M., & Mostarica-Stojkovic, M. Dry
394 olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, *Clinical Nutrition*
395 28 (2009), pp. 346-350.

396 Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. T., & Franceschi, S. Influence of processing on the
397 antioxidant properties of fruits and vegetables, *Trends in Food Science and Technology* 10
398 (1999), pp. 94-100.

399 Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Povrenovic, V. T. D., & Siler-Marinkovic, S.
400 Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak
401 acorns from Serbia, *Food Chemistry* 104 (2007), pp. 830-834.

402 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant
403 activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical*
404 *Biology and Medicine* 26 (1999), pp. 1231-1237.

405 Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V., &
406 Hammer, K. A. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract,
407 *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 (2009), pp. 461-463.

408 Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Moccetti,
409 T., Verbruggen, M. (2010). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with
410 stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, doi:10.1016/j.phymed.
411 2010.08.016

412 Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.O., & Dommes, J. Optimisation of
413 extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability
414 during storage, *Food Chemistry* 105 (3) (2007), pp. 1268-1275.

415 Tsakona, S., Galanakis, C. M., & Gekas, V. (2010). Hydro-ethanolic mixtures for the
416 recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food Bioprocess Technology*. DOI
417 10.1007/s11947-010-0419-0

418 Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., & Velioglu, Y. S. Effects of prolonged heating on
419 antioxidant activity and colour of honey, *Food Chemistry* 95 (2006), pp. 653-657.
420 Zhang, M., Chen, H., Li, J., Pei, Y., & Liang, Y. Antioxidant properties of tartary buckwheat
421 extracts as affected by different thermal processing methods, *LWT - Food Science and*
422 *Technology* 43 (2010), pp. 181-185.

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443 **Figure captions**

444 Fig. 1. Thermal treatment at 100 °C of an aqueous extract from olive leaves (obtained by
445 maceration of powder 1 % in water for 5 min): Effect of heating time on Trolox Equivalent
446 Antioxidant Capacity (TEAC) (A), total phenolic content (TP) (B) and color (OD at 280 nm)
447 (C).

448 Data are reported as the averages of results carried out in triplicate and error bars indicate
449 standard deviations. Significant difference at 95 % level (p-value < 0.05) proved by ANOVA
450 for TEAC (p-value = 0.0136), for TP (p-value = 0.0034) and for OD 280 nm (p-value =
451 0.0037). The threshold of significance (*****), determined by Duncan's multiple range tests,
452 are 350.21 mg L⁻¹ Trolox equivalent for TEAC, 48.26 mg L⁻¹ Gallic Acid equivalent for TP
453 and 7.23 for OD 280 nm.

454

455 Fig. 2. Effect of thermal treatment of an aqueous extract from olive leaves (obtained by
456 maceration of powder 1 % in water for 5 min) on molecular mass distribution of
457 polyphenolic: The elution pattern of untreated sample (□) and heated sample at 100 °C for
458 120 min (■), obtained by Gel filtration chromatography on Sephadex G50.

459 Standards: 1: Blue dextran (MM = 200 kDa), 2: Lysozym (MM = 15 kDa), 3: Syringic acid
460 (MM = 198 Da).

461

462 Fig. 3. Effect of thermal processing on the correlation between total phenolic content (TP) and
463 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) in an olive leaves tisane: curve with
464 (□ - - -) and without (■ —) thermal treatment.

465 Data are reported as the averages of results carried out in triplicate and error bars indicate
466 standard deviations for TP and TEAC.

467

Table 1. Influence of preparation method of an olive leaf tisane on total phenolic content (TP) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC): Results collected from tests planned according to the complete experimental design 2^3 with three variables.

Tests	Variables			Analytical parameters	
	EM ^a	ET ^b (min)	PD ^c (%)	TP ^d (mg Gallic Acid equivalent. g ⁻¹ Dry Powder)	TEAC ^e (mg Trolox equivalent. mg ⁻¹ TP)
Tests performed according to the 2^3 experimental design					
1	Maceration	5	1	5.04 ± 0.32	8.89 ± 0.51
2	Decoction	5	1	5.15 ± 0.34	5.91 ± 0.64
3	Maceration	60	1	3.97 ± 0.60	11.31 ± 1.62
4	Decoction	60	1	4.69 ± 0.63	14.52 ± 2.75
5	Maceration	5	10	2.59 ± 0.16	12.13 ± 1.22
6	Decoction	5	10	2.70 ± 0.10	12.58 ± 0.53
7	Maceration	60	10	2.70 ± 0.17	12.08 ± 0.46
8	Decoction	60	10	3.70 ± 0.17	12.15 ± 0.71

^a EM: Extraction method; ^b ET: Extraction time; ^c PD: Powder dose (g of powder per 100 mL of water); ^d TP: total phenolic content; ^e TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Results are reported as the Mean ± Standard Deviation of analysis carried out in triplicate.

Table 2. Influence of preparation method of an olive leaves tisane on total phenolic content (TP) and antioxidant capacity (TEAC): Multiple linear regression results for the estimated effects of three variables and interactions between them.

Variables and Interactions (x)	Analytical parameters					
	TP ^d (mg Gallic Acid equivalent. g ⁻¹)			TEAC ^e (mg Trolox equivalent. g ⁻¹)		
	Dry Powder)			TP)		
	Coefficient	± error	<i>p-value</i>	Coefficient	± error	<i>p-value</i>
EM ^a	0,48	0,07	0,09	0,18	1,64	0,92
ET ^b	-0,10	0,07	0,36	2,63	1,64	0,34
PD ^c	-1,79 *	0,07	0,02	2,07	1,64	0,41
EM x IT	0,37	0,07	0,11	1,45	1,64	0,54
EM x PD	0,07	0,07	0,50	0,07	1,64	0,97
IT x PD	0,66	0,07	0,06	-2,87	1,64	0,32
Constant	3,81	0,03		11,19	0,82	

^a EM : Extraction method; ^b ET : Extraction time; ^c PD : Powder dose; ^d TP : total phenolic content; ^e TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

* indicates significance at 95% level (*p-value* < 0.05).

Table 3. Abundance (% peak area) of the main phenolic compounds present in an aqueous extract from olive leaves (obtained by maceration of powder 1 % in water for 5 min) as affected by thermal treatment at 100°C for different durations.

Compounds	RT*	Time of thermal treatment				<i>p</i> -value	
		0	5	30	60		120
Hydroxytyrosol	8.65	0.46 ± 0.05 ^a	0.63 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.12 ^a	0.64 ± 0.07 ^a	0.64 ± 0.03 ^a	0.1910
Cathechin	11.32	0.09 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.00 ^b	0.0020
Caffeic acid	15.84	0.11 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.05 ^b	0.22 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.04 ^{ab}	0.0404
Verbascoside	26.50	0.38 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.39 ^a	0.49 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.07 ^a	0.9410
Oleuropein	32.60	13.84 ± 1.32 ^a	18.88 ± 1.10 ^b	18.49 ± 0.50 ^b	18.08 ± 0.83 ^b	15.71 ± 0.20 ^a	0.0095
Rutin	33.90	0.48 ± 0.14 ^a	1.10 ± 0.01 ^b	1.06 ± 0.00 ^b	0.58 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.09 ^a	0.0027

*RT: Retention time (min); ^{ab} Values in each row with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Results are reported as the Mean ± Standard Deviation of analysis carried out in duplicate.

Fig. 1.

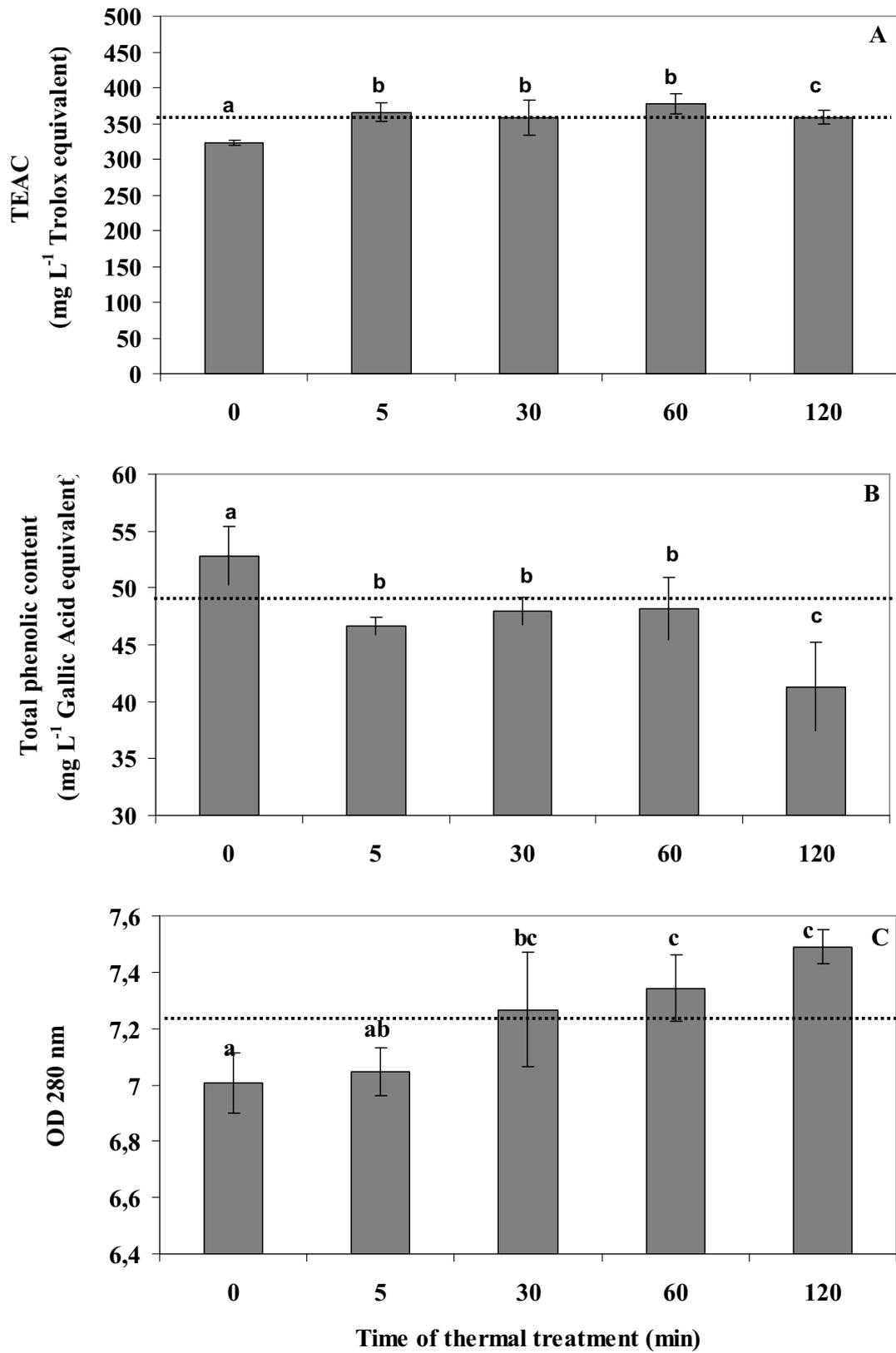


Fig. 2.

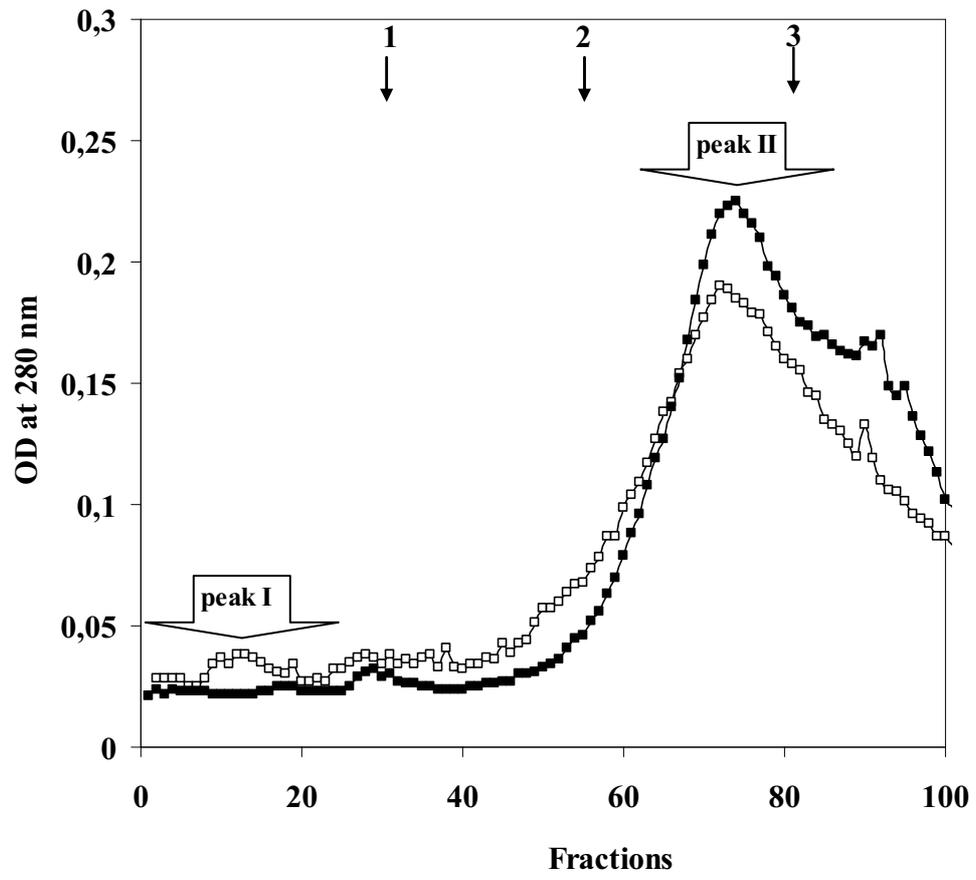
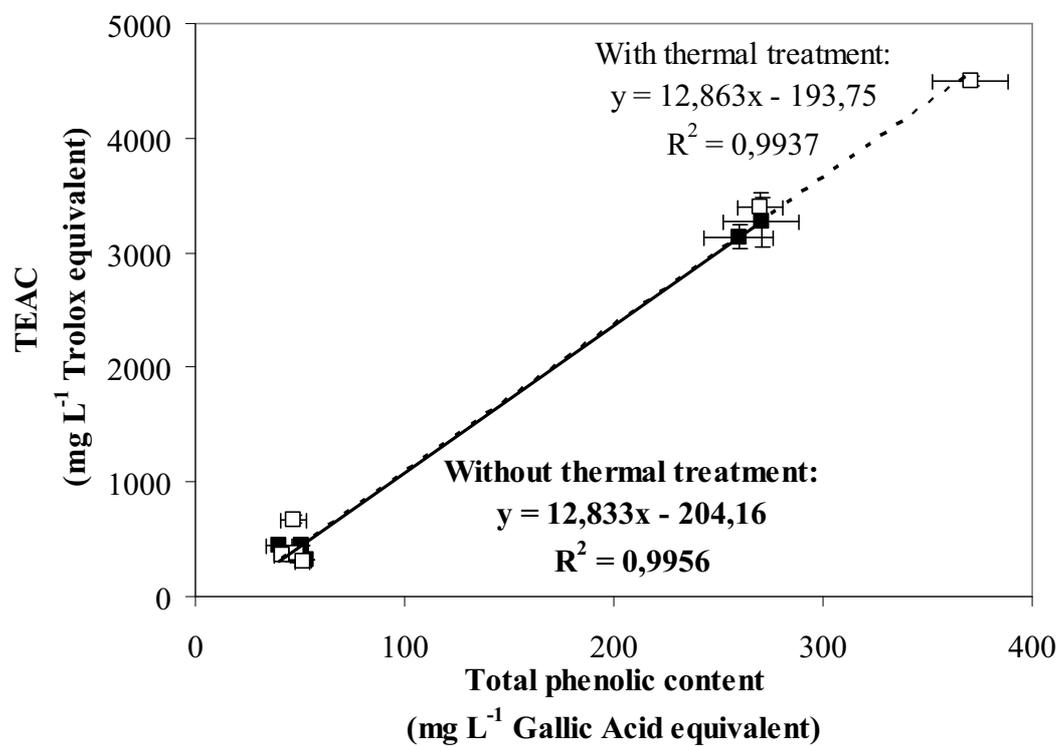
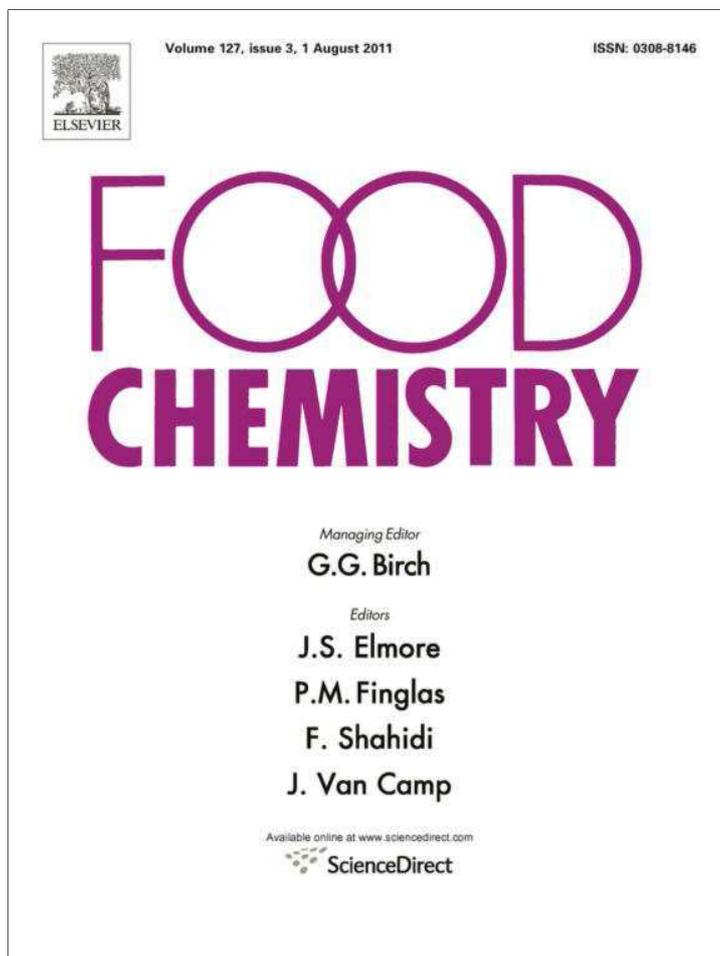


Fig. 3.



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

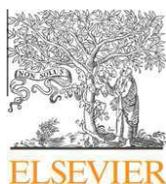


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

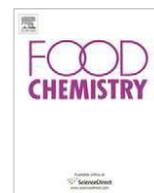
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds

Fathia Aouidi^{a,c,*}, Samia Ayari^{a,b}, Hana Ferhi^a, Sevastianos Roussos^c, Moktar Hamdi^a

^aLaboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, 1080 Tunis, University of Carthage, Tunisia

^bNational Center for Nuclear Sciences and Technologies (CNSTN), Tunis cedex, 2020, Tunisia

^cMediterranean Institute of Ecology and Palaeoecology UMR CNRS/IRD 193, IMEP Case 441, FST Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, Av. Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2010

Received in revised form 12 December 2010

Accepted 24 January 2011

Available online 2 February 2011

Keywords:

Olive leaf

Gamma irradiation

D₁₀-value

Phenolic compound

Antioxidant capacity

ABSTRACT

Olive leaves are commercialized for their antioxidative value due to their valuable phenolic compounds. The present study aimed to evaluate the effect of gamma irradiation on microbial load, on antioxidative properties and on phenolic compounds of air-dried olive leaves. Irradiation was applied up to 25 kGy (5 kGy intervals) to powdered and intact samples. Total aerobic bacteria, yeast and mold, and lactic acid bacteria were counted after gamma irradiation. Decontamination was obtained at 20 kGy. The radioresistance of microbial population was high with D₁₀ values between 9.74 and 25.12 kGy. Besides, gamma irradiation up to 25 kGy was found to maintain the antioxidant capacity, molecular mass distribution of polyphenolics, total phenolics, *ortho*-diphenols, flavonoids, oleuropein, verbascoside and rutin contents.

To conclude, the improvement of the microbial quality of air-dried olive leaves, without affecting phenolic composition and antioxidative properties, can be successively achieved by the application of gamma irradiation treatment.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The importance of functional foods, nutraceuticals, dietary supplements and other natural healthy products has been well recognized in connection with health promotion, disease risk reduction and reduction in health care costs. Therefore, there has been a growing interest in research, development and commercialization of these healthy products around the globe (Day, Seymour, Pitts, Konczak, & Lundin, 2009). Among nutraceuticals, phenolic compounds from natural sources have attracted great attention during the last decade, notably, due to their antioxidant contribution to human health (Benavente-Garcia, Castillo, Lorente, Ortuno, & Del Rio, 2000; Lee et al., 2009; Skerget et al., 2005).

Olive leaves from *Olea europaea* tree, native to the Mediterranean, could be considered as a nutraceutically valued material, owing to their high quality and quantity of their phenolic compounds. The main active phenolic constituents are oleuropein, verbascoside, luteolin-7-glucoside and rutin (Benavente-Garcia et al.,

2000; Hayes, Stepanyan, Allen, O'Grady & Kerry, 2010; Lee et al., 2009).

Olive leaves have been reported to have antioxidative, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, hypoglycemic, hypotensive and hypothyroidism properties (Anonymous, 2009). Historically, olive leaves had been used as a folk medicine for fever and malaria. Nowadays, this vegetable material is proved and recommended for treating many diseases, such as diabetes, cardiovascular diseases, viral and microbial infections (Anonymous, 2009).

Olive leaves can be used not only for therapeutic but also for cosmetic purpose and as food additive. In the past, powdered dried olive leaves were used as an ingredient for the preparation of a traditional food "Bsissa" in Tunisia. Recently, olive leaves extract has been investigated as an additive supplemented to food products, such as oils (Bouaziz, Fki, Jemai, Ayadi, & Sayadi, 2008) and meats (Hayes, Stepanyan, Allen, O'Grady, & Kerry, 2010), to extend shelf-life and impart the image of wholesomeness to consumers. Olive leaves are commercialized under several forms (intact leaves, powdered leaves, extract, etc.), for their benefits for human health.

Plant materials are highly susceptible to microbial contamination due to the medium (water and soil) in which they grow. Harvesting, storage and processing may cause additional contamination and microbial growth (Bhat, Sridhar, & Karim, 2010; Katusin-Razem, Novak, & Razem, 2001). Besides representing a

* Corresponding author at: Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Department of Biological and Chemical Engineering, National Institute of Applied Sciences and Technology (INSAT), 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, 1080 Tunis, Tunisia. Tel.: +216 98 326 675; fax: +216 71 704 329.

E-mail address: aouidifathia@yahoo.fr (F. Aouidi).

direct health hazard to consumers, such contaminated materials can also cause the spoilage of pharmaceuticals and food items to which they are added. Furthermore, the presence of microbial contaminants may also affect the efficacy and stability of active compounds of the plants during storage (Thomas, Senthilkumar, Kumar, Mandal, & Muraleedharan, 2008). Thus, an adequate technology for decontamination is required to improve the hygienic quality of plant materials and to make it suitable for human use and commercialization (Bhat et al., 2010; Katusin-Razem et al., 2001).

Conventional methods of microbial decontamination are fumigation with either gaseous ethylene oxide or methyl bromide, which are carcinogenic and hence are now prohibited or being increasingly restricted in most advanced countries for health, environmental or occupational safety reasons. Gamma irradiation is well known as a decontamination method for many foodstuffs and plant materials, being an environment friendly and effective technology to resolve technical problems in trade and commercialization (Khattak, Simpson, & Ihasnullah., 2009).

The phenolic composition of olive leaves and its antioxidant capacity have been well reported (Benavente-Garcia et al., 2000; Bouaziz et al., 2008; Lee et al., 2009).

To our knowledge, no studies have investigated the effect of gamma irradiation on phenolic composition and microbial load in olive leaves. Therefore, the present study aimed to evaluate the decontamination efficiency of gamma irradiation treatment of air-dried olive leaves. Powdered and intact samples were irradiated. The effect of this technology on the antioxidant capacity and phenolic content (total phenolics, *ortho*-diphenols, flavonoids, oleuropein, verbascoside and rutin contents and molecular mass distribution of polyphenolics) of olive leaves was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents and standards

Oleuropein, verbascoside and rutin were obtained from Extrasynthèse. ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, caffeic acid, gallic acid, formic acid, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), lys-ozym, blue dextran, diethylene glycol, sodium azide, sodium molybdate and sodium nitrate were obtained from Sigma. Sodium carbonate, ethanol and methanol were purchased from Riedel-de Haën. Methanol was of HPLC grade. Ethanol was of analytical grade. Folin–Ciocalteu phenol reagent, potassium persulfate and syringic acid were purchased from Fluka.

2.2. Sample preparation and irradiation treatment

Fresh olive leaves (*Olea europaea* L. var Chemlali North) were hand harvested randomly from a tree grown in National Institute of Applied Sciences and Technology (Tunis, Tunisia) in June 2009. Collected leaves (around 2 kg) were dried at room temperature (30 ± 5 °C) for one week in the dark and under ventilation. A part of the batch was powdered using a commercial grinder (Moulinex). 10 lots of dried intact olive leaves (IOL) (20 g each lot) and 10 lots of dried powdered olive leaves (POL) (50 g each lot) were packed hermetically in polyethylene bags.

Samples in duplicate were subjected to irradiation treatment at room temperature with a dose rate of 15.64 Gy min⁻¹ for the POL samples and with a dose rate of 18.2 Gy min⁻¹ for the IOL samples. The five doses used were 5, 10, 15, 20 and 25 kGy with a non-irradiated control.

After irradiation treatment, all samples were immediately stored at 4 °C until analysis.

Gamma irradiation was carried out using a carrier type irradiator equipped with a ⁶⁰Co source (C-188, MDS Nordion) at the National Center for Nuclear Sciences and Technologies (CNSTN), Tunis, Tunisia. The dose distribution was measured using a PMMA dosimeter (PMMA Instruments, Harwell, UK).

2.3. Microbial load analyses

Microbial load was evaluated by a plate count method. Samples (5 g) were decimal diluted serially with sterile solution (1% peptone, 0.5% sodium chloride). Total aerobic bacteria (TAB) were determined after 3 days incubation at 30 °C on the Plate Count Agar (PCA). Yeast and mold (YM) were determined on the Sabouraud Chloramphenicol Agar (SCA) after incubation for 3 days at 30 °C. Lactic acid bacteria (LAB) were determined on the Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) and were incubated for 24 h at 37 °C.

The microbial content of the samples was measured by observing the average number of viable cells, expressed as Colony forming units per gram (CFU g⁻¹), in the samples. The presented data are the average counts observed in three Petri dishes for each sample.

The percentage of the survival fraction was calculated according to the following formula:

$$\text{Survival fraction (\%)} = \frac{N}{N_0} * 100 \quad (1)$$

where N_0 is the microbial load in the control sample and N is the microbial load in the irradiated sample.

2.4. Determination of radiation D_{10} -values

The D_{10} -value was defined as the dose required inactivating one Log₁₀ cycle of the initial population. In other words, The D_{10} -value is the dose required to inactivate 90% of a population.

CFU survivors following each gamma irradiation processing were plotted on a logarithmic scale as a function of gamma irradiation dose, resulting in survivor curves. A linear regression equation for the type $y = ax + b$ was derived, where y is Log₁₀ (CFU) in each irradiation dose, x is the irradiation dose, and a is the slope.

$$a = \frac{-1}{D_{10}} \quad (2)$$

The D_{10} -value was determined by calculating the negative reciprocal of the survivor curve slope (Ayari, Dussault, Millette, Hamdi, & Lacroix, 2009).

2.5. Determination of total phenolic, *ortho*-diphenol and flavonoid contents in olive leaves extract

After irradiation, IOL samples were powdered. For all samples, the powders (1 g) were extracted by 50 ml methanol for 48 h. The extraction was performed at room temperature in the dark. The resulted extracts were centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The supernatants were recovered and used to determine the total phenolic, *ortho*-diphenol and flavonoid contents.

The concentration of total phenolic content in extracts was measured by UV spectrophotometry, based on a colorimetric oxidation/reduction reaction (Skerget et al., 2005). The oxidizing agent used was Folin–Ciocalteu reagent. To 0.5 ml of diluted extract, 2.5 ml of Folin–Ciocalteu reagent (diluted 10 times with water) was added and, after 8 min, 2 ml of Na₂CO₃ (75 g l⁻¹) was added. The sample was incubated for 5 min at 50 °C and then cooled. For the blank, 0.5 ml of methanol was used instead of the extract. The absorbance was measured at 760 nm against the reagent blank. Gallic acid in methanol was used as an external standard to prepare calibration curve in the range 0–70 mg l⁻¹

($Y = 0.0142X$; Y : The absorbance at 760 nm; X : gallic acid concentration; $R^2 = 0.9936$). The results were expressed in milligram of gallic acid equivalents per gram of dry matter of olive leaves (mg GAE g^{-1} DM).

Ortho-diphenol content was also determined by colorimetric reaction according to Blekas, Psomiadou, Tsimidou, and Boskou (2002). An aliquot (0.2 ml) of the methanol extract was diluted with water to a volume of 1 ml and then a 0.1 M phosphate buffer (1 ml) and a 5% sodium molybdate solution (2 ml) were added. For the blank, 0.2 ml of methanol was used instead of the extract. Absorbance was measured after 15 min at 350 nm against the reagent blank. Caffeic acid in methanol served as a standard for preparation of calibration curve in the range 0–100 $mg\ l^{-1}$ ($Y = 0.0049X$; Y : The absorbance at 350 nm; X : caffeic acid concentration; $R^2 = 0.9979$). The results were expressed in milligram of caffeic acid equivalents per gram of dry matter of olive leaves (mg CAE g^{-1} DM).

The content of total flavonoids was determined according to the method used by Lee et al. (2009). The sample solution (1 ml) was placed in a test tube with diethylene glycol (10 ml) and 1 N NaOH solution (1 ml) and allowed to stand for 30 min. For the blank, 1 ml of methanol was used instead of the extract. The absorbance was measured at 420 nm against the reagent blank.

Rutin in methanol served as a standard for the preparation of the calibration curve in the range 0–250 $mg\ l^{-1}$ ($Y = 0.0031X$; Y : The absorbance at 420 nm; X : rutin concentration; $R^2 = 0.9991$). The results were expressed in milligram of rutin equivalents per gram of dry matter of olive leaves (mg RE g^{-1} DM).

All determinations of the total phenolic, ortho-diphenol and flavonoid contents were performed in triplicate for each extract of olive leaves.

2.6. Determination of total antioxidant capacity

The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assessment of methanol extract was determined in terms of radical scavenging ability by using improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay (Re et al. (1999). Stock solution of ABTS⁺ radical cation was prepared by mixing 7 mM ABTS [2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] and 2.45 mM potassium persulfate. The ABTS⁺ solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 (± 0.03) at 734 nm and equilibrated at 30 °C. Ten microliters of sample was added to 1 ml ABTS⁺ solution and the absorbance decrease at 734 nm was recorded after 6 min. Percentage inhibition of oxidation (PI) was calculated for each sample according to the following equation:

$$PI(\%) = \frac{(OD_0 - OD_{6min}) * 100}{OD_0} \quad (3)$$

where OD_0 denotes the initial absorbance of diluted ABTS⁺ and OD_{6min} denotes the absorbance of the sample after 6 min of reaction.

Series of dilutions were prepared such that they produced between 20% and 80% inhibition of the blank absorbance. Trolox was used as an external standard to prepare the calibration curve in the range 125–312.5 $mg\ l^{-1}$ ($Y = 43.21X$; Y : percentage inhibition; X : Trolox concentration; $R^2 = 0.9961$). TEAC calculation was performed as following:

$$TEAC(mM) = \frac{PI * dilution}{43.21} \quad (4)$$

The results were expressed as millimoles Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (mM TEAC) in the methanol extract.

All determinations were performed in triplicate for each olive leaves extract.

2.7. HPLC analyses of phenolic compounds

HPLC analyses were performed with an analytical HPLC unit (Agilent technologies 1200 series), equipped with a diode array detector. The stationary phase was an Atlantis[®] Waters dC18 column (5 μm particle size; 250 mm; 4.6 mm).

The mobile phases were formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% B and installing a gradient to obtain 15% B at 3 min, 25% B at 13 min, 35% B at 25 min, 45% B at 35 min, 50% B at 40 min, 100% B at 45 min, 5% B at 46 min, and finally, re-equilibration for 4 min to return to the initial composition.

The flow rate was 0.9 $ml\ min^{-1}$ with elution at room temperature. The injection volume was 10 μl and chromatograms were recorded at 280 nm. The data were processed on the ChemStation Agilent technologies software.

Phenolic compounds in methanol extracts were identified by matching the retention time and the UV spectra of a peak in the extract chromatogram with the peak of a known standard compound. Identifications were confirmed by analyzing a sample supplemented by the corresponding standard.

Phenolic compounds quantification was achieved by calibration curves relative to external standards, developed by injecting different amounts of a known standard compound in the HPLC column (For oleuropein: $Y = 0.0032X$; $R^2 = 1.000$; for verbascoside: $Y = 0.001X$; $R^2 = 0.9990$; for rutin: $Y = 0.0012X$; $R^2 = 0.9989$, where Y : mass of the standard (μg) and X : air of corresponding peak).

2.8. Molecular mass distribution of polyphenolics

Chromatography gel filtration on Sephadex G-50 was used to analyze the polymeric aromatic fraction present in olive leaves aqueous extract. A powder (2 g) made from the olive leaves was mixed with water (20 ml). After 5 min, the mixture was centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The supernatant was recovered and filtered through a 1.2 μm filter. Three milliliters of this aqueous extract was placed on a Sephadex coarse G-50 column (2.5–60 cm) previously equilibrated with $NaNO_3$ 0.05 M containing 0.02% sodium azide at a flow rate of 0.6 $ml\ min^{-1}$. Sample was collected on the basis of 3 ml per tube. The optic density of these fractions was measured spectrometrically at 280 nm. The column was calibrated with syringic acid (MM = 198 Da), lysozym (MM = 15 kDa) and blue dextran (MM = 200 kDa) (Asses et al., 2009).

2.9. Statistical analyses

All measurements were carried out at least in duplicate. The mean values and standard deviations were calculated using Excel Software Version 2003 for Windows. The results were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) and multiple range tests using STATGRAPHICS Plus Software version 1.4 for Windows. For all analyses, parameters were considered significant at a 95% level when p -value < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Effect of gamma irradiation on microbial load of dried olive leaves

3.1.1. Microbial load of dried olive leaves

Total aerobic bacteria (TAB), yeast and moulds (YM) and lactic acid bacteria (LAB) are present in the non-irradiated control samples, at levels of 2.5×10^2 – 6.65×10^2 CFU g^{-1} , 1.62×10^2 – 1.71×10^2 CFU g^{-1} and 0.25 – 3.51×10^2 CFU g^{-1} , respectively. These levels were within the range of levels reported in black tea (Thomas et al., 2008) and in lotus *Nelumbo nucifera* rhizome (Khattak et al., 2009). The contamination of plant materials depends on

various parameters; such as processing history, the composition and the available surface of the materials (Katusin-Razem et al., 2001).

The obtained results showed that air-dried olive leaves contain microbial contaminants. Therefore, decontamination could be required in order to obtain safe olive leaves.

3.1.2. Decontamination dose

Gamma irradiation was investigated in order to improve microbiological quality of olive leaves samples, presented for the treatment in two forms (POL and IOL). Different doses of (0, 5, 10, 15, 20 and 25 kGy) were applied.

The treatment of olive leaves samples with ionizing radiation had a substantial effect on the total microbial load. Gamma irradiation of olive leaves samples was found to cause a reduction in microbial load proportional to the dose delivered, as shown in Fig. 1. The fraction of surviving microorganisms markedly decreased with the increase of applied dose. Significant reduction (p -value < 0.05) was obtained at the dose of 5 kGy. For 10 kGy dose, the rates of lethal fraction of all studied populations and in all samples were more than 60%. Results obtained demonstrate that the

contaminant microbes still survived at 15 kGy dose and treatment with doses from 20 kGy was proved sufficient to decrease the microbial load under the limit of the detection.

According to WHO (1999), the 20 kGy irradiated olive leaves samples could be considered safe for human consumption. A joint FAO/IAEA/WHO experts committee was convened to assess the safety and nutritional adequacy of food irradiated to doses above 10 kGy. They indicated that irradiation at doses above 10 kGy does not produce any toxicological hazards or nutritional or microbiological problems in food. They also concluded that food irradiated to any dose appropriate to achieve the intended technological objective is both safe to consume and nutritionally adequate (WHO, 1999).

Our results show that, like spices and tea, gamma irradiation could be successfully employed for olive leaves to reduce the contaminants of bacteria and fungal species, which may be responsible for the degradation of nutraceutical compounds.

No information in the literature is available on the effect of gamma irradiation on the microbial load of olive leaves, but decontamination of other plants materials following gamma irradiation are reported by several researchers. Khattak et al., 2009 indicated that the microbial load of *Nelumbo nucifera* rhizome were 3.8×10^2 CFU g^{-1} for bacterial count and 9.8×10^1 CFU g^{-1} for fungal count. A gamma irradiation treatment with a dose of 2 kGy was proved to be sufficient to decrease the microbial load of *Nelumbo nucifera* rhizome to less than 10 CFU g^{-1} . Thomas et al. (2008) reported that 7 kGy dose irradiation was effective to decontaminate black tea samples. However, an irradiation dose of ≥ 10 kGy was recommended to remove the microbial load of aniseed (*Pimpinella anisum*) (Al Bachir, 2007). In a recent study, Bhat et al. (2010) investigated the application of different doses of gamma irradiation (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 and 30 kGy) to lotus seeds for decontamination purpose. A significant dose-dependent decrease in the fungal contaminants was revealed. However, the contaminant yeasts could survive up to 10 kGy dose, which could be completely eliminated at 15 kGy. From the results obtained, a dose range between 10 and 15 kGy is recommended for complete decontamination of lotus seeds. Similar to our results, Kikuchi, Todoriki, Saito, and Hayashi (2003) reported that doses of 5, 10 and 15 kGy of gamma irradiation were insufficient to eliminate the contaminant microbes in *Enrei* and *Vinton* varieties of soybeans and have recommended higher doses of gamma irradiation (20 kGy) to attain total decontamination.

The lethal action of gamma irradiation on microorganisms is owing to various reactive oxygen species (ROS) produced during the treatment of foodstuff. ROS introduces some heavy lesions in deoxyribonucleic acid (DNA) molecules, which are one of the principal targets for radiation damage, preventing the DNA from functioning normally and inducing alteration of protein expression. Thus, it contributes to cellular damage (Bonura, Smith, & Kaplan, 1975).

3.1.3. Radioresistance of microbial load in olive leaves

The resistance of microflora to irradiation is expressed as a dose required for the first 90% reduction i.e. the dose required to reduce the initial microbial load by one log cycle (D_{10} -value).

The D_{10} -values determined in the present work were arranged between 9.74 and 25.12 kGy, depending on the microbial population and the form of samples (Fig. 2 and Fig. 3). Our D_{10} results were remarkably higher than those reported in literature (Table 1). Katusin-Razem, Matic, Razem, and Mihokovic (1988) studied the decontamination of Mint leaves (*Folium menthae*) by treatment with gamma irradiation. D_{10} -value in Mint leaves (*Folium menthae*) were 1.10 kGy for total aerobic plate count and 1.30 kGy for mold propagula. These values are widely low, in comparison with our findings. Total aerobic plate count and mold propagula were found

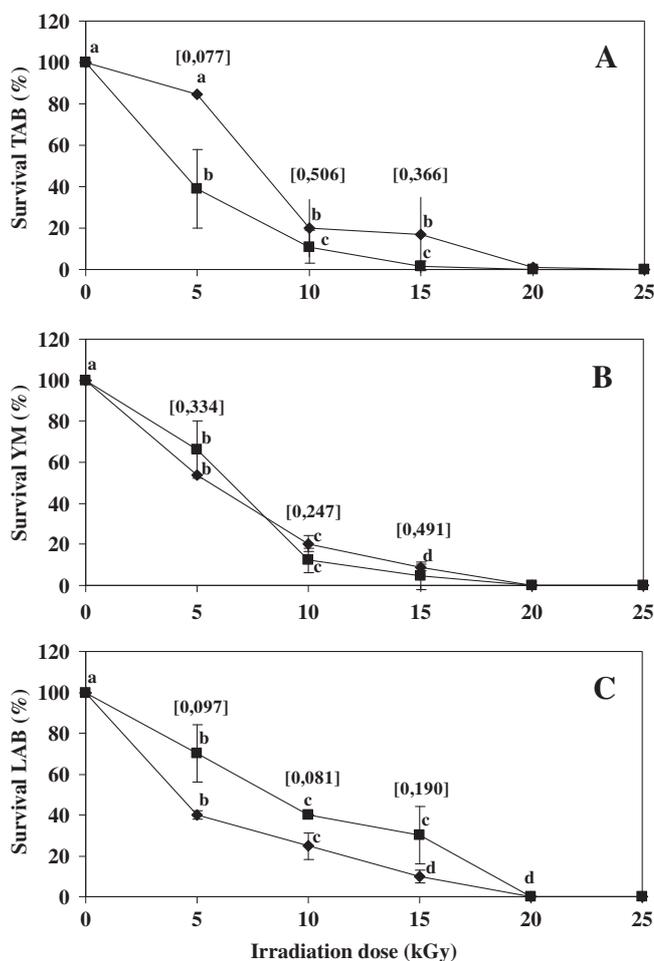


Fig. 1. Inactivation curves by gamma irradiation for total aerobic bacteria (TAB) (A), yeast and mold (YM) (B), and lactic acid bacteria (LAB) (C) in powdered olive leaves (POL) (◆) and in intact olive leaves (IOL) (■). All data were the mean of two replicates of samples and the vertical bars represent the standard deviations for each data point. Initial loads were 2.50×10^2 CFU g^{-1} of TAB, 1.71×10^2 CFU g^{-1} of YM and 3.51×10^2 CFU g^{-1} of LAB in POL and 6.65×10^2 CFU g^{-1} of TAB, 1.62×10^2 CFU g^{-1} of YM and 0.25 CFU g^{-1} of LAB in IOL. Values in square brackets are the p -Values determined by ANOVA between data for POL and IOL for each irradiation dose (the significance level was set at p -value < 0.05). Values in each curve with different letters differ significantly (p -value < 0.05).

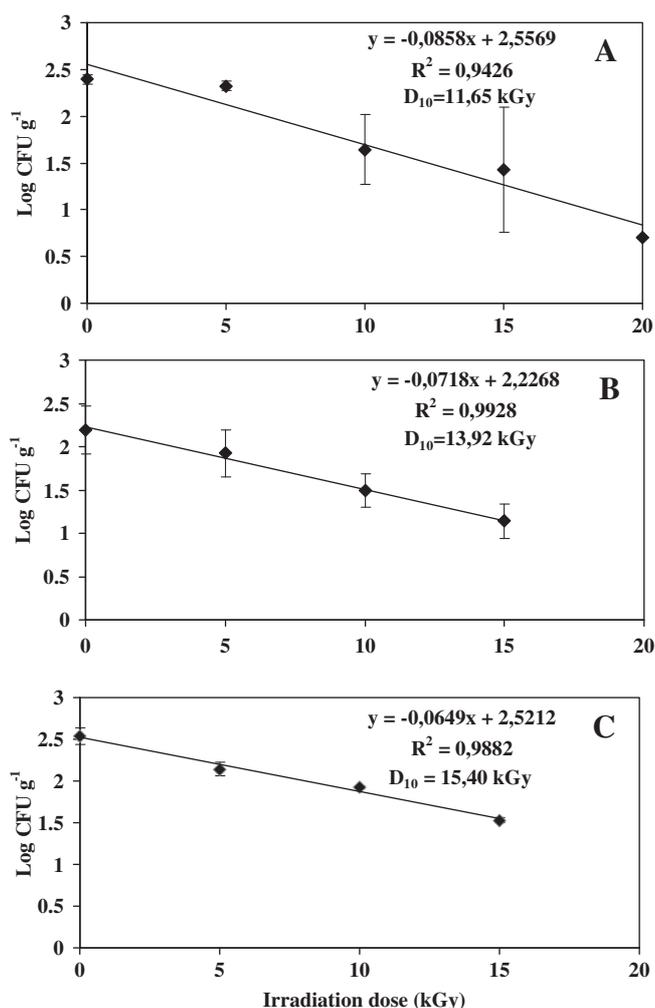


Fig. 2. Radioresistance curves of total aerobic bacteria (TAB) (A), yeast and mold (YM) (B), and lactic acid bacteria (LAB) (C) in powdered olives leaves (POL) and determination of D_{10} -values. All data were the mean of two replicates of samples and the vertical bars represent the standard deviations for each data point.

more radioresistant in Plantain seeds (*Semen plantaginis*), with D_{10} -value about 4.40 kGy and 3.80 kGy, respectively (Katusin-Razem et al., 2001). However, these results are also lower than our findings.

It seemed that the high radioresistance of microorganisms in olive leaves is owing to the low availability of water (a_w) and to the presence of phenolic compounds, among other factors. It was reported that various environmental factors affected the sensitivity of microorganisms to radiation. At a higher availability of water (a_w), the microorganisms are more sensitive to radiation because of more free radicals generated by the irradiation. It has been reported that the efficiency of gamma irradiation on populations of microorganisms increased with increasing moisture content of the sewage sludge. D_{10} values were 1.55, 1.25, 1.16, 1.10 and 1.02 kGy for the sludge moisture content of 2%, 20%, 40%, 60% and 80%, respectively (Al-Bachir, Al-Adawi, & Asma, 2003). Besides, phenolic compounds in olive leaves act as scavengers of the radicals (Lee et al., 2009) leaving fewer radicals to react with the organism. Therefore, the radiosensitivity of microorganisms in olive leaves was low.

The resistance of microorganisms to gamma irradiation is dependant on the kinds of population. In both POL and IOL samples, LAB was found the most radioresistant population, followed by YM and then by TAB. Previously, it has been reported that gram

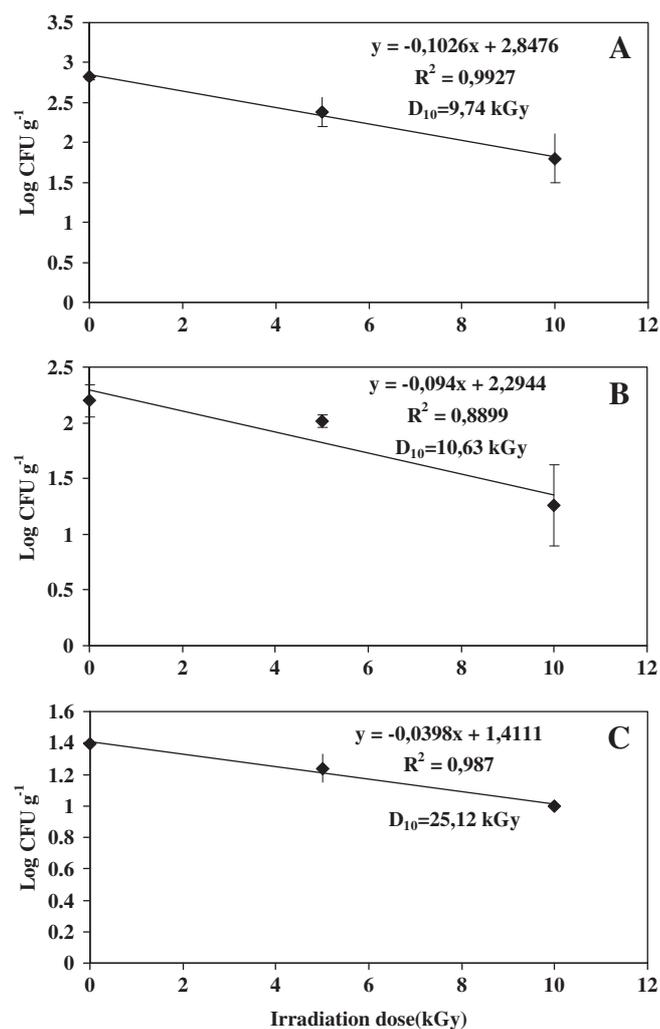


Fig. 3. Radioresistance curves of total aerobic bacteria (TAB) (A), yeast and mold (YM) (B), and lactic acid bacteria (LAB) (C) in intact olives leaves (IOL) and determination of D_{10} -values. All data were the mean of two replicates of samples and the vertical bars represent the standard deviations for each data point.

(+) bacteria, such as LAB, are more radioresistant than gram (–) bacteria (Ayari et al., 2009). For each irradiation dose and each population, the difference between the radioresistance of microorganisms on POL and on IOL was not statistically significant (p -Values > 0.05) (Fig. 1).

3.2. Effect of gamma irradiation on antioxidant capacity of olive leaves extract

Although irradiation is proven to be an adequate technology for the decontamination of olive leaves, the investigation of the effect of this treatment on antioxidative characteristics could be of interest when considering vegetable material as a food additive or medicinal plant.

The antioxidant capacity of methanol extract of irradiated and non-irradiated olive leaves samples was performed in terms of radical scavenging ability according to the ABTS/ $K_2S_2O_8$ method. It is expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Methanol extract of non-irradiated samples showed a TEAC value of 1.546 and 1.324 mM for POL and IOL samples, respectively. These results confirmed the findings of Benavente-Garcia et al. (2000), who obtained a TEAC value of 1.58 mM.

In the present study, gamma irradiation treatment did not show any significant effect (p -Values > 0.05) on antioxidant capacity of

Table 1
Dose D_{10} required for decimal reduction of microbial load in various materials by gamma irradiation treatment.

Irradiated materials	Microbial population	D_{10}^* (kGy)	Reference
Sewage sludge	Total microbial count	1.02–1.55	Al-bachir et al. (2003)
Mint leaves (<i>Folium menthae</i>)	Total aerobic plate count	1.10	Katusin-Razem et al. (1988)
Linden flowers (<i>Flos tiliae</i>)	Total aerobic plate count	1.40	Katusin-Razem et al. (1988)
Plantain seeds (<i>Semen plantaginis</i>)	Total aerobic plate count	4.40	Katusin-Razem et al. (2001)
Milled Plantain seeds (<i>Semen plantaginis</i>)	Total aerobic plate count	9.90	Katusin-Razem et al. (2001)
Intact olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Total aerobic bacteria	9.74	This work
Powdered olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Total aerobic bacteria	11.65	This work
Linden flowers (<i>Flos tiliae</i>)	Mold propagula	0.80	Katusin-Razem et al. (1988)
Mint leaves (<i>Folium menthae</i>)	Mold propagula	1.30	Katusin-Razem et al. (1988)
Plantain seeds (<i>Semen plantaginis</i>)	Mold propagula	3.80	Katusin-Razem et al. (2001)
Intact olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Yeast and mold	10.63	This work
Powdered olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Yeast and mold	13.92	This work
Powdered olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Lactic acid bacteria	15.40	This work
Intact olive leaves (<i>olea europaea</i>)	Lactic acid bacteria	25.12	This work

* D_{10} is the dose required to inactivate a 1Log_{10} cycle of the initial population.

both POL and IOL samples (Table 2). This could be attributed to the low water content, which limited the possibility of free radicals being formed (Murcia et al., 2004). In fact, radiolysis of water results in the production of radicals such as hydrated electrons, hydroxyl radicals and hydrogen atoms. These radicals may break some bonds, leading to the possible structure modifications of some active principles that have antioxidant capacity.

Though various researchers have worked on the antioxidant capacity of olive leaves (Altiok, Baycin, Bayraktar, & Ulku, 2008; Benavente-Garcia et al., 2000; Kiritsakis et al., 2010; Lee et al., 2009), nothing was reported on the effect of gamma irradiation on this property. However, the effect of the irradiation technology on antioxidant capacity was reported for other plants and spices. Our finding was in agreement with that of Lee, Jo, Sohn, Kim, and Byun (2006), who reported the absence of a significant effect of gamma irradiation at 20 kGy on antioxidant capacity of green tea byproducts and green tea leaf extracts. Murcia et al. (2004) also revealed that irradiation up to 10 kGy did not have any effect on the antioxidant capacities of seven dessert spices.

Nevertheless, some studies indicated an enhancement of antioxidant capacity by gamma irradiation processing of some vegetable materials, such as almond skin treated up to a 16 kGy dose (Harrison & were, 2007) and *Nelumbo nucifera* rhizome treated up to a 6 kGy dose (Khattak et al., 2009). Gamma irradiation could also reduce the antioxidant capacity as observed in *Glycyrrhiza glabra* root treated up to a 25 kGy dose (Khattak & Simpson, 2010).

3.3. Effect of gamma irradiation on phenolic compounds content in dried olive leaves

The nutraceutical property of olive leaves is attributed to phenolic compounds, which play an antioxidant role by reducing the

Table 2
Antioxidant capacity in olive leaves presented in intact and powdered forms to gamma irradiation at different doses.

Irradiation dose (kGy)	Antioxidant capacity (mM TE)	
	Powdered olive leaves (POL)	Intact olive leaves (IOL)
0	1.54 ± 0.09ab	1.32 ± 0.30a
5	1.57 ± 0.13 a	1.79 ± 0.29a
10	1.60 ± 0.15a	1.55 ± 0.48a
15	1.36 ± 0.17b	1.81 ± 0.27a
20	1.55 ± 0.07ab	1.37 ± 0.52a
25	1.49 ± 0.15ab	1.47 ± 0.29a

TE: Trolox equivalents.

Results were expressed as Mean ± standard deviation. All results were the mean of at least 4 replicates.

Values in each column with different letters differs significantly (p -Values < 0.05).

free radicals and the reactive oxygen species. Gamma irradiation could modify the structure of phenolic compounds, depending on the environmental conditions. Therefore, it is interesting to investigate the effect of gamma irradiation on phenolic compounds content in treated olive leaves.

3.3.1. Total phenolics content

The total phenolics content of irradiated and control samples of olive leaves was determined in methanol extracts using the Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Table 3). The total phenolics contents were 53.05 and 63.98 mg g⁻¹ DM in the POL and IOL control samples, respectively. An earlier study by Kiritsakis et al. (2010) reported that total phenolics contents in olive leaves of three Greek cultivars were 60.9, 55.7 and 61.9 mg g⁻¹ DM. While, Lee et al. (2009) found 148 mg g⁻¹ of total phenolics in 80% ethanol extract of olive leaves.

Gamma irradiation at all the tested doses (5, 10, 15, 20 and 25 kGy) did not affect significantly the total phenolics content (p -Values > 0.05) in both POL and IOL samples, in comparison with non-irradiated control samples.

This result was in agreement with that of Koseki et al. (2002) who did not observe any significant changes in the total phenolics content of sweet basil (*Ocimum basilicum* Linné) at doses up to 30 kGy. A similar observation was reported for green tea byproducts and green tea leaf extracts treated by gamma irradiation at dose of 20 kGy (Lee et al., 2006). However, gamma irradiation treatments have been shown to either increase or decrease the total phenolics content of plants materials, which is dependent on the dose delivered and the raw material used. Khattak et al. (2009) reported that gamma irradiation treatment at dosage levels of 1, 2, 4 and 6 kGy increased the yield of total phenolics in *Nelumbo nucifera* rhizome. A similar effect was observed on irradiated almond skin (Harrison & Were, 2007). In contrast to this, it has been found that gamma irradiation, up to 30 kGy (10 intervals), decreased total phenolics in dehydrated rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linné) (Koseki et al., 2002).

3.3.2. Ortho-diphenols content

Total phenolics content in olive leaves has been reported in the past (Boudhrioua, Bahloul, Ben Slimen & Kechaou, 2009; Kiritsakis et al., 2010; Lee et al., 2009), but to our knowledge, no previous studies were carried out on ortho-diphenols content in olive leaves. Ortho-diphenols, especially hydroxytyrosol and caffeic acid, are the most active antioxidants among the olive phenols. Ortho-diphenols levels (Table 3) were 9.46 and 8.52 mg g⁻¹ DM in POL and IOL control samples, respectively.

The effect of gamma irradiation on the ortho-diphenols contents in olive leaves depends on the delivered dose and on the form of

Table 3

Total phenolics, *ortho*-diphenols and flavonoids contents in olive leaves presented in intact and powdered forms to gamma irradiation at different doses.

Form of presentation	Irradiation dose (kGy)	Total phenolics content (mg GAE g ⁻¹ DM)	<i>Ortho</i> -diphenols content (mg CAE g ⁻¹ DM)	Flavonoids content (mg RE g ⁻¹ DM)
Powdered olive leaves (POL)	0	53.05 ± 1.61ab	9.46 ± 0.72a	18.68 ± 0.27a
	5	50.11 ± 1.56a	8.19 ± 0.68b	14.62 ± 0.96c
	10	54.21 ± 1.44b	11.57 ± 0.68c	17.75 ± 0.29ab
	15	50.66 ± 4.53ab	10.05 ± 0.19a	16.71 ± 1.09b
	20	53.46 ± 3.37ab	9.31 ± 0.20ab	20.19 ± 1.13d
	25	53.18 ± 2.02ab	9.98 ± 1.52a	20.16 ± 1.43d
Intact olive leaves (IOL)	0	63.98 ± 3.47a	8.52 ± 2.91ab	18.65 ± 0.44a
	5	56.61 ± 1.39b	7.47 ± 1.50ab	15.03 ± 0.52a
	10	59.12 ± 3.18ab	9.03 ± 0.56ab	16.05 ± 0.27a
	15	60.96 ± 7.61ab	10.20 ± 1.49a	15.23 ± 2.23a
	20	59.23 ± 2.93ab	7.34 ± 1.94b	18.07 ± 3.74a
	25	62.09 ± 1.86ab	7.82 ± 2.01ab	18.11 ± 4.19a

GAE: gallic acid equivalents; CAE: caffeic acid equivalents; RE: rutin equivalents; DM: dry matter.

Results were expressed as mean ± standard deviation. All results were the mean of at least 4 replicates.

Values in each column with different letters differs significantly (*p*-Values < 0.05).

Table 4

Effect of gamma irradiation on oleuropein, verbascoside and rutin contents in intact and powdered olive leaves samples.

Form of presentation	Irradiation dose (kGy)	Oleuropein (mg g ⁻¹ DM)	Verbascoside (mg g ⁻¹ DM)	Rutin (mg g ⁻¹ DM)
Powdered Olive leaves (POL)	0	27.47 ± 0.06a	0.79 ± 0.12a	0.60 ± 0.04a
	5	27.96 ± 3.12a	0.77 ± 0.10a	0.80 ± 0.12a
	10	25.16 ± 3.05a	0.66 ± 0.06a	0.72 ± 0.04a
	15	22.78 ± 1.79a	0.55 ± 0.08a	0.67 ± 0.06a
	20	24.21 ± 2.13a	0.60 ± 0.15a	0.71 ± 0.08a
	25	23.17 ± 2.11a	0.58 ± 0.08a	0.67 ± 0.11a
Intact olive leaves (IOL)	0	19.86 ± 0.54a	0.20 ± 0.04a	0.94 ± 0.13a
	5	20.79 ± 1.70a	0.14 ± 0.01a	0.61 ± 0.08a
	10	17.11 ± 1.80a	0.15 ± 0.01a	0.62 ± 0.04a
	15	17.46 ± 2.28a	0.15 ± 0.04a	0.64 ± 0.11a
	20	18.13 ± 1.30a	0.20 ± 0.01a	0.86 ± 0.22a
	25	18.96 ± 2.11a	0.20 ± 0.04a	0.95 ± 0.19a

DM: dry matter.

Results were expressed as mean ± standard deviation. All results were the mean of 2 replicates.

Values in each column with different letters differs significantly (*p* < 0.05).

samples presentation to treatment (POL or IOL). Statistical analysis by ANOVA showed a significant variation (*p*-Values < 0.05) in *ortho*-diphenols content in POL samples, depending on irradiation dose. While no significant effect (*p*-Values > 0.05) was observed for irradiated IOL samples, in comparison with the control. *Ortho*-diphenols in IOL seemed to be protected from the action of gamma irradiation, owing to the compartmentalization.

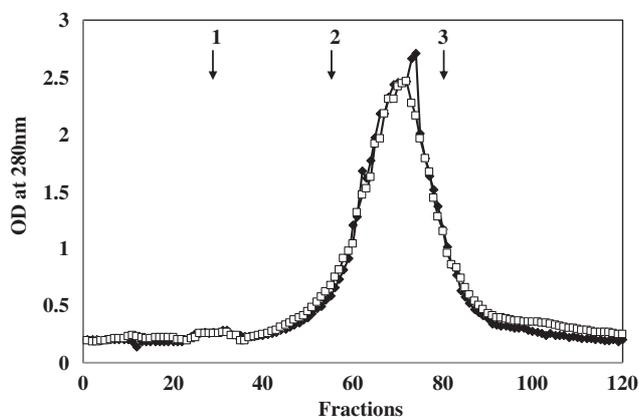


Fig. 4. Effect of gamma irradiation of powdered olive leaves on molecular mass distribution of polyphenolics: The elution pattern of aqueous extract from non-irradiated (◆) and 20 kGy irradiated (□) sample, obtained by gel filtration chromatography on Sephadex G50. 1: Blue dextran (MM = 200 kDa), 2: Lysosym (MM = 15 kDa), 3: Syringic acid (MM = 198 Da).

3.3.3. Flavonoids content

The flavonoids contents were determined in methanol extracts. The non-irradiated olive leaves showed 18.68 and 18.65 mg g⁻¹ DM of flavonoids in POL and IOL samples, respectively (Table 3).

It should be mentioned that the levels of flavonoids contents in this investigation were lower than that found in an 80% ethanol extract (58 mg g⁻¹) (Lee et al., 2009). However, when considering the abundance percent of flavonoids against total phenolics, our finding (about 29%–35%) was in the range of level reported by Lee et al. (2009) (39%).

One of the prominent and medically most useful properties of many flavonoids is their ability to scavenge free radicals (Benavente-Garcia et al., 2000).

The gamma irradiation treatment did not have any detrimental effect on flavonoids contents in IOL samples. However, treated POL samples showed significant variation (*p*-Values < 0.05) of flavonoids content, comparing to the control. This finding is in agreement with that of *ortho*-diphenols contents.

There is no information available in the literature on the effect of gamma irradiation on the flavonoids content of olive leaves. However for other plant materials, diverse effects of radiation have been reported.

Koseki et al. (2002) showed that there was no significant effect of irradiation, up to 30 kGy, of three herbs: sweet basil (*Ocimum basilicum* Linné), Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linné) and Artichoke (*Cynara scolymus* Linné). Also, gamma irradiation (1–6 kGy) did not affect some flavonoids, notably ellagic acid derivatives and quercetin concentrations, in strawberries (Breitfellner, Solar,

& Sontag, 2002). Nevertheless, this treatment noticeably diminished some other flavonoids, notably catechin and kaempferol components, in strawberries materials (Breitfellner et al., 2002).

3.3.4. Molecular mass distribution of polyphenolics

Gel filtration chromatography on Sephadex G50 was used to analyze the polymeric aromatic fraction present in aqueous extract of olive leaves. The elution pattern of untreated POL sample (Fig. 2) showed one peak, corresponding to a family of aromatics with molecular mass between 198 Da (molecular mass of syringic acid) and 15,000 Da (molecular mass of lysosym).

The elution pattern of irradiated POL sample at a 20 kGy dose coincides with that of the untreated POL sample. Thus, it can be concluded that gamma irradiation did not affect the molecular mass distribution of polyphenolics in olive leaves. According to this result, it could be suggested that gamma irradiation of air-dried olive leaves does not lead to polymerization, hydrolysis or oxidation of polyphenolic compounds.

3.3.5. HPLC analyses of methanol extract

HPLC analyses were carried out in order to quantify three phenolic compounds (Oleuropein, verbascoside and rutin) in the methanol extract of olive leaves samples. Table 4 showed the content of oleuropein, verbascoside and rutin in the control and the irradiated samples of POL and IOL.

Oleuropein was found to be the major phenolic compound in olive leaves as reported by many authors (Benavente-Garcia et al., 2000; Kiritsakis et al., 2010; Lee et al., 2009).

Oleuropein contents in the control sample were 27.47 and 19.86 mg g⁻¹ DM in POL and IOL, respectively. These levels were consistent with the finding of Japon-Lujan, Luque-Rodriguez, and de Castro (2006) who extracted up to 23 mg g⁻¹ of oleuropein. Altiok et al. (2008) extracted 2 to 91 mg g⁻¹ of oleuropein, depending on extraction solvent. Verbascoside (0.79 mg g⁻¹ DM in POL and 0.20 mg g⁻¹ DM in IOL) and rutin (0.60 mg g⁻¹ DM in POL and 0.94 mg g⁻¹ DM in IOL) were minor phenolic compounds in olive leaves. The level of verbascoside is within the range of levels reported by Japon-Lujan et al. (2006) (0.4 mg g⁻¹). However, the level of rutin is markedly lower than those showed by Altiok et al. (2008) (around 0.5–20 mg g⁻¹, depending on extraction solvent).

Gamma irradiation did not have any significant effect (*p*-Values > 0.05) on oleuropein, verbascoside and rutin contents in both the POL and IOL samples. In a previous study (Schindler, Solar, & Sontag, 2005), it was shown that gamma irradiation treatment (2, 4, and 6 kGy) markedly reduced the concentration of rutin in tomato.

4. Conclusion

The results of our investigations showed that the gamma irradiation treatment effectively reduces the numbers of microorganisms present in air-dried olive leaves. A dose of 20 kGy was required to decontaminate the studied materials. Microbial populations in this material are highly radioresistant (D₁₀: 9.74–25.12 kGy). The high radioresistance seemed to be attributed to the presence of phenolic compound and to the low availability of water in dried olive leaves.

Despite the high doses, the irradiation dose up to 25 kGy didn't alter the antioxidant capacity, molecular mass distribution of polyphenolics, total phenolics, *ortho*-diphenols, flavonoids, oleuropein, verbascoside and rutin contents in olive leaves.

To conclude, gamma irradiation is a promising technology for decontamination of air-dried olive leaves. In fact, it improves microbial quality of olive leaves without altering the phenolic composition and the antioxidative properties. (Fig. 4).

Acknowledgments

This research was financially supported by the Tunisian Ministry of Scientific Research, Technology and Competences Development. The authors gratefully acknowledge the National Center for Nuclear Sciences and Technologies for the irradiation operations. The authors are also thankful to the Mediterranean Institute of Ecology and Palaeoecology UMR CNRS/IRD for providing all the facilities to conduct HPLC analyses.

References

- Al-Bachir, M. (2007). Effect of gamma irradiation on microbial load and sensory characteristics of aniseed (*Pimpinella anisum*). *Bioresource Technology*, 98, 1871–1876.
- Al-Bachir, M., Al-Adawi, M. A., & Asma, M. (2003). Synergetic effect of gamma irradiation and moisture content on decontamination of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 90, 139–143.
- Altiok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., & Ulku, S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342–348.
- Anonymous (2009). Olive leaf. *Alternative medicine review*, 14(1), 62–66.
- Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Ben Rejeb, I., Gargouri, M., & Hamdi, M. (2009). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology*, 100(7), 2182–2188.
- Ayari, S., Dussault, D., Millette, M., Hamdi, M., & Lacroix, M. (2009). Changes in membrane fatty acids and murein composition of *Bacillus cereus* and *Salmonella Typhi* induced by gamma irradiation treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 1–6.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L-leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457–462.
- Bhat, R., Sridhar, K. R., & Karim, A. A. (2010). Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(9), 976–981.
- Blekas, G., Psomiadou, E., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 340–346.
- Bonura, T., Smith, K. C., & Kaplan, H. S. (1975). Enzymatic induction of DNA double strand breaks in gamma irradiated *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 72, 4265–4269.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., & Kechaou, N. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29, 412–419.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., & Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from *Chemlali* olive leaves. *Food Chemistry*, 108, 253–262.
- Breitfellner, F., Solar, S., & Sontag, G. (2002). Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research and Technology*, 215, 28–31.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 388–395.
- Harrison, K., & Were, L. M. (2007). Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of Almond skin extracts. *Food Chemistry*, 102, 932–937.
- Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N., & Kerry, J. P. (2010). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Science*, 84(4), 613–620.
- Japon-Lujan, R., Luque-Rodriguez, J. M., & de Castro, M. D. L. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108(1), 76–82.
- Katusin-Razem, B., Matic, S., Razem, D., & Mihokovic, V. (1988). Radiation decontamination of tea herbs. *Journal of Food Science*, 53, 1120–1126.
- Katusin-Razem, B., Novak, B., & Razem, D. (2001). Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 62, 261–275.
- Khattak, K. F., & Simpson, T. J. (2010). Effect of gamma irradiation on the antimicrobial and free radical scavenging activities of *Glycyrrhiza glabra* root. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 507–512.
- Khattak, K. F., Simpson, T. J., & Ihasnullah (2009). Effect of gamma irradiation on the microbial load, nutrient composition and free radical scavenging activity of *Nelumbonucifera* rhizome. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 206–212.
- Kikuchi, O. K., Todoriki, S., Saito, M., & Hayashi, T. (2003). Efficacy of soft-electron (low-energy electron beam) for soybean decontamination in comparison with gamma-rays. *Journal of Food Science*, 68, 649–652.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 369–376.
- Koseki, P. M., Villavicencio, A. L. C. H., Brito, M. S., Nahme, L. C., Sebastiao, K. I., Rela, P. R., et al. (2002). Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 681–684.

- Lee, N. Y., Jo, C., Sohn, S. H., Kim, J. K., & Byun, M. W. (2006). Effects of gamma irradiation on the biological activity of green tea byproduct extracts and a comparison with green tea leaf extracts. *Journal of Food Science*, *71*, 269–274.
- Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., et al. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, *100*, 6107–6113.
- Murcia, M. A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jiménez, A. M., & Martínez-Tomé, M. (2004). Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*, 1872–1881.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.
- Schindler, M., Solar, S., & Sontag, G. (2005). Phenolic compounds in tomatoes. Natural variations and effect of gamma-irradiation. *European Food Research and Technology*, *221*, 439–445.
- WHO. (1999). *High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy, Report of a joint FAO/IAEA/WHO study group. WHO technical Report Series 890*. Geneva: World Health Organization.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simonic, M., & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, *89*, 191–198.
- Thomas, J., Senthilkumar, R. S., Kumar, R. R., Mandal, A. K. A., & Muraleedharan, N. (2008). Induction of γ -irradiation for decontamination and to increase the storage stability of black teas. *Food Chemistry*, *106*, 180–184.

Conclusion & Perspectives

Conclusion & Perspectives

Les pays méditerranéens, et en particulier la Tunisie, possèdent un patrimoine oléicole très important. Dans ces pays, la culture et l'industrie oléicole engendre des quantités énormes de feuilles d'olivier, généralement sous-exploitées. Des études scientifiques montrent des valeurs ajoutées importantes des feuilles d'olivier, dont principalement leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Ceci nous a encouragé à étudier et proposer des voies de valorisation de cette biomasse renouvelable pour un développement durable du secteur oléicole et la contribution à la connaissance scientifique internationale dans ce domaine.

Au terme de ces travaux de thèse, des résultats promoteurs ont été obtenus et ils ont été présentés dans trois grandes parties.

Les travaux de recherche de la 1^{ère} partie ont été orientés vers un volet analytique. L'objectif de cette partie était l'application d'une approche novatrice de spectroscopie moyen infrarouge à transformé de Fourier (FT-MIR) associée à des traitements chimiométriques, pour des analyses qualitatives et quantitatives des feuilles d'olivier. Cette méthode analytique est une technique prometteuse en raison de ses multiples avantages (sa simplicité, sa rapidité, son cout faible...).

Dans l'optique d'une analyse qualitative, des feuilles d'olivier de 5 variétés tunisiennes ont été collectées (75 lots) et préparées pour être analysées par spectroscopie FT-MIR. Une banque des données spectrales a été établie. Des traitements chimiométriques des différents spectres MIR ont été effectués. L'analyse en composante principale a montré la discrimination des spectres MIR des feuilles d'olivier selon leur classe variétale. Pour chaque variété, un modèle de classification a été construit en utilisant la méthode discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA : Partiel Least Square-Discriminant Analysis). Les cinq modèles construits ont été démontré acceptables avec des coefficients de détermination R^2 proche de 1 (0,96 à 0,98), des erreurs standard de calibration SEC faibles (0,047 à 0,073), des

erreurs standard de prédiction SEP faibles (0,182 à 0,216) et des biais faibles (-0,019 à -0,083). Les modèles construits ont permis une correcte classification (100%) des 5 variétés tunisiennes étudiées. Ainsi, nous avons mise en évidence la possibilité de la reconnaissance variétale des oliviers en analysant des feuilles d'olivier, matériel persistant tout l'année, par la méthode rapide de spectroscopie FT-MIR combinée avec des traitements chimiométriques.

Étant donné que les feuilles d'olivier représentent une source d'oleuropéine (composé phénolique d'intérêt), nous avons examiné le potentiel quantitatif de la spectroscopie FT-MIR, combinée avec des traitements chimiométriques, pour le dosage de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier. Les valeurs de référence des concentrations de l'oleuropéine dans 105 échantillons ont été déterminées par la méthode de HPLC. Les mêmes échantillons ont été analysés par spectroscopie FT-MIR. Les données spectrales ont été corrélées avec les valeurs de référence des concentrations de l'oleuropéine en appliquant la méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS : Partiel Least Square). Le modèle de régression obtenue est satisfaisant, avec une erreur relative de prédiction de 8 % et un coefficient de corrélation de 0,91 et 0,74 respectivement pour les données de calibration et de celles de validation. Ainsi, nous pouvons proposer la spectroscopie FT-MIR comme méthode alternative à la méthode de HPLC pour la quantification de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier. L'intérêt de cette méthode innovante découle dans la rapidité des analyses. En faite, une analyse par spectroscopie FTIR dure quelques minutes tandis qu'une analyse HPLC dure 50 min.

Concernant les travaux de recherche relatifs à la 2^{ème} partie de la présente thèse, l'objectif était l'étude de la potentialité de l'utilisation des feuilles d'olivier (sous forme de poudre ou d'extrait) comme additif alimentaire. Le modèle alimentaire utilisé était la viande bovine hachée.

Au terme des études microbiologiques, nous avons trouvé que l'extrait des feuilles d'olivier montre un effet antimicrobien contre les 4 germes pathogènes étudiés (*Listeria monocytogène*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica sérovar zanzibar* et *Pseudomonas aeruginosa*) et qui ont été inoculés artificiellement dans les viandes bovines hachées. Une dose de 50 µg de phénol dans l'extrait/g de viandes hachées est suffisante pour la diminution du nombre du survivants des pathogènes étudiées durant la conservation réfrigérée des viandes hachées crues. Outre, l'extrait des feuilles d'olivier a diminué la thermorésistance des germes pathogènes, par effet antimicrobien synergique. De ces résultats, nous pouvons suggérer l'utilisation du l'extrait des feuilles d'olivier pour la préservation des viandes bovines hachées contre les pathogènes.

La préservation de la qualité microbiologique, en termes du nombre de flore mésophile aérobie totale et du nombre des coliformes totaux, des viandes bovines hachées crues par effet du l'extrait des feuilles d'olivier a été aussi observée. Ces résultats témoignent l'augmentation de la date limite de consommation (DLC) de la viande bovine hachée en présence d'extrait des feuilles d'olivier. La DLC, déterminée par la méthode de vieillissement accéléré, s'élève de 8 jours pour le témoin à 11 et 17 jours pour les échantillons contenant respectivement les doses 50 et 150 µg de phénols /g de viandes crues conservées à une température de +4°C.

Outre la préservation de la qualité microbiologique, nous avons montré l'effet préservatif des feuilles d'olivier (en forme d'extrait ou de poudre) contre l'altération oxydative des viandes bovines hachées crues et cuites durant la conservation réfrigérée. En effet, les feuilles d'olivier ont limité l'oxydation de l'oxymyoglobine en méthyoglobine et des lipides. Et ainsi, elles retardent le brunissement de la couleur et l'apparition du goût du rancissement.

L'incorporation des feuilles d'olivier (en forme d'extrait ou de poudre) a aussi amélioré les qualités technologiques des viandes bovines hachées. En effet, les échantillons additionnés des feuilles d'olivier possèdent des pH proches à la neutralité et ainsi ils montrent des pertes à la conservation, à la cuisson et à la décongélation plus faibles par rapport à celles du témoin. Une amélioration de la capacité de rétention d'eau et du rendement technologique de saumurage-cuisson de NAPOLE - c.à.d. l'aptitude à la transformation- ont été aussi obtenues par effet d'ajout des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées.

Ces résultats biochimiques et technologiques ont été notés pour les doses testées 100 et 150 µg de phénols /g de viandes bovines hachées crues. Pour ces même doses, les feuilles d'olivier, que ce soit incorporées en forme d'extrait ou de poudre, n'influe pas significativement les propriétés sensorielles des viandes bovines crues et cuites.

Au terme de ces résultats, nous avons mis en évidence les propriétés techno-fonctionnelles des feuilles d'olivier dans un modèle alimentaire. Et ainsi, nous pouvons proposer les feuilles d'olivier comme additif alimentaire potentiel pour la préservation des viandes hachées.

Dans la 3^{ème} partie des travaux de recherche de cette présente thèse, notre intérêt a été porté vers l'étude des effets du deux traitements technologiques (traitement thermique et traitement d'irradiation) sur les composés phénoliques et les capacités antioxydants des feuilles d'olivier.

Nos résultats montrent que les conditions de préparation des tisanes des feuilles d'olivier (temps, température et dose) affectent la composition phénolique et le pouvoir antioxydant du l'extrait obtenu. Un traitement de décoction (ébullition) des feuilles sèches en poudre est le

plus favorable, par rapport à un traitement de macération, pour l'obtention d'une tisane avec une meilleure extractabilité des composés phénoliques et un meilleur pouvoir antioxydant. Nous avons aussi trouvé qu'un traitement d'ébullition diminue la concentration en phénols totaux mais il augmente le pouvoir antioxydant d'un extrait aqueux des feuilles d'olivier. Nous avons démontré que cet effet est dû à un phénomène d'hydrolyse des polymères phénoliques et à l'augmentation significative des pourcentages d'abondance de rutine, oleuropéine et acide caféique dans l'extrait. Ainsi, un traitement thermique pourrait être de grande utilité pour l'amélioration des capacités antioxydantes et de l'extractabilité des composés phénoliques dans une tisane des feuilles d'olivier.

A propos du traitement des feuilles d'olivier par irradiation ionisante gamma, l'étude microbiologique a montré que la dose de décontamination est 20 kGy pour les 2 formes sèches des feuilles d'olivier (complètes et en poudre). Vu la faible teneur en eau des feuilles sèches d'olivier et leur richesse en composés phénoliques, la radiorésistance de sa population microbienne a été trouvée élevée. En fait, les valeurs de D_{10} sont 9,74-11,65 kGy pour les bactéries aérobies totales ; 10,63-13,90 kGy pour les levures et moisissures ; et 15,40-25,12 kGy pour les bactéries lactiques. L'irradiation gamma jusqu'à une dose de 25 kGy (à intervalle de 5 kGy) n'avait pas significativement affecté la teneur en phénols totaux, en *ortho*-diphénols, en flavonoïdes, en oleuropéine, en verbascoside et en rutine. La distribution des polyphénols selon leur masse moléculaire, analysée par chromatographie par filtration sur gel Sephadex, n'a pas été aussi modifiée. La capacité antioxydante a été aussi maintenue dans la gamme des doses utilisées d'irradiation gamma. Ainsi, le traitement par irradiation gamma pourrait être suggéré comme technique de décontamination des feuilles d'oliviers, qui améliore la qualité microbiologique de ce matériel tout en préservant sa composition phénolique et ses propriétés antioxydantes.

Comme perspective à la 1^{ère} partie de cette présente thèse, il serait intéressant de continuer l'étude spectroscopique FT-MIR des feuilles d'olivier, tout en incluant différents variables (tel que : le temps de collecte des feuilles d'olivier, l'âge des feuilles, l'âge des oliviers, les conditions climatiques, l'origine géographique...). Cette étude plus approfondie est indispensable pour améliorer la robustesse des modèles de prédiction variétale et de prédiction de la teneur de l'oleuropéine dans les feuilles d'olivier.

Une étude d'intégration de l'approche FT-MIR dans la méthodologie globale de la reconnaissance variétale des oliviers serait de grande utilité, pour être adopté par le conseil oléicole international.

Les résultats de la 2^{ème} partie de la présente thèse, concernant l'incorporation des feuilles d'olivier dans les viandes bovines hachées, sont encourageants. Cependant, il est indispensable d'évaluer la toxicité de cet additif. L'aliment formulé constitue par définition un aliment fonctionnel. Des études plus poussées (in vivo, étude clinique...) devront être effectuées afin d'évaluer l'effet bénéfique pour la santé des feuilles d'olivier tout en étant mélangées avec les viandes bovines hachées.

L'étude de l'effet des différents traitements technologiques sur plusieurs fonctions thérapeutiques (activité hypoglycémiant, activité hypolipidémique, activité anti-inflammatoire, activité anti-cancérogène, activité antimicrobienne) des feuilles d'olivier pourrait constituer une continuité pour la 3^{ème} partie de la présente thèse.

Références Bibliographiques

Liste des références bibliographiques

A

Abaza, L., Talorete, TP., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk, M., Isoda, H., (2007). Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 71(5), 1306-1312.

Akemi, M., Masamichi, I., Masanori, O., Noriaki, O., (2001). Cosmetic for protecting and improving aged skin having AGEs degrading activity/Cosmetic having AGEs degrading activity and effective in protecting and improving aged skin. Patent written in Japanese. JP 99-300806 19991022, 5 pp.

Alba, V., Montemurro, C., Sabetta, W., Pasqualone, A., Blanco, A., (2009). SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea L.* diffused in Southern-Italy. *Scientia Horticulturae*, 123, 11-16.

Al-Azzawie, H.F., Alhamdani, M.S., (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 78(12), 1371-1377.

Alibes, X., Berge, Ph., (1983). Valorización de los subproductos del olivar como alimentos para los rumiantes en España. Division de la Production Animale. FAO, Rome, 1983.

Al-Jowder, O., Kemsley, E.K., Wilson, R. H., (1997). Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: a feasibility study. *Food Chemistry*, 59 (2), 195-201.

Allen, K., Cornforth, D., (2010). Comparison of spice-derived antioxidants and metal chelators on fresh beef color stability. *Meat Science*, 85 (4), 613-619.

Allouche, Y., Uceda, M., Jiménez, A., Aguilera, M.P., Gaforio, J.J., Beltran, G., (2009). Fruit Quality and Olive Leaf and Stone Addition Affect Picual Virgin Olive Oil Triterpenic Content. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (19), 8998-9001.

Altioek, E., Baycin, D., Bayraktar, O., Ulku, S., (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348.

Andreadou, I., Iliodromitis, E.K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, D.T., (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr.*, 136(8) : 2213-2219.

Ashwell, M., (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific basis for all claims. *Public Health Nutrition*, 4, 859-863.

Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M., (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114-129.

B

Bahloul, N., Boudhrioua, N., Kechaou, N., (2008). Moisture desorption-adsorption isotherms and isosteric heats of sorption of Tunisian olive leaves (*Olea europaea L.*). *Industrial Crops and Products*, 28, 162-176.

- Baldi, A., Romani, A. Tatti, S., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., (1995). HPLC analysis of polyphenolic compounds present in *Olea europaea* L. (cv. *Leccino*). Colloq. Inst. Natl. Rech. Agron., 69 (Polyphenols 94), 269-270.
- Banwell, C. N., (1983). *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. McGraw-Hill, New-York.
- Bao, J., Zhang, D.W., Zhang, J.Z.H., Lee Huang, P., Lin Huang, P., Lee-Huang, S., (2007). Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. FEBS Letters, 581 (14), 2737-2742.
- Bayçin, D., Altıok, E., Ülkü, S., Bayraktar, O., (2007). Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Antioxidants on Silk Fibroin. J. Agric. Food Chemistry, 55 (4), 1227-1236.
- Belaj, A., Trujillo, I., De la Rosa, R., Rallo, L., (2001). Polymorphism and Discrimination Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm Bank. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126(1), 64-71.
- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., Baldoni, L., (2004). Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of Arbequina and Manzanilla de Sevilla olive. HortScience, 39, 1566-1570.
- Bellisle, F., Blundell, J.E., Rogers, P.J., Hill, A.J., (1987). *Evaluating the satiating power of foods: implications for acceptance and consumption*. In : Food Acceptance and Nutrition, (JSolms, DABooth, RMPangbourne & ORaunhardt, eds), pp. 205–219. Academic Press: London.
- Benakmoum, A., Abbeddou, S., Ammouche, A., Kefalas, P., Gerasopoulos, D., (2008). Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. Food Chemistry, 110, 684-690.
- Ben Akacha, N., Gargouri, M., (2009). Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid /gas reactor. Process Biochemistry, 44 (10), 1122-1127.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J. A., (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L-leaves. Food Chemistry, 68(4), 457-462.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Alcaraz, M., (2002). Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. J Med Food, 5(3), 125-35.
- Berkel, B.M, Boogaard, B., Heijnen, C., (2005). La conservation du poisson et de la viande. Traduction : Josiane Bardon, Première édition en français : 1994, Deuxième édition révisée 2005. Digigrafi, Wageningen, Pays-Bas, pp. 90.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., Bervillé, A., (2001). Cultivar identification in olive based on RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126, 668-675.
- Beullens, K., Kirsanov, D., Irudayaraj, J., Rudnitskaya, A., Legin, A., Nicolai, B.M., Lammertyn, J., (2006). The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. Sensors and Actuators B, 116, 107-115.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. Sapiirstein, H.D., (2005). Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. Cereal Chem., 82(4), 390-393.

- Biesalski, H. K., (2005). Meat as a component of a healthy diet-Are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70, 509-524.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Pharm Pharmacol*, 51(8), 971-974.
- Blekas, G., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D., (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 340-346.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Christaki, E., Botsoglou, N., (2010). Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 121, 17-22.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S., (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (1), 179-184.
- Bouaziz, M., Sayadi, S., (2003). High yield extraction of oleuropein from chemlali olives and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols actualités*, 23, 11-15.
- Bouaziz, M., Sayadi, S., (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 497-504.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108, 253-262
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Kouhila, M., Nabil, K. (2008a) . Sorptions isotherms and isosteric heats of sorption of olive leaves (Chemlali variety): Experimental and mathematical investigations. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 167-175.
- Boudhrioua, N., Kouhila, M., Kechaou, N., (2008b). Experimental and mathematical investigations of convective solar drying of four varieties of olive leaves. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 176-184.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*, 29, 412-419.
- Bouillet, A., Duchene, M., Deroanne, C.I., (1982). Conservation en congélation et réfrigération de la viande hachée de boeuf et de porc: évolution de la flore microbienne et des Propriétés physico-chimiques en cours de stockage, Volume 5, Number 6.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., Trujillo, I., (2009). SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122, 209-215.
- Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., Nucci, R., (2002). Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 93, 109-119.
- Briante, R., Patumi, M., Febbraio, F., Nucci, R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, 111, 67-77.

Broncano, J.M., Petrón, M.J., Parra, V., Timón, M.L., (2009). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in *Latissimus dorsi* muscle of Iberian pigs. *Meat Science*, 83, 431-437.

Bruneton, J., (1993). *Pharmacognosie. Technique et documentation*-Lavoisier, Paris, p.278.

Buege, J.A., Aust, S.D., (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 306.

Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J.M., Renard, C.M.G.C., (2009). Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 115, 1133-1140.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of food Microbiology*, 940, 223-253.

C

Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V. Mulet, A., Rodríguez, L., Riera, E., (2010). Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves *Physics Procedia*, 3(1), 147-152.

Cardoso, C., Mendes, R., Nunes, M.L., (2008). Development of a healthy low-fat fish sausage containing dietary fibre. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 276-283.

Careaga, M., Fernandez, E., Dorantes, L., Mota, L., Jaramillo, M.E., Hernandez-Sanchez, H., (2003). Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 83, 331-335.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6), 1914-1920.

Casale, M., Sinelli, N., Oliveri, P., Di Egidio, V., Lanteri, S., (2010a). Chemometrical strategies for feature selection and data compression applied to NIR and MIR spectra of extra virgin olive oils for cultivar identification. *Talanta*, 80, 1832-1837.

Casale, M., Zunin, P., Cosulich, M-E., Pistarino, E., Perego, P., Lanteri, S., (2010b). Characterisation of table olive cultivar by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 122 (4), 1261-1265.

Castro, W.F., Mariutti, L.R.B., Bragagnolo, N., (2011). The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. *Food Chemistry*, 124, 126-131.

Cava, R., Tarrega, R., Ramirez, M. R., Mingoarranz, F. J., Carrasco, A., (2005). Effect of irradiation on colour and lipid oxidation of dry-cured hams from free-range reared and intensively reared pigs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 135-141.

Chéret, R., (2005). Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Thèse de Doctorat. École Polytechnique de l'Université de Nantes. France.

Chiou, A., Kalogeropoulos, N., Salta, F.N., Efstathiou, P., Andrikopoulos, N.K. (2009). Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1090-1097

Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., (2002). Microsatellite markers isolated in Olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 223-228.

Coll, D., Mathonnet, J.P., Zannini, G., (2000). Composition à destination cosmétique et/ou diététique contenant un mélange de lycopène et d'extrait de feuille d'olivier. Brevet rédigé en français. PCT/FR2000/001105. WO/2000/066078.

Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., Carlini, E.A., (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35(1), 45-54.

Conseil Oléicole International (2006). L'oléiculture en Tunisie.

Coxam, V., Delzenne, N., (2008). Aliments fonctionnels, Tec & Doc.

Cronquist, A., (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.

D

Defernez, M., Kemsley, E.K., Wilson, R.H., (1995). The use of infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of fruit puree. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 109-113.

DeJong, S., Lanari, M. C., (2009). Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chemistry*, 116, 892-897.

Dekanski, D., Janicijevic-Hudomal, S., Tadic, V., Markovic, G., Arsic, I., Mitrovic, D. M., (2009). Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Journal of the Serbian chemical society*, 74 (4), 367-377.

Delgado-Pertinez, M., Gomez-Cabrera, A., Garrido, A., (2000). Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Animal Feed Science and Technology*, 87, 187-201.

De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., Ranalli, G., (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226 (4), 653-659

De Lucas, A., Martinez de la Ossa, E., Rincón, J., Blanco, M.A., Gracia, I., (2002). Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3), 221-228.

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.

Di Donna, L., Mazzotti, F., Naccarato, A., Salerno, R., Tagarelli, A., Taverna, D., Sindona, G. (2010). Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 121, 492-496.

Doveri, S., Gil, F. S., Diaz, A., Reale, S., Busconi, M., Camara Machado, A., Martin, A., Fogher, C., Donini, P., Lee, D., (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea L.*). *Scientia Horticulturae*, 116, 367-373.

Duarte, I. F., Barros, A., Delgadillo, I., Almeida, C., Gil, A. M., (2002). Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3104-3111.

E

Edelmann, A., Diewok, J., Schuster, K. C., Lendl, B., (2001). Rapid method for the determination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1139-1145.

El-Etre, A.Y., (2007). Inhibition of acid corrosion of carbon steel using aqueous extract of olive leaves. *Journal of Colloid and Interface Science*, 314, 578-583.

El-Hadad, N.N.M., Youssef, M.M., Abd El-Aal, M.H., Abou-Gharbia, H.H., (2011). Utilisation of red palm olein in formulating functional chocolate spread. *Food Chemistry*, 124, 285-290.

Erbay, Z., Icier, F., (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91, 533-541.

Ergulen, E., Ozkaya, M.T., Ulger, S., Ozilbey, N., (2002). Identification of some Turkish olive cultivars by using RAPD-PCR technique. *ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing*.

Esmaili-Mahani, S., Rezaeezadeh-Roukerd, M., Esmailpour, K., Abbasnejad, M., Rasouljan, B., Sheibani, V., Kaeidi, A., Hajjalizadeh, Z., (2010). Olive (*Olea europaea L.*) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 200-205.

Essadki, M., Ouazzani, N., (2003). Résultats préliminaires de l'identification des variétés d'olivier à l'aide des marqueurs génétiques ISSR. *Olivae*, 97, 42-45.

European Commission Community Research (2000). Project Report: *Functional food science in Europe*, Volume 1; *Functional food science in Europe*, Volume 2; *Scientific concepts of functional foods in Europe*, Volume 3. EUR-18591, Office for Official Publications of the European Communities, L-2985, Luxembourg.

F

Farag, R.S., Mahmoud, E.A., Basuny, A.M., (2007). Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 107-115.

Fayed A.M., El-Ashry M.A. et Aziz H.A., (2009). Effect of Feeding Olive Tree Pruning By- Products on Sheep Performance in Sinai. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5, 436-445.

Fegeros, K., Zervas, G., Apsokardos, F., Vastardis, J., Apostolaki, E. (1995). Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*, 17, 9-15.

- Fernandez, K., Agosin, E., (2007). Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-Transform Mid-Infrared spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 7294-7300.
- Fonollá, J., Díaz-Ropero, P., De la Fuente, D.E., Quintela, J.C., (2010). MS358 one-month consumption of an olive leaf extract enhances cardiovascular status in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis Supplements*, 11(2), 182
- Formanek, Z., Kerry, J.P., Higgins, F.M., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science* 58, 337-341.
- Food and Drug Administration, 1998. *Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. AOAC. International, USA.
- Functional Food Science in Europe (1998). *British Journal of Nutrition*, 80(1), S1-S193.
- Furneri, P.M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., Bisignano, G., (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents.*, 20(4), 293-296.
- Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Nicolaides, D.N., (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* 10 (30), 3813-3833.

G

- Galtier, O., Le Dréau, Y., Ollivier, D., Kister, J., Artaud, J., Dupuy, N., (2008). Lipid compositions and French Registered Designations of Origins of virgin olive oils predicted by chemometric analysis of Mid-Infrared spectra, *Applied Spectroscopy*, 62 (5), 583-590.
- Galtier, O., Abbas, O., Le Dréau, Y., Rebufa, C., Kister, J., Artaud, J., Dupuy, N., (2011). Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. *Vibrational Spectroscopy*, 55 (1), 132-140.
- Garcia-Gomez, A., Roig, A., Bernal, M.P., (2003). Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86, 59-64.
- García-Iñiguez de Ciriano, M., García-Herreros, C., Larequi, E., Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2009). Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in α -3 PUFA. *Meat Science*, 83, 271-277.
- Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L., (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25, 865-869.
- Ghedira, K., (2008). L'Olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.
- Ghoreishi, S.M., Gholami Shahrestani, R. (2009). Subcritical water extraction of mannitol from olive leaves. *Journal of Food Engineering*, 93 (4), 474-481.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., Tsaganos, T., Sabracos, L., Karagianni, V., Pelekanou, E., Tzepi, I., Kranidioti, H., Koussoulas, V., Giamarellou, H., (2006). Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock*, 26(4), 410-416.

Giao, M.S., Gonzalez-Sanjose, M.L., Rivero-Perez, M.D., Pereira, C.I., Pintado, M.E., Malcata, F.X., (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of Science Food & Agriculture*, 87, 2638-2647.

Giroux, H.J., Houde, J., Britten, M., (2010). Use of heated milk protein-sugar blends as antioxidant in dairy beverages enriched with linseed oil. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1373-1378.

Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J., Osuna, I., (1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*. 58(6), 513-515.

Govaris, A., Botsoglou, E., Moulas, A., Botsoglou, N., (2010). Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *South African Journal of Animal Science*, 40 (2), 145-155.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S., (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 175-180.

Guinda, Á., Albi, T., Pérez-Camino, M.C., Lanzón, A., (2004). Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*olea europaea*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 22-26.

Gurdeniz, G., Ozen, B., (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*, 116 (2), 519-525.

Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 194-198.

H

Habtemariam, S., (2003). Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon*. 41 (6), 723-7.

Hamdaoui, O., (2009). Removal of cadmium from aqueous medium under ultrasound assistance using olive leaves as sorbent. *Chemical Engineering and Processing*, 48, 1157-1166.

Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., Bervillé, A. (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 116, 280-290.

Haoyuan, S., (2006). Method for preparing olive leaf extract. Patent written in Chinese : CN 1002-4178 20050303. 6pp.

Harborne, J. B., Simmonds, N. W., (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp. 101.

Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., O'Brien, N.M., Kerry, J.P. (2009). The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Science*, 83 (2), 201-208.

Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. (2010). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Science*, 84 (4), 613-620.

- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126 (3), 948-955.
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., Kerry, J.P., (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 164-172.
- Hayouni, E.A. , Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., Hamdi, M., (2008). Tunisian *Salvia officinalis L.* and *Schinus molle L.* essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242-251.
- Hdeib, T.M., Hassawi, D.S., (2006). Genetic Analysis of Jordanian Olive (*Olea europaea L.*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2 (2), 95-102.
- 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.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., et al., (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Hiroshi, K., Teruhiko, N., Kyoichiro, H., Yasuhiro, Y., (2008). Antioxidizing substance obtained by subjecting extract from olive leaf to yeast treatment. Japanese Patent JP2008201715.
- Honikel, K.O., (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447-457.
- Hu, G., Huang, S., Cao, S., Ma, Z., (2009). Effect of enrichment with hemicellulose from rice bran on chemical and functional properties of bread. *Food Chemistry*, 115, 839-842.
- Hugas, M., (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, S139-S150.
- Huang, S.C., Shiau, C.Y., Liu, T.E., Chu, C.L., Hwang, D.F., (2005). Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Science*, 70, 613-619.
- Huang, L., Sites, J. (2007). Automatic control of a microwave heating process for in-package pasteurization of beef frankfurters. *Journal of Food Engineering*, 80, 226-233.
- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X., Wang, Y., (2011). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat Science*, 87, 46-53.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.

I

- Idrissi, A., Ouazzani, N., (2003). Apport des descripteurs morphologiques à l'inventaire et à l'identification des variétés d'olivier (*Olea europaea L.*). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 136, 1-10.

International Food Information Conseil : www.ific.org/nutrition/functional

J

Japon-Lujan, R., Luque de Castro, M.D. (2006). Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1136, 185-191

Japon-Lujan, R., Luque-Rodriguez, J.M., Luque de Castro, M.D., (2006a). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108, 76-82.

Japon-Lujan, R., Ruiz-Jimnez, J., Luque de Castro, M.D., (2006b). Discrimination and Classification of Olive Tree Varieties and Cultivation Zones by Biophenol Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26), 9706-9712.

Jemai, H., Bouaziza, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S., (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions* 176, 88–98

Jimenez, P., Masson, L., Barriga, A., Chávez, J., Robert, P., (2011). Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113 (4), 497-505.

Julián Castillo, J., Alcaraz, M., Benavente-García, O., (2010). Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 951-958.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626- 631.

K

Kamoun, N.G., Ouazzani, N., Trigui A., (2002). Characterizing isozymes of some Tunisian olive (*Olea europaea L.*) cultivars. *ISHS Acta Horticulturae* 586: IV International Symposium on Olive Growing.

Karakaya, S., (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6), 453-64.

Karoui, R., Mazerolles, G., Bosset, J.O., de Baerdemaeker, J., Dufour, E., (2007). Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses. *Food Chemistry*, 105 (2), 847-854.

Karray, B., Msallam, M., Ksantini, M., Mahjoub Boujnah, D., Grati Kamoun, N., (2009). L'Institut de l'Olivier – Tunisie: Programmes et acquis de recherches pour la rénovation de la filière huile d'olive et l'amélioration de ses performances. Ministère de l'Agriculture, IRESA, Institut de l'Olivier, Tunisia.

Kavkler, K., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Demsar, A. (2011). FTIR spectroscopy of biodegraded historical textiles. *Polymer Degradation and Stability*, 96, 574-580.

Kelley, M.S., Wooden, D.H., (2009). The composition of dust in Jupiter-family comets inferred from infrared spectroscopy. *Planetary and Space Science*, 57 (10), 1133-1145

- Khalil, M.M.H., Ismail, E.H., El-Magdoub, F., (2010). Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2010.11.011 (article in press)
- Khanmohammadi, M., Garmarudi, A.B., (2011). Infrared spectroscopy provides a green analytical chemistry tool for direct diagnosis of cancer. *Trends in Analytical Chemistry*, **In Press, Corrected Proof**.
- Khayyal, M.T., El-Ghazaly, M.A., Abdallah, D.M., Nassar, N.N., Okpanyi, S.N., Kreuter, M.H., (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*, 52(11), 797-802.
- Kijowski, J., (2001). Muscle proteins. In: *Chemical and functional properties of food proteins*. S. Z.E. Lancaster, PE, Technomic Publishing Co., Inc. pp. 233-269.
- Kim, Y.H., Keeton, J.T., Yang, H.S., Smith, S.B., Sawyer, J.E., Savell, J.W. (2009). Color stability and biochemical characteristics of bovine muscles when enhanced with L- or D-potassium lactate in high-oxygen modified atmospheres. *Meat Science*, 82, 234-240.
- Kimura, Y, Sumiyoshi, M., (2009). Olive Leaf Extract and Its Main Component Oleuropein Prevent Chronic Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Damage and Carcinogenesis in Hairless Mice. *Journal of Nutrition*, 139 (11), 2079-2086.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., Kiritsakis, A., (2010). Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87 (4), 369-376.
- Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K. Ohta, Y. Tsakada, Y., (2003). Identification of Anti- α -Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Sci. Technol. Res.*, 9(1), 35-39.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., (2008), Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*, 28 (1), 76-87.
- Kurt, S., Zorba, O. (2009). The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of "sucuk" - A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science*, 82, 179-184.
- Kuwajima, H., Uemura, T., Takaishi, K., Inouye, H., (1988). Monoterpene glucosides and related natural products. Part 60. A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 27, 1757-1759.
- Kyoji, K., (1999). Pulverization treatment of olive leaf. Japanese Patent JP 2934959.
- Kyoji, K., Kazuo, K., (1999). Manufacture of fermented liquid tea from olive leaves. Patent written in Japanese. JP 11262378 A 19990928, 4 pp.

L

- Lacroix, M., Ouattara, B., Saucier, L., Giroux, M., Smoragiewicz, W., (2004). Effect of gamma irradiation in presence of ascorbic acid on microbial composition and TBARS composition of ground beef coated with an edible active coating. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 71-75.
- Laguerre, M., Lopez Giraldo, L.J., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M.C., Pina, M., Benaissa, M., Combe, A., Rossignol Castera, A., Lecomte, J., Villeneuve, P., (2009). Characterization of Olive-

Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay. *J Am Oil Chem Soc*, 86, 1215-1225.

Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., Bogiatzis, F., (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127(4), 1521-1525.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

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.

Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K., Kim, Y.C., (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100, 6107-6113.

Lee, O.H., Lee, B.Y., (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10), 3751-3754.

Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P.L., Chang, Y.T., Huang, P.L., (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 307(4), 1029-1037.

Le Floch, F., Tena, M.T, Ríos, A., Valcárcel, M., (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46 (5), 1123-1130.

Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*. 76, 69-75.

Leslie, N., (1998). Method for producing extract of olive leaves. United States Patent 5714150.

Leslie, N., (1999). Method for producing extract of olive leaves and extract produced thereby. WIPO Patent Application WO/1999/038383.

Le Tutour, B., Guedon, D., (1992). Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31, 1173-1178.

Lianji, M., Chen, N., (1989). Research in improving the water holding capacity of meat in sausage products. In Proceedings of 35th 16 International Congress on Meat Science and Technology, (pp.781-786), 20-25, Copenhagen, Denmark.

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.

Linton, M., McClements, J.M.J., Patterson, M.F. (2004). Changes in the microbiological quality of vacuum-packaged, minced chicken treated with high hydrostatic pressure, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 151-159.

Lo Scalzo, R., Scarpati, M.L., Verzebnassi, B., Vita, G., (1994). *Olea europaea* chemical repellent to *Dacis oleae* females. J. Chem. Ecol., 20, 1813-1923.

Loukas, M., Krimbas, C.B., (1983). History of Olive cultivars based on their genetic distances. Journal of Horticultural Science, 58, 121-127.

Luciano, G., Vasta, V., Monahan, F.J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M., Priolo, A., (2011). Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of longissimus dorsi muscle from lambs fed a tannin-containing diet. Food Chemistry, 124, 1036-1042.

Luisa García, M., Calvo, Marta M., Dolores Selgas, M. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. Meat Science, 83, 45-49.

Lungu, B., Johnson, M. G., (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 °C. Journal of Food Protection, 68, 855-859.

M

Maâmouri, O., Rouissi, H., Dridi, S., Kammoun, M., De Baerdemaeker, J., Karoui, R., (2008). Mid infrared attenuated total reflection spectroscopy as a rapid tool to assess the quality of Sicilo-Sarde ewe's milk during the lactation period after replacing soybean meal with scotch bean in the feed ration. Food Chemistry, 106 (1), 361-368.

Macheix J.-J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P., (2003). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Dans Les polyphénols en agroalimentaire; Sarni-Manchado P. et Cheynier V., Eds.; Lavoisier: Paris; pp 1-28.

Mackey, B.M., Kerridge, A.L., (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. International Journal of Food Microbiology, 6, 57-65.

Mahrour, A., Caillet, S., Nketsia-Tabiri, J., Lacroix, M., (2003). Microbial and sensorial quality of marinated and irradiated chicken. Journal of Food Protection, 66, 2156-2159.

Malik, N. S.A., Bradford, J. M., (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina" olives. Scientia Horticulturae 110, 274-278.

Malik, N.S.A., Bradford, J.M. (2008). Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. Journal of Food, Agriculture & Environment, 6(2): 8-13.

Maragkoudakis, P.A. , Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D., Tsakalidou, E., (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. International Journal of Food Microbiology, 130, 219-226.

Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I., (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses. 46(3-4), 132-136.

Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Ann. Cardiol. Angéiol. 51, 304-315.

Martin-Garcia, A.I., Moumen, A., Yáñez Ruiz, D.R., Molina Alcaide, E., (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61-74.

Martin-Garcia, A.I., Molina-Alcaide, E., (2008). Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 142, 317-329.

Martin-Garcia, I., Yanez Ruiz, D., Moumen, A., Molina Alcalde, E., (2006). Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Research*, 61, 53-61.

Masataka, K., Nobuhiko, K., Tadakazu, H., (2007), Antiallergic agent. Patent written in Japanese. JP 2007182403 A 20070719. 8pp.

Mauriello, G., Ercolini, D., La Stora, A., Casaburi, A., Villani, F., (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 314-322.

Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A., (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.*, 66(2-3):129-36.

Miljkovic, D., Dekanski, D., Miljkovic, E., Momcilovic, M., Mostarica-Stojkovic, M., (2009). Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Nutrition*, 28, 346-350.

Mohagheghi, F., Bigdeli, M. R., Rasouljan, B., Hashemi, P., Rashidi, M.P., (2011). The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia *Phytomedicine*, 18 (2-3), 170-175.

Molette, C., (2004). Analyse protéomique d'altérations de propriétés sensorielles et technologiques de la viande de dinde. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.

Mourtzinis, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., Karathanos, V.T., (2007). Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (20), 8088-8094.

Movsumov, I.S., Aliev, A.M., Tagieva, Z.D., (1987). Pharmacochemical studies of olives grown in the Azerbaijan Soviet Socialist Republic. *Farmatsiya (Moscow)*, 36, 32-34.

Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(5), 977-985.

N

Naveau, J., Pommeret, P., Lechaux, P., (1985). Proposition d'une méthode de mesure du rendement technologique « le rendement Napoléon ». *TechniPorc.*, 8(6), 7-13.

Nefzaoui A., (1995). Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March 1995.

Noriyuki, H., Masato, T., (2006). Olive leaf tea and its manufacture by boiling materials before extraction. Patent written in Japanese. JP 2006191854 A 20060727. 25 pp.

Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, K.P., (2008). Meat spoilage during distribution. Meat Science, 78, 77-89.

O

Ogihara, H., Yatuzuka, M., Horie, N., Furukawa, S., Yamasaki, M., (2009). Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. Food Control, 20, 963-966.

Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J., (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. Industrial Crops and Products, 4, 23-31.

Orozco-Solano, M., Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D. (2010). Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1217, 1227-1235

Orsat, V., Bai, J., Raghavam, G. S. V., Smith, J. P., (2004). Radiofrequency heating of ham to enhance shelf-life in vacuum packaging. Journal of Food Engineering, 27, 267-283.

Ozkaya, M.T, et Celik, M., (1999). Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. Acta Horticulturae, 474, 477-480.

Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., Di Giusto, F., (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild Olive trees (*Olea europaea* L.). Journal of Heredity, 84, 34-42.

Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., (1995). Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'Olivier (*Olea europaea* L.). Agronomie, 15, 31-37.

P

Pagnol, J., (1996). L'Olivier. Aubanel Ed, France.

Paiva-Martins, F., Correia, R., Fealix, S., Ferreira, P., Gordon, M.H., (2007). Effects of Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Leaves. J. Agric. Food Chem., 55, 4139-4143.

Paiva-Martins, F., Pinto, M., (2008). Isolation and Characterization of a New Hydroxytyrosol Derivative from Olive (*Olea europaea*) Leaves. J. Agric. Food Chem., 56 (14), 5582-5588.

Panagiotis, K., (2007). Isolation of oleuropein from the leaves of olive tree. European Patent Application EP1795201.

Parra, V., Viguera, J., Sánchez, J., Peinado, J., Espárrago, F., Gutierrez, J.I., Andrés, A.I., (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. Meat Science, 84 (4), 760-768.

Pasqualone, A., Caponio, F., (2001). Inter-simple Sequence Repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. European Food Research and Technology, 213, 240-243.

Panizzi, L., (1960). The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 1449-85.

Peng, X., Maa, J., Cheng, K.W., Jiang, Y., Chen, F., Wang, M., (2010). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119, 49-53.

Pereira, A. P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) Leaves. *Molecules*, 12, 1153-1162.

Perrin, J.L., (1992). Détermination de l'altération dans « Manuel des corps gras ». Paris TEC DOC, Lavoisier, 2: 1198-1218.

Perrinjaquet-Moccetti, T., Busjahn, A., Schmidlin, C., Schmidt, A., Bradl, B., Aydogan, C., (2008). Food Supplementation with an Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Reduces Blood Pressure in Borderline Hypertensive Monozygotic Twins. *Phytotherapy research*, 22, 1239-1242.

Piette, G., Buteau, M. E., de Halleux, D., Chiu, L., Raymond, Y., Ramaswany, H. S., et al. (2004). Ohmic cooking of processed meats and its effects on product quality. *Journal of Food Science*, 69, E71-E78.

Pinheiro, P.B.M., Esteves da Silva, J.C.G., (2005). Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L. *Analytica Chimica Acta*, 544, 229-235.

Pinnell-Sheldon, R., Omar Mostafa, M., (2004). Topical composition comprising olive leaf extract. United States Patent 6743449.

Pinnell-Sheldon, R., Omar Mostafa, M., (2003). Olive leaf extraction method and formulations containing olive leaf extract. United States Patent Application 20030152656 10/074974.

Piskernik, S., Klancnik, A., Riedel, C.T., Brondsted, L., Mozina, S.S., (2011). Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, 22, 718-724.

Puel, C., Mathey, J., Agalias, A., Kati-Coulibaly, S., Mardon, J., Obled, C., Davicco, M.J., Lebecque, P., Horcajada, M.N., Skaltsounis, A.L., Coxam, V., (2006). Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin Nutr.*, 25(5), 859-868.

Q

Quinebèche, S., Navarro, C., Gnanou, Y., Fontanille, M., (2009). In situ mid-IR and UV-visible spectroscopies applied to the determination of kinetic parameters in the anionic copolymerization of styrene and isoprene. *Polymer*, 50 (6), 1351-1357.

R

Rallo, P., Dorado, G., Martin, A., (2000). Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 984-989.

- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., (2006). Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 434-440.
- Rauwald, H.W., Brehm, O., Odenthal, K.P., (1994). Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytotherapy Research*, 8(3), 135-40.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- Rebucci, R., Sangalli, L., Fava, M., Bersani, C., Cantoni, C., Baldi, A. (2007). Evaluation of functional aspects in *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *Journal of food quality*, 30, 187-201.
- Reeves, III J.B., Smith, D.B., (2009). The potential of mid- and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy for determining major- and trace-element concentrations in soils from a geochemical survey of North America. *Applied Geochemistry*, 24 (8), 1472-1481.
- Reichl, F.X., (2004), *Guide pratique de toxicologie*, trad. Robert Perraud et Eduard Krahé, 2^{ème} éd., De Boeck, Bruxelles, 368 p.
- Renner, M., (1988). Quelles recommandations pour mesurer la couleur de la viande au laboratoire? *Industries AgroAlimentaires*, 530-533.
- Rhee, K.S., Ziprin, Y.A., Calhoun, M.C. (2001). Antioxidative effects of cottonseed meals as evaluated in cooked meat. *Meat Science*, 58, 117-123.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. Glover W., (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Rouessac, F., Rouessac, A., (2002). *Analyse Chimiques. Méthodes et techniques instrumentales modernes*. 5^{ème} éditions, Dunod.
- Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E., (1997). Analysis of *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 74, 273-279.
- Ruby, J., (1917). *Recherches morphologiques et biologiques sur l'Olivier et ses variétés cultivées en France* [Thèse]. France, Faculté des sciences, Paris.

S

- Samuelsson, G., (1951). The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea Europaea*. *Farmaceutisk Revy*, 15, 229-39.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N., (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161, 168-175.
- Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D., (2009). Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reactions monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta*, 78, 40-48.

- Sanoner P., (2001). Les polyphénols de la pomme à cidre: diversité variétale et oxydation. Thèse de doctorat, Université de Caen, 316 p.
- Santé, V., (1993). Instabilité de la couleur de la dinde (Méléagris Gallopovo): influence de la rigor mortis, du mode de conditionnement et d'antioxydants. Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, pp. 132.
- Santé canada, 1998. «Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid Biotin and Choline», Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary reference intakes, Food and Nutrition Board, Washington D.C., National Academy Press.
- Santos, M.V., Zaritzky, N., Califano, A., (2010). A control strategy to assure safety conditions in the thermal treatment of meat products using a numerical algorithms. *Food Control*, 21 (2), 191-197.
- Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, Riad., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., et Balansard, G., (2001). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 618-621.
- Sayago-Ayerdi, S.G., Brenes, A., Goñi, I., (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 971-976.
- Scheffler, A., Rauwald, H.W., Kampa, B., Mann, U., Mohr, F.W., Dhein, S., (2008), *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 233-240.
- Schillinger, U., Kaya, M., Lucke, F. K., (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 473-478.
- Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. (1999). *British Journal of Nutrition*, 81(1), S1-S27.
- Shuichi, H., Hiromichi, N., (2003). Dried olive leaf having high oleuropein content and extract of the leaf. Japanese Patent JP 2003 335693.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (11), 8022-8028.
- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I., Casiraghi, E., (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 50 (1), 31-36.
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A.M., Turner, A.H., Hawley, J.A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 18, 127-132.
- Sinhuber, R.O., Yu, T.C., (1958). 2-Thiobabituric acid method for the measurement of rancidity in fisher products: II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technology*, 12(1), 9-12.
- Skandamis, P.N., Tsigarida, E., Nychas, G.J.E., (2000). Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 31-35.

Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E., (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1-2), 35-45.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simonic, M., Knez, Z., (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 89, 191-198.

Somboonpanyakul, P., Barbut, S., Jantawat, P., Chinprahast, N., (2007). Textural and sensory quality of poultry meat batter containing malva nut gum, salt and phosphate. *LWT*, 40, 498-505.

Sommers, C., Boyd, G., (2006). Variations in the radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with complex ready-to-eat food products. *Radiation Physics and Chemistry*, 75, 773-778.

Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A., (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 299-305.

Sterlie, M., Lerfall, J., (2005). Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. *Food Research International*, 38, 925-929.

Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Rileya, T.V. Hammera, K.A., (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 461-463.

Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R.R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Mocchetti, T., Verbruggen, M., (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), 251-258.

T

Tadashi, U., (2006). Antiaging food compositions containing collagen, and their manufacture. Patent written in Japanese. Application: JP 2006191845 A 20060727, 7 pp.

Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F., Cabrini, L., (2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 33, 105-114.

Takeshi, Y., Hiroshi, S., Gustavo, S., Naohide, K., Shuichi, M., (2007). Food containing olive leaf extract and α -lipoic acid and prevention of diseases due to accumulation of advanced glycation end products with the food. Patent written in Japanese. JP 2006-167353 20060616. 7 pp.

Tang, S.Z. Ou, S.Y., Huang, X.S., Li, W., Kerry, J.P., Buckley, D.J., (2006). Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions. *Journal of Food Engineering* 77, 248-253.

Thomas, D., Anemone, T., Marianne, W-L., Armin, W., (2006). Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Patent written in German. EP 2005-20052 20050915, 40 pp.

Terzopoulos, P.J., Kolano, B., Bebeli, P.J., Kaltsikes, P.J., Metzidakis, I., (2005). Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 105 (1), 45-51.

Trigui, A., Msallem, M. et collaborateur, (2002). Oliviers de Tunisie, In: Catalogue des variétés autochtones et types locaux, identification variétale et caractérisation morpho-pomologique des

ressources génétiques oléicoles de Tunisie vol. 1. Ministère de l'Agriculture, IRESA, Institut de l'Olivier, Tunisia.

Trujillo, I., Rallo, L., (1995). Identifying Olive cultivars by Isozyme Analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, 120(2), 318-324.

U

Uccella, N., (2001). Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. Trends Food Science and Technology. 11, 315-327.

Udén, P., (2009). Estimating residual starch from in vitro fermentations by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. Animal Feed Science and Technology, 152 (1-2), 133-140.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 65 (10), 4606- 4610.

Ultee A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R., (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68 (4), 1561-1568.

Ulu, H., (2004). Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolate on oxidative processes and textural properties of cooked meatballs. Food Chemistry, 87, 523-529.

Urtubia, A., Pérez-Correa, J. P., Pizarro, F., Agosin, E., (2008). Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. Food Control, 19, 382-388.

V

Veraverbeke, E.A., Lammertyn, J., Nicolai, B.M., Irudayaraj, J. (2005). Spectroscopic evaluation of the surface quality of apple. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53, 1046-1051.

Verdier, E., (2003). L'Huile d'olive.

Vergari, G., Patuma, M., Fontanazza, G., (1996). Utilisation des marqueurs RAPD pour la caractérisation du germoplasme d'olivier. Olivae, 60, 19-22.

Vierling, É., (2008). Aliments et boissons: filières et produits, Doin, Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, 3^{ème} éd., 277 p.

Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., and Andrade, P.B., (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. Food Chemistry, 89, 561-568.

Visioli F, Galli C, (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation, Life Sciences, 55(24), 1965-1971.

Vlahov, G., (1992). Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. J. Sci. Food Agric., 58, 157-159.

W

Williams, P., (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64 (Suppl.4): S113–S119, DOI: 10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x

Wu, Y.W., Sun, S.Q., Zhou, Q., Leung, H.W., (2008). Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (3), 498-504.

Y

Yáñez Ruiz, D. R., Martín García, A. I., Moumen, A., Molina Alcaide, E. (2004). Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *J Anim Sci.*, 82, 3006-3014.

Yilmaz, I., Arici, M., Gumus, T., (2005). Changes of microbiological quality in meatballs after heat treatment. *European Food Research and Technology*, 221, 281-283.

Young Soo, J., (2005). Health beverage composition containing olive leaf extract (oleuropein) as essential component. Patent written in Korean. KR 2005090956 A 20050914.

Yuhong, L., Qingsheng, L., Huiqing, K., Chen, Z., Xiong, L., Qiuyan, L., Meiling, L., (2006a). Study on analyzing structure of flavonoids antioxidants from olive leaves. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, 32(9), 28-31. (Journal written in Chinese).

Yuhong, L., Qingsheng, L., Huiqing, K., Chen, Z., Xiong, L., Qiuyan, L., Meiling, L., (2006b). Study on using microwave to extract flavonoid antioxidants from olive leaves. *Shipin Keji*, (8), 111-114. Journal written in Chinese.

Z

Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., Gonzalez, M., Utrilla, M.P., (1991). Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica*, 57(5), 417-419.

Zhang, W. Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15-31.

Ziqi, Y., Kai, W., Xiaoyong, B., Jun, F., (2007). Method for preparing *Olea europaea* leaf extract. Patent written in Chinese. CN 101049328 A 20071010. 6 pp.

Zunin, P., Evangelisti, F., Pagoano, M. A., Tiscornia, E., (1995). Phenolic compounds in oil from *Olea europaea* and anti-Dacus treatments. *Riv.Ital. Sostanze Frasse*, 72, 55-59.

Annexe

Annexe -1- Composition des Milieux de culture utilisés (g L⁻¹)**Bouillon Man Rigosa et Sharp (MRS)**

Peptone.....	10
Extrait de viande.....	5
Extrait de levure	5
D(+)-Glucose	20
Phosphate hydrogene dipotassium.....	2
Citrate hydrogene diammonium.....	2
Acetate de sodium.....	5
Sulfate de Magnésium.....	0,1
Sulfate de manganèse.....	0,05
Tween 80.....	1ml/L
pH.....	6 ± 0,2

Gélose Man Rigosa et Sharp (MRS)

Peptone.....	10
Extrait de viande.....	5
Extrait de levure	5
D(+)-Glucose	20
Phosphate hydrogene dipotassium.....	2
Citrate hydrogene diammonium.....	2
Acetate de sodium.....	5
Sulfate de Magnésium.....	0,1
Sulfate de manganèse.....	0,05
Agar	15
Tween 80.....	1ml/L
pH.....	6,5 ± 0,2

Eau peptonnée

Peptone	10
Extrait de viande.....	5
Chlorure de sodium.....	7
pH.....	7 ± 0,1

Plate Count Agar (PCA)

Peptone de caséine.....	5
Extrait de levure.....	2,5
Dextrose.....	1
Agar.....	15
pH.....	7 ± 0,1

Pseudomonas agar

Digest Pancréatique de gélatine.....	16
Hydrolysats enzymatique de caséine..	10
Sulfate de potassium.....	10
Chlorure de magnésium.....	1,4
Agar.....	15
pH.....	7,1 ± 0,2

Gélose Nutritive

Peptone de gélatine.....	5
Extrait de viande.....	3
Agar.....	15
pH.....	6,8 ± 0,2

Bouillon nutritif

Tryptone.....	10
Extrait de viande.....	5
Chlorure de sodium.....	5
pH.....	7 ± 0,1

Bouillon cystéine sélénite

Hydrolysats enzymatique de caséine.....	5
Lactose.....	4
Phosphate de di sodium.....	10
L-Cystéine.....	0,01
Sélénite hydrogène de sodium.....	4
pH.....	7 ± 0,2

Salmonelle Shigelle agar (SS agar)

Extrait de viande.....	5
Mélange de peptone.....	5
Lactose.....	10
Mélange des sels biliaires.....	8,5
Citrate de Sodium.....	8,5
Thiosulfate de sodium.....	8,5
Citrate de fer.....	1
Rouge neutre.....	0,025
Vert brillant.....	0,0003
Agar.....	15
pH.....	7 ± 0,2

Palcam : Listeria Identification Agar

Digest peptique de tissus animal.....	23
Chlorure de sodium	5
Starch	1
Mannitol.....	10
Citrate d'ammonium de fer.....	0,5
Esculine.....	0,8
Dextrose.....	0,5
Chlorure de Lithium.....	1,5
Rouge de phénol.....	0,08
Agar.....	13
pH.....	7 ± 0,2

Annexe -2- Fiche d'évaluation sensorielle du viande bovine hachée

Nom et prénom :	Homme <input type="checkbox"/>	Femme <input type="checkbox"/>	Spécialité et niveau d'étude :
Age :			

Vous disposez de 5 produits codés : 131 / 824 / 583 / 725 / 643.

Comparez ces produits en donnant une note de 1 à 9 pour les critères suivants :

Apparence globale: la note 9 est donnée au produit le plus apprécié.

Produit					
Note					
Appréciation					

Couleur : la note 9 est donnée au produit le plus apprécié.

Produit					
Note					
Appréciation					

Odeur : la note 9 est donnée au produit le plus apprécié.

Produit					
Note					
Appréciation					

Texture : la note 9 est donnée au produit le plus ferme.

Produit					
Note					
Appréciation					

Elasticité : la note 9 est donnée au produit avec une élasticité la plus élevée

Produit					
Note					
Appréciation					

Jutosité : la note 9 est donnée au produit le plus sec.

Produit					
Note					
Appréciation					

Goût : la note 9 est donnée au produit le plus apprécié.

Produit					
Note					
Appréciation					

Remarques supplémentaire :

Etude et valorisation des feuilles d'olivier *Olea Europaea* dans l'industrie Agro-Alimentaire

Fathia AOUIDI

Résumé :

Vue les propriétés bénéfiques des feuilles d'olivier pour la santé humaine, leur persistance toute l'année et leur quantité énorme engendrée comme sous produit de l'industrie oléicole dans les pays méditerranéens et en particulier en Tunisie, nous nous sommes intéressés dans cette thèse à l'étude et la proposition des voies de valorisation de cette biomasse renouvelable.

La 1^{ère} voie proposée consiste à considérer les feuilles d'olivier comme matériel pour l'identification variétale des oliviers par la méthode innovante de spectroscopie moyen infrarouge à transformé de Fourier (FT-MIR). Nous avons montré la discrimination des feuilles d'olivier selon leur origine variétal par leurs spectres moyen infrarouge. La reconnaissance variétale des oliviers en analysant des feuilles par cette méthode innovante a été mise en évidence.

Étant donné que les feuilles d'olivier représentent une source d'oleuropéine (composé phénolique d'intérêt), nous avons suggéré la méthode de la spectroscopie FT-MIR pour la quantification rapide de ce composé dans sa matrice naturelle.

Une autre voie proposée consiste à utiliser les feuilles d'olivier comme additif ajouté à un modèle alimentaire « les viandes bovines hachées ». Nos résultats montrent l'effet préservatif des feuilles d'olivier contre les pathogènes et l'oxydation des lipides et de l'oxymyoglobine dans les viandes bovines hachées crues et cuites. Une augmentation de la date limite de conservation et une amélioration des propriétés technologiques des viandes bovines hachées ont été aussi obtenues.

Les feuilles d'olivier sont considérées comme matériel phytothérapeutique pour usage humain. Un traitement thermique, pour la préparation de tisane des feuilles d'olivier, augmente le pouvoir antioxydant de l'extrait et modifie sa composition phénolique. L'irradiation ionisante, proposée pour la décontamination des feuilles sèches d'olivier, maintient la composition phénolique et le pouvoir antioxydant du matériel initial.

En conclusion, nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour la valorisation des feuilles d'olivier afin d'améliorer la rentabilité du secteur oléicole.

Mots clés :

Feuille d'olivier *Olea Europaea* ; Composés phénoliques ; Oleuropéine ; Prédiction ; Valorisation ; Viandes bovines hachées ; Traitements technologiques.
