



LIVAE

N° 122
ÉD. FRANÇAISE
NOVEMBRE 2015

JOURNAL OFFICIEL DU CONSEIL OLÉICOLE INTERNATIONAL

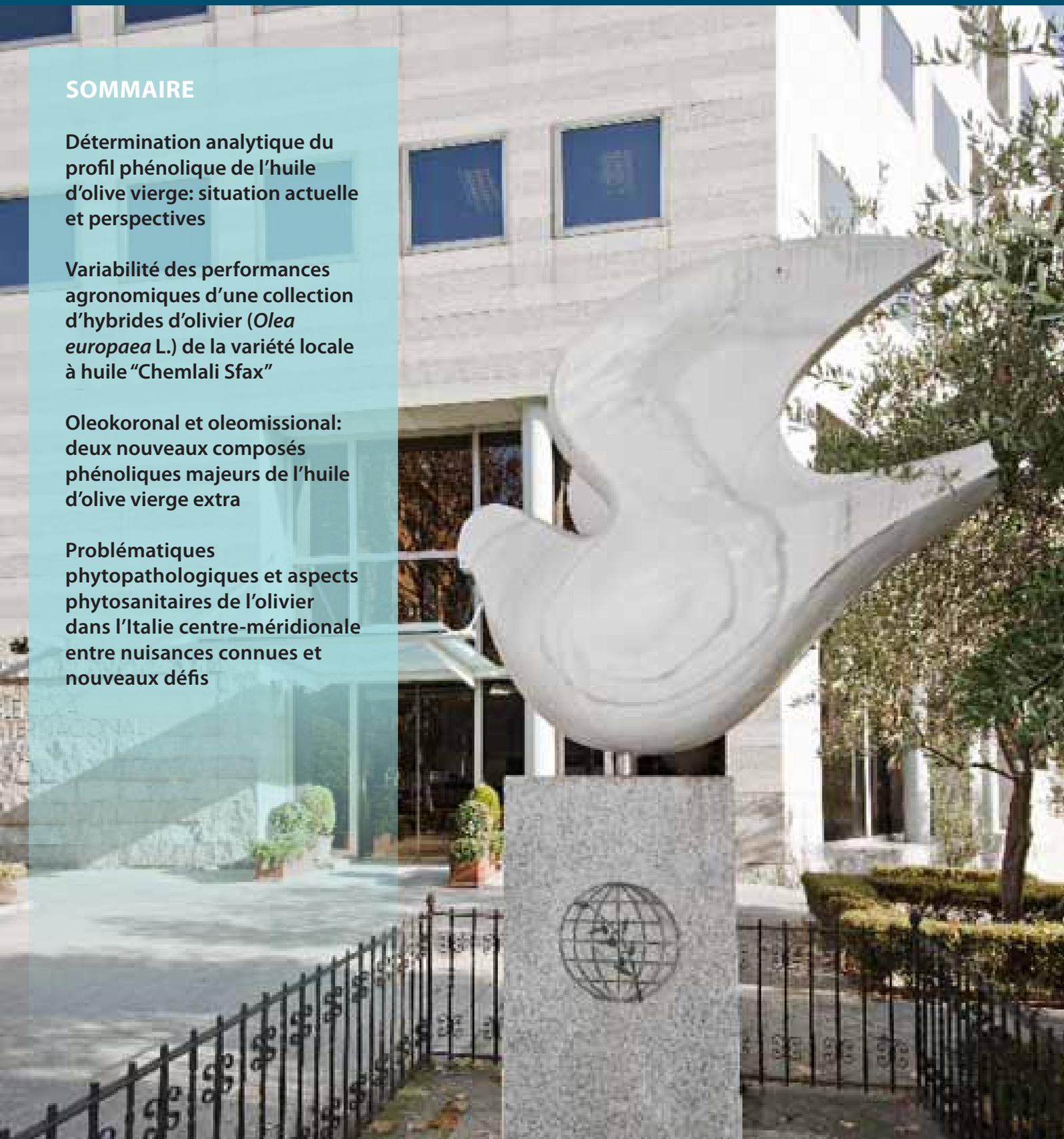
SOMMAIRE

Détermination analytique du profil phénolique de l'huile d'olive vierge: situation actuelle et perspectives

Variabilité des performances agronomiques d'une collection d'hybrides d'olivier (*Olea europaea* L.) de la variété locale à huile "Chemlali Sfax"

Oleokoronal et oleomissional: deux nouveaux composés phénoliques majeurs de l'huile d'olive vierge extra

Problématiques phytopathologiques et aspects phytosanitaires de l'olivier dans l'Italie centre-méridionale entre nuisances connues et nouveaux défis



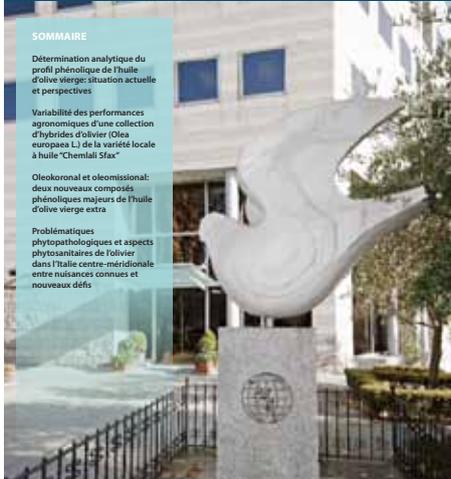
SOMMAIRE

Détermination analytique du profil phénolique de l'huile d'olive vierge: situation actuelle et perspectives

Variabilité des performances agronomiques d'une collection d'hybrides d'olivier (*Olea europaea* L.) de la variété locale à huile "Chemlali Sfax"

Oleokoronal et oleomissional: deux nouveaux composés phénoliques majeurs de l'huile d'olive vierge extra

Problématiques phytopathologiques et aspects phytosanitaires de l'olivier dans l'Italie centre-méridionale entre nuisances connues et nouveaux défis



SOMMAIRE

OLIVÆ | N°122

OLIVÆ**Journal officiel du Conseil oléicole international**

Publié en : anglais, arabe, espagnol, français et italien.

Revue évaluée par les pairs.

Príncipe de Vergara, 154
28002 Madrid, Espagne
Tél. : 34-915 903 638
Fax : 34-915 631 263
E-mail : iooc@internationaloliveoil.org

ISSN : 0255-996X
Dépôt légal : M-18626-1984

Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part du Secrétariat exécutif du COI aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

Le contenu des articles figurant dans la présente publication ne reflète pas nécessairement le point de vue du Secrétariat exécutif du COI en la matière.

La reproduction totale ou partielle des articles d' OLIVÆ est autorisée sous réserve expresse de la mention d'origine.

3**Détermination analytique du profil phénolique de l'huile d'olive vierge: situation actuelle et perspectives**

Abdelhakim Bakhouché / Jesús Lozano Sánchez / Alberto Fernández Gutiérrez / Antonio Segura Carretero

17**Variabilité des performances agronomiques d'une collection d'hybrides d'olivier (*Olea europaea* L.) de la variété locale à huile "Chemlali Sfax"**

Ben Amar F. / Mezghani-Aiachi M. / Yengui A. / Belguith H. / Harrab S. / Hergli M.K.

23**Oleokoronal et oleomissional: deux nouveaux composés phénoliques majeurs de l'huile d'olive vierge extra**

Panagiotis Diamantakos / Angeliki Velkou / K. Brian Killday / Thanasis Gimisis / Eleni Melliou / Prokopios Magiatis

35**Problématiques phytopathologiques et aspects phytosanitaires de l'olivier dans l'Italie centre-méridionale entre nuisances connues et nouveaux défis**

V.Vizzarri / L.Tosi

Détermination analytique du profil phénolique de l'huile d'olive vierge: situation actuelle et perspectives

**Abdelhakim Bakhouché^{a,b}, Jesús Lozano Sánchez^{b,c*},
Alberto Fernández Gutiérrez^{a,b}, Antonio Segura Carretero^{a,b}**

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada (España).

^b Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, E-18016 Granada (España)

^c Departamento de Investigación y Desarrollo del Aceite de Oliva como Alimento Funcional, Aceites Maeva S. L. Avda. Incar s/n, 18130 Escúzar, Granada (España).

Auteur pour la correspondance

*Tél.: +34 958249510.

Fax: +34958249510.

Adresse de courrier électronique : jesusls@ugr.es

Résumé

Au cours de dernières années, on a pu observer un intérêt croissant pour la fraction phénolique de l'huile d'olive (HOV) en raison de l'importance de ces composés pour la santé des consommateurs. C'est pourquoi il s'avère indispensable d'établir une méthodologie analytique permettant leur analyse qualitative et quantitative de manière efficace et précise. Dans cet article, nous présentons une révision bibliographique des procédures analytiques actuelles disponibles pour leur détermination comprenant : l'extraction des analytes d'intérêt, la séparation chromatographique des composants présents dans l'extrait obtenu durant l'étape préalable et leur caractérisation qualitative et quantitative. Les systèmes d'extraction les plus utilisés sont l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). Parmi les techniques de séparation décrites, la chromatographie liquide de haute résolution (HPLC) est la technique la plus employée pour l'analyse des composés phénoliques. Toutefois, il a été démontré que sur la chromatographie gazeuse (GC) et l'électrophorèse capillaire (CE) constituent des techniques complémentaires à l'HPLC et offrent une méthodologie alternative pour la caractérisation de la composition phénolique des HOV. Cet article fait le point sur les principaux détecteurs correspondant à chaque technique de séparation ainsi que les paramètres optimisés et les avantages et inconvénients de chacune. Enfin, nous exposons les problèmes analytiques que présentent actuellement les méthodes pour la détermination des composés phénoliques de l'HOV. Pour résoudre ces problèmes, les chercheurs doivent tenir compte des inconvénients de chacune des méthodes décrites. Le défi analytique pour l'avenir sera de mettre au point une méthode unique qui puisse s'appliquer à toutes les études des composés phénoliques de l'HOV.

Mots clés

HOV, composés phénoliques, extraction, techniques de séparation, problèmes analytiques

Abstract

Due to the important role played by phenolic compounds in the nutritional value of virgin olive oil (VOO), it is necessary to develop efficient and accurate analytical methods for their qualitative and quantitative analysis. This

Reçu: mars 2015 / **Accepté:** mai 2015 / **Publié:** juillet 2015

review presents an overview of different analytical approaches to the determination of phenolic compounds in VOO. In principle, the analytical procedure for the determination of individual phenolic compounds in VOO involves three basic steps: extraction from the oil sample, chromatographic separation, and characterization. The extraction systems in widest use are liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). Among the separation techniques reported, high performance liquid chromatography (HPLC) was the most widespread technique applied for the analysis of phenolic compounds. However, it was demonstrated that gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE) are able to achieve the same aims as HPLC while providing alternative methodologies for the characterization of phenolic compounds in VOO. The optimized parameters, advantages and disadvantages of each technique are reported in this review. In addition, the different detectors coupled to the separation techniques are reviewed. Finally, the current analytical problems in the determination of phenolic compounds in VOO are also presented. In order to overcome these problems, researchers have to take into consideration the drawbacks of the previous methods. The future challenge will be to establish one single method for application to all VOO studies relating to phenolic compounds.

Keywords

VOO, phenolic compounds, extraction, separation techniques, analytical problems.

Introduction

L'huile d'olive vierge (HOV) jouit d'une popularité croissante dans le monde, non seulement pour ses caractéristiques organoleptiques uniques mais également pour ses effets positifs sur la santé, associés à sa consommation, en particulier lorsqu'elle s'inscrit dans le cadre d'un régime méditerranéen. Les bienfaits pour la santé de l'huile d'olive ont été attribués à son profil d'acides gras ainsi qu'à la présence de nombreux composants bioactifs comme les tocophérols, les phospholipides et les composés phénoliques. En réalité, différentes fonctions et propriétés biologiques ont été reliées à la présence de ces derniers composés. Comme le montrent les études menées sur des humains, la consommation d'huile d'olive riche en composés phénoliques a des effets antioxydants et anti-inflammatoires et réduit la prolifération des molécules d'adhésion cellulaire par

rapport à la consommation d'huile d'olive ayant une teneur plus faible en composés phénoliques (Covas 2007; Fitó et de la Torre *et al.*, 2007). En 2011, l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA) a approuvé une déclaration relative à l'effet protecteur des composés phénoliques de l'huile d'olive (5 mg/jour) face au dégât oxydatif dans les lipides dans le sang (Franco et Galeano-Díaz *et al.*, 2014).

Dans les HOV, au moins 36 composés phénoliques avec une structure différente ont été identifiés, tels qu'alcools phénoliques, acides phénoliques, lignanes, flavonoïdes et sécoiridoïdes. Ces composés sont la catégorie la plus importante des antioxydants naturels présents dans l'HOV. Hélas, leur concentration dans les HOV n'est pas constante, mais elle varie en fonction de différents facteurs, comme la variété d'olive, les conditions édaphoclimatiques et agronomiques de la zone de culture et l'état de maturité du fruit (Bajoub et Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2015; Bakhouch et Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; Dabbou et Chehab *et al.*, 2010). En outre, plusieurs études ont décrit les effets des différentes étapes de l'élaboration de l'HOV, comme le broyage, le malaxage, la centrifugation ou la séparation des phases, le stockage et le filtrage, sur la composition phénolique de ces huiles (Bakhouch et Lozano-Sánchez, *et al.*, 2014a; Frankel et Bakhouch *et al.*, 2013).

En raison des variations continues dans la teneur en composés phénoliques des HOV dues aux facteurs déjà mentionnés et de la nécessité de distinguer correctement les profils polyphénoliques des HOV obtenues à partir de différentes variétés d'olives, zones géographiques ou systèmes de production et d'élaboration de cet aliment, plusieurs méthodes d'analyse ont été proposées pour déterminer les composés phénoliques selon les techniques d'extraction, de séparation et de caractérisation qualitative et quantitative. Pour isoler et séparer cette fraction de l'huile, deux méthodes ont été principalement utilisées : l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). Dans les deux systèmes ont été testés différents mélanges de solvants et différents types d'adsorbants pour maximiser la récupération des composés phénoliques dans l'HOV (Bendini et Bonoli *et al.*, 2003).

Pour mener à bien la caractérisation de la composition phénolique des extraits obtenus par l'un ou l'autre des deux systèmes d'extraction, la chromatographie liquide à haute résolution (HPLC) est la principale technique employée pour la séparation des composés phénoliques (Bayram et Esatbeyoglu *et al.*, 2012). D'autres techniques ont également été décrites, notamment la chromatographie gazeuse (GC) et l'électrophorèse ca-

pillaire (CE) (Ballus et Meinhart *et al.*, 2011; García-Villalba et Pacchiarotta *et al.*, 2011). Ces techniques de séparation sont couplées à différents détecteurs. Ainsi, la détection ultraviolette-visible (UV-Vis) avec barrette de diodes (DAD) est la méthode standard utilisée pour les composés phénoliques et, avec la spectrométrie de masses, c'est le système qui prédomine actuellement (Bakhouché et Lozano-Sánchez *et al.*, 2013). La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) a également été utilisée comme système de détection pour la caractérisation de la composition phénolique dans l'HOV. Toutefois, eu égard à son coût élevé, elle n'est accessible qu'à un nombre réduit d'institutions (Etrakis et Giomyrganaki *et al.*, 2008).

Bien que de nombreuses méthodes aient été optimisées pour déterminer la concentration des composés phénoliques dans l'HOV, il demeure difficile de réaliser une comparaison directe des données disponibles dans la littérature compte tenu des écarts importants en termes de concentration. Dans la plupart des cas, ces écarts ont été attribués à l'influence de différents facteurs agronomiques et technologiques, ce qui peut, dans une certaine mesure, justifier de tels écarts. Toutefois, certains auteurs ont suggéré que les écarts observés pourraient être dus aux méthodes d'analyse employées (Bakhouché et Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Karkoula et Skantzari *et al.*, 2012). Les objectifs de cet article sont donc: premièrement de proposer une description générale des principales méthodes d'extraction et de séparation employées dans l'analyse des composés phénoliques dans l'HOV, et deuxièmement d'identifier les avantages et les inconvénients des méthodes actuellement employées, à partir des résultats décrits dans la bibliographie par différents auteurs.

Méthodes d'extraction des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge

En général, toute méthodologie analytique exige une étape préalable d'isolement des analytes à l'étude de la matrice correspondante. L'objectif principal de cette étape est de préparer un extrait enrichi dans tous les composés d'intérêt et libre d'interférences avec d'autres espèces chimiques présentes dans la matrice et qui peuvent avoir un impact dans l'étape de séparation et de détection de ces composés.

Comme indiqué plus haut, l'extraction des composés

phénoliques dans les échantillons d'HOV est majoritairement réalisée par LLE et SPE. Ces systèmes diffèrent non seulement dans les solvants ou les adsorbants de phase solide utilisés mais également dans les quantités d'échantillon et dans le volume des solvants utilisés dans les procédures.

Extraction liquide-liquide

Les composés phénoliques de l'huile d'olive ont été isolés principalement par extraction à partir d'une solution d'huile avec du méthanol ou de mélanges de méthanol/eau. Avant l'extraction, la procédure d'extraction liquide-liquide nécessite une étape préalable dans laquelle l'HOV est dissoute avec un solvant apolaire pour éliminer la fraction lipidique et faciliter l'extraction des composés phénoliques au moyen du solvant polaire. A cette fin, différents types de solvants ont été utilisés, comme l'hexane, l'éther de pétrole et le chloroforme. Parmi eux, l'hexane est celui qui a été utilisé le plus fréquemment (Lerma-García et Lantano *et al.*, 2009; Montedoro et Servili *et al.*, 1992). Dans le cas des solvants polaires employés dans l'extraction, la littérature ne contient pas de données définitives sur l'identification du meilleur solvant pour la récupération totale des composés phénoliques de l'HOV. Initialement, l'extraction avec un mélange de méthanol/eau dans une proportion de 80:20 semblait donner de meilleurs résultats que le méthanol pur ou que les mélanges de méthanol/eau 60:40 (Montedoro et Servili *et al.*, 1992). Pourtant, cinq ans plus tard, le méthanol pur a été choisi comme solvant pour l'extraction des composés phénoliques de l'HOV au lieu des mélanges de méthanol/eau en raison de l'extraction incomplète de certains composés phénoliques avec ces mélanges. Cette hypothèse pourrait être attribuée à la formation considérable d'émulsion entre l'eau et l'huile (Angerosa et D'Alessandro *et al.*, 1995). D'autres études ont montré qu'en réduisant le pourcentage de méthanol à 60 %, les pourcentages de récupération des composés phénoliques augmentaient (Ballus et Meinhart *et al.*, 2014; Pirisi et Cabras *et al.*, 2000). De même, l'emploi de solvants organiques différents du méthanol dans la LLE, comme par exemple l'éthanol, l'acétonitrile et la *N,N*-dyméthylformamide (DMF), a été décrit. Cette dernière semble donner de bons pourcentages de récupération (Brenes et Garcá *et al.*, 2000).

Selon la quantité d'échantillon et de solvant utilisés pour l'extraction des composés phénoliques de l'HOV, le système LLE peut se diviser en plusieurs catégories. Le système conventionnel était caractérisé par l'emploi de grandes quantités d'échantillon et de solvants organiques, qui faisaient de l'extraction un processus laborieux, cher et long (Gómez-Caravaca et Carrasco Pan-corbo *et al.*, 2005). Compte tenu de ces inconvénients,

un nouveau système de LLE a été élaboré. Dénommé micro extraction liquide-liquide (LLME), il remplace le système conventionnel. On pourrait le considérer comme une version de la LLE conventionnelle exigeant une quantité inférieure d'échantillon moindre et générant moins de résidus. C'est également une méthode rapide. Une étude comparative a évalué la répétabilité, la reproductibilité et la récupération des composés phénoliques avec les systèmes LLE et LLME. Les résultats ont montré que les deux méthodes présentaient une bonne répétabilité et une bonne reproductibilité. Toutefois, les valeurs de phénols totaux extraits de l'HOV avec la méthode LLE étaient inférieures à celles obtenues avec la méthode LLME (Pizarro et Becerra *et al.*, 2013). Dans une étude plus récente, la méthode LLME a été améliorée et le volume de solvant a été réduit de 1 ml à 0,5 ml afin d'obtenir une caractérisation des composés phénoliques de l'HOV au moyen de la chromatographie liquide à ultra haute résolution couplée à la spectrométrie de masses de triple quadripôle (Becerra-Herrera et Sánchez-Astudillo *et al.*, 2014). Outre ces méthodes, d'autres techniques d'extraction liquide-liquide ont été mises au point et appliquées à l'extraction de composés phénoliques de l'HOV, comme la micro extraction liquide-liquide par dispersion (DLLME) et la micro extraction liquide-liquide par dispersion en phase inverse (RP-DLLME) (Godoy-Caballero et Acedo-Valenzuela *et al.*, 2013).

Extraction en phase solide

La technique SPE est devenue de plus en plus populaire au cours des dix dernières années comme procédé pour l'isolement des composés phénoliques de l'HOV. Différents types de adsorbants ont été utilisés dans son application. Les premières extractions ont été réalisées avec des cartouches C8 (500 mg ; 3,5 ml ; Alltech) et se sont avérées plus rapides et simples que l'extraction LLE (Pirisi et Cabras *et al.*, 2000). Un an plus tarde, une étude comparative a été menée sur différents types d'adsorbants modifiés avec des groupes fonctionnels diol et amino afin de déterminer le plus adéquat pour l'extraction de ces analytes (Mateos et Espartero *et al.*, 2001). Les auteurs ont montré que l'extraction des polyphénols avec des phases modifiées avec des groupes amino donnait lieu à la formation d'artefacts, probablement en raison d'interactions entre le solvant employés et ces groupes fonctionnels. Un meilleur adsorbant a donc été sélectionné pour l'extraction de la phase solide modifiée avec des groupes -diol. Parallèlement, d'autres auteurs ont évalué la capacité d'autres adsorbants pour extraire des polyphénols de l'huile : l'octadécylsilane C_{18} (2 g, 6 ml) et octadécylsilane C_{18EC} (par blocage, ou « end-capping » ; 2 g, 6 ml) (Liberatore et Procida *et al.*, 2001). Les résultats ont montré des répercussions peu

satisfaisantes avec les cartouches C_{18EC} , alors que les cartouches C_{18} ont permis une récupération quantitative pratiquement totale de tous les composés étudiés. Les auteurs ont attribué les différences dans le comportement des cartouches C_{18} et C_{18EC} à l'interaction entre le matériel adsorbant et l'analyte. Les mécanismes sous-jacents dans la libération de l'analyte induit par l'éluant dépend probablement de l'interaction entre les groupes Si-OH résiduels situés à la surface du matériel de silice et les composés adsorbés. Dans le cas de la cartouche C_{18EC} , les groupes polaires résiduels sont supprimés et cette caractéristique réduit apparemment la libération de l'analyte. Compte tenu des résultats, les années suivantes une étude a été menée pour établir les pourcentages de récupération des composés phénoliques de l'HOV au moyen des adsorbants C_8 , C_{18} et -diol. Les résultats ont montré que l'extraction avec des cartouches diol permettait une plus grande récupération des phénols totaux, *o*-diphénols, tyrosol, hydroxytyrosol et secoïridoïdes qu'avec les autres procédés d'extraction (Bendini et Bonoli *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude plus récemment (Gómez-Caravaca et Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005).

Un autre aspect important dont il faut tenir compte durant la SPE est l'équilibre entre la quantité d'HOV et d'adsorbant utilisé. Dans une première étude, l'extraction des polyphénols présents dans 30 g d'HOV a été réalisée au moyen de cartouches diol de 500 mg et d'1 g. Les résultats obtenus ont montré qu'avec les cartouches de 500 mg, la récupération présentait des valeurs basses. Toutefois, les valeurs enregistrés ont augmenté substantiellement avec les cartouches d'1 g. Postérieurement, pour établir la saturation de l'adsorbant la quantité d'HOV a été modifiée (10 g, 20 g et 30 g). Les résultats ont montré que la plupart des composés ont enregistré une augmentation linéaire dans l'aire de pic liée à l'augmentation de la quantité d'huile d'olive. Néanmoins, à partir de 20 g d'HOV, les chercheurs ont observé une courbe du signal du tyrosol, de l'acide vanillique et de l'acide syringique, probablement liée à la saturation de la cartouche (Godoy-Caballero et Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012). Certaines études ont indiqué que la cartouche de 500 mg est généralement utilisée dans la SPE à petite échelle et celle de 1 g, dans la SPE à grande échelle (Laura Capriotti et Cavaliere *et al.*, 2014).

Enfin, des études comparatives sur les deux techniques d'extraction —SPE et LLE— ont donné lieu à la publication des données discordantes. Bien que de nombreuses études aient conclu que l'extraction LLE permet une plus grande récupération que la SPE (Bendini et Bonoli *et al.*, 2003; Hrncirik et Fritsche,

2004), d'autres auteurs ont considéré la SPE comme la méthode de référence pour l'extraction de composés phénoliques de l'HOV au lieu de la LLE en raison de sa facilité d'application et de la rapidité de l'extraction (Gómez-Caravaca and Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005; Pirisi and Cabras *et al.*, 2000). Toutefois, une étude a décrit des problèmes avec la méthode de SPE en raison de sa sélectivité vers les composés phénoliques individuels. En particulier les aglycones (Hrnčirik and Fritsche, 2004). En outre, les auteurs sont parvenus à la conclusion que la SPE ne semble efficace qu'avec l'HOV fraîche car lorsqu'elle s'oxyde, la phase stationnaire des colonnes de SPE interagit avec les phénols oxydés. Cette interaction conduirait à une plus grande rétention non sélective des composés phénoliques non oxydés, réduisant ainsi la récupération totale de ces analytes (Armaforte et Mancebo-Campos *et al.*, 2007).

Techniques de séparation pour l'analyse des composés phénoliques dans l'HOV

Chromatographie liquide

La chromatographie liquide (LC) est considérée comme une technique de choix pour la séparation des composés phénoliques. Dans la littérature scientifique on trouve des références à la LC en phase normale comme en phase inverse. La première utilise le gel de silice comme phase stationnaire dans la colonne et un solvant non polaire comme éluant, alors que la deuxième utilise une phase stationnaire liée d'octadécylamine non polaire (C18) et un solvant polaire comme phase mobile. La LC en phase inverse est considérée comme la technique la plus utilisée car elle permet de mieux séparer les composés polaires et présente une meilleure reproductibilité (Carrasco-Pancorbo et Cerretani *et al.*, 2005; Laura Capriotti et Cavaliere *et al.*, 2014). Dans cette modalité, une grande variété de colonnes de différentes dimensions a été décrite. Les colonnes les plus utilisées sont celles de 100 à 250 mm de longueur, 2 à 4,6 mm de diamètre intérieur et 1,8 à 5 µm de taille de particule (Selvaggini et Servili *et al.*, 2006; Taamalli et Abaza *et al.*, 2013).

Initialement, la séparation des composés phénoliques était effectuée par gradient isocratique, car cette technique permettait une bonne résolution avec une phase mobile présentant une composition adéquate (Akasbi et Shoeman *et al.*, 1993). Toutefois, aujourd'hui, on

utilise exclusivement le mode d'éluion par gradient en raison essentiellement de la complexité du profil phénolique de l'huile. Plusieurs phases mobiles composées de différents éluants – habituellement les systèmes binaires avec de l'eau et un solvant organique moins polaire, comme l'acétronitrile et le méthanol, ont été employées (Bakhouch et Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; De la Torre-Carbot et Jauregui *et al.*, 2005). L'éluant aqueux est généralement acidifié avec des acides tels que l'acide acétique, l'acide formique et l'acide perchlorique, afin de garantir une concentration acide constante durant les mesures du gradient et d'améliorer la séparation chromatographique (Bayram et Esatbeyoglu *et al.*, 2012; De la Torre-Carbot et Jauregui *et al.*, 2005; Taamalli et Abaza *et al.*, 2013). En effet, la réduction du pH a permis en partie d'améliorer la résolution mais l'absence de résolution entre les composés avec des temps proches de rétention et une longue analyse restent les principaux inconvénients de cette technique. Ces problèmes ont été résolus en partie avec le développement de colonnes avec des particules de petite taille dans la phase stationnaire, ce qui a augmenté la résolution et réduit le temps d'analyse. Les hautes pressions dérivant de l'emploi de phases stationnaires avec des particules de petite taille obligent à mettre au point de nouveaux systèmes capables de supporter des pressions supérieures, comme les équipements commerciaux de chromatographie liquide de résolution rapide (RRLC) et la chromatographie liquide d'ultra haute résolution (UPLC).

Les principaux paramètres qui ont fait l'objet d'une attention particulière dans l'optimisation des méthodes de LC ont été le type de colonne, le gradient, la température et le flux de phase mobile. Dans une étude récente, une nouvelle méthode de chromatographie a été optimisée grâce à un appareil RRLC équipé d'une colonne plus compactée (colonne Zorbax C18: 4,6 mm × 150 mm, taille de particule de 1,8 µm) en se basant sur les conditions chromatographiques d'une méthode antérieure de chromatographie qui utilisait une colonne de plus grandes dimensions (colonne Gemini C18: 3 mm × 250 mm, taille de particule de 5 µm) (García-Villalba et Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). Dans ce travail, les auteurs ont optimisé une éluion gradient dans un système binaire en employant comme phase mobile de l'eau + 0,5 % d'acide acétique comme éluant A, et de l'acétronitrile comme éluant B, des températures entre 25 et 40 °C et des flux de phase mobile compris entre 0,5 et 2 ml/min. Les résultats ont montré que l'augmentation du flux et la température ont permis de réduire la durée de l'analyse sans réduire de manière significative la résolution chromatographique, sauf pour des valeurs de température autour de 40 °C où se produit une super-

position de certains pics. Les valeurs optimales ont été déterminées à un débit de 1,5 ml/minute et une température de 30 °C. Grâce à cette méthode optimisée, la durée de l'analyse a été réduite de 60 minutes (HPLC) à 20 minutes (RRLC). Dans une étude postérieure, avec la même colonne, d'autres auteurs ont comparé les différents éluants comme phase mobile (eau avec différents pourcentages d'acétique comme éluant A et acétonitrile et méthanol, ainsi que leurs mélanges comme éluant B), et différentes températures et débits. Les résultats ont montré une meilleure séparation avec la phase mobile eau + 0,25 % acétique comme éluant A, méthanol comme éluant B, et température et débit de 25 °C et 0,8 ml/minute, respectivement. Ces conditions ont permis une bonne séparation chromatographique des composés phénoliques en seulement 27 minutes (Lozano-Sánchez et Segura-Carretero *et al.*, 2010).

Chromatographie gazeuse

Depuis son invention, et en particulier depuis l'introduction de la colonne capillaire de silice fondue dans la chromatographie gazeuse (GC), cette technique est devenue une des plus efficaces pour la chimie analytiques en raison des améliorations significatives dans la qualité des séparations (Carrasco-Pancorbo et Nevdomskaya *et al.*, 2009). La GC a été utilisée pour effectuer des déterminations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques des HOV (García-Villalba et Pacchiarotta *et al.*, 2011; Saitta et Curto *et al.*, 2002). Toutefois, son usage a été limité en raison de la volatilité réduite de nombreux composés phénoliques. Pour résoudre ce problème, l'analyse précise d'une étape préalable connue comme dérivatisation, dans laquelle les composés phénoliques se transforment en composés plus volatiles grâce à différentes réactions de dérivatisation. Il existe de nombreuses méthodes de dérivatisation mais la plus citée de toutes est la silylation (Angerosa et D'Alessandro *et al.*, 1996; Zafra-Gómez et Luzón-Toro *et al.*, 2010).

Dans une étude récente, la procédure de dérivatisation a été optimisée grâce à la comparaison de différents réactifs et la vérification de son efficacité aussi bien sur des solutions étalons que des échantillons réels. À cet effet, la procédure de dérivatisation a d'abord été optimisée dans une solution étalon d'un mélange de tyrosol et d'hydroxytyrosol avec, comme réactifs de dérivatisation, N,O-bis-trimethylsilyl trifluoracetamide (BSTFA), N,O-bis-trimethylsilyl trifluoracetamide + trimethylchlorosilane (BSTFA + TMCS), N,O-bis-trimethylsilyl trifluoracetamide + trimethylchlorosilane (BSA + TMCS) y ter-butildimethylchlorosilane (TBDMSCl), et comme solvants de réaction la pyridine et l'acétonitrile. Malgré les bons résultats obtenus avec les réactifs BST-

FA et BSTFA+TMCS, les meilleurs pourcentages ont été obtenus avec le mélange BSA+TMCS. Toutefois, ces auteurs ont proposé la BSTFA pour l'analyse des composés phénoliques d'échantillons d'HOV afin d'éviter l'injection de TMCS, susceptible de réduire la vie utile de la colonne (Purcaro et Codony *et al.*, 2014).

La littérature scientifique comprend de nombreux travaux portant sur l'optimisation des variables qui affectent la séparation des composés phénoliques dérivatisés par GC. Les principaux paramètres optimisés ont été la nature des colonnes, les températures de l'injecteur, les modes d'injection, la quantité d'échantillon injectée et la température du four (Angerosa et D'Alessandro *et al.*, 1996; García-Villalba et Pacchiarotta *et al.*, 2011; Ríos et Gil *et al.*, 2005). Dans presque toutes les méthodes décrites, l'hélium est utilisé comme gaz porteur. L'optimisation des paramètres antérieurs a permis une bonne résolution chromatographique, le temps d'analyse variant en fonction des valeurs appliquées pour chaque variable décrite. Toutefois, la nécessité d'effectuer la dérivatisation rend cette technique laborieuse. Par ailleurs, les réactions de dérivatisation incomplètes peuvent être accompagnées de la formation de plusieurs espèces chimiques du même composé, qui pourraient donner lieu à une certaine confusion dans les résultats. Autre inconvénient de cette technique: le recours à des températures élevées, avec le risque d'abîmer les analytes que cela suppose (Carrasco-Pancorbo et Cerretani *et al.*, 2005).

Électrophorèse capillaire

Au cours des dernières années, l'électrophorèse capillaire (CE) s'est avérée une technique rapide pour l'analyse des composants alimentaires, car elle permet des analyses rapides et une séparation très efficace. Elle a été utilisée en particulier pour l'analyse des composés phénoliques de l'HOV (Bendini et Bonoli *et al.*, 2003). Différentes méthodes électrophorétiques ont été optimisées pour définir les meilleures conditions de séparation et réaliser ainsi l'analyse le plus rapidement possible et avec une résolution suffisante. Les paramètres typiques qui ont fait l'objet d'optimisation ont été les dimensions du capillaire, le tampon (type, concentration et pH), température, voltage appliqué pour la séparation et type d'injection de l'échantillon. L'optimisation des premières méthodes s'est avérée très laborieuse en raison de la nécessité d'optimiser individuellement tous les paramètres indiqués plus haut (Bonoli et Montanucci *et al.*, 2003; Carrasco-Pancorbo et Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Gómez-Caravaca et Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Toutefois, l'emploi récent de méthodes multicritères, qui tiennent compte simultanément de toutes les séparations critiques, facilite la mise au point de nouvelles méthodes

électrophorétiques (Ballus et Meinhart *et al.*, 2011; Balus et Meinhart *et al.*, 2014). De même, pour réduire le nombre d'étapes de l'analyse des composés phénoliques par électrophorèse capillaire, une nouvelle technique a été mentionnée : l'électrophorèse capillaire non aqueuse (NACE). Son principal avantage par rapport à la technique conventionnelle est sa capacité à fonctionner avec une grande variété de solvants organiques (méthanol, éthanol, 1-propanol, 2-propanol, ou acétonitril, entre autres). Avant l'analyse des matrices complexes, il est souvent nécessaire de réaliser des LLE ou SPE pour obtenir une préconcentration avec des solvants organiques. Après la préconcentration, les analytes présentant un intérêt sont habituellement dilués dans un solvant organique. Normalement, dans la CE aqueuse, l'extrait s'évapore et les analytes sont dissous dans un milieu aqueux. Toutefois, cette étape n'est pas nécessaire avec la NACE (Godoy-Caballero and Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b). Malgré les efforts réalisés par différents groupes de chercheurs pour mettre au point des méthodes de CE fiables, le nombre de publications sur l'application de cette technique dans le domaine de *Olea europaea* est limité, probablement en raison des inconvénients qu'elle présente, comme sa faible reproductibilité, sa faible sensibilité dans la détection UV et les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masses (Carrasco-Pancorbo et Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Godoy-Caballero et Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b).

Détecteurs

Les composés phénoliques sont habituellement déterminés au moyen de détecteurs UV-Vis et DAD, principalement couplés à la LC et la CE. Dans la détection des composés phénoliques avec la LC, il est possible d'utiliser une longueur d'onde de 280 nm pour les analyses de routine, car la plupart d'entre elles absorbent à cette longueur d'onde, alors qu'une longueur de 240 nm est utilisée pour certains sécoiridoïdes et leurs dérivés; une longueur d'onde de 310-320 nm, pour les acides hydroxycinnamiques et une longueur de 350 nm, pour les flavones (Bakhouch et Lozano-Sánchez *et al.*, 2013; Garcia et Coelho *et al.*, 2013; Godoy-Caballero et Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012a). La méthode d'analyse officielle du Conseil oléicole international (COI) pour la détermination des composés phénoliques utilise la détection UV-Vis. Cette méthode définit les valeurs maximales d'absorbance de 27 composés phénoliques différents et établit une procédure pour la quantification de ces analytes en prenant comme base les données fournies par le détecteur UV (COI, 2009). Les

détecteurs UV ont aussi été utilisés pour étudier la variation de la teneur en composés phénoliques de l'HOV sous l'influence de différents facteurs agronomiques et technologiques (Gómez-Rico et Salvador *et al.*, 2006; Parenti et Spugnoli *et al.*, 2008).

En ce qui concerne l'analyse par CE, la détection UV pour la caractérisation de différents groupes phénoliques dans l'HOV a été effectuée aux longueurs d'ondes suivantes: 200, 240, 280 et 330 nm, bien que l'on ait utilisé la détection à barrette de diodes dans la gamme de 190-600 nm pour obtenir les données spectroscopiques (Carrasco-Pancorbo et Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a). Dans des études plus récentes, on a utilisé la CE couplée à un détecteur UV pour mettre au point une nouvelle méthode électrophorétique pour la séparation des composés phénoliques des extraits d'HOV, afin de comparer la récupération des composés phénoliques de différents systèmes d'extraction et pour étudier la composition phénolique de l'HOV issue de différentes variétés d'olives (Ballus et Meinhart *et al.*, 2014; Godoy-Caballero et Galeano-Díaz *et al.*, 2012c; Gómez-Caravaca et Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005).

En GC, le détecteur à ionisation de flamme (FID) est le détecteur associé le plus fréquemment à cette technique de séparation. D'ailleurs, la technique GC-FID a été utilisée pour analyser les profils phénoliques de différentes huiles, y compris l'HOV. La méthode proposée à cet effet a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques d'huiles de tournesol, de colza et d'olive vierge (Farajzadeh et Yadeghari *et al.*, 2014). D'autres auteurs ont utilisé la technique GC-FID pour analyser la teneur totale en hydroxytyrosol et tyrosol dans les huiles d'olive vierges extra après l'hydrolyse des formes plus liées (Purcaro et Codony *et al.*, 2014).

Récemment, des spectromètres de masse (MS) ont été associés à différentes techniques de séparation pour la caractérisation des composés phénoliques de l'HOV. Les types de détecteurs les plus cités dans la littérature sont l'analyseur de masse à temps de vol (TOF-MS), l'analyseur de masse quadripôle-temps de vol (Q TOF-MS) et l'analyseur à piégeage d'ions (IT-MS) (Bakhouch et Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Fu et Segura-Carretero *et al.*, 2009; Laura Capriotti et Cavaliere *et al.*, 2014). Concernant les analyseurs de masse à temps de vol, outre la grande vitesse de balayage et la large gamme de masses qu'ils peuvent détecter, une autre caractéristique importante du spectromètre de masse est sa grande précision dans la détermination de la masse exacte. Cette méthode offre une grande sélectivité dans la détermination des composés phénoliques avec le mode de chromatogramme d'ions extraits (EIC)

lorsqu'il y a superposition de pics. De même, l'hybride Q TOF permet de confirmer rapidement et de manière efficace la composition élémentaire des ions au moment de la fragmentation. Le couplage de la LC, de la GC ou de la CE à des spectromètres de masse a permis d'obtenir une caractérisation détaillée de la fraction phénolique dans différentes études consacrées à la qualité de l'HOV (Bengana et Bakhouché *et al.*, 2013; Carrasco-Pancorbo et Arráez-Román *et al.*, 2006b; Saitta et Curto *et al.*, 2002). En outre, l'utilisation de la spectrométrie de masse permet d'étudier la relation entre la nature chimique de la concentration des différents composés phénoliques des extraits d'HOV et leur capacité contre certaines maladies chroniques (García-Villalba et Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). D'autres détecteurs ont été mentionnés, comme les détecteurs de fluorescence et les détecteurs de RMN (Etrakis et Giomyrgianaki *et al.*, 2008; Tena et García-González *et al.*, 2009). Néanmoins, ils ne sont pas aussi habituels que les détecteurs UV et MS.

Problèmes analytiques de la caractérisation des composés phénoliques de l'HOV

Dans toutes les études qui ont pour objectif de quantifier les composants phénoliques de l'HOV, la préoccupation des chercheurs a été la récupération totale de ces analytes depuis la matrice. Pour évaluer cette récupération, les premières études ont eu recours à un mélange d'étalons commerciaux, qui a été enrichi avec de l'huile d'arachide raffinée pour comparer les pourcentages de récupération avec différentes techniques d'extraction. L'huile enrichie a été soumise par la suite à différents systèmes d'extraction (LLE et SPE). Les extraits résultants ont été analysés par HPLC et la quantité de chaque étalon a été comparée au mélange d'étalons soumis à aucun processus d'extraction (Bendini et Bonoli *et al.*, 2003). Toutefois, lorsque les résultats obtenus sont analysés, il faut savoir que pour la plupart des composés phénoliques présents de manière naturelle dans l'huile d'olive, il n'y a pas d'étalons commerciaux disponibles sur le marché. Pour évaluer leur récupération, on a donc utilisé d'autres composés avec des structures similaires. Dans ces cas, ces étalons, avec des structures similaires, peuvent donner une réponse différente à celle des analytes présents dans les échantillons d'huile et les résultats de la récupération doivent donc être considérés uniquement comme des estimations.

Pour résoudre ce problème, d'autres auteurs ont proposé une méthode d'extraction basée sur l'enrichissement de l'huile de tournesol raffinée (libre de composés phénoliques) avec une dose exacte d'un extrait de composés phénoliques d'HOV préparé par LLE. L'huile enrichie fait ensuite l'objet d'une extraction SPE et les pourcentages de récupération sont calculés (Gómez-Caravaca et Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Cette approche constitue une solution partielle pour estimer la récupération des composés phénoliques de l'HOV.

D'autre part, il est important de noter que ces études préliminaires dans lesquelles ont été comparés les pourcentages de récupération de différents systèmes d'extraction n'ont pas tenu compte des interactions entre la matrice et les composés objet d'analyse. On notera en particulier l'effet de la teneur en eau de l'HOV dans l'extraction des composés phénoliques avec les deux systèmes (LLE et SPE). Différentes études ont montré la relation entre la teneur en eau et les composés phénoliques. On sait que l'huile d'olive contient une petite quantité d'eau et qu'elle peut donc être considérée comme une émulsion d'eau dans l'huile. Les composés phénoliques se trouvent dans l'interface eau/huile (Ambrosone et Cinelli *et al.*, 2006; Frankel et Huang *et al.*, 1994).

L'effet de la teneur en eau sur l'extraction des composés phénoliques de l'HOV a été observé pour la première fois en étudiant l'effet du système de filtration à échelle de laboratoire sur la teneur en composés phénoliques de l'HOV (Gómez-Caravaca et Cerretani *et al.*, 2007). Dans cette étude, la LLE a été utilisée pour extraire les composés phénoliques. Les résultats obtenus par les auteurs ont montré que la quantité de composés appartenant au groupe de sécoiridoïdes, comme le ligustroside aglycone et l'oleuropéine aglycone, augmente significativement après diminution du contenu en eau lors de la filtration au coton par rapport à l'HOV non filtré. Ainsi, dans les émulsions d'eau dans l'huile, les composés phénoliques se stabilisent autour des gouttes d'eau et l'affinité de ces composés par l'extraction avec un solvant est basse dans les matrices plus polaires (huile d'olive avec une plus grande teneur en eau), rendant ainsi difficile la récupération. Toutefois, l'élimination partielle de l'eau durant la filtration facilite l'extraction des composés phénoliques avec un mélange de solvants moins polaires, donnant comme résultat une augmentation apparente de sa concentration dans l'HOV filtrée. Cinq ans plus tard, l'effet de la teneur en eau sur l'extraction des composés phénoliques d'échantillons d'HOV par SPE a été confirmé (Lozano-Sánchez et Cerretani *et al.*, 2012). En utilisant la méthode de filtration en sac dans une unité pilote, les auteurs ont constaté que les sécoiridoïdes de l'HOV filtrée étaient

responsables de l'augmentation apparente de la teneur totale en composés phénoliques. Finalement, dans une étude plus récente, l'augmentation apparente du contenu de différents composés du groupe des sécoiridoïdes en raison de la variation de la teneur en eau de l'HOV a été confirmée (Bakhouché et Lozano-Sánchez *et al.*, 2014a). Les structures chimiques des principaux composés dont la récupération s'est vue affectée par la variation dans la teneur en eau de l'HOV font l'objet de la **figure 1**.

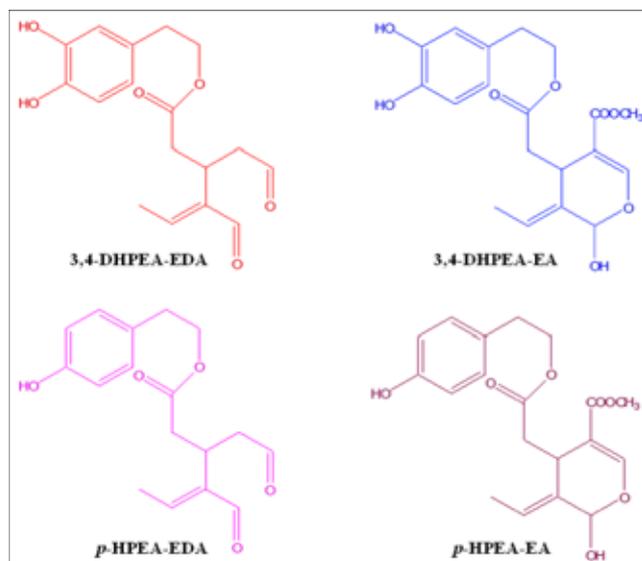


Figure 1: Structure de certains composés phénoliques affectés par la variation de la teneur en eau de l'HOV durant l'extraction: 3,4-DHPEA-EDA (décarboxyméthyl oleuropéine aglycone), 3,4-DHPEA-EA, (oleuropéine aglycone), *p*-HPEA-EDA (décarboxyméthyl ligustroside aglycone) et *p*-HPEA-EA (ligustroside aglycone).

Ces études ont confirmé l'effet de la variation de la teneur en eau de l'HOV induite par la filtration sur l'extraction des composés phénoliques. Toutefois, on sait que la teneur en eau de l'HOV varie également en fonction de l'état de maturation du fruit, de la variété d'olive et de la zone géographique (Motilva et Tovar *et al.*, 2000; Taamalli et Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). De nombreuses études ont utilisé les profils phénoliques pour distinguer les différentes variétés d'olive, pour classer les HOV en fonction de leur origine géographique (dénomination d'origine) et pour déterminer le meilleur moment pour la récolte afin d'obtenir une HOV caractérisée par une forte teneur en composés phénoliques, alors que d'autres études ont été menées sur la bioactivité des composés phénoliques de l'HOV (García-Villalba et Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010; Karkoula et Skantzari *et al.*, 2012; Ouni et Taamalli *et al.*, 2011; Rotondi et Bendini *et al.*, 2004; Taamalli et Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). Malheureusement, dans aucune de ces études il n'a été tenu compte de la varia-

tion de la teneur en eau de l'HOV et de son effet durant l'extraction des composés phénoliques. Cela peut affecter la précision des données décrites dans différentes publications sur la concentration de ces analytes dans l'HOV. Dans une récente tentative pour résoudre ce problème, une nouvelle approche a été développée pour corriger l'effet de la réduction de l'humidité postérieure à la filtration de l'HOV sur la récupération des composés phénoliques au moyen d'un étalon interne durant l'extraction. Le résultat est que l'augmentation apparente des sécoiridoïdes a été corrigée et il a été possible de quantifier correctement les composés phénoliques dans l'HOV filtrée (Bakhouché et Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b). Néanmoins, l'optimisation de la méthode proposée s'est basée uniquement sur la modification de la teneur en humidité de l'HOV après la filtration. De futures études seront donc nécessaires pour mettre au point une nouvelle méthode d'extraction qui puisse s'appliquer à tous les types d'études liées à la fraction phénolique et à la teneur en eau de l'HOV. En attendant, l'extraction des composés phénoliques de l'HOV continuera à poser des problèmes.

On sait qu'après l'isolement des composés phénoliques de l'HOV, le défi suivant est la mise au point d'une méthode fiable pour l'analyse des extraits obtenus. Malgré le développement de puissants équipements et méthodes d'analyse, la caractérisation structurale totale de la fraction phénolique reste encore parfois impossible en raison de la complexité du large groupe de polyphénols, en particulier les sécoiridoïdes. Les principaux composés identifiés dans ce groupe sont l'oléuropéine aglycone, le ligustroside aglycone et leurs dérivés, comme les formes hydroxylées, décarboxyméthylées, hydratées et méthylées. Aujourd'hui, les isomères de ces composés sont l'objet de recherches scientifiques. Dans la première étude réalisée, on a caractérisé onze isomères de l'oléuropéine aglycone dans l'HOV espagnole (Fu et Segura-Carretero *et al.*, 2009) avec la chromatographie liquide de résolution rapide couplée à la spectrométrie de masse par ionisation par électrospray, avec des analyseurs à temps de vol et piégeage ionique. Dans une étude plus récente, on a détecté 18, 17 et 9 isomères de l'oléuropéine aglycone, du ligustroside aglycone et de l'acide élénolique respectivement, par chromatographie en phase inverse Fused-Core couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et à la spectrométrie de masse en tandem de haute résolution (HRMS/MS), avec des modes de ionisation par électrospray (ESI) en modes positif et négatif (Vichi et Cortés-Francisco *et al.*, 2013). Ces isomères ont été considérés comme le résultat de l'isomérisation de l'oléuropéine et du ligustroside après l'hydrolyse produite durant la

maturation de l'olive et l'extraction de l'huile d'olive. Néanmoins, une étude menée par HPLC-UV sur colonne phase inverse a montré la formation d'isomères de décarboxyméthyle ligustroside aglycone et de décarboxyméthyle oleuropéine aglycone en raison de la réaction de ces deux composés avec l'eau ou le méthanol utilisés comme phase mobile (Karkoula et Skantzari *et al.*, 2012). En outre, dans une étude plus récente, ces mêmes auteurs ont étudié la formation artificielle des isomères de l'oleuropéine aglycone et du ligustroside aglycone (Karkoula et Skantzari *et al.*, 2014). Les isomères peuvent donc aussi se former durant l'analyse chromatographique, selon la phase mobile utilisée.

Ces découvertes ont confirmé que la mesure chromatographique classique de ces composés s'avère problématique, en particulier dans les milieux aqueux, et que de nombreuses mesures décrites dans la littérature sont plus ou moins fiables. Il faut savoir que les méthodes officielles et proposées par différents auteurs et comités internationaux utilisent l'eau comme éluant A pour la phase mobile. Cela peut affecter les résultats en raison de l'interaction entre l'eau et certains composés phénoliques, ce qui est de nature à remettre en question l'estimation de cette fraction, comme le montre par exemple la **figure 2** en ce qui concerne les principaux isomères détectés dans l'HOV.

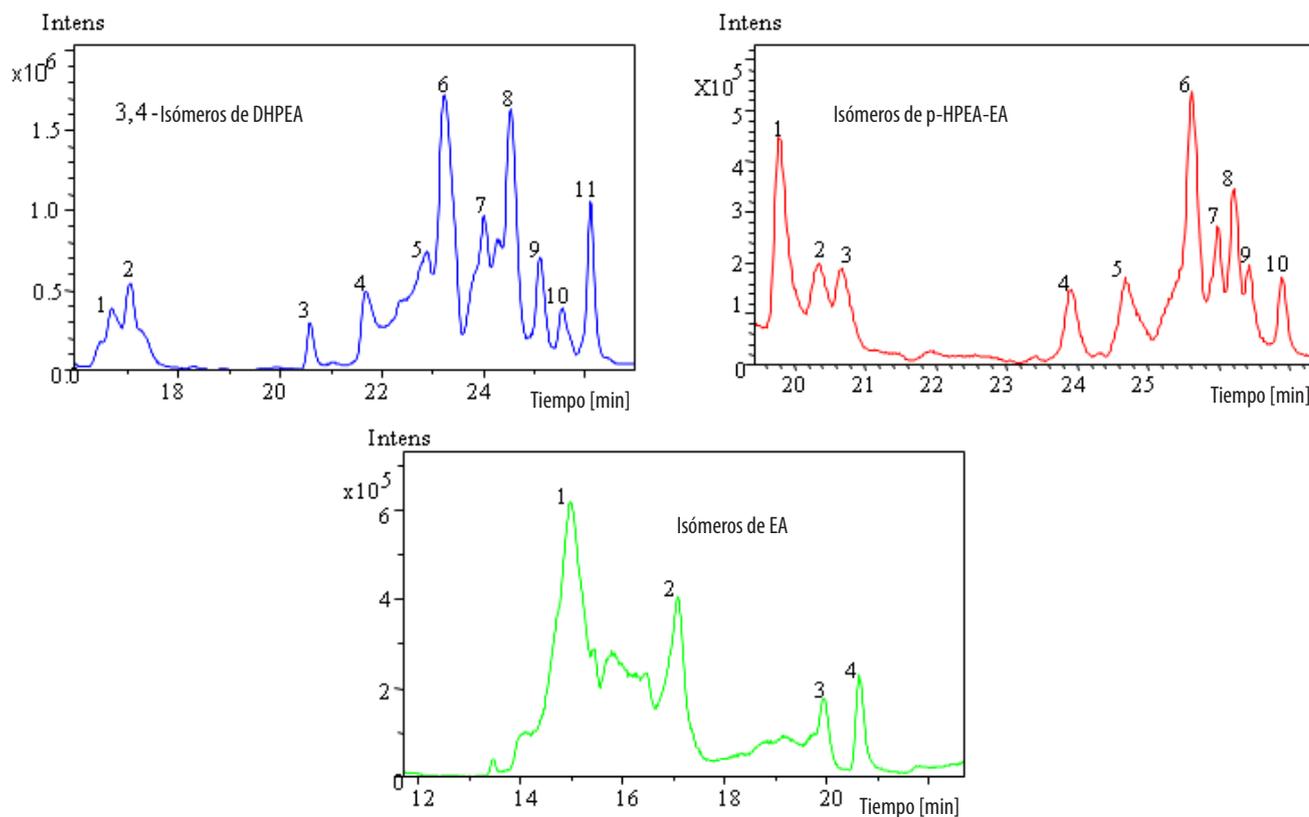


Figure 2: Isomères de l'oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA), du ligustroside aglycone (*p*-HPEA-EA) et de l'acide élénolique (EA) obtenus par HPLC-ESI-TOF/MS.

Conclusions

Les différentes méthodes pour l'isolement et la séparation des composés phénoliques ont résolu de nombreux problèmes liés à l'estimation de cette fraction dans l'HOV. De cette manière, il a été possible de montrer facilement la valeur nutritionnelle et les propriétés de cette huile sur la santé. Pourtant, certains aspects des méthodes citées doivent encore être améliorés. Par exemple, l'incohérence des données rapportées dans la littérature scientifique rend difficile la comparaison

des HOV produites dans différentes parties du monde, avec comme critère de distinction leur teneur en composés phénoliques. De nouvelles recherches seront donc nécessaires. Elles devront avoir pour objectif la mise au point de méthodes précises et harmonisées qui permettent d'éviter les confusions lors de la comparaison des données publiées. Les améliorations qu'il s'avère nécessaire d'apporter doivent tenir compte de la problématique actuelle, en particulier l'effet de la

teneur en eau des HOV sur l'isolement des composés phénoliques et la formation artificielle de certains isomères durant la séparation chromatographique comme conséquence de la phase mobile utilisée.

Remerciements

Nous remercions le ministère espagnol de l'Économie et de la Concurrence (projet BFU2014-52433-C3-2-R), le ministère de l'Innovation et des Sciences du gouvernement d'Andalousie (P11-CTS-7625), l'Université de Grenade, le Centre de recherche et de développement sur l'alimentation fonctionnelle et le Conseil oléicole international (COI) pour l'octroi d'une bourse à l'étudiant de doctorat.

Bibliographie

- Akasbi, M., Shoeman, D. M. and Saari Csallany, A. 1993. High-Performance Liquid Chromatography of Selected Phenolic Compounds in Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 367–370.
- Ambrosone, L., Cinelli, G., Mosca, M. and Ceglie, A. 2006. Susceptibility of water-emulsified extra virgin olive oils to oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 165–170.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Corana, F. and Mellerio, G. 1996. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 736: 195–203.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Konstantinou, P. and Di Giacinto, L. 1995. GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1802–1807.
- Armaforte, E., Mancebo-Campos, V., Bendini, A., Desamparados Salvador, M., Fregapane, G. and Cerretani, L. 2007. Retention effects of oxidized polyphenols during analytical extraction of phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 30: 2401–2406.
- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ajal, E. A., Ouazzani, N. and Fernández-Gutiérrez, A. 2015. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chem.* 166: 292–300.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014b. A new extraction approach to correct the effect of apparent increase in the secoiridoid content after filtration of virgin olive oil. *Talanta.* 127: 18–25.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Martínez-García, M., Velasco, G. M., Govantes, Á. O., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014a. Monitoring the moisture reduction and status of bioactive compounds in extra-virgin olive oil over the industrial filtration process. *Food Control.* 40: 292–299.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Res. Int.* 50: 401–408.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Bengana, M., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2015. Time course of Algerian Azeradj extra-virgin olive oil quality during olive ripening. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 0000–0000.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Bruns, R. E. and Godoy, H. T. 2011. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta.* 83: 1181–1187.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., de Souza Campos, F. A., Bruns, R. E. and Godoy, H. T. 2014. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 146: 558–68.
- Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J. and Rimbach, G. 2012. Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant foods Hum. Nutr.* 67: 326–36.
- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R. and Sayago, A. 2014. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 57: 49–57.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lerccker, G. and Toschi, T. G. 2003. Liquid – liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A.* 985:425–433
- Bengana, M., Bakhouche, A., Lozano-sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Res. Int.* 54: 1868–1875.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G. and Lercker,

- G. 2003. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A*. 1011: 163–172.
- Brenes, M., Garcá, A., Garcá, P. and Garrido, A. 2000. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5178–5183.
- Carrasco-pancorbo, A., Arráez-román, D., Segura-carretero, A. and Fernández-gutiérrez, A. 2006b. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. 27: 2182–2196.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T. and Fernández-Gutiérrez, A. 2005. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837–858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2006a. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 29: 2221–2233.
- Carrasco-Pancorbo, A., Nevedomskaya, E., Arthen-Engeland, T., Zurek, G., Baessmann, C., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2009. Gas Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Analytical Validation and. *Anal. Chem.* 81: 10071–10079.
- Covas, M. I. 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* 55: 175–86.
- Dabbou, S., Chehab, H., Faten, B., Dabbou, S., Esposto, S., Selvaggini, R., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammamia, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manage.* 97: 763–768
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Ravento, R. M. and López-Sabater, M. C. 2005. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS / MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4331–4340.
- Etrakis, P. A. V. P., Giomyrganaki, A. L. A., Hristophoridou, S. T. C., Pyros, A. P. S. and Ais, P. H. D. 2008. Geographical Characterization of Greek Virgin Olive Oils (Cv. Koroneiki) Using ¹H and ³¹P NMR Fingerprinting with Canonical Discriminant Analysis and Classification Binary Trees. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3200–3207.
- Farajzadeh, M. A., Yadeghari, A., Khoshmaram, L. and Ghorbanpour, H. 2014. Analytical Methods Development and validation of a rapid and sensitive gas chromatographic method for the analysis of some phenolic compounds in vegetable oils. *Anal. Methods*. 6: 5314–5321.
- Fitó, M., de la Torre, R. and Covas, M. I. 2007. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1215–24.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, O., Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M. V. and Martín-Vertedor, D. 2014. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem.* 163: 289–98.
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2013. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61: 5179–5188.
- Frankel, E., Huang, S., Kanner, J. and German, J. B. 1994. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsionst. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1054–1059.
- Fu, S., Segura-Carretero, A., Arráez-Román, D., Menéndez, J. A., De La Torre, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2009. Tentative characterization of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11140–11147.
- Garcia, B., Coelho, J., Costa, M., Pinto, J. and Paiva-Martins, F. 2013. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1727–32.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 416–29.
- García-Villalba, R., Pacchiarotta, T., Carrasco-Pancorbo, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2011. Gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *J. Chromatogr. A*. 1218: 959–971.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2013. New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*. 1313: 291–301.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2012a. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of

- virgin olive oil by LC-DAD-FLD. *Talanta*. 101: 479–87.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I., Durán-Merás, I. and Galeano-Díaz, T. 2012b. Development of a non-aqueous capillary electrophoresis method with UV-visible and fluorescence detection for phenolics compounds in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 279–90.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Galeano-Díaz, T. and Acedo-Valenzuela, M. I. 2012c. Simple and fast determination of phenolic compounds from different varieties of olive oil by nonaqueous capillary electrophoresis with UV-visible and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 35: 3529–39.
- Gómez-Caravaca, A. M., Carrasco Pancorbo, A., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2005. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. 26: 3538–51.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Lercer, G. 2007. Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *Am. J. Food Technol.* 2: 671–678.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M. and Fregapane, G. 2006. Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil (*Olea europaea* L . Cv . Cornicabra) with Regard to Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7130–7136.
- Hrncirik, K. and Fritsche, S. 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 540–549.
- International Olive Council. 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2012. Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative (1)H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11696–703.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2014. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 62: 600–607.
- Laura Capriotti, A., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R. and Laganà, A. 2014. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem.* 158: 392–400.
- Lerma-García, M. J., Lantano, C., Chiavaro, E., Cerretani, L., Herrero-Martínez, J. M. and Simó-Alfonso, E. F. 2009. Classification of extra virgin olive oils according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Res. Int.* 42: 1446–1452.
- Liberatore, L., Procida, G., D'Alessandro, N. and Cichelli, A. 2001. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chem.* 73: 119–124.
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2012. New filtration systems for extra-virgin olive oil: effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3754–62.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Menendez, A. J., Oliveras-Ferraro, C., Cerretani, L. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile . Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9942–9955.
- Mateos, R., Espartero, L., Trujillo, M., Ri, J. J. and Leo, M. 2001. Determination of Phenols , Flavones , and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185–2192.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., Agrarie, I. and Costanzo, V. S. 1992. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1571–1576.
- Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S. and Girona, J. 2000. Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (*Arbequina* cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2037–2043.
- Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Zarrouk, M. 2011. Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chem.* 127: 1263–7.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P. and Calamai, L. 2008. The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 735–741.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M. and Muggelli, M. 2000. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1191–1196.

- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M. and Beltrán, R. 2013. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Anal. Methods*. 6: 123–132.
- Purcaro, G., Codony, R., Pizzale, L., Mariani, C. and Conte, L. 2014. Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116: 805–811.
- Ríos, J. J., Gil, M. J. and Gutiérrez-Rosales, F. 2005. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *J. Chromatogr. A*. 1093: 167–176.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G. and Toschi, T. G. 2004. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3649–54.
- Saitta, M., Curto, S. Lo, Salvo, F., Bella, G. D. and Dugo, G. 2002. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Anal. Chim. Acta*. 466: 335–344.
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A. and Montero, G. F. 2006. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2832–2838.
- Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammami, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manag.* 97: 763–768.
- Taamalli, A., Abaza, L., Arráez Román, D., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Zarrouk, M. and Nabil, B. Y. 2013. Characterisation of phenolic compounds by HPLC-TOF/IT/MS in buds and open flowers of “Chemlali” olive cultivar. *Phytochem. Anal.* 24: 504–512.
- Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 965–975.
- Tena, N., García-González, D. L. and Aparicio, R. 2009. Evaluation of Virgin Olive Oil Thermal Deterioration by Fluorescence Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10505–10511.
- Vichi, S., Cortés-Francisco, N. and Caixach, J. 2013. Insight into virgin olive oil secoiridoids characterization by high-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements. *J. Chromatogr. A*. 1301: 48–59.
- Zafra-Gómez, A., Luzón-Toro, B., Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O. and Navalón, A. 2010. Quantification of phenolic antioxidants in rat cerebrospinal fluid by GC-MS after oral administration of compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 103–108.

Variabilité des performances agronomiques d'une collection d'hybrides d'olivier (*Olea europaea* L.) de la variété locale à huile "Chemlali Sfax"

**Ben Amar F.*, Mezghani-Aiachi M., Yengui A., Belguith H.,
Harrab S., Hergli M.K.**

Institut de l'Olivier – Route de l'aéroport Km 1,5 – BP 1087 – 3000 Sfax (Tunisie)

*Auteur de correspondance : fathi.benamar@iresa.agrinet.tn

Résumé

L'étude de quelques paramètres agronomiques dans une collection d'hybrides de la variété locale d'olive *Chemlali Sfax* a révélé une variabilité assez importante. La collection renferme 145 hybrides de *Chemlali Sfax* avec plusieurs géniteurs locaux et étrangers et surtout avec la variété italienne *Coratina* (90). La production en olives par année de la collection varie de 1,9 kg en 2010 à 9 kg en 2005, avec une large variabilité intra-annuelle. La production moyenne par croisement varie entre 3,35 kg (*Chemlali/Sigoise*) et 4,86 kg (*Chemlali/Souri*), avec une variabilité moins importante que celle par année. L'indice d'alternance de la production est élevé et varie de 0,71 (*Chemlali/Souri*) à 0,87 (*Arbequina/Chemlali*) et il est peu variable au sein de chaque croisement. Pour le port de l'arbre, 90 % des hybrides de la collection ont un port étalé (55 %) ou dressé (35 %), le port retombant étant faiblement représenté (10 %). La caractéristique des hybrides issus des croisements entre *Chemlali Sfax* et *Coratina* est d'avoir un taux de port retombant nettement plus élevé que celui de toute la collection (26 %). L'état de l'arbre (productif ou végétatif) des hybrides varie selon l'année et l'état productif sur deux années consécutives est plus élevé chez les hybrides de *Chemlali Sfax* et *Coratina* (58 %) que dans toute la collection (17,5 %).

Abstract

Study of a number of agronomic parameters in a collection of hybrids of the local 'Chemlali Sfax' olive variety revealed considerable variability. The collection contains 145 hybrids of 'Chemlali Sfax' obtained from several local and foreign genitors, in particular the Italian 'Coratina' variety (90). The annual crop production of the collection varied from 1.9 kg in 2010 to 9 kg in 2005 and showed wide intra-annual variability. Average production per cross varied between 3.35 kg ('Chemlali'/Sigoise) and 4.86 kg ('Chemlali'/Souri), thus recording smaller variability than annual production. The alternate bearing index was high, ranging from 0.71 ('Chemlali'/Souri) to 0.87 ('Arbequina'/Chemlali), and showed little variability within each cross. The growth habit of the hybrids in the collection was spreading (55%) or erect (35%) in 90% of the cases and drooping in only 10%. The hybrids obtained by crossing 'Chemlali Sfax' and 'Coratina' were characterised by a higher percentage of trees with a drooping growth habit (26%) compared with the collection as a whole. Hybrid tree status (on-crop or off-crop) differed according to year. The percentage of 'Chemlali Sfax'/'Coratina' hybrids with on-crop status in two consecutive years (58%) was higher than in the collection as a whole (17.5%).

Introduction

L'hybridation dirigée chez l'olivier est relativement récente et date de la seconde moitié du siècle dernier. Les croisements dirigés ont été adoptés en Israël pour mettre au point des variétés en mesure de répondre à des conditions de culture luxueuses et adaptées à une industrie intensive et rentable (Lavee *et al.*, 2003). Les travaux entrepris ont permis l'obtention de plusieurs nouvelles variétés : *Kadesh* (Lavee, 1978), *Barnea* (Lavee *et al.*, 1986), *Maalot* (Lavee *et al.*, 1999), *Askal* (Lavee *et al.*, 2003) et *Kadeshon*, *Sepoka* et *Masepo* (Lavee *et al.*, 2004).

En Espagne, un programme d'hybridation a eu lieu à partir de 1991. Ainsi, des croisements réciproques entre cultivars ont été réalisés dans le but de diminuer la période juvénile et d'améliorer la production en olives et le rendement en huile des olives. Récemment, une nouvelle variété (*Chiquitita*) a été sélectionnée (Rallo *et al.*, 2008).

Cette technique a aussi été utilisée en Chine pour tenter de sélectionner des variétés adaptées aux conditions pédoclimatiques du pays suite à l'échec de l'expérimentation de variétés introduites de la Méditerranée (Fontanazza et Baldoni, 1990). De nouveaux cultivars résistants au froid ont été obtenus (Gu Ying *et al.*, 1984).

En Italie, un programme d'amélioration génétique a été engagé en 1971 à partir de croisements contrôlés qui ont abouti à l'obtention de 5 000 hybrides (Bellini *et al.*, 2000 a). Les travaux de sélection prenant en compte des critères de vigueur, de productivité et de qualité de la drupe ont permis de repérer de nouveaux cultivars à double fin : *Arno*, *Tevere* et *Basento* (Bellini *et al.*, 2000 b).

En France, un programme de sélection de semis issus d'hybridation non contrôlée a permis d'inscrire en 1998 une nouvelle variété au Catalogue officiel des espèces et variétés fruitières, *Moncita* (www.Olivettes.fr), caractérisée par une période d'improductivité réduite et une bonne qualité de l'huile.

Dans les pays du Sud de la Méditerranée, un programme d'amélioration génétique par croisements dirigés a été initié en 1993 par le Conseil oléicole international et a intéressé 5 pays méditerranéens, dont la Tunisie et le Maroc (Trigui et Msallem, 2002). Au Maroc, l'étude des hybrides obtenus a permis de sélectionner cinq cultivars performants (Ministère de l'Agriculture, 2013).

En Tunisie, de 1993 à 1996, ce programme a visé les variétés les plus cultivées, à savoir *Chemlali Sfax*, *Chétoui* et *Meski*. La variété à huile *Chemlali Sfax* se caractérise par sa vigueur, son adaptation à différents environ-

nements et sa productivité (Trigui, 1996). Cependant, elle connaît des problèmes au niveau de la composition acide de son huile : taux d'acide oléique faible et taux d'acide palmitique élevé (Grati-Kamoun et Khlif, 2001). Les hybridations de cette variété ont pour objectif l'obtention de nouveaux génotypes performants au niveau de la composition acide tout en préservant les bonnes qualités de cette variété.

Les hybrides obtenus sont plantés en collection dans la région de Sfax depuis 1997 dans deux sites : la station de l'Institut de « Taous » et le siège de l'Institut de l'Olivier (IO). Une sélection préliminaire d'une centaine d'hybrides sur la base de leur composition en acide oléique (> 65 %) a été opérée (IO, 2005). Un travail de caractérisation de ces hybrides a été entamé pour une sélection finale.

Dans cette communication, on se propose de présenter certaines performances agronomiques d'une collection d'hybrides, relatives au port de l'arbre, à l'état de l'arbre et à la production.

Matériel et méthodes

Le matériel végétal de cette étude est constitué de 145 hybrides plantés au siège de l'Institut de l'Olivier à Sfax (Tunisie) ayant les coordonnées géographiques suivantes : latitude 34° 44' 02" Nord ; longitude 10° 43' 59" Est ; altitude 6 m. L'hybridation de la variété *Chemlali Sfax* a été entreprise avec différentes variétés locales et introduites.

La plantation a été effectuée à une densité de 1 250 arbres/hectare, soit un écartement de 2 m x 4 m et en régime d'irrigation localisée.

Le suivi de cette collection a concerné les paramètres suivants :

- La production en olives en kg par hybride a été noté en novembre durant la période 2005-2013. Ainsi, on a calculé la production moyenne par année de toute la collection et par croisement pour toute la période de suivi.
- L'indice d'alternance pour toute la période de suivi a été calculé au moyen de la formule de Hoblyn *et al.* (1936) au niveau de chaque croisement.
- Le port de l'arbre a été noté en novembre comme étant érigé, étalé ou retombant selon les normes du COI (1997).
- L'état de l'arbre a été suivi durant deux années successives et est qualifié de productif ou végétatif.

Les données recueillies sont présentées pour la collection entière et pour chaque croisement. Chaque moyenne est présentée avec l'écart type et la variabilité de chaque moyenne est mesurée par le coefficient de variation ($(\text{écart type}/\text{moyenne}) \times 100$).

Résultats et discussion

Inventaire de la collection

La collection de l'Institut de l'Olivier abrite au total 145 hybrides appartenant à 13 croisements différents (Tableau 1). Mis à part les deux hybrides issus de pollinisation libre de la variété *Chemlali Sfax*, les autres croisements ont fait intervenir différents géniteurs de pays méditerranéens. Il s'agit de géniteurs de la France (*Picholine* et *Lucques*), du Liban (*Souri*), de l'Algérie (*Sigoise*), de la Tunisie (*Chemchali* et *Sig 4*),

de l'Espagne (*Arbequina* et *Manzanilla*) et de l'Italie (*Coratina*).

On remarque que 62 % des hybrides proviennent du croisement de *Chemlali Sfax* et *Coratina* et son réciproque. Ce nombre représente un point fort de ce programme d'hybridation en raison des bonnes aptitudes florales et technologiques de la variété *Coratina*. En effet, Al-Kasasbeh *et al.* (2005) rapportent que cette variété est dotée de bonnes caractéristiques polliniques et florales puisqu'elle montre des taux élevés en ce qui concerne les fleurs parfaites, le nombre de pollens par fleur et les fleurs fertiles par pollinisation croisée. D'autre part, Zarrouk *et al.* (2009) montrent que l'huile de *Coratina* a une composition acide équilibrée puisqu'elle présente un taux élevé d'acide oléique (70 %) et assez faible d'acide palmitique (9 %). On devrait s'attendre à une sélection efficace d'hybrides de ce croisement.

Tableau 1. Répartition des hybrides de la collection de l'Institut de l'Olivier selon le croisement

| Croisement | Nombre d'hybrides |
|---------------------|-------------------|
| Arbequina/Chemlali | 6 |
| Chemlali/Arbequina | 2 |
| Chemlali/Coratina | 84 |
| Coratina/Chemlali | 6 |
| Chemlali/Lucques | 8 |
| Chemlali/Sigoise | 13 |
| Chemlali/Souri | 17 |
| Koroneiki/Chemlali | 3 |
| Chemlali Libre | 2 |
| Chemlali/Manzanilla | 1 |
| Chemlali/Picholine | 1 |
| Chemlali/Sig 4 | 1 |
| Chemlali/Chemchali | 1 |
| Total | 145 |

Production en olives par an

La production en olives de la collection d'hybrides par an connaît des variations importantes de 1,9 kg en 2010 à 9 kg en 2005 (Figure 1). Pour chaque année, on remarque une large variabilité entre les hybrides puisque le coefficient de variation a atteint plus de 200 % en 2013. La variabilité intra-annuelle dénote un

comportement productif assez diversifié entre les hybrides, qui peut permettre une sélection efficace au niveau de la productivité dans les conditions de conduite de la parcelle. D'autre part, la variabilité interannuelle peut révéler une tendance à l'alternance de production. Une attention particulière doit être prêtée à ce critère dans la sélection finale des hybrides.

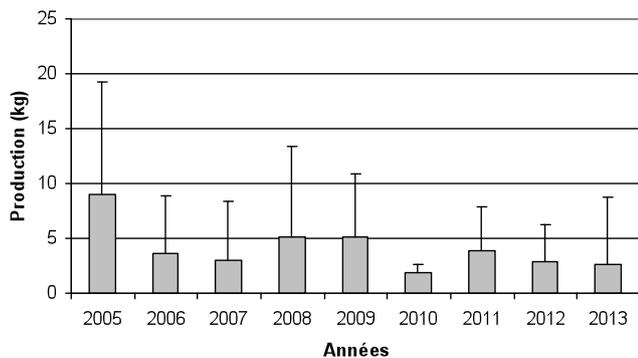


Figure 1: Production en olives des hybrides selon l'année (barre horizontale = écart type)

Production en olives par croisement

La production moyenne par croisement a intéressé six croisements ayant plus de trois hybrides dans la collection (Figure 2). Ce critère est moins variable que celui de la production par an puisque les valeurs oscillent entre 3,35 kg (*Chemlali/Sigoise*) à 4,86 kg (*Chemlali/Souri*). La variabilité entre les hybrides de chaque croisement est également moins importante que celle par an, avec un coefficient de variation maximal de 83,7 %. La variabilité constatée permettra d'effectuer une sélection efficace d'hybrides provenant de la plupart des croisements.

On remarque que la performance de production est pratiquement la même pour les croisements réciproques entre *Chemlali Sfax* et *Coratina*. Cette constatation peut indiquer que le déterminisme génétique du caractère de production est indépendant du géniteur dans ce croisement. Ainsi, la sélection pour la production en olives peut être efficace dans les deux croisements réciproques.

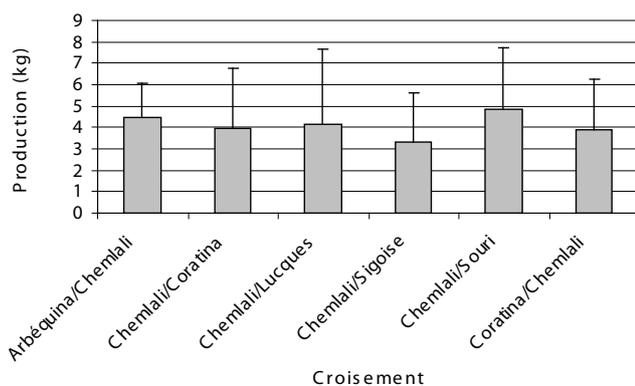


Figure 2: Production en olives des hybrides selon le croisement (Barre horizontale = écartype)

Alternance de production

L'indice d'alternance a intéressé les mêmes six hybrides (Figure 3). Il est très peu variable entre les croisements mais assez élevé, puisque les valeurs varient de 0,71 (*Chemlali/Souri*) à 0,87 (*Arbequina/Chemlali*). La variabilité entre les hybrides de chaque croisement est aussi assez peu importante, avec un coefficient de variation maximal de 16,2 %. Ces résultats montrent que la collection des hybrides étudiés est marquée par un phénomène d'alternance stricte dans les conditions de l'étude. Cela suppose que la sélection d'hybrides productifs sera accompagnée d'un degré d'alternance élevé. L'aspect d'alternance de la collection des hybrides peut avoir comme origine la variété objet du programme d'amélioration *Chemlali Sfax* connue, selon Trigui et Msallem (2002), pour l'alternance de sa production.

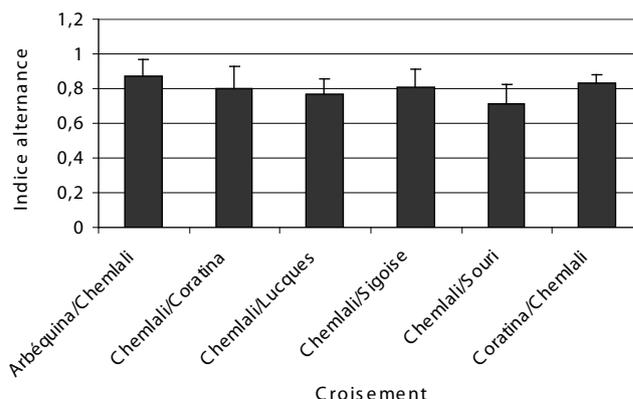


Figure 3: Indice d'alternance des hybrides selon le croisement (Barre horizontale = écart type)

Port de l'arbre

D'après la Figure 4, près de 90 % des hybrides de la collection ont un port étalé (55 %) ou dressé (35 %). Le port retombant est faiblement représenté, avec 10 %. Les hybrides issus des croisements entre *Chemlali Sfax* et *Coratina* montrent le taux de port étalé le plus élevé (45 %), qui reste néanmoins plus faible que celui de toute la collection (Figure 5). Le port érigé de ces hybrides est similaire à celui de la collection (29 %). Toutefois, on remarque que le taux de port retombant de ce groupe d'hybrides est nettement plus élevé que celui de la collection (26 %).

La dominance du port étalé dans les deux cas rappelle le port de la variété *Chemlali Sfax* rapporté par Barranco *et al.* (2000) et Trigui et Msallem (2002). La présence du port dressé dans les hybrides de la collection peut dériver des géniteurs utilisés, tels que Souri et

Lucques, selon le COI (2000). D'autre part, l'augmentation significative du taux de port retombant dans les croisements de *Chemlali Sfax* et *Coratina* peut indiquer un déterminisme génétique bien particulier chez ces deux variétés. Dès lors, une étude génétique et moléculaire des deux géniteurs et de leurs hybrides doit être entreprise pour élucider ce déterminisme. Les résultats de cette étude seront très utiles dans les programmes d'amélioration génétique de l'olivier pour la sélection des variétés à port retombant. Ces variétés sont très recherchées de nos jours pour la culture de l'olivier en hyperintensif qui, d'après Tombesi (2013), gagne de plus en plus de terrain dans l'olivieraie mondiale. Dans notre collection, la sélection est possible pour les différents types de port.

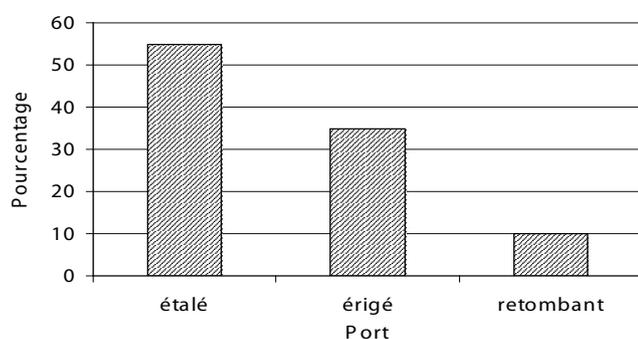


Figure 4: Variabilité du port de l'arbre des hybrides de la collection

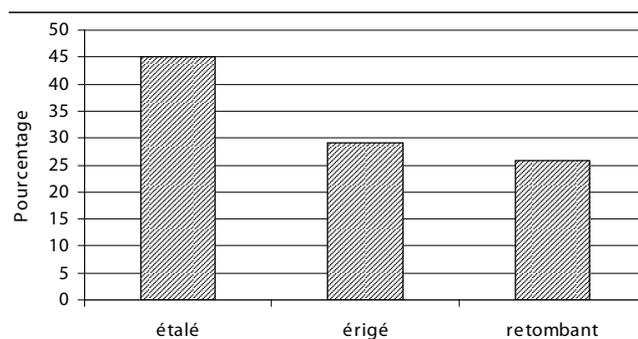


Figure 5: Variabilité du port de l'arbre des hybrides issus des croisements entre *Chemlali Sfax* et *Coratina*

État de l'arbre

Le Tableau 2 montre que le comportement des hybrides de la collection durant la première année est en majeure partie non productif, avec 72 %. Au contraire, les hybrides issus des croisements des variétés *Chemlali Sfax* et *Coratina* sont plutôt en production, avec 58 %. Au cours de la deuxième année, les hybrides de toute la collection sont à moitié en production alors que la totalité des hybrides des croisements de *Chemlali Sfax* et *Coratina* le sont. Par conséquent, les hybrides en production durant les deux années représentent 17,5 % seulement de la collection et 58 % du groupe issus des variétés *Chemlali Sfax* et *Coratina*.

Ces valeurs confirment la présence du phénomène d'alternance de production constaté dans cette collection d'hybrides. Toutefois, ce phénomène est moins visible dans les hybrides issus des croisements de *Chemlali Sfax* et *Coratina*. La sélection pour l'alternance de production sera plus efficace avec les hybrides des deux variétés *Chemlali Sfax* et *Coratina* que dans les autres croisements.

Tableau 2. Pourcentage de l'état de l'arbre des hybrides durant deux années successives

| Matériel végétal | État | Année 1 | Année 2 | 2 années |
|--------------------------------------|-----------|---------|---------|----------|
| Collection d'hybrides | Végétatif | 72 | 48 | |
| | Productif | 28 | 52 | 17.5 |
| Croisement Chemlali Sfax et Coratina | Végétatif | 42 | 0 | |
| | Productif | 58 | 100 | 58 |

Conclusion

Il ressort de la présente étude des paramètres agronomiques de la collection d'hybrides de la variété *Chemlali Sfax* que la sélection pour ces paramètres est prometteuse. D'ailleurs, les travaux entrepris depuis 2005 ont débouché sur une sélection préliminaire d'hybrides qui font l'objet d'évaluation finale. On projette dans un proche avenir l'inscription finale de certains hybrides dans le Catalogue national des variétés.

Références bibliographiques

- Al-Kasasbeh M.F., Atteyyeh A.F., Qrunfleh M.M., 2005. A study on self and cross-pollination of three olive varieties in Jordan. *Dirasat Agricultural sciences* 32 (2): 222-227.
- Bellini E., Giordani E., Parlato M.V., Pandolfi S., 2000 a. Olive genetic improvement: Thirty years of research. *Acta Horticulturae* 586: 105-108.
- Bellini E., Giordani E., Parlato M.V., 2000 b. Three new olive cultivars obtained by cross breeding. *Acta Horticulturae* 586: 221-223.
- COI, 1997. Méthodologie pour la caractérisation primaire et secondaire des variétés d'olivier. Projet RESGEN-CT (96/97). Union européenne-COI.

- COI, 2000. Catalogue mondial des variétés d'olivier. Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castañeda C., Serafini F., Trujillo I., 360 p illustrées. Fontanazza G., Baldoni L., 1990. Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 34 : 32-40.
- Grati-Kamoun N., Khlif M., 2001. Caractérisation technologique des variétés d'olivier cultivées en Tunisie. *Revue Ezzitouna* (numéro spécial). 69 p.
- IO, 2005. Rapport d'activité de l'Institut de l'Olivier pour l'année 2005.
- Lavee S. 1978. Kadesh table olive. *HortScience* 131 (1): 62-63.
- Lavee S., Haskal A., Wodner M. 1986. « Barnea »: a new olive cultivar from first breeding generation. *Olea* 17: 95-99.
- Lavee S., Harshemesh H., Haskal A., Meni Y., Wodner M., Ogrodovich A., Avidan B., Wiesman Z., Avidan N., Trapero-Casus A. 1999. « Maalot », un nouveau cultivar résistant à l'œil de paon (*Spilotea oleagina*, cast). *Olivae* 78 : 51-59.
- Lavee S., Avidan B., Meni Y. 2003. « Askal » : une nouvelle variété performante d'olivier à huile pour les oliveraies intensives et super-intensives. *Olivae* 97 : 53-59.
- Lavee S., Avidan B., Meni Y., Haskal A., Wodner M. 2004. Trois nouvelles variétés d'olivier demi-naines pour la table. *Olivae* 102 : 33-41.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. 2013. Veille économique du secteur oléicole. Note stratégique n° 95. Septembre 2013. 14 p.
- Rallo L., Barranco D., De La Rosa L., Leon L. 2008. Chiquitita olive. *HortScience* 43: 529-531.
- Trigui A. 1996. L'amélioration quantitative et qualitative de la production oléicole en Tunisie : l'incontournable nécessité et les perspectives de l'identification et de l'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 61 : 34-40.
- Trigui A., et Msallem M. 2002. Catalogue des variétés autochtones et types locaux, 159 p.
- Tombesi A. 2013. Advances in harvesting and pruning of olive trees. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. 42 (1): 97-103.
- Ying G., Shu-zhi H., Ziu-jun S., Hui-chan B, Hou-jun W., Shan-an H., 1984. Studies on variation and selection of olive seedlings for cold resistance. In: Shan-an H, Ying G. (eds): *Olive acclimatation and breeding*. Zarrouk W., Baccouri B., Taamalli W., Trigui A., Daoud D., Zarrouk M. 2009. Oil fatty acid composition of eighteen Mediterranean olive varieties cultivated under the arid conditions of Boughrara (southern Tunisia). *Grasas y aceites*. 60 (5): 498-506.
- www.olivettes.fr/fr/biodiversité/olives.pdf (site consulté le 03/02/2015).

Oleokoronal et oleomissional: deux nouveaux composés phénoliques majeurs de l'huile d'olive vierge extra

Panagiotis Diamantakos¹, Angeliki Velkou², K. Brian Killday³,
Thanasis Gimisis², Eleni Melliou^{1,4} et Prokopios Magiatis^{1,4,*}

¹ Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

² Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

³ Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA

* Auteur pour la correspondance: Tél.: +30 210 7274052. E-mail: magiatis@pharm.uoa.gr

Résumé

L'huile d'olive vierge extra contient des quantités significatives de composés phénoliques polaires. La grande majorité est constituée d'esters de tyrosol ou d'hydroxytyrosol avec des dérivés sécoiridoïdes de l'oleuropéine ou du ligstroside. Nous décrivons dans cet article un certain nombre de formes nouvelles ou partiellement caractérisées de ligstroside aglycone et de l'oleuropéine aglycone. Deux d'entre elles sont des formes énoliques stables et sont décrites pour la première fois comme composés réels de l'huile d'olive bien que leur présence dans l'huile d'olive ait été supposée. Pour minimiser la confusion dérivée des noms complexes des isomères d'aglycone, nous proposons de nommer ces deux composés oleokoronal et oleomissional. Après avoir étudié 2 000 échantillons d'huile d'olive de la plupart des principales variétés, nous avons été en mesure d'identifier des échantillons d'huile d'olive dans lesquels l'oleokoronal et l'oleomissional étaient les principaux composés phénoliques et qui pouvaient être utilisés comme matériel de départ pour isoler ces composés. Curieusement, durant la chromatographie en phase normale ou inverse, les deux composés se sont transformés dans les formes connues des aglycones mono aldéhydes à cycle fermé, ce qui explique pourquoi ces composés n'avaient pas encore été identifiés. Leur présence réelle dans l'huile d'olive a été confirmée par observation directe en RMN sans aucun solvant.

Mots clé

Phénoliques, sécoiridoïdes, ligstroside aglycone, oleuropéine aglycone, huile d'olive, RMN

Abstract

Extra virgin olive oil contains significant quantities of polar phenolic ingredients. The large majority is made up of esters of tyrosol or hydroxytyrosol with secoiridoid derivatives from oleuropein or ligstroside. In the current study we describe a number of new or incompletely characterized forms of ligstroside and oleuropein aglycons. Two of them which are stable enolic forms are described for the first time as real olive oil ingredients although their presence in olive oil had been postulated. To minimize the confusion with the complicated names of the aglycon isomers we propose the names oleokoronal and oleomissional for the two ingredients. After screening 2000 samples of olive oil from most major varieties we were able to identify samples of olive oil in which oleo-

koronal and oleomissional were the major phenolic ingredients and could be used as starting material for their isolation. Interestingly, during normal or reversed phase chromatography both compounds were transformed to the known forms of monoaldehydic closed ring aglycons, which offers an explanation as to why those compounds had not been identified so far. Their real presence in olive oil was confirmed by direct NMR observation without the use of any solvent.

Keywords

Phenolics, secoiridoids, ligstroside aglycon, oleuropein aglycon, olive oil, NMR

Introduction

Le régime méditerranéen traditionnel, qui fait l'objet de l'intérêt croissant de la communauté scientifique en raison de ses bienfaits sur la santé, repose sur la consommation quotidienne d'huile d'olive comme principale source de lipides. Les dérivés phénoliques secoiridoïdes sont l'un des groupes de composés de l'huile d'olive les plus importants. Ils présentent un potentiel protectif croissant pour la santé. La législation de l'Union européenne (EU 432/2012), se basant sur l'opinion scientifique de l'EFSA, a récemment autorisé la mention d'allégations santé spécifiques liées aux niveaux des composés spécifiques contenus dans l'huile d'olive.

Les principaux composés effectivement efficaces dans la « protection des lipides sanguins du stress oxydatif » sont l'hydroxytyrosol (1), le tyrosol (2) et leurs dérivés. C'est la raison pour laquelle il est très important d'obtenir des informations précises sur l'identité chimique de tous ces ingrédients et de connaître leur quantité dans l'huile d'olive. Il n'y a pas actuellement de méthode officielle pour mesurer ces composés liés à l'allégation santé en raison de difficultés techniques bien connues. L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et le tyrosol (p-HPEA) sont présents dans l'huile d'olive principalement dans les formes estérifiées de l'oléacéine (3,4-DHPEA-EDA) (3) et de l'oléocanthal (p-HPEA-EDA) (4) ainsi que comme oleuropéine aglycone (3,4-DHPEA-EA) (5a) et ligstroside aglycone (p-HPEA-EA) (6a), qui possèdent tous des activités biologiques significatives.

Toutefois, les termes d'oleuropéine aglycone et de ligstroside aglycone ne sont pas précisément définis et

sont souvent utilisés de manière erronée. En réalité, il existe plusieurs isomères possibles des aglycones et un grand nombre n'est pas bien caractérisé. Ils sont souvent cités par des noms descriptifs compliqués comme : forme hydroxylée, forme monoaldéhyde, forme dialdéhyde, forme hydratée, cycle ouvert, cycle fermé, carboxylé, décarboxylé, etc. L'absence de définitions officielles précises et de noms et d'informations fiables de la RMN est source de plusieurs problèmes dans la littérature. Dans cet article, nous examinons l'isolement et la structure d'un certain nombre de formes précédemment décrites d'oleuropéine aglycone et de ligstroside aglycone et nous clarifions les termes et la caractérisation par RMN des membres précédemment décrits de cette famille de composés.

Matériel et méthodes

Général

De la β -glucosidase d'amande a été achetée auprès de Sigma-Aldrich. L'oleuropéine a été isolée des feuilles d'oliviers sauvages ayant une teneur élevée en oleuropéine (15 % sur poids sec) comme décrit précédemment (Andreadou *et al.*, 2006). Les spectres de RMN ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Avance 700 ; les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm et les axes ont été calibrés par rapport au signal résiduel de CDCl_3 . Une chromatographie a été réalisée sur colonne de gel de silice RP-18 60 (40–63 μm) (Merck) et une autre chromatographie a été réalisée sur couche mince (CCM) sur des plaques revêtues de gel de silice RP-18 60 F254 Merck, 0,25 mm.

Huile d'olive

L'isolement des composés étudiés a été réalisé sur deux types d'huile : la première, fournie par la coopérative de Paleopanagia en Laconie (Grèce), a été produite en novembre 2013 à partir d'olives de la variété *Koroneiki* dans un moulin à trois phases à 25 °C avec un malaxage de 30 minutes. La deuxième huile, fournie par Berkeley à Oroville (Californie), a été produite à partir d'olives de la variété *Mission* en novembre 2013.

D'autres huiles d'olive utilisées pour l'étude venaient d'une base de données d'échantillons comme indiqué plus haut (Karkoula *et al.*, 2014).

Extraction et isolement

De l'huile d'olive (100 g) a été mélangée avec du cyclohexane (400 ml) et de l'acétonitrile (500 ml) et le mélange a été homogénéisé et centrifugé à 4 000 tpm

pendant 5 min. La phase d'acétonitrile a été recueillie dans une ampoule à décanter, et évaporée sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu a été soumis à une chromatographie en phase inverse sur colonne de gel de silice. De l'acétonitrile à 100 % a été utilisé pour éliminer les lipides résiduels. Toutes les fractions recueillies qui étaient exemptes de lipides ont été réunies,

évaluées et ont fait l'objet d'une nouvelle chromatographie préparative CCM en phase inverse, (H₂O/Acétonitrile 60:40), permettant l'isolement de deux zones : A (2,3 mg/ rf = 0,5) et B (3,3 mg/ rf = 0,7). La structure des composés isolés (**Figure 1**) a été étudiée au moyen d'une combinaison de spectres RMN 1D et 2D. Les pics assignés sont présentés dans les **Tableaux 1 à 4**.

Tableau 1. Données 1H-NMR de l'oléokoronol (14) et ligstrodiol (12a,b) à une concentration de 3 mg/0.6 mL. Calibrage de l'axe basé sur CDCl₃ = 7.26 ppm

| | 12a (5S,4R) | 12b (5S,4S) | 14 |
|-------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 9.212, d, 2.0 | 9.218, d, 2.0 | 9.225, d, 1.7 |
| 3 | 9.68, d, 2.7 | 9.46, d, 2.7 | 7.386, dd, 12.6, 0.8 |
| 4 | 4.06, dd, 10.5, 2.7 | 4.11, dd, 10.5, 2.7 | - |
| 5 | 3.83, m, (overlp) | 3.83, m (overlp) | 4.16, ddd (overlp) |
| 6a | 2.81, (overlp) | 2.82, (overlp) | 2.97, dd, 16.1, 9.6 |
| 6b | 2.62, (overlp) | 2.58, (overlp) | 2.78, dd, 16.1, 6.3 |
| 8 | 6.70, q, 7.1 | 6.72, q, 7.1 | 6.56, q, 7.1 |
| 10 | 2.055, d, 7.0 | 2.062, d, 7.1 | 2.062, d, 7.0 |
| 3-OH | - | - | 11.75, d, 12.6 |
| OCH3 | 3.65, s | 3.77, s | 3.75, s |
| 1' | 4.20, m | 4.18, m | 4.18, m |
| 2' | 2.81, m | 2.81, m | 2.81, m |
| 4',8' | 7.05, d (overlp) | 7.05, d (overlp) | 7.05, d (overlp) |
| 5',7' | 6.76, d (overlp) | 6.76, d (overlp) | 6.76, d (overlp) |

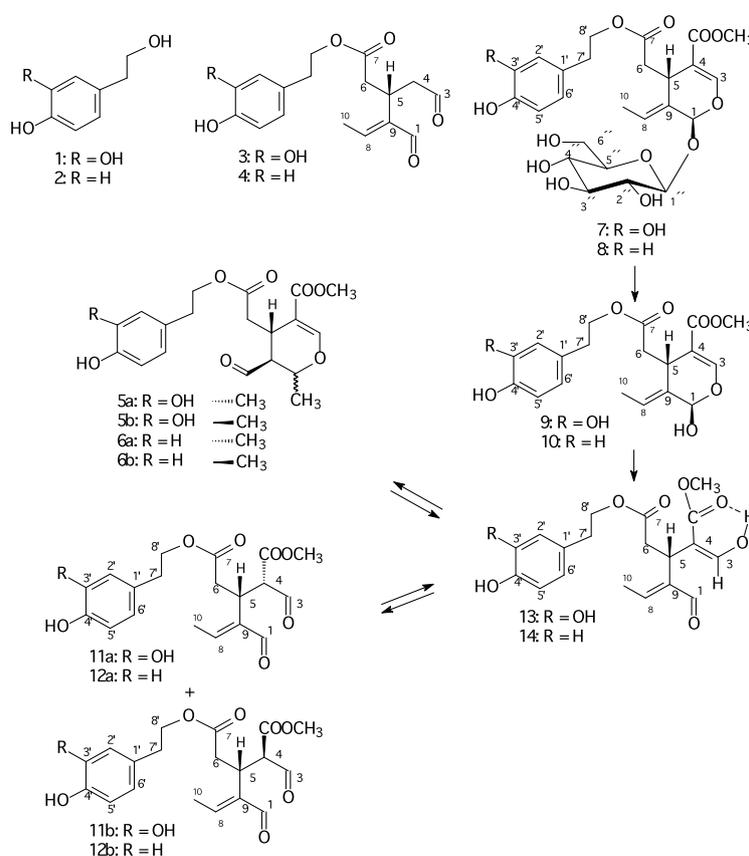


Figure 1: Structure des composés étudiés

Analyse RMN de l'huile d'olive avec extraction

L'extraction et l'analyse de l'huile d'olive ont été réalisées comme décrit précédemment (Karkoula *et al.*, 2014). En bref, l'huile d'olive (5,0 g) a été mélangée avec du cyclohexane (20 ml) et de l'acétonitrile (25 ml) et le mélange a été homogénéisé au moyen d'un mélangeur vortex pendant 30 secondes et centrifugé à 4 000 tpm pendant 5 min. La phase de l'acétonitrile (25 ml) a été recueillie, mélangée avec 1,0 ml d'une solution de syringaldéhyde (0,5 mg/ml) dans l'acétonitrile et évaporée sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu a été dissous dans CDCl_3 (750 μl) et un volume mesuré avec précision (550 μl) de la solution a été transféré dans un tube pour RMN de 5 mm. Cinquante acquisitions (*scans*) ont été recueillies avec 32 K de points de données dans un intervalle spectral de 0 à 16 ppm avec un délai de relaxation de 1 s et un délai d'acquisition de 1,7 s. Avant la transformée de Fourier, un facteur exponentiel de pondération correspondant à un élargissement de la ligne de 0,3 Hz a été appliqué. Les spectres ont été lissés et intégrés automatiquement au moyen du logiciel TopSpin (Bruker). L'intégration précise a été effectuée manuellement pour les pics d'intérêt.

Analyse RMN à impulsion d'excitation sélective d'une huile d'olive sans extraction

600 μl d'huile d'olive ont été introduits dans un tube pour RMN de 5 mm sans solvant deutéré. Les spectres RMN des échantillons purs ont été obtenus sans deutérium lock (verrouillage), générant un field offset de la même valeur que celle obtenue pour l'échantillon extrait locké dans le CDCl_3 . La séquence DDPFGPE a été exécutée en utilisant un reburp selective refocusing pulse de 1,26 ms à 180 degrés, avec une fenêtre d'excitation de 4 900 Hz de 14 à 7 ppm. Les données de 16 balayages ont été recueillies. Les spectres ont été lissés automatiquement en utilisant le logiciel TopSpin (Bruker).

Synthèse de l'oleuropéine aglycone

L'oleuropéine (100 mg) a été dissoute dans un ballon de 25 ml à fond rond contenant un tampon acétate (pH = 5, 5 ml). Le chloroforme (5 ml) a été ajouté et le système biphasique résultant a été agité doucement. De la β -glucosidase (3,4 unités/mg, 70 mg) a été ajoutée et la réaction résultant a été agitée doucement à 30 °C pendant 20 h, ou jusqu'à ce que la CCM (12 % de MeOH dans du dichlorométhane) montre une consommation complète de l'oleuropéine. La phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été extraite avec du chloroforme (3 x 5 ml). Les extraits organiques combinés ont été lavés avec de la saumure (20 ml), séchés sur du sulfate de sodium, puis filtrés et évaporés sous vide. Le produit brut (66 mg, 94 %) a été analysé par ^1H RMN.

Résultats et discussion

Les termes oleuropéine aglycone et ligstroside aglycone ne sont pas définis avec précision et sont souvent utilisés de manière erronée. Les deux termes correspondent à un grand nombre d'isomères qui, dans de nombreux cas, ne sont pas bien décrits. En fait, la plupart des dérivés phénoliques sécoiridoïdes de l'huile d'olive proviennent de l'oleuropéine (7) et du ligstroside (8), qui sont les principaux sécoiridoïdes du fruit de l'olivier. Au cours du broyage et du malaxage pour l'extraction de l'huile d'olive, ces deux ingrédients sont en contact avec la β -glucosidase (Koudounas *et al.*, 2015) et sont transformés respectivement en aglycones réels 9 et 10. Ces deux formes sont instables et ont été observées uniquement dans des conditions très spécifiques (Christophoridou et Dais, 2009). À l'intérieur de la matrice de l'huile d'olive ou généralement dans un milieu non aqueux, les aglycones réels 9 et 10 n'existent pas. Ils sont principalement transformés dans les formes monoaldéhydiques plus stables à cycle fermé 5a et 6a (Limiroli *et al.*, 1995) ou par réarrangement dans les formes dialdéhydiques à cycle fermé. Les formes annulaires fermées ont également été décrites dans les différentes formes de stéréoisomères, par exemple 5b et 6b, mais d'autres existent aussi (Perez-Trujillo *et al.*, 2010). Comme nous l'avons montré récemment, les formes annulaires fermées de l'oleuropéine aglycone et du ligstroside aglycone qui dominent dans l'huile d'olive se trouvent sous la forme de 5a et 6a, tandis que les autres stéréo-isomères sont artificiellement augmentés au cours de la purification ou de l'analyse chromatographique (Karkoula *et al.*, 2014) et on les trouve normalement à un taux très bas ou ils sont totalement absents.

Nous avons récemment publié une méthodologie pour l'observation et la quantification des formes monoaldéhydiques à cycle fermé 5a et 6a par RMNq, avec de l'oléacéine (3) et de l'oléocanthal (4) (Karkoula *et al.*, 2012 ; Karkoula *et al.*, 2014). En appliquant cette méthodologie à 2 000 échantillons d'huiles d'olive obtenues à partir de plusieurs variétés dans différentes conditions de production, nous avons pu observer à plusieurs reprises un certain nombre de pics correspondant aux protons aldéhydiques qui ne correspondaient à aucune structure décrite, mais que nous avons pu provisoirement relier à des isomères de l'oleuropéine aglycone et du ligstroside aglycone. Fait intéressant, dans certains échantillons d'huile d'olive, ces pics correspondaient aux principaux composants phénoliques. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'isoler les ingrédients inconnus et de caractériser leur structure, en utilisant comme produit de départ deux huiles d'olive spécialement sélectionnées à partir des variétés *Koroneiki* et *Mission*.

De manière surprenante, tous les efforts initiaux à l'isolement par chromatographie sur colonne ou sur couche mince, que ce soit en phase normale ou inverse, ont conduit uniquement aux structures connues **5a,b** et **6a,b**, alors que l'analyse RMN n'avait montré que de faibles concentrations de ces structures dans l'huile d'origine. Partant de ce constat, nous avons supposé que les ingrédients inconnus étaient des structures qui avaient été transformées en **5a,b** et **6a,b** durant la purification. Un réexamen attentif des deux zones A de la CCM a révélé la

présence d'un petit reste de la forme initiale, identique à celle observée dans l'extrait de l'huile d'olive avant la purification. L'analyse par RMN des zones mentionnées ci-dessus a montré qu'il s'agissait d'un mélange inséparable de trois composés dans chaque cas. Étant donné que le mélange était inséparable et qu'il avait été transformé au cours du processus de purification, nous l'avons étudié en tant que mélange dans le cadre d'expériences RMN 2D étendues afin d'élucider la structure de chaque composé et d'attribuer les pics observés (Tableaux 1-4).

Tableau 2: Données ^{13}C -NMR de l'oléokoronal (14) et ligstrodiol (12a,b) à une concentration de 3 mg/0.6 mL. Calibrage de l'axe basé sur $\text{CDCl}_3 = 177.16$ ppm

| | 12a (5S,4R) | 12b (5S,4S) | 14 |
|--------|-------------|-------------|--------|
| ,1 | 194,75 | 194,56 | 194,88 |
| ,3 | 195,72 | 195,08 | 164,23 |
| ,4 | 60,27 | 59,30 | 103,33 |
| ,5 | 31,42 | 31,42 | 29,95 |
| ,6 | 34,52 | 34,98 | 35,61 |
| ,7 | 172,07 | 171,33 | 171,98 |
| ,8 | 156,11 | 155,74 | 153,53 |
| ,9 | 142,40 | 141,87 | 142,68 |
| ,10 | 15,20 | 15,20 | 15,20 |
| ,11 | 168,18 | 168,55 | 172,18 |
| ,OCH3 | 52,38 | 52,61 | 51,59 |
| ,1' | 65,24 | 65,24 | 65,24 |
| ,2' | 34,02 | 34,02 | 34,02 |
| ,3' | 129,88 | 129,88 | 129,95 |
| ,4',8' | 130,03 | 130,03 | 130,05 |
| ,5',7' | 115,29 | 115,29 | 115,29 |
| ,6' | 154,13 | 154,13 | 154,13 |

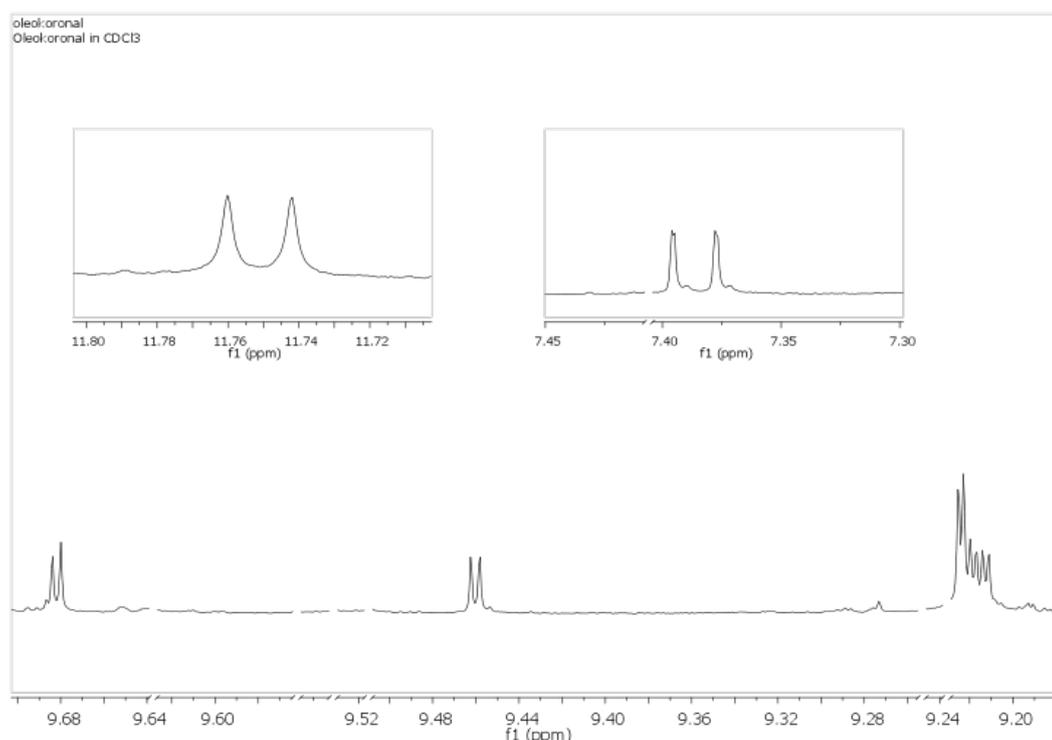


Figure 2: Spectre ^1H NMR de la région aldéhydique et oléfinique de l'oléokoronal et du mélange 4S/4R-ligstrodiol

L'élucidation de la structure a révélé que l'ingrédient majeur dans chaque mélange était une forme monoaldéhydique à cycle ouvert tandis que les deux autres correspondaient à des formes dialdéhydiques à cycle fermé. Le rapport entre les trois composés tels que déterminés par l'intégration des trois protons aldéhydiques, à savoir à 9,21 - 9,22 ppm pour la zone A était de 2:1:1 (**Figure 2**). Le premier mélange des trois composés de la zone A montrait les signaux caractéristiques du groupement tyrosol tandis que le deuxième mélange de la zone B montrait les signaux caractéristiques du groupement hydroxytyrosol. Au moyen d'expériences HSQC, HMBC, COSY et TOCSY, nous avons pu attribuer tous les pics des trois composés dans chaque mélange. Tous les composés montraient les pics caractéristiques d'un groupe méthyle attaché à une double liaison adjacente à un proton oléfinique ainsi que tous les autres pics attendus pour la forme à cycle ouvert de l'acide élénolique estérifié avec du tyrosol ou de l'hydroxytyrosol. Les deux constituants mineurs de chaque mélange correspondaient aux paires 4*R*,5*S* et 4*S*,5*S* des formes dialdéhydiques à cycle ouvert de l'oleuropéine aglycone et du ligstroside aglycone **11a,b** et **12a,b**. Le troisième ingrédient principal dans chaque mélange correspondait à une structure très similaire avec une différence principale : l'absence d'un deuxième aldéhyde. Fait intéressant, au lieu d'un deuxième aldéhyde chaque molécule présentait un doublet très déblindé autour de 11,8 ppm, qui dans la HSQC n'était relié à aucun carbone. En outre, un proton oléfinique supplémentaire a été observé autour de 7,3 ppm comme un doublet ($J = 16$ Hz) corrélé avec le doublet à 11,8 ppm. Le proton oléfinique dans l'expérience de HMBC a été relié à un carbonyle portant un groupe méthoxyl. Il était évident, selon toutes ces données, que l'ingrédient principal dans chaque zone était la forme monoénolique des dialdéhydés **11a,b** et **12a,b**. Contre toute attente, les formes énol **13** et **14** étaient stables en raison de la liaison hydrogène entre l'hydroxyle énolique et le carbonyle adjacent du groupe carbométhoxy.

L'existence de la forme énol du ligstroside aglycone **14** avait été postulée par le passé (Cf. Angerosa *et al.*, 1996). Cependant, il est rapporté ici sans aucun doute pour la première fois comme un produit et un ingrédient naturel de l'huile d'olive que nous vous proposons de nommer oleokoronal. Les formes dialdéhydiques du ligstroside aglycone **12a,b** avaient été signalées à plusieurs reprises comme ingrédients de l'huile d'olive par l'identifica-

tion MS (Cf. De Nino *et al.*, 2000), mais l'élucidation de leur structure par RMN n'avait jamais été rapportée. De même, ils ont été étudiés par identification MS dans les eaux usées des huileries par Sanchez de Medina *et al.* (2011) et nommés p-HPEA-FA. Dans certains cas, ils avaient été signalés comme ligstroside aglycone dialdéhyde mais en fait ils faisaient référence au p-HPEA-EDA ou à l'oléocanthal, qui est confondu avec le nom decarboxyméthyl ligstroside aglycone dialdéhyde (Cf. Gomez del Campo et Garcia, 2012). Afin de minimiser l'utilisation de noms descriptifs longs et ambigus, nous proposons que le nom le plus approprié pour **12a,b** soit 4*R*/4*S*-ligstrodial, par association avec le ligstral qui se réfère à la forme monoaldéhydique à cycle fermé du ligstroside aglycone **6a,b** (Calis *et al.*, 1993).

La forme énolique de l'oleuropéine aglycone **13** n'a jamais été signalée comme un ingrédient de l'huile d'olive mais seulement comme un ingrédient des fruits de l'olivier non transformés (Bianco & Uccella, 2000) ou comme un produit de l'hydrolyse enzymatique de l'oleuropéine (Bianco *et al.*, 1999a). Cependant, plusieurs anomalies dans la description RMN de ce composé (Bianco & Uccella 2000 ; Bianco *et al.*, 1999a) doivent être révisées. En particulier, les auteurs n'ont pas signalé le pic critique de l'hydroxyle énolique à 11,78 ppm. Ils ont également signalé le déplacement chimique du carbone oléfinique portant le groupe carbométhoxy à 130,37 ppm alors que nous l'avons observé à 103,69 ppm. Le proton oléfinique énolique à 7,36 ppm a été donné comme un doublet avec un couplage 6 Hz alors que le couplage réel est de 16 Hz et, évidemment, il n'y a aucun signal OH à 7,40 ppm comme indiqué précédemment. D'autres différences dans la RMN du ^1H et du ^{13}C ainsi que plusieurs constantes de couplage manquantes rendent nécessaire une description plus complète et précise. Il est à noter que ce composé et **11a, b** présentent une dérive importante de déplacements chimiques de RMN du ^1H spécifiques selon la concentration de l'échantillon (**Tableau 4** et **Figure 3**). Cela peut expliquer certaines différences par rapport aux données précédentes de la littérature, mais pas les plus importantes. Fait intéressant, les mêmes auteurs dans un document parallèle (Bianco *et al.*, 1999b) attribuent les pics observés à 11,79 et 11,83 ppm à des dérivés d'oxydation (aldéhyde carboxyle) découlant lentement dans CDCl_3 . Selon nos résultats, ces pics ne sont pas dus à l'oxydation, mais à l'équilibre entre l'aldéhyde et l'énol.

Tableau 3: Données ¹H-NMR de l'oléomissional (13) et l'oleuropeindial (11a,b) à une concentration de 20 mg/0.6 mL.^a Calibrage de l'axe basé sur CDCl₃ = 7.26 ppm

| | 11a (5S,4R) | 11b (5S,4S) | 13 |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 9.17, d, 2.0 | 9.17, d, 2.0 | 9.17, d, 2.0 |
| 3 | 9.67, d, 2.7 | 9.44, d, 2.7 | 7.36, dd, 12.6, 0.8 |
| 4 | 4.04, dd, 10.5, 2.7 | 4.10, dd, 10.5, 2.7 | - |
| 5 | 3.84, tdd, 10.5, 4.7, 2.0 | 3.80, tdd, 10.5, 4.3, 2.0 | 4.17, ddd (overlp) |
| 6a | 2.82, dd, 16.0, 10.5 | 2.83, dd, 15.8, 10.5 | 2.98, dd, 15.8, 9.6 |
| 6b | 2.63, dd, 16.0, 4.7 | 2.58, dd, 15.8, 4.3 | 2.77, dd (overlp) |
| 8 | 6.70, c, 7.1 | 6.73, c, 7.1 | 6.59, c, 7.1 |
| 10 | 2.02, d, 7.1 | 1.99, d, 7.1 | 2.05, d, 7.1 |
| 3-OH | - | - | 11.78, d, 12.6 |
| OCH ₃ | 3.65, s | 3.78, s | 3.74, s |
| 1' | 4.21, m | 4.12, m | 4.16, m |
| 2' | 2.75, m | 2.75, m | 2.75, m |
| 4' | 6.68, d, 1.8 ^b | 6.67, d, 1.8 ^b | 6.71, d, 1.8 ^b |
| 7' | 6.78, d (overlp) | 6.78, d (overlp) | 6.78, d (overlp) |
| 8' | 6.58 | 6.58 | 6.60, dd |

^a De petites différences dans les déplacements chimiques ont été observées pour 11a, 11b et 13 lorsque les spectres ont été enregistrés à une concentration de 1 mg/0.6 mL (e.g H-3: 9.70/9.46/7.39, H-10: 2.04/1.98/2.07, COOCH₃: 3.66/3.80/3.76 respectivement)

^b peut interchanger

Tableau 4: Données ¹³C-NMR de l'oléomissional (13) et l'oleuropeindial (11a,b) à une concentration de 20 mg/0.6 mL. Calibrage de l'axe basé sur CDCl₃ = 177.16 ppm

| | 11a (5S,4R) | 11b (5S,4S) | 13 |
|------------------|-------------|-------------|--------|
| 1 | 195.53 | 195.65 | 196.04 |
| 3 | 196.24 | 195.41 | 164.07 |
| 4 | 60.45 | 59.50 | 103.69 |
| 5 | 31.58 | 31.97 | 30.14 |
| 6 | 34.80 | 35.44 | 35.92 |
| 7 | 171.71 | 171.46 | 172.18 |
| 8 | 156.78 | 157.29 | 155.05 |
| 9 | 141.14 | 140.52 | 142.40 |
| 10 | 15.40 | 15.49 | 15.41 |
| 11 | 168.23 | 169.02 | 172.12 |
| OCH ₃ | 52.69 | 53.02 | 51.86 |
| 1' | 65.52 | 65.52 | 65.52 |
| 2' | 34.28 | 34.28 | 34.28 |
| 3' | 130.46 | 130.46 | 130.53 |
| 4' | 116.29 | 116.24 | 116.38 |
| 5' | 143.60 | 143.65 | 143.68 |
| 6' | 143.05 | 143.00 | 142.92 |
| 7' | 115.39 | 115.39 | 115.39 |
| 8' | 121.27 | 121.33 | 121.27 |

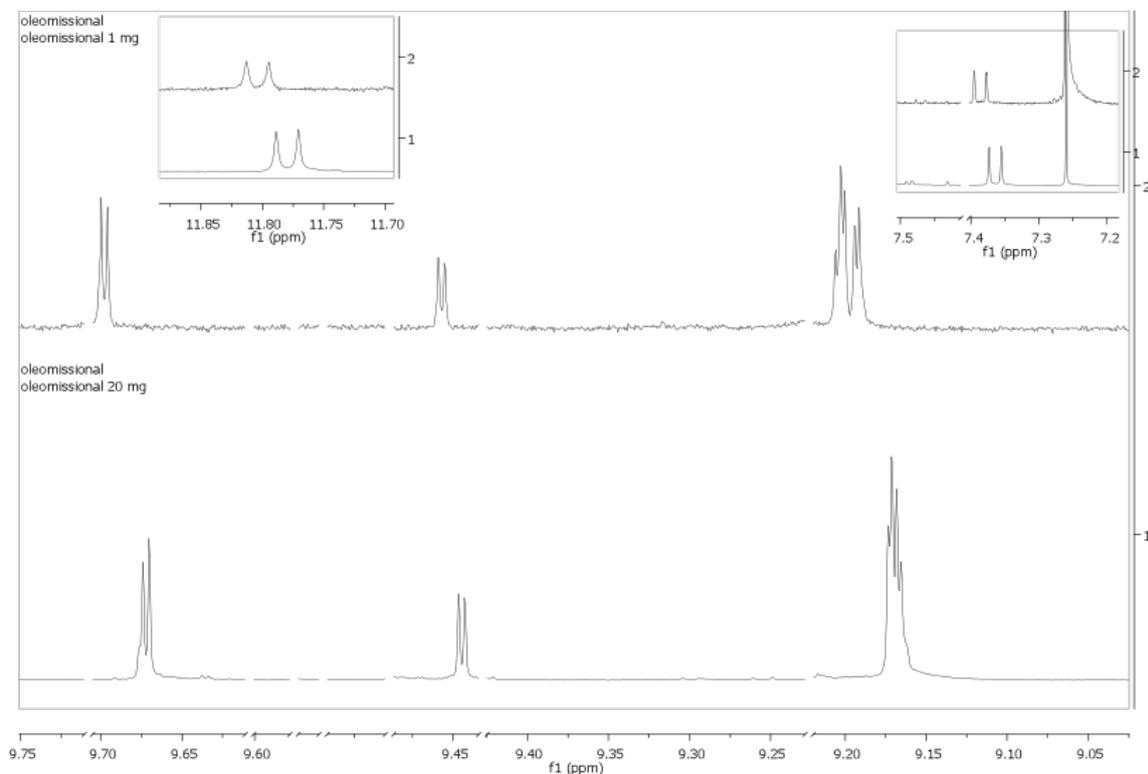


Figure 3: Spectre ^1H NMR de la région aldéhydique et oléfinique de l'oléomissional et du mélange $4S/4R$ -oleuropeindial (en haut: 1mg/0.6 ml, en bas: 20 mg/0.6 ml)

La même confusion semble apparaître dans le cas de l'article de Paiva-Martins et Gordon (2001) dans lequel deux pics à 11,76 et 11,82 ppm ont été reliés aux groupes carboxyle de deux isomères géométriques résultant de l'hydrolyse des groupes carbométhoxy de **13**. De même, la cause n'est pas l'hydrolyse ou l'oxydation, mais l'équilibre entre l'aldéhyde et la forme énol. La structure proposée doit donc être considérée comme douteuse. Les mêmes auteurs dans le même travail décrivent également les formes dialdéhydrique à cycle ouvert **11a,b** isolées à partir de feuilles d'olivier, mais les données de la RMN rapportées sont incomplètes pour de nombreuses constantes du couplage. En outre, dans plusieurs cas, il y a une confusion dans les données ^{13}C entre les pics attribués à chacun des deux diastéréoisomères.

Des composés **11a,b** ont été signalés dans l'huile d'olive par De Nino *et al.* (2000), mais la description de la RMN est très trompeuse et contient plusieurs affectations incohérentes qui ont également besoin de révision. La description par Bianco *et al.* (1999a) de l'hydrolyse de l'oleuropéine est plus précise, mais là encore plusieurs pics ne sont pas observés (par exemple à 56 ppm) ou ils le sont à des déplacements chimiques très différents (différence > 5 ppm pour le carbone portant le groupe carbométhoxy), ou la des-

cription du motif de scission et des constantes de couplage correspondantes est incomplète. La description la plus précise a été donnée par Christophoridou & Dais (2009) dans un document sur l'étude de l'hydrolyse enzymatique de l'oleuropéine, mais il y a encore des différences et aucune donnée de la RMN du carbone n'est fournie.

Pour éviter toute confusion et simplifier la nomenclature de la forme énol **13**, nous proposons le nom oleomissional au lieu de l'énololeuropeindial décrit à tort (Bianco *et al.*, 1999a). Pour les formes dialdéhydriques à cycle ouvert de l'oleuropéine aglycone, le nom le plus approprié serait $4S/4R$ -oleuropeindial comme indiqué précédemment (Bianco *et al.*, 1999).

Afin de confirmer que l'oleokoronol est un véritable composé de l'huile d'olive et non un artefact produit durant l'extraction ou la dilution de l'huile d'olive avec le solvant de la RMN (CDCl_3), nous avons effectué une expérience d'impulsion d'excitation sélective dans un échantillon d'huile d'olive sans aucun solvant, comme décrit dans la partie expérimentale et nous l'avons comparée avec l'extrait de la même huile d'olive diluée dans le CDCl_3 . L'impulsion d'excitation sélective permet d'observer des pics de faible concentration en présence d'autres composés en forte concentration (par exemple,

les lipides). La méthodologie suivie a été décrite précédemment de manière détaillée (Melliou *et al.*, 2015). Dans cette expérience, nous avons pu observer l'hydroxyle déblindé à 11,78 ppm de la forme énol **14** du ligstroside aglycone dans de l'huile d'olive pure et dans

un extrait de la même huile d'olive (**Figure 4**) prouvant qu'il s'agit d'un véritable composant de l'huile d'olive. La dérive observée des déplacements chimiques dans le spectre de l'huile pure est causée par la présence de grandes quantités de lipides.

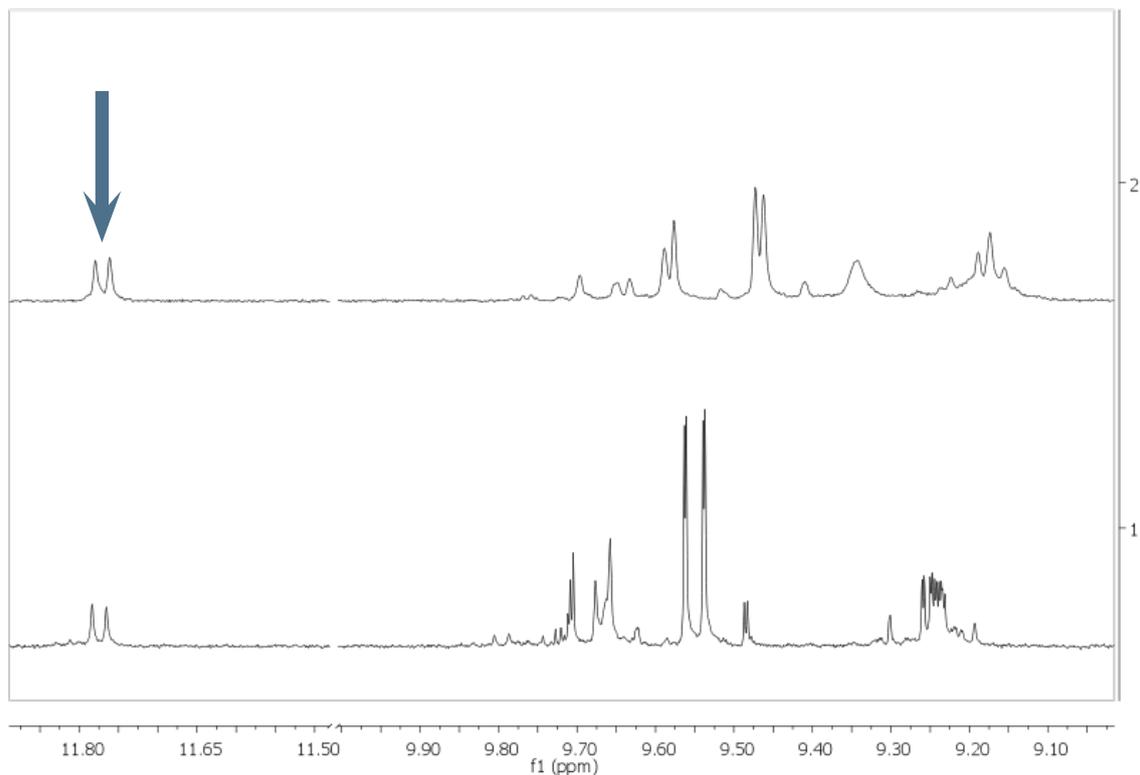


Figure 4: Spectre d'impulsion d'excitation sélective ^1H NMR d'huile d'olive pure (en haut) et d'huile d'olive diluée dans CDCl_3 (en bas). Le pic d'oléokoronal à 11,78 ppm peut être observé dans les deux cas, montrant que l'oléokoronal est un ingrédient réel de l'huile d'olive.

Pour confirmer davantage les structures proposées, nous avons procédé à la transformation enzymatique de l'oleuropéine dans les formes à cycle ouvert. Dans des conditions de pH appropriées, il était possible de réduire au minimum la transformation de l'oleuropéine en forme **5a** à cycle fermé et de diriger la transformation uniquement vers les formes à cycle ouvert. Le mélange résultant des composés a montré exactement les mêmes pics que le mélange isolé de l'huile d'olive et de nouveau le dérivé majeur était la forme énol **13** accompagnée des deux stéréo-isomères **11a** et **11b**.

Concernant les quantités d'oleuropéine aglycone et de ligstroside aglycone, dans un travail précédent, nous avons présenté une méthode validée pour mesurer les formes **5** et **6** du monoaldéhyde à cycle fermé (Karkoula *et al.*, 2014). Avec la même méthodologie et les courbes d'étalonnage, nous avons réussi à obtenir des données

quantitatives pour chacune des formes dialdéhydiques et énoliques. La séparation complète de chaque pic n'est possible qu'avec des RMN de champs magnétiques élevés (> 600 MHz). Cependant, même à 400 MHz, l'intégration RMN de l'ensemble de l'aire des protons aldéhydiques permet d'obtenir des données quantitatives pour toutes les formes d'aglycones à cycle ouvert dans leur globalité.

En ce qui concerne l'abondance de l'oleokoronal et de l'oleomissional, il convient de mentionner qu'ils ont d'abord été détectés dans l'huile d'olive des variétés *Koroneiki* (**Figure 5**) et *Mission* (**Figure 6a**). On notera également que dans la plupart des huiles étudiées, la concentration d'oleokoronal et d'oleomissional et des dialdéhydes liés était inférieure à la concentration d'oléocanthal et d'oléacéine et dans de nombreux cas, les deux composés étaient totalement absents (**Figure 6b**). Cependant, il semble que dans des variétés spé-

cifiques et également selon les paramètres de production de l'huile, l'oleokoronal ou l'oleomissional peuvent être des composés phénoliques importants de l'huile

d'olive. Un autre article est consacré à la présentation de données supplémentaires sur cette question et sur les concentrations de ces composés.

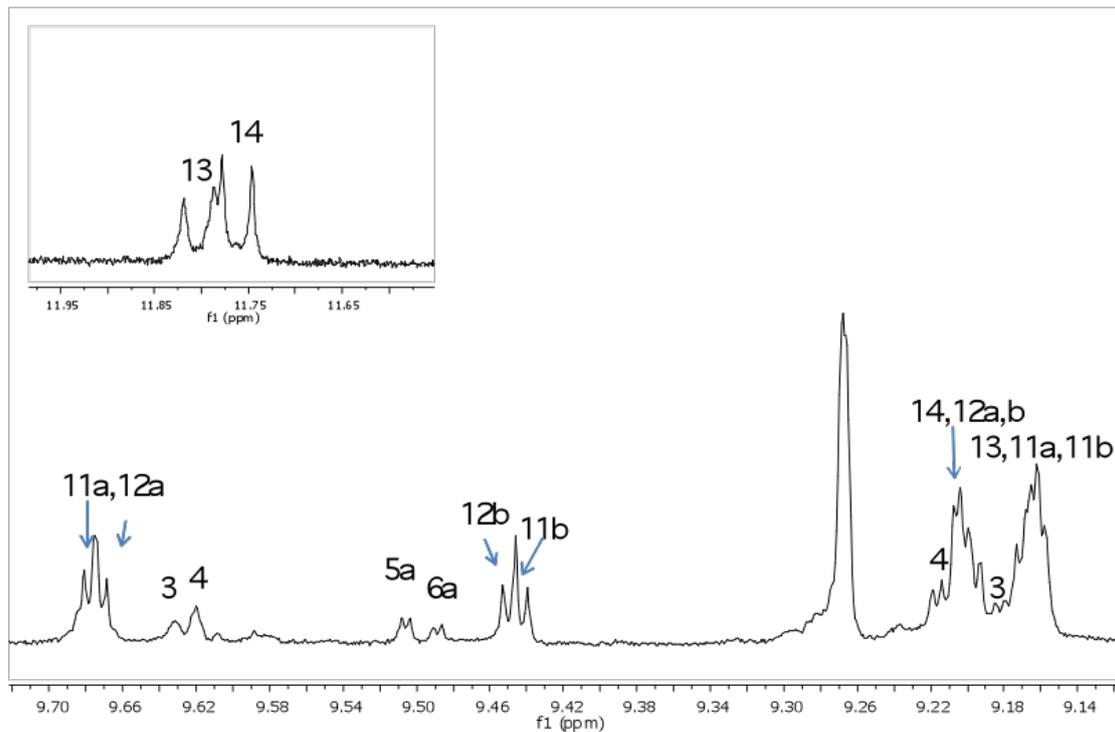


Figure 5: Spectre ^1H NMR de la région aldéhydique d'une huile d'olive Koroneiki produite à faible température et avec une durée réduite de malaxage (enregistré à 400 MHz)

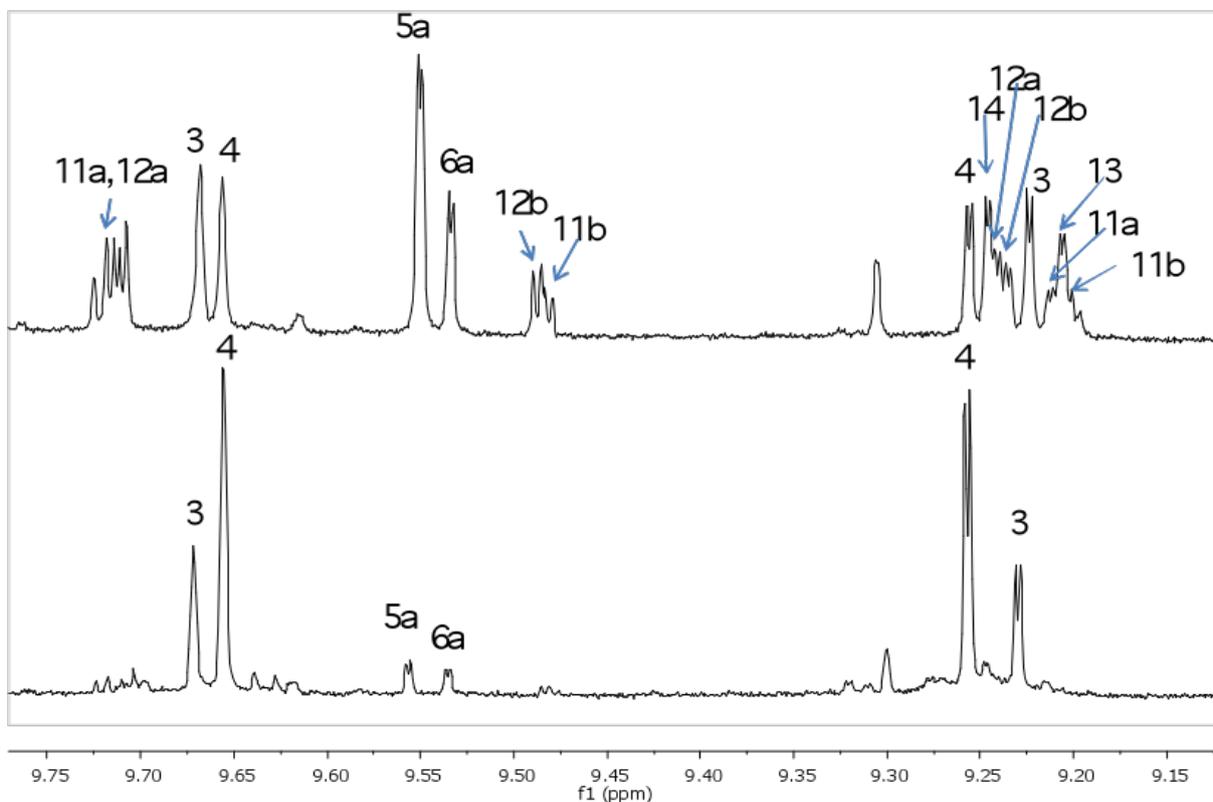


Figure 6: Spectre ^1H NMR de la région aldéhydique d'un extrait d'huile d'olive de la variété Mission (a: en haut) et de la variété typique Koroneiki (b: en bas) montrant les pics correspondants aux composés 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14. Le déplacement chimique des pics observés dans l'extrait d'huile d'olive est légèrement différent de celui des composés purs en raison de la présence des lipides dans l'extrait (non montré).

Conclusion

Dans ce travail, nous avons isolé et décrit par RMN plusieurs composés appartenant à la famille de l'oleuropéine et du ligstroside aglycone, dont certains ont été considérés pour la première fois comme composés de l'huile d'olive. De nouveaux noms tels que oleokoronal, oleomissional et ligstrodial ont été proposés afin d'atténuer la confusion découlant de l'utilisation de noms compliqués ou abrégés. L'étude RMN directe d'une huile d'olive pure a montré que les formes énoïques des aglycones sont des composés phénoliques importants, en tout cas d'huiles d'olive spécifiques. La caractérisation complète de ces nouveaux composés et la simplicité de l'analyse quantitative par RMN offrent une nouvelle perspective pour le contrôle de la qualité de la protection des bienfaits de l'huile d'olive sur la santé.

Remerciements

Nous tenons à remercier la Coopérative de Paleopagnia en Laconie et le Berkeley Olive Grove en Californie pour les échantillons d'huile d'olive, M^{me} Marcomichelaki de Volvi Estate pour les feuilles d'olivier, Venia Smyrli et Stella Konstantopoulou pour l'isolement de l'oleuropéine et le Prof. Diomedes Logothetis pour la mise à disposition des installations de RMN à VCU. AV. et T.G. remercient le programme SYNERGASIA 2011 pour son financement. Ce programme est cofinancé par le Fonds européen de développement régional et les ressources nationales (Code de projet 11SYN_2_1613). P. D., E. M. et P. M. remercient la Fondation Latsis pour son soutien financier.

Bibliographie

- Andreadou I., Iliodromitis E., Mikros E., Constantinou M., Agalias A., Magiatis P., Skaltsounis A.L., Kamber E., Tsantili-Kakoulidou A., Kremastinos D. 2006. *The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits*. J. Nutrition 136: 2213-2219.
- Angerosa F., d'Alessandro N., Corana F., Mellerio G. 1996. *Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 736: 195-203.
- Bianco A.D., Uccella N. 2000. *Biophenolic components of olives*. Food Res. Intl. 33: 475-485
- Bianco A.D., Muzzalupo I., Piperno A., Romeo G., Uccella N. 1999. *Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits*. J. Agric. Food Chem. 47: 3531-3534.
- Bianco A.D., Piperno A., Romeo G., Uccella N. 1999. *NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis*. J. Agric. Food Chem. 47: 3665-3668.
- Caliş I., Hosny M., Khalifa T., Nishibe, S. 1993. *Secoiridoids from Fraxinus angustifolia*. Phytochem. 33: 1453-1456,
- Christophoridou S., Dais P. 2009. *Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 633: 283-292.
- De Nino A., Mazzotti F., Perri E., Procopio A., Raffaelli A., Sindona G. 2000. *Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry*. J. Mass Spec. 35: 461-467
- Gómez del Campo M., García J.M. 2012. *Canopy Fruit Location Can Affect Olive Oil Quality in 'Arbequina' Hedgerow Orchards*. J. Am. Oil Chem. Soc. 89: 123-133.
- Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P. 2012. *Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative 1H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils*. J. Agric. Food Chem. 60: 11696-11703.
- Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P. 2014. *Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers*. J. Agric. Food Chem. 62: 600-607.
- Koudounas K., Banilas G., Michaelidis C., Demoliou C., Rigas S., Hatzopoulos P. 2015. *A defence-related Olea europaea β-glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent*. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erv002
- Limiroli R., Consonni R., Ottolina G., Marsilio V., Bianchi G., Zetta L. 1995. *1H and 13C NMR characterisation of new oleuropein aglycone*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1519-1523.
- Melliou E., Killday K.B., Magiatis P. 2015. *A New Ultra Rapid Screening Method for Olive Oil Health Claim Evaluation Using Selective Pulse NMR Spectroscopy* From the book: Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. Royal Society of Chemistry
- Paiva-Martins F., Gordon M.H. 2001. *Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (Olea europaea) Leaves*. J. Agric. Food Chem. 49: 4214-4219.

- Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Parella T. 2010. *Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from Olea europaea L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon.* J. Agric. Food Chem. 58: 9129-9136.
- Sánchez de Medina V., Priego-Capote F., Jiménez-Ot, C., Luque de Castro M.D. 2011. *Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition.* J. Agric. Food Chem. 59: 11432-11441.

Problématiques phytopathologiques et aspects phytosanitaires de l'olivier dans l'Italie centre-méridionale entre nuisances connues et nouveaux défis

V.Vizzarri¹, L.Tosi²

¹ Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi-Vermicelli, 87036 Rende (CS), Italia (auteur pour la correspondance), e-mail: veronica.vizzarri@entecra.it

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Ambientali ed Alimentari, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno, 74, 06121 Perugia, Italia; e-mail: laura.tosi@unipg.it

Résumé

L'importance économique, sociale, culturelle et éco-environnementale de l'olivier en Italie et dans d'autres pays méditerranéens, la préservation des oliveraies existantes, la culture dans les zones nouvelles, voire son introduction dans des régions extra-européennes, exigent d'accorder une attention particulière aux problématiques phytopathologiques de la culture et une actualisation continue des connaissances sur les aspects agrocultureux et épidémiologiques des maladies phytosanitaires et des phytophages. Ce travail illustre la situation actuelle des problématiques phytopathologiques de l'olivier, également dans la perspective des changements climatiques, et cherche à montrer dans quelle mesure ceux-ci peuvent avoir un impact sur la recrudescence des maladies déjà connues. L'attention est aussi portée sur les nouvelles situations d'urgence et des indications sur les stratégies les plus modernes de lutte intégrée écodurable sont formulées.

Abstract

The economic, social, cultural and eco-environmental importance of olive growing in Italy and the other Mediterranean countries, coupled with the maintenance of existing olive orchards and the spread of olive cultivation to new areas or its introduction in areas outside Europe, makes it necessary to pay close attention to crop phytopathological problems and to update the cultural and epidemiological aspects of plant pests and diseases on a continuing basis. This paper describes the current phytopathological problems in olive, including in the light of climate change. It shows how these problems can affect the re-emergence of diseases that are already known and focuses attention on newly emerging threats, besides informing on the latest eco-sustainable integrated protection strategies.

Introduction

Le secteur oléicole italien montre, sur l'ensemble du territoire, des situations très différentes qui peuvent expliquer la perte de compétitivité de ce pays. En réalité, à la différence de l'Espagne, l'oléiculture en Italie est encore pratiquée sur des terrains marginaux même si, comme c'est le cas dans les régions méridionales, la culture de l'olivier est parfois la seule option d'utilisation des terres. Face à quelques points faibles tels que la superficie moyenne nationale réduite – 70 % des exploitations oléicoles ont une superficie inférieure à deux hectares –, il convient de citer les points forts: l'ampleur du patrimoine variétal, même si les variétés les plus diffusées au niveau national ne sont pas plus d'une dizaine et occupent une superficie de 475 000 ha, soit environ 42 % du total (Madau, 2009). Parmi ces variétés, on citera en particulier *Coratina*, *Ogliarola Salentina* et *Cellina di Nardò*, diffusées dans la région des Pouilles, et d'autres que l'on trouve sur une grande partie du territoire national (*Carolea*, *Frantoio*, *Leccino*). Il existe aux moins cent autres variétés, beaucoup moins diffusées (entre 1 000 et 10 000 m²) qui représentent néanmoins, pour les caractéristiques de leurs fruits, destinés à la consommation directe, ou pour la qualité de leur huile, une ressource importante, en particulier pour la recherche de nouvelles sources de résistance aux stress biotiques qui pénalisent fortement la production oléicole, ainsi que pour en orienter la culture dans des zones à plus grande vocation car elles peuvent être adaptées plus facilement aux différentes conditions pédoclimatiques du territoire italien.

Ce travail, réalisé dix ans après un article précédent (Tosi et Zizzerini, 2005), se propose de faire le point sur la situation phytosanitaire de l'olivier en soulignant, entre les pathologies végétales déjà connues, la verticilliose, maladie vasculaire encore difficile à surmonter; l'anthracnose, maladie encore considérée comme mineure dont les attaques sont devenues plus intenses dans certaines zones oléicoles ces dernières années; et deux phénomènes émergents. L'objectif de ce travail est donc de montrer comment la mise au point et l'adoption de mesures de lutte ne peuvent se passer d'une connaissance approfondie et actualisée des techniques agronomiques et culturales qui, lorsqu'elles sont modifiées, ont un impact sur l'agrosystème olivier et se répercutent sur l'incidence et la gravité des phénomènes cités ci-dessus. La lutte phytosanitaire moderne, comme le veut la directive 128/2009 CE, telle qu'appliquée en Italie par

D.L. n° 150/2012, aborde le problème au sens large et organique en ce qui concerne l'impact sur l'environnement et l'innocuité des aliments suite à l'application de traitements agronomiques. Depuis le 1^{er} janvier 2014, grâce au Plan d'Action Nationale (PAN) qui définit deux niveaux d'application (lutte intégrée et agriculture biologique) sont fournis les principes généraux de la lutte intégrée, qui devient obligatoire. En résumé, la nouvelle législation base la lutte sur la prévention, en tirant partie de manière synergique des potentialités et des spécificités que les différents moyens de lutte proposent pour permettre une protection complète de la culture, sans se limiter à la maîtrise d'une seule phytopathie, et pour intervenir en même temps lorsque de nouvelles maladies apparaissent (par exemple le dessèchement rapide de l'olivier). Le fait de mener une lutte rationnelle des cultures exige donc une mise à jour continue et constante des connaissances, des technologies et une intégration croissante entre les différentes compétences.

Aspects épidémiologiques de la verticilliose et influence des pratiques phytosanitaires

Cette maladie cryptogamique, répandue depuis de nombreuses années dans les oliveraies de l'Italie centrale et du Sud et même dans différents pays de la Méditerranée (Espagne, Grèce, Tunisie, Maroc, Syrie, etc.), pose des problèmes non seulement dans les plantations anciennes mais également dans les oliveraies jeunes et souvent irriguées. Les recherches menées dans les oliveraies de l'Italie centrale (Ombrie, Toscane) et du Sud (Calabre, Sicile et Pouilles) depuis les années 90 (Zizzerini et Tosi, 1998 ; 2000 ; Ciccarese, 2003 ; Vizzarri, 2005) ont montré que les facteurs climatiques, de l'agro-élevage et géno-phénotypiques, liés à l'augmentation de l'incidence et de l'intensité de la maladie et au phénomène, non rare, de la guérison naturelle des arbres infectés, pouvaient avoir un impact différent sur le développement de la verticilliose (Fig. 1) et par conséquent rendre inutiles les mesures phytosanitaires.



Figure 1: Verticilliose de l'olivier. Manifestation caractéristique de l'évolution chronique ou lente détérioration (A) et de l'évolution aiguë, ou apoplexie (B).

La certification de l'état de santé des végétaux est très importante, non seulement pour la constitution de nouvelles exploitations, mais également pour la rénovation de vieilles oliveraies où la densité de plantation est augmentée, comme c'est le cas depuis les deux dernières décennies en Grèce, en Espagne et même en Italie, que ce soit dans les oliveraies en régime pluvial que dans les exploitations irriguées (Navarro et Parra, 2008). À cet égard, la recherche menée dans les Pouilles (Nigro *et al.*, 2005) a permis de détecter la présence de la *Verticillium dahliae* dans 50% des pépinières analysées. Également en Ombrie, des cas de verticilliose ont été observés dans de jeunes exploitations ainsi que dans oliveraies ayant fait l'objet d'une restructuration, en raison de l'utilisation de matériel de propagation infecté (Tosi, com. pers.).

Dans les deux situations décrites ci-dessus (nouvelles exploitations et remplacement des plantes mortes à la suite de la maladie), l'utilisation de matériel de propagation sain doit être associée au choix de l'utilisation de cultivars résistants ou de variétés greffées sur des porte-greffes résistants à la verticilliose. Ce moyen de lutte est cependant, fortement conditionné par certaines caractéristiques biologiques de l'agent pathogène (densité de l'inoculum dans le sol, virulence des isolats), les conditions environnementales, les résultats de l'examen de la résistance, pas toujours cohérents suite à l'utilisation de différents isolats de *V. dahliae*, des différentes méthodes d'inoculation et des conditions expérimentales utilisées pour évaluer la résistance. Pour ce dernier aspect, il est

donc nécessaire d'adopter des protocoles expérimentaux normalisés et reconnus au niveau international.

Selon la virulence sur l'olivier, les isolats de *V. dahliae* sont traditionnellement classés comme pathotypes défoliants (D) et non défoliants (ND) en fonction de leur capacité à entraîner respectivement la chute complète des feuilles encore vertes (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993). En particulier, les pathotypes D, isolés sur l'olivier et le coton, peuvent être virulents sur les deux hôtes et donner lieu à des symptômes tels que le flétrissement, la chlorose, la défoliation et la mort de la plante, tandis que les pathotypes ND peuvent entraîner des symptômes similaires, mais dont la gravité est légère ou modérée.

En général, les différences de virulence sont également visibles entre les différents cultivars d'oliviers et les infections causées par les pathotypes D peuvent commencer plus tôt et progresser plus rapidement et avec une plus grande intensité (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993 ; Lopez-Escudero *et al.*, 2004 ; Martos-Moreno *et al.*, 2006 ; Dervis *et al.*, 2010).

Il est bien connu par ailleurs que la reproduction de l'agent pathogène étant exclusivement de nature asexuée, les seules possibilités qui peuvent assurer l'échange de matériel génétique sont représentées par des anastomoses d'hyphes (fusion des hyphes entre les isolats végétativement compatibles) et l'hétérokaryste ultérieure (fusion des noyaux). Bien que de nom-

breuses études aient mis en évidence une association entre les groupes de compatibilité végétative (VCG) et la diversité génétique (moléculaire), la corrélation entre la spécificité de l'hôte, la virulence de l'agent pathogène et la répartition géographique est plus complexe et difficile à interpréter. En fait, bien que dans tous les pays où le pathotype défoliant a été signalé (Pérez-Artes *et al.*, 2000 ; Collado-Romero *et al.*, 2006 ; Dervis *et al.*, 2010) et classé comme appartenant au groupe VCG 1A, et où le pathotype ND a été attribué aux autres groupes (VCG 2, 4 VCG), certaines recherches ont montré qu'il n'y avait aucune corrélation entre la pathogénicité des isolats provenant de l'olivier et les groupes VCG (Tanatoui *et al.*, 2002) et comment, au sein du groupe/pathotype VCG 1A/D, certains isolats D montraient une virulence (sévérité des symptômes), dans le cadre d'inoculations artificielles, similaire à celle de pathotypes ND (Dervis *et al.*, 2010).

La caractérisation et la différenciation génétique des isolats de *V. dahliae* de l'olivier étudiés au moyen de techniques moléculaires (RAPD, AFLP et PCR avec des marqueurs spécifiques) semblent montrer que, dans un groupe donné de VCG, il existe une similitude au niveau moléculaire. Ces groupes d'isolats concernent la spécificité et l'origine géographique (Collado-Romero *et al.*, 2006 ; 2008) mais il convient de noter que les pathotypes VCG 1A/D, isolés à partir d'oliviers en Turquie, différents sur le plan moléculaire des isolats d'oliviers espagnols, n'ont montré aucune différence significative de virulence dans des essais de pathogénicité (Dervis *et al.*, 2010). Les recherches menées dans les régions oléicoles du bassin Méditerranéen ont montré que les pathotypes D se sont rapidement propagés en Espagne (Mercado-Blanco *et al.*, 2003 ; Navas-Cortés *et al.*, 2008). En Turquie, on a observé une virulence accrue des isolats appartenant au groupe/pathotype VCG 1A/D (Dervis *et al.*, 2010), alors qu'en Italie, ce sont les pathotypes ND qui semblent prévaloir (Nigro *et al.*, 2005 ; Vizzarri, 2005). Il n'est donc pas étonnant qu'il existe des différences entre les résultats des tests de résistance dans des conditions artificielles et ceux liés aux observations sur le terrain en ce qui concerne le comportement variétal qui peut être largement influencé par les conditions environnementales, par la quantité d'inoculum de l'agent pathogène dans le sol, par sa virulence ainsi que par les pratiques agro-culturales appliquées. Les recherches menées dans différents pays depuis plus de quarante ans dans des conditions naturelles et expérimentales montrent que les variétés agronomiquement meilleures sont plus sensibles au pathotype D, comme par exemple les variétés *Picual*, *Hojiblanca*, *Arbequina*, *Manzanilla de Sevilla* (cultivars espagnols), *Kalamon*, *Amfissis*, *Konservolia* (culti-

vars grecs) ou *Ascoli*, *Leccino* (cultivars italiens). Des niveaux plus élevés de résistance ont été reliés aux cultivars *Oblonga*, *Changlot Real*, *Empeltre* ou *Frantoio* (López-Mercado-Escudero et Blanco, 2011).

Une autre alternative est le porte-greffe résistant : les cultivars *Sevillano* (Hartman *et al.*, 1971) et *Conservolia* (Tjamos *et al.*, 1985), greffés sur *Oblonga*, ont montré une résistance à *V. dahliae*, bien que le greffage d'autres variétés d'*Olea europaea* ou de différentes espèces du genre *Olea* ait produit des résultats variables. La réaction d'un génotype donné dans des conditions expérimentales peut en effet s'avérer différente sur le terrain, en raison des facteurs environnementaux, biologiques et agro-culturaux déjà mentionnés (Blanco Lopez *et al.*, 1998). La résistance dans des conditions naturelles peut être altérée par le phénomène de la guérison (*natural recovery*) de plantes infectées chez lesquelles on observe une rémission temporaire des symptômes (au-delà de 2-3 ans) et l'apparition d'une nouvelle végétation sous les branches sèches (Tosi et Zizzerini, 1998 ; 2000 ; Trapero et Blanco, 2001 ; Ciccarese, 2003). Pour parler de récurrence de la maladie, de nouvelles infections sont donc nécessaires. Ce phénomène pourrait être dû à l'activation de réponses de défense de l'hôte par la production de composés phénoliques, à l'occlusion des vaisseaux du xylème infectés et l'inactivation en résultant de *V. dahliae*. Le phénomène de la guérison dépend de la virulence du pathogène et de la résistance des variétés. Il a été plus fréquemment observé dans les oliveraies en présence de pathotypes ND et de cultivars résistants (Tosi et Zizzerini, 1998 ; 2000 ; Vizzarri, 2005 ; Lopez-Escudero *et al.*, 2004 ; Martos-Moreno *et al.*, 2001). Cette situation peut être favorisée par l'adoption de pratiques agro-culturales appropriées - apport d'azote, élimination des mauvaises herbes pour éviter le travail du sol qui peut entraîner des blessures et l'apparition de nouvelles infections, utilisation de la solarisation dans le terrain situé autour des plantes - pour réduire la quantité d'inoculum de *V. dahliae* (Tosi et Zizzerini, 1998 ; 2000 ; Ciccarese, 2003 ; Trapero et Blanco, 2001). En revanche, dans une étude menée récemment dans la région des Pouilles (Sud de l'Italie), sur de jeunes oliviers (5-12 ans) de la variété très sensible *Cerignola* et en présence dans le sol d'une densité modérée d'inoculum de *V. dahliae* (pathotype ND), on a observé que la guérison des plantes, induite artificiellement en utilisant individuellement et en combinaison la solarisation, la cyanamide de calcium et des drageons, s'avérait plutôt faible et limitée à un an (Bubici et Cirulli, 2014).

En définitive, dans les régions oléicoles italiennes, en raison de la nature polyétiologique de *V. dahliae*, de la propagation majeure des pathotypes ND et de l'impossibi-

lité d'éradiquer la maladie, les stratégies de lutte doivent reposer sur l'adoption de pratiques agricoles et de culture qui, en interagissant avec certaines caractéristiques biologiques du pathogène et avec les conditions environnementales, sont à même de garantir certains résultats, voire synergiques, pour limiter la maladie.

Aspects épidémiologiques de l'antracnose et influence des pratiques phytosanitaires

L'antracnose ou la lèpre, présente aujourd'hui dans de nombreuses régions oléicoles du monde, est répandue depuis longtemps dans certains pays du bassin Méditerranéen, mais avec une intensité différente en raison des automnes doux et pluvieux. En Italie, la maladie, plus fréquente et plus grave dans certaines régions du Sud (Pouilles, Calabre), a également été observée en Sardaigne, en Sicile et parfois en Ombrie et en Toscane. Depuis les premiers signalements dans les Pouilles (Ciccione, 1950), les infections ont présenté une évolution épidémique dans les régions du Sud de l'Italie pendant au moins vingt ans pour régresser par la suite (Pouilles, Sardaigne, Sicile). Le phénomène, d'abord attribué à la perte de la virulence de l'agent responsable, a ensuite été attribué à des tendances saisonnières plus sèches résultant des changements climatiques des deux dernières décennies, à l'exception de la plaine de Gioia Tauro (Calabre) et du Salento (Pouilles) où les conditions environnementales favorisent toujours l'émergence d'épidémies majeures (Cacciola *et al.*, 2012).

Différentes espèces de *Colletotrichum* ont été signalées comme responsables de l'antracnose dans les différents pays où la maladie est présente. De récentes études morphologiques et moléculaires (Faedda *et al.*, 2011) ont montré que *C. clavatum* (précédemment dénommée *C. acutatum* groupe moléculaire A4) avait provoqué de graves épidémies en Grèce, au Monténégro, dans certaines zones restreintes du Portugal et de l'Espagne et en Italie. Dans les régions du Sud de l'Italie, au moyen de tests de compatibilité végétative (Agosteo *et al.*, 2002), pour relier l'origine géographique et le profil moléculaire (par RAPD), deux groupes VCG ont été identifiés dans la population de *Colletotrichum* : l'un comprenant les isolats originaires des Pouilles ; l'autre regroupant les isolats provenant de Calabre, de Sardaigne et d'Ombrie et l'isolat grec de référence (CBS 193.32) déposé par Petri en 1930. La présence de deux groupes VCG dif-

férents dans les Pouilles et en Calabre laisse penser que *C. clavatum* pourrait avoir été introduit par les Balkans en Italie, à des moments différents, probablement pendant les années 1930-1940 (Agosteo, 2010), puis, à travers la diffusion de matériel infecté, il se serait propagé de la Calabre à d'autres régions (Sardaigne, Ombrie). On ne peut pas cependant exclure la possibilité qu'il n'y ait eu qu'une seule introduction de l'agent pathogène et que différents groupes VCG dans différents pays soient apparus à l'issue d'un processus de diversification causé par l'isolement géographique. Ainsi, *C. simmondsii* (initialement identifié comme groupe A2 *C. acutatum sensu lato*), espèce responsable des foyers d'antracnose au Portugal (Talhinhas *et al.*, 2011), n'a pas été isolé à partir de l'olivier en Italie, bien qu'étant connu comme agent causal de l'antracnose des fraises dans différentes régions, y compris dans les Pouilles et en Calabre. De la même manière, *C. acutatum sensu stricto* (initialement groupe A5) n'a pas été isolé sur l'olivier en Italie alors que c'est l'espèce dominante dans les régions oléicoles de l'Hémisphère Sud (Faedda *et al.*, 2011). En substance, plusieurs espèces de *Colletotrichum* sont responsables de l'antracnose de l'olivier et la recherche indique, à quelques exceptions près, qu'une espèce donnée est dominante dans une zone oléicole donnée, ce qui est le signe d'une adaptation potentielle selon les conditions environnementales et caractéristiques génétiques de l'hôte.

Comme illustré brièvement, on observe que la virulence de l'agent pathogène, la sensibilité des cultivars et les conditions environnementales sont les facteurs prédisposants des infections de *Colletotrichum spp.* Les résultats les plus récents du point de vue épidémiologique indiquent que dans des conditions naturelles, les infections sur les fleurs et les jeunes fruits ont lieu au printemps, lorsque les conditions de température et d'humidité sont plus favorables ; durant la croissance des drupes au cours des mois d'été caractérisés par des périodes chaudes et sèches, les infections deviennent latentes, constituant toujours la principale source d'inoculum pour les épidémies automnales. L'agent pathogène peut pénétrer directement, en perforant l'épicarpe des drupes grâce à la production de cutinases extracellulaires, mais la gravité de l'infection et le taux de colonisation augmentent de façon significative en présence de microfissures causées par des morsures ou des trous de ponte de la mouche de l'olive (*Bactrocera oleae* Gmelin). L'activité trophique des larves favorise la colonisation de l'agent pathogène et anticipe la maturation des olives. L'insecte peut également contribuer à la dispersion des conidies.

La susceptibilité des drupes augmente au fur et à mesure de leur maturation et dans des conditions favo-

rables, elles sont susceptibles de pourrir (Fig. 2) et de se momifier, entraînant de graves pertes en quantité et en qualité, en particulier pour la mauvaise qualité de l'huile. En outre, l'agent sporule sur la surface des fruits infectés, donne lieu, si les conditions environnementales favorables persistent, à des cycles infectieux secondaires. Les fruits momifiés qui restent accrochés aux branches, permettent la survie de l'agent pathogène durant l'hiver et sont une source d'inoculation pour la saison suivante.



Figure 2: Lèpre de l'olivier. Symptomatologie habituelle de la "tête de singe" sur les drupes affectées par *Colletotrichum gloeosporioides* avec des acervules évidents du champignon.

Les informations sur la susceptibilité/résistance des différents cultivars ne sont pas dénuées de contradiction, suite à une identification pas toujours claire des cultivars, et aux écarts entre les résultats obtenus en laboratoire et les observations sur le terrain. A cet égard, on observe une plus grande concordance des données si les infections artificielles, dans des conditions contrôlées, sont effectuées sur des drupes immatures et vertes par rapport à celles plus mûres, car la susceptibilité des fruits augmente avec la maturation. *Ottobratica*, *Corniola*, *Strana*, *Carolea*, *Picudo*, *Morona Manzanilla de Sevilla* sont parmi les cultivars les plus sensibles alors que *Frantoio*, *Leccino*, *Santomauro*, *Picual*, *Blanqueta*, *Koroneiki* et *Razzola* sont résistants (Cacciola *et al.*, 2012). Le recours à des cultivars moins susceptibles ou résistants est donc un bon moyen de confinement de la maladie au moment de créer une nouvelle oliveraie. En revanche, dans les oliveraies existantes, plantées de cultivars sensibles ou caractérisées par des conditions environnementales favorables au développement de l'antracnose, il est conseillé d'effectuer une opération de taille pour éliminer les branches et les rameaux infectés et les fruits momifiés afin de réduire la quantité d'inoculation et de permettre une plus grande aération de la canopée de manière à réduire l'humidité à l'intérieur de la végétation et d'anticiper la récolte des fruits.

Ces moyens de lutte doivent cependant être associés à des traitements chimiques. S'ils ne constituent pas la solution, ils sont toutefois nécessaires pour éviter de graves épidémies. Il est conseillé d'intervenir avec des produits à base de cuivre, de privilégier les formules à faible dose d'ions cuivriques et dotés d'une plus grande adhérence et persistance. Lorsqu'ils sont appliqués contre l'œil de paon avant la floraison et après la nouaison, ces produits ont des effets collatéraux intéressants contre l'antracnose. Les traitements à base de cuivre doivent être répétés durant la croissance des fruits et avant la véraison. Malheureusement, durant les années humides et en présence d'oliviers séculaires, il est encore plus important de surveiller la distribution correcte et uniforme des produits phytopharmaceutiques dans le feuillage des plantes. Récemment, des tests ont été effectués dans des oliveraies des Pouilles pour comparer l'efficacité de certaines stratégies de défense impliquant l'utilisation de produits à base de cuivre, de pyraclostrobine et un mélange de tryfloxystrobin + tébuconazole. L'expérience a montré que la pyraclostrobine associée avec le cuivre et le mélange tryfloxystrobin + tébuconazole étaient actifs contre l'agent pathogène et pour limiter l'infection des fruits. Il est crucial d'intervenir en préfloraison pour contenir les infections latentes, et d'appliquer des produits à base de cuivre après la véraison pour réduire les infections secondaires (Nigro *et al.*, 2011; Cacciola *et al.*, 2012). En Italie, le ministère de la Santé a autorisé temporairement, depuis 2011, l'utilisation de la pyraclostrobine en application unique, entre juillet et août, dans les oliveraies calabraises très susceptibles à la maladie, mais ce traitement s'est révélé plutôt inefficace (Cacciola *et al.*, 2012).

Nouveaux défis phytosanitaires: syndrome du dessèchement rapide de l'olivier

Le premier rapport sur le syndrome de dessèchement rapide de l'olivier (en anglais *Olive Quick Decline Syndrome*, OQDS) observé dans certaines oliveraies du Salento (Pouilles, Italie du Sud) remonte à 2010 (Saponari *et al.*, 2013). De là, la maladie s'est rapidement répandue, affectant en 2013 une superficie d'environ 10 000 hectares. Les symptômes de la maladie sont caractérisés par un dessèchement soudain des brindilles et des branches qui se prolonge dans le feuillage, entraînant la mort de la plante. Les extrémités et le bord des feuilles

jaunissent, puis elles commencent à brunir jusqu'au dessèchement. Les parties transversales du tronc, les branches et les brindilles commencent à montrer des brunissements plus ou moins étendus des éléments vasculaires. Les vieux arbres sont les plus gravement

touchés. Lorsqu'ils ne meurent pas, ils sont secs et présentent une abondante émission de rejets au niveau du collet, conséquence des tailles drastiques réalisées par les agriculteurs dans l'espoir de donner naissance à une nouvelle végétation (Fig. 3).

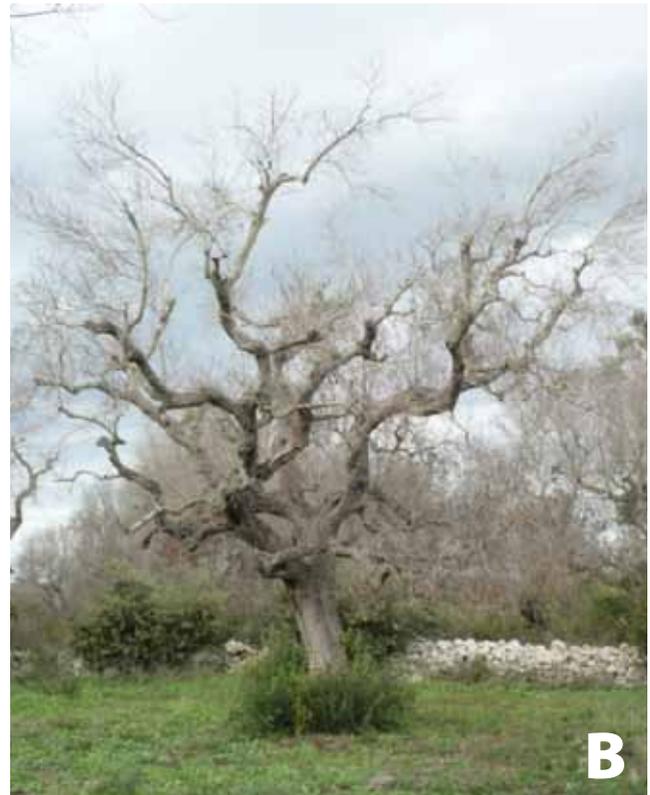


Figure 3: Syndrome de dessèchement rapide de l'olivier. Dessèchement typique de la frondaison appelé "peau de léopard" (A) et dessèchement total par occlusion des vaisseaux lymphatiques (B)

Des études étiologiques longues et complexes, pas encore concluantes et exhaustives, ont permis : i) d'identifier, au moyen d'analyses moléculaires et sérologiques, dans des oliviers symptomatiques, mais aussi dans des lauriers-roses et des amandiers présentant une brûlure des feuilles, et d'autres espèces d'arbres et de graminées, la bactérie Gram négatif *Xylella fastidiosa* (Well et Raju) subsp. pauca (Cariddi *et al.*, 2014 ; Loconsole *et al.*, 2014) ; ii) d'isoler la bactérie en culture pure (Elbeaino *et al.*, 2014a) ; iii) de séquencer le génome de la bactérie (Giampetruzzi *et al.*, 2015) ; iv) de prouver que *Philaenus spumarius* L., connu sous le nom de philène spumeuse pour sa production d'une sécrétion glandulaire abdominale blanche qui enveloppe, comme une mousse, les formes juvéniles (nymphe) et les protège du dessèchement et des ennemis naturels, est la seule espèce capable de transmettre la bactérie (Saponari *et al.*, 2014). Dans le Salento, cet insecte, polyphage et caractérisé par une bonne capacité d'adaptation écologique, ne provoque pas de dommages directs importants aux cultures, mais du point de vue épidémiologique, sa capacité à transmettre

des bactéries, comme *X. fastidiosa*, est bien plus élevée. En fait, cette dernière étant une bactérie xylématique et asporogène, elle ne peut être transmise que par des insectes doté d'un appareil buccal permettant de piquer et sucer. Une fois qu'ils sont vecteurs de la bactérie, les insectes vecteurs peuvent inoculer, en s'alimentant, des espèces sauvages et cultivées mais ce n'est que dans les hôtes sensibles qu'elle pourra se multiplier et donner lieu à des affections latentes ou à des plantes symptomatiques. Les recherches sur le terrain ont mis en évidence d'autres insectes vecteurs potentiels (Elbeaino *et al.*, 2014b), bien que l'infectiosité n'ait pas été prouvée jusqu'à présent.

La *X. fastidiosa* est un pathogène de quarantaine figurant sur la liste A1, All. I, partie A, Sec. I Dir. 2000/29CE, et endémique dans les Amériques, où il provoque la chlorose variée des agrumes (Costa Rica, Brésil) et la maladie de Pierce sur la vigne (Californie). Son introduction, dans une zone précédemment indemne, a été attribuée au commerce de matériel végétal infecté, hypothèse confirmée plus tard, en octobre 2014, suite à

l'interception par le Service néerlandais de Protection des Végétaux, d'un lot de caféiers d'intérieur infectés par la *Xylella*, importés du Costa Rica. Il est donc très plausible que la souche OQDS soit d'origine costarienne, comme les analyses moléculaires semblent également confirmer (Giampetruzzi *et al.*, 2015).

Le cadre réglementaire actuel peut être résumé comme suit : le 19 juin 2015, approbation du décret ministériel «mesures d'urgence pour la prévention, le contrôle et le confinement de la *Xylella fastidiosa* (Well et Raju) sur le territoire de la République italienne» (JO n° 148 du 29 juin 2015), en application de la décision (2015/789) de la Commission européenne du 18 mai 2015, visant à renforcer les mesures de protection pour empêcher l'introduction et la propagation de la bactérie au sein de l'Union. Le décret, en vigueur depuis le 30 juin 2015, abroge les précédents du 26 septembre 2014 et du 17 mars 2015, instruments d'application de la décision n° UE 2014/497. Parmi les aspects les plus importants du décret : le renforcement de la surveillance de l'ensemble du territoire national, la définition des zones délimitées, constituées de la zone infectée (zone de peuplement) et d'une zone tampon (zone visant à limiter l'expansion du front épidémique), l'interdiction d'introduire dans l'Union des plantes en provenance du Costa Rica et du Honduras autres que les semences de café, l'identification des mesures d'éradication et de confinement. Tenant compte de l'expérience acquise jusqu'alors, les mesures les plus rationnelles sont basées sur les interventions agronomiques (au printemps fauchage des mauvaises herbes et travail du sol pour éliminer les stades juvéniles du vecteur et réduire le nombre d'insectes adultes en mesure de diffuser la bactérie), les traitements contre les adultes de l'insecte vecteur qui auraient pu échapper aux interventions précédentes, avec des insecticides enregistrés et autorisés sur l'olivier, et l'élimination et la destruction des plantes infectées.

Dépérissement causé par le neiron de l'olivier [Phloeotribus scarabaeoides (Bernard)]

Le scolyte est un coléoptère de couleur sombre, recouvert d'une pelure noirâtre, de petites dimensions (2-2,4 mm de long) mais robuste. Il est répandu dans toutes les régions oléicoles méditerranéennes et au Maroc (Lozano *et al.*, 1999) et attaque l'olivier et d'autres

oléacées. Cet insecte est xylophage dans les stades larvaires comme au stade adulte. Il est caractérisé par 1 à 3 générations par an en fonction de la sensibilité des arbres affaiblis ou d'autre matériel végétal (Russo, 1938 a ; b). Les adultes creusent des galeries d'alimentation (Fig. 4) au printemps, à la base des bourgeons et des inflorescences en croissance. Par la suite, les femelles puis les mâles creusent des galeries de ponte dans les branches en décomposition ou blessées par la taille, qui font apparaître de nombreux petits amas de sciure blanchâtre.

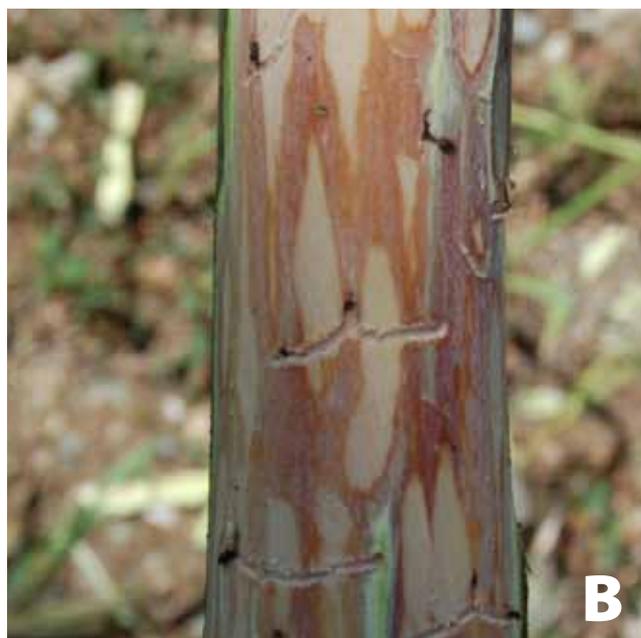


Figure 4: Neiron de l'olivier. La sciure montre la présence du scolyte sous l'écorce (A) et les galeries d'alimentation (B)

Les dégâts les plus importants sont causés par les adultes qui, avec leurs nombreuses excavations, entraînent la mort des branches fructifères de l'année, ce qui provoque une perte de production pouvant affecter jusqu'à 73 % de la récolte potentielle (Gonzalez et Campos, 1994). Sur les plantes fortement affaiblies ou celles qui viennent juste d'être mises en terre, l'attaque peut entraîner la mort des spécimens infectés (Benazoun, 1992). Le coléoptère scolytidé provoque également des dommages indirects puisque le thrips de l'olive (*Liothrips oleae*) trouve refuge pour hiberner et pondre dans ses orifices d'alimentation.

Le scolyte attaque de préférence le bois affaibli et au flux lymphatique réduit. Les troncs, branches et rameaux fructifères affaiblis ou qui ont subi des dommages à la suite d'événements climatiques défavorables (gel, sécheresse prolongée, etc.) sont les organes de la plante préférés du parasite. Les parties ainsi attaquées sont encore plus affaiblies par l'action trophique des nombreuses larves qui se développent sous l'écorce. Le scolyte peut causer des dégâts également sur les oliviers situés dans le voisinage immédiat de tas de bois ou de résidus de la taille de l'olivier qui constituent des foyers d'infestation. Dans ce cas, les larves se développent sur le bois mort ou affaibli (résidus de la taille, branches séchés, etc.), et les nouveaux adultes qui se déplacent sur les oliviers sains, au cours de la phase d'alimentation, creusent des tunnels dans les branches en bon état végétatif causant la mort des petites brindilles, des inflorescences et même des jeunes fruits, réduisant de manière significative la production de l'année.

Les étés chauds et secs des dernières années, comme le montrent plusieurs rapports, ont favorisé le développement du neiroun dans des oliveraies de la plaine de Sibari (Calabre), causant la mort de jeunes oliviers et l'échec des nouvelles plantations de cultivars *Carolea*. Le neiroun passe l'hiver à l'état de larve et/ou adulte, et comme les derniers hivers ont été particulièrement doux et sans gelées prolongées, cette espèce n'a pas souffert du froid, ce qui lui a permis de se multiplier de façon spectaculaire. On ne lui connaît pas non plus d'ennemis naturels efficaces et capables de maintenir la population du scolyte dans les limites du seuil économique d'intervention.

La prévention est donc essentielle dans la défense contre les attaques de ce coléoptère, par l'entretien des plantes en bon état végétatif, avec les pratiques culturelles appropriées : travail du sol, fertilisation équilibrée, irrigation (si possible), réalisation des traitements phytosanitaires nécessaires contre d'autres parasites, élimination, avec une taille annuelle, des parties affaiblies ou

appauvries de l'arbre (Furlong *et al.*, 2004). Les résidus de la taille d'hiver représentent un foyer potentiel de développement de l'insecte et doivent être éloignés au plus vite. On évitera également d'entreposer du bois d'olivier (pour les cheminées ou les fours) à proximité des plantes cultivées. Un moyen efficace de lutte est de recueillir, en mars, les tas de brindilles résultant de l'élagage (branches *appât*), situées dans les zones les plus ombragées au sein de l'oliveraie infestée, afin d'attirer les adultes proliférants. Ces appâts doivent être retirés et brûlés avant la fin du mois d'avril, dès l'apparition de rougissements et avant que les adultes de la première génération n'illent se poser sur les plantes pour se reproduire. Dans la mesure où ce petit coléoptère se propage en profondeur dans le bois d'olivier, il est extrêmement difficile de l'atteindre de l'extérieur avec des traitements chimiques. On obtient de bons résultats en utilisant la deltaméthrine qui, comme d'autres pyréthroides (Loch, 2005), est un insecticide qui réduit la présence du neiroun en une seule application. Néanmoins, la deltaméthrine est un principe actif à large spectre d'action, qui provoque une forte mortalité des arthropodes non ciblés (Ruano *et al.*, 2008). Le confinement de *P. scarabaeoides* avec de la deltaméthrine sur les troncs déjà colonisés par l'insecte est une bonne stratégie pour plusieurs raisons : i) il empêche la dispersion du neiroun grâce à l'effet induit de l'insecticide répulsif ; ii) l'application du principe actif sur les troncs, non utilisés pour la consommation humaine, n'a pas d'effets toxiques pour l'homme ; iii) la population de l'insecte est réduite avant que les oliviers ne soient attaqués.

Conclusions et perspectives

Les problèmes phytopathologiques de l'olivier, tels que synthétisés dans cet article, montrent qu'une lutte appropriée doit reposer sur des connaissances étiologiques précises, qui sont aujourd'hui de plus en plus cruciales pour assurer le succès des mesures phytosanitaires appliquées. Seule une lutte intégrée peut constituer la stratégie la plus efficace pour lutter contre les maladies ou parasites traditionnels et récents qui affectent le pathosystème olivier. C'est également un exemple de ce qui peut être fait avec d'autres cultures ligneuses. La faible efficacité des fongicides - et l'accent mis sur les aspects environnementaux et toxicologiques, imposé par les réglementations européennes et nationales -, exige une approche intégrée qui tire parti du potentiel et des caractéristiques des différents moyens de lutte, en agissant de manière préventive à la fois dans les anciennes oliveraies et dans les nouvelles exploitations. La prévention joue un rôle important dans le secteur de la

pépinière où la certification garantit non seulement la conformité variétale mais aussi la santé des plantes. À cet égard, les moyens de diagnostic, en particulier les méthodes moléculaires telles que la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), sont essentiels dans le cas de la verticilliose pour vérifier l'absence de l'agent pathogène dans les parties asymptomatiques de la plante ainsi que dans le sol (Ceccherini *et al.*, 2014). La détermination de l'existence des infections latentes et/ou de la présence de propagules de *V. dahliae* dans le sol permettrait de surveiller la situation dans les oliveraies et d'évaluer l'efficacité des mesures phytosanitaires appliquées ; dans les pépinières, l'utilisation de cette méthode permettrait d'obtenir des plants sains et d'éviter d'introduire, également à travers les sols contaminés, l'agent pathogène dans de nouvelles zones de culture.

À l'heure actuelle, une surveillance accrue s'impose au niveau européen et au niveau national quant à l'introduction et à la circulation de matériel végétal pour en assurer la santé du point de vue phytosanitaire, une surveillance continue et constante dans les oliveraies et les pépinières et l'adoption de tests de diagnostic systématiques dans le cadre de protocoles spécifiques. Ces pré-requis peuvent permettre le confinement des maladies et parasites anciens et nouveaux.

BIBLIOGRAPHIE

- AGOSTEO G.E. (2010) – Avversità dell'olivo ed evoluzione dei relativi sistemi di difesa in Calabria fra XVIII e XX secolo. *Petria* 20 (Suppl.1), 41-70.
- AGOSTEO G.E., MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O., FRISULLO S. (2002) – Characterisation of the casual agent of olive anthracnose in Southern Italy. *Acta Horticulturae* 586, 713-716.
- BENAZOUN A. (1992) - Contribución al estudio bioecológico del barrenillo *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Col., Escolítidos) en el olivo en la región de Taroudant, Marruecos. *Olivæ* 40, 26-35.
- BLANCO- LÓPEZ M.A., HIEMSTRA J., HARRIS D., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., ANTONIOU P. (1998) – Selection and screening for host resistance. In: Himenstra J., Harris D. (eds.) *Compendium of Verticillium wilt in tree species*. Ponsen & Loonijen, Wageningen, 51-54.
- BUBICI G., CIRULLI M. (2014) – Natural recovery from *Verticillium* wilt in olive: can it be exploited in a control strategy? *Plant and Soil* 381, 85-94.
- CACCIOLA S.O., FAEDDA R., SINATRA F., AGOSTEO G.E., SCHENA L., FRISULLO S., MAGNANO DI SAN LIO (2012) – Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94, (1), 29-44.
- CARIDDI C., SAPONARI M., BOSCIA D., DE STRADIS A., LOCONSOLE G., NIGRO F., PORCELLI F., POTERE O., MARTELLI G.P. (2014) – Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology* 96, (2), 425-429.
- CECCHERINI M.T., LUCHI N., PANTANI O.-L., ASCHER J., CAPRETTI P., PIETRAMELLARA G. (2014) – Upward movement of *Verticillium dahliae* from soil to olive plants detected by qPCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1961-1967.
- CICCARESE F. (2003) – Grave minaccia all'olivo: la verticilliosi. *Informatore fitopatologico* 53, (12), 17-21.
- CICCARONE A. (1950) – Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della "lebbra" delle olive, recentemente osservate nel Leccese. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma S.III*, 5, 143-165.
- COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* 98, 1019-1028.
- COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., VALVERDE-CORREDOR A., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2006) – Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96, 485-495.
- DERVIS S., MERCADO-BLANCO J., ERTEN L., VALVERDE-CORREDOR A., PÉREZ-ARTÉS E. (2010) – *Verticillium* wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 287-301.
- ELBEAINO T., VALENTINI F., KUBBA R.A., MOUBARAK P., YASEEN T., DI GIARO M. (2014a) – Multilocus sequences typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by "olive quick decline syndrome" in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 3, 533-542.
- ELBEAINO T., YASSEN T., VALENTINI F., BEN MOUSSA I.E., MAZZONI V., D'ONGHIA A.M. (2014b) – Identification of three potential vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 126-130
- FAEDDA R., AGOSTEO G.E., SCHENA L., MOSCA S., FRISULLO S. MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O. (2011) – *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the casual agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 283-302.
- FURLONG M.J., ZU-HUA S., YIN-QUAN L., SIU-JIAN G., YAO-BIN L., SHU-SHENG L., ZALUCKI M.P. (2004) - Experimental analysis of the influence of pest management practice on the efficacy of an endemic arthropod natural enemy complex of the diamondback

- moth. J. Econ. Entomol. 97, 1814–1827.
- GIAMPETRUZZI A., CHIUMENTI M., SAPONARI M., DONVITO G., ITALIANO A., LOCONSOLE G., BOSCIA D., CARIDDI C., MARTELLI G.P., SALDARELLI P. (2015) – Draft Genome Sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO Strain. Genome Announcements 3, 1, 1-2.
- GONZÁLEZ R., CAMPOS M. (1994) - A preliminary study of the effect of attack by *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae) on the productivity of the olive tree (*Olea europea*). Bull. Soc. Entomol. Suisse 67, 67–75.
- HARTMAN H., SCHNATHORST W.C., WHISLER J. (1971) – Oblonga, clonal olive rootstock resistant to *Verticillium* wilt. Calif. Agric. 25, 12-15.
- LOCH A.D. (2005) - Mortality and recovery of eucalypt beetle pest and beneficial arthropod populations after commercial application of the insecticide alpha-cypermethrin. Forest Ecol. Manage. 217, 255–265.
- LOCONSOLE G., POTERE O., BOSCIA D., ALTAMURA G., DIELOUAH K., ELBEAINO T., FRASHERI D., LORUSSO D., PALMISANO F., SILLETTI M.R., TRISCIUZZI N., VALENTINI F., SAVINO V., SAPONARI M. (2014) – Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. Journal of Plant Pathology 96, (1), 7-14.
- LÓPEZ-ESCUADERO F.J., DEL RIO C., CABALLER J.M., BLANCO-LÓPEZ M.A., (2004) – Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. Eur. J. Plant Pathol. 100, 79-85.
- LÓPEZ-ESCUADERO F.J., MERCADO-BLANCO J. (2011) – *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. Plant Soil 344, 1-50.
- LOZANO C., BENAZOUN A., KIDD N., CAMPOS M. (1999) - Population dynamics of the bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard (Coleoptera: Scolytidae), a pest of African olive orchards in Morocco. African Entomology 7, (2), 271-275.
- MADAU F.A. (2009) – Evoluzione del mercato internazionale e nazionale del comparto olivicolo. Convegno di studi “Un piano strategico per lo sviluppo dell’olivicultura del Medio Campidano” Gonnosfanadiga (VS) 7 novembre 2009, 1-21.
- MARTOS-MORENO C., CABALLERO J.M., DEL RÍO C., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2001) – Epidemiological behaviour of olive cultivars in orchard infested with mixtures of defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. 8th Int. *Verticillium* Symposium, Book of abstracts, Córdoba, Spain, 67.
- MARTOS-MORENO C., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2006) – Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. HortScience 41, 1313-1316.
- MERCADO-BLANCO J., RODRÍGUEZ-JURADO D., PARRILLA-ARAUJO S., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2003) – Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. Plant Dis. 87, 1487-1494.
- NAVARRO C., PARRA MA. (2008) – Plantación. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) El cultivo del olivo, 6th ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 189-238.
- NAVAS-CORTÉS J.A., LANDA B.B., MERCADO-BLANCO J., TRAPERO-CASA J.L., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – Spatiotemporal analysis of spreads of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in Southern Spain. Phytopathology 98, 167-180.
- NIGRO F., GALLONE P., ROMANAZZI G., SCHENA L., IPPOLITO A., SALERNO M.G. (2005) – Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. J. Plant Pathol. 87, 13-23.
- NIGRO F., GUARIO A., LACCONE G. (2011) – Ultime acquisizioni sull’epidemiologia e sulla protezione della lebbra dell’olivo. 23° Forum Medicina vegetale, Bari 15 Dicembre 2011.
- PÉREZ-ARTÉS E., GARCIA-PEDRAJAS M.D., BEJARANO-ALCÁZAR J., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2000) – Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. Eur. J. Plant Pathol. 106, 507-517.
- PETRI L. (1930) – Azione tossica dell’arseniato sodico sopra le spore del *Gloeosporium olivarum* Alm. Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma 10, 359-361.
- RODRÍGUEZ-JURADO D., BLANCO-LÓPEZ M.A., RAPOPORT H., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (1993) – Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalucía (southern Spain) Bull OEPP/EPPO Bull 23, 513-516.
- RUANO F., CAMPOS M., SÁNCHEZ - RAYA A.J., PEÑA A. (2008) - Deltamethrin application on colonized olive logs: effect on the emergence of the olive bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard 1788 (Coleoptera: Scolytidae) and its associated parasitoids. Crop Protection 27, 614 – 621.
- RUSSO G., (1938a) - V. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). Fauv. Parte prima: Morfologia, anatomia e istologia. Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici 1, 1–260.
- RUSSO G., (1938b) - VI. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). Fauv. Parte seconda: Biografia, simbiotici, danni e lotta. Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici 2, 1–419.
- SAPONARI M., BOSCIA D., NIGRO F., MARTELLI

- G.P. (2013) – Identification of DNA sequenze related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive tree exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95, 668.
- SAPONARI M., LOCONSOLE G., CORNARA D., YOKOMI R. K., DE STRADIS A., BOSCIA D., BOSCO D., MARTELLI G.P., KRUGNER R., PORCELLI F. (2014) – Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *Journal of Economic Entomology* 107, (4), 1316-1319.
- TALHINHAS P., MOTA-CAPITÃO, MARTINS S., RAMOS A.P., NEVES-MARTINS J., GUERRA_GUIMARÃES L., VÁRZEA V., SILVA M.C., SREENIVASAPRASAD S., OLIVEIRA H. (2011) – Epidemiology, histopathology, and etiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* 60, 483-495.
- TANATOUI A., LACHQER K., SEDRA M.H. (2002) – Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from olive (*Olea europea*). *Phytopathologia Mediterranea* 41, 19-27.
- TJAMOS E.C., THANASSOULOPOULOS C.C., BIRIS D.A. (1985) – Resistance evaluation to *Verticillium dahliae* olive rootstocks. *Proc. 3rd Nat. Phytopathol. Conf. Hellenic Phytopathol. Soc.*, 18-19.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (1998) – Indagini epidemiologiche sulla verticilliosi dell'olivo nell'Italia centrale. *Olivae* 71, 50-55.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2000) – Ulteriori indagini su alcuni aspetti epidemiologici della verticilliosi dell'olivo in Umbria. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 81-86.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2005) – La difesa integrata dell'olivo dai patogeni vegetali. *Informatore fitopatologico* LV, 11, 12-18.
- TRAPERO A., BLANCO M.A. (2001) – Enfermedades. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) *El cultivo del olivo*, 4th ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 495-550.
- VIZZARRI V. (2005) – Aspetti epidemiologici di *Verticillium dahliae* Kleb. in oliveti umbri, *screening* per la resistenza e caratterizzazione molecolare degli isolati. Selezione di microrganismi fungini, isolati dal filloplano, per possibili applicazioni in lotta biologica. Tesi di Dottorato, XIX Ciclo, Università degli Studi di Perugia, A.A. 2005/2006, 122 pp.



Príncipe de Vergara, 154
28002 Madrid, Espagne

Tel.: 34-915 903 638

Fax: 34-915 631 263

E-mail: iooc@internationaloliveoil.org

www.internationaloliveoil.org