

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI, TIZI-OUZOU**

**FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

## **Soutenance de magister**

**Spécialité : Chimie**

**Option : Chimie de l'environnement**

**Présenté par M<sup>me</sup> Kahina BOUHADJRA épouse FODHIL**

### **Thème**

## **ETUDE DE L'EFFET DES ANTIOXYDANTS NATURELS ET DE SYNTHÈSE SUR LA STABILITÉ OXYDATIVE DE L'HUILE D'OLIVE VIERGE**

Devant le jury d'examen composé de :

Mr: M <sup>ed</sup> . O. MECHERRI	Professeur ; U.M.M.T.O	Président
Mr : R. MOUSSAOUI	Maitre de conférences A; U.M.M.T.O	Rapporteur
Mr : H. KADI	Professeur ; U.M.M.T.O	Examineur
Mr : Y. AMIR	Maitre de conférences A; U.M.M.T.O	Examineur
M <sup>me</sup> : M. MAKHLOUFI	Maitre de conférences B; U.M.M.T.O	Examinatrice

**Soutenu le : 11/12/2011**

## Résumé :

Malgré leur profil polluant, les margines d'huile d'olive sont considérées comme une source très riche en antioxydants naturels, les polyphénols. Ces derniers existent aussi dans les feuilles d'olivier et quelques fruits tels que les raisins.

Dans cette étude, ces polyphénols ont été extraits afin de les valoriser en tant qu'antioxydants naturels et en les comparant avec un antioxydant synthétique l'acide gallique. Des concentrations de 100 à 500 ppm de ces polyphénols et de 100 à 200 ppm d'acide gallique sont additionnées à une huile d'olive vierge. Les échantillons d'huile sont mis sous des conditions de stockage à l'étuve ( $T^{\circ}$  avoisinant les  $40^{\circ}\text{C}$ ) pendant 60 jours. L'altération de l'huile utilisée a été suivie par une détermination de l'acidité, de l'indice de peroxyde, de l'indice d'iode et des extinctions spécifiques à 232 et à 270 nm.

Les résultats obtenus ont montré que tous les échantillons d'huile contenant des antioxydants ont subi une détérioration oxydative moins accentuée que celle du témoin (sans additif). L'effet antioxydant des polyphénols des feuilles d'olivier ajoutés à une concentration de 200 ppm est assez comparable à celui de l'acide gallique, ils ont contribué à la meilleure stabilité oxydative parmi les traitements. Cependant, les extraits phénoliques des margines et ceux des raisins ajoutés à des concentrations de 500 ppm semblent moins protégés.

Mots-clés : Huile d'olive vierge, polyphénols, stabilité oxydative, caractéristiques physicochimiques.

## Abstract:

In spite of their polluting nature, the olive mill waste water is considered as a very rich source in natural antioxidants, polyphenols. These last ones also exist in the leaves of olive tree and some fruit such as grapes.

In this study, these polyphenols were extracted to develop them as natural antioxidants, and to compare them with a synthetic antioxidant: the Gallic acid. Concentration from 100 to 500 ppm of these polyphenols and from 100 to 200 ppm of Gallic acid is added to a virgin olive oil. These samples of oil are put under storage conditions in the drying oven ( $T^{\circ}$  bordering  $40^{\circ}\text{C}$ ) during 60 days. The oxydation of the used oil was followed by a determination of the acidity of the peroxide index, iodine index and the specific extinctions in 232 and in 270 nm.

The obtained results showed that all the samples of oil containing antioxidants underwent an oxidative deterioration less accentuated than the one with the witness (without additive). The antioxidants effect of polyphenols existing in the leaves of olive tree added to a concentration of 200 ppm is almost the same with the one of Gallic acid, they have contributed to the best oxidative stability among the processing. However the extracted phenolic from the olive mill waste water and the ones from grapes added to concentration of 500 ppm seem like less protected.

Key words: virgin olive oil, polyphenols, oxidative stability, physico-chemical characteristics

# **Remerciements**

*Ce travail a débuté en Janvier 2010 grâce au financement du laboratoire de chimie appliquée et génie chimique « Valorisation des Sous-Produits Oléicoles » du département de chimie, faculté des sciences exactes de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi- Ouzou.*

*Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères au Dr. Ramdane MOUSSAOUI de m'avoir accordé sa confiance et permis de réaliser ce travail de recherche dans son laboratoire. À travers ses qualités professionnelles, en tant que directeur de ce travail, il m'a transmis de précieuses connaissances.*

*Je n'oublie pas de remercier le directeur du laboratoire monsieur Saïd TEZKRATT ainsi que le personnel permanent du laboratoire de chimie appliquée et génie chimique pour leur sympathie et leur aide scientifique.*

*Mes remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :*

*Mr MECHERRI Mouhamed Oimar, professeur à l'UMMTO qui m'a fait l'honneur de présider ce jury,*

*Mr KADI Hocine, professeur à l'UMMTO qui a bien voulu participer à ce jury,*

*Mme MAKHLOUFI Malika, maitre de conférences à l'UMMTO qui a bien voulu examiner ce travail,*

*Mr AMIR Youcef, maitre de conférences à l'UMMTO qui a bien voulu accepter de juger ce travail.*

# ***Dédicaces***

*A mes chers parents  
en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leurs sacrifices et leur  
soutien tout au long de mes études. Que Dieu leurs prête santé.*

*A mon mari Djamel qui n'a jamais cessé de croire en moi  
source d'amour et de tendresse  
sans toi ce mémoire n'aurait jamais vu le jour...*

*A mes beaux-parents, mes belles sœurs et mes beaux-frères en témoignage de mon  
affection et ma reconnaissance pour leurs encouragements.*

*A mes chers sœurs et frère  
en témoignage de mes sentiments les meilleurs.*

*A mes deux petits neveux Kaïs et Louaï  
que j'aime profondément.  
Que dieu les protège.*

*Kahina*

# ***TABLE DES MATIERES***

<b>INTRODUCTION</b> .....	2
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1. LIPIDES</b>	
1.1. Définition des lipides.....	5
1.2. Rôle des lipides dans l'organisme .....	5
1.3. Classification des lipides .....	5
1.3.1. Lipides vrais .....	5
1.3.2. Composés à caractère lipidique (lipoides).....	6
1.3.3. Associations de lipides et les lipides conjugués .....	6
1.4. Composition des lipides.....	6
1.4.1. Constituants majeurs.....	6
1.4.1.1. Acides gras .....	6
1.4.1.2. Triglycérides .....	7
1.4.2. Constituants mineurs .....	9
1.4.2.1. Phospholipides.....	9
1.4.2.2. Monoglycérides et diglycérides ou glycérides partiels .....	9
1.4.2.3. Insaponifiables.....	9
1.4.2.4. Cire .....	10
1.5. Propriétés physico chimiques des lipides .....	10
1.5.1. Propriétés physiques .....	10
1.5.1.1. Point de fusion .....	10
1.5.1.2. Solubilité.....	11
1.5.2. Propriétés chimiques.....	11
1.5.2.1. Formation de sels de sodium ou potassium .....	11
1.6. Altération des lipides .....	12
1.6.1. Types d'altération des lipides .....	12
1.6.1.1. Hydrolyse .....	14
1.6.1.2. Altération thermique.....	14
1.6.1.3. Oxydation .....	14
1.7. Mécanisme réactionnel de l'oxydation.....	16
1.7.1. Initiation .....	17
1.7. 2. Propagation.....	17
1.7. 3. Terminaison .....	18
1.8. Réaction de Maillard .....	19
1.8.1. Interaction entre réaction d'oxydation lipidique et réaction de Maillard .....	19
1.8.2. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'oxydation des lipides .....	19
1.9. Méthodes de détermination de la stabilité oxydative des lipides .....	19
1.9.1. Mesure de l'oxygène absorbé .....	19
1.9.2. Test de stabilité de Swift .....	20
1.9.3. Méthode à l'étuve ou test Schaal.....	20
1.9.4. Test au Rancimat .....	20

## 2. HUILE D'OLIVE

2.1. Définition.....	22
2.2. Technologie d'extraction de l'huile d'olive .....	22
2.2.1. Système discontinu d'extraction par presse .....	22
2.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à trois phases .....	23
2.2.3. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases .....	24
2.3. Rendement et qualité des huiles issues des trois systèmes d'extraction.....	26
3.4. Classification des huiles d'olive .....	27
2.5. Caractéristiques de l'huile d'olive.....	29
2.5.1. Caractères organoleptiques.....	29
2.5.2. Caractères physico-chimiques .....	29
2.5.2.1. Indice d'acidité .....	29
2.5.2.2. Indice de peroxyde.....	29
2.5.2.3. Spectre en lumière ultra-violette.....	30
2.6. Composition chimique de l'huile d'olive .....	30
2.6.1. Fraction saponifiable .....	30
2.6.1.1. Acides gras .....	30
2.6.2. Composants mineurs .....	31
2.6.2.1. Tocophérols .....	31
2.6.2.2. Composés phénoliques .....	32
2.6.2.3. Composés aromatiques .....	32
2.6.2.4. Hydrocarbures .....	32
2.6.2.5. Stérols .....	32
2.6.2.6. Chlorophylles et dérivées .....	33
2.7. Stockage des olives.....	35
2.8. Conservation de l'huile d'olive .....	35
2.8.1. Conditionnement et emballage .....	35
2.8.2. Conditions de stockage.....	35
2.9. Bienfaits de l'huile d'olive .....	36
2.9.1. Action de l'huile d'olive sur quelques maladies et cancers.....	36
2.9.2. L'huile d'olive lutte contre l'oxydation des LDL .....	36
2.10. Variables externes influençant l'oxydation de l'huile d'olive.....	37
2.10.1. Influence de la température et de la concentration en oxygène.....	37
2.10.2. Influence de la lumière .....	37

## 3. ANTIOXYDANTS

3.1. Radicaux libres .....	40
3.1.1. Définition.....	40
3.1.2. Nature des radicaux libres .....	40
3.1.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) .....	40
3.1.2.2. Espèces libres non oxygénées.....	41
3.2. Antioxydants.....	42
3.2.1. Définition.....	42
3.2.2. Utilisation des antioxydants .....	42
3.2.3. Classification des antioxydants .....	42
3.2.3.1. Antioxygènes de synthèses .....	42
3.2.3.2. Substances synergiques .....	43
3.2.3.3. Antioxygènes d'origine végétale.....	44

a. Tocophérols .....	44
b. Caroténoïdes .....	45
c. Composés phénoliques .....	47
d. Composés phénoliques des raisins .....	50
e. Composés phénoliques des margines .....	53
f. Composés phénoliques des feuilles d'olivier .....	54
3.2.3.4. Contenu en composés phénoliques des olives de tables et activité antioxydante .....	55
3.3. Mécanismes d'action des antioxydants .....	56
3.3.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne .....	56
3.3.2. Antioxydants secondaires .....	56
3.4. Efficacité des antioxydants .....	57
3.4.1. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests in vitro .....	57
3.4.1.1. Test TEAC (ou ABTS) .....	57
3.4.1.2. Test ORAC .....	57
3.4.1.3. Test DPPH .....	57
3.4.2. Effet des antioxydants sur la santé humaine .....	58

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

### 1. MATERIELS ET METHODES

1. Matériel .....	61
1.1. Huile d'olive vierge .....	61
1.2. Margines .....	61
1.3. Feuilles d'olivier .....	61
1.4. Raisins .....	61
2. Méthodes .....	62
2.1. Extraction .....	62
2.1.1. Margines .....	62
2.1.1.1. Extraction des lipides .....	62
2.1.1.2. Extraction des composés phénoliques .....	62
2.1.2. Raisins .....	62
2.1.2.1. Prétraitement .....	62
2.1.2.2. Extraction des composés phénoliques .....	63
2.1.3. Feuilles d'olivier .....	63
2.1.3.1. Prétraitement .....	63
2.1.3.2. Extraction des composés phénoliques .....	64
2.2. Analyses .....	64
2.2.1. Dosage des composés phénoliques .....	64
2.2.2. Acidité .....	65
2.2.3. Indice de peroxyde .....	65
2.2.4. Indice d'iode .....	66
2.2.5. Absorbance aux rayonnements ultraviolets .....	67
3. Préparation des échantillons d'huile d'olive .....	68

**2. RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Teneur en composés phénoliques ..... 70  
2. Analyses chimiques ..... 72  
2.1. Acidité ..... 72  
2.2. Indice de peroxyde..... 75  
2.3. Indice d'iode ..... 79  
3. Analyse physique..... 83  
3.1. Absorbances aux rayonnements UV ..... 83  
3.2. Calcul de  $\Delta K$  ..... 91

**CONCLUSION** ..... 94

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... i

**ANNEXES** .....viii

- A** : Acidité
- AA** : Activité antioxydante définie comme  $CI_{50}/ [DPPH]_{initiale}$
- AAPH** : 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure
- ADN** : Acide disoxyrubo- nucléique
- AG** : Acide gras
- AGI** : Acide gras insaturé
- AGMI** : Acide gras monoinsaturé
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé
- AGS** : Acide gras saturé
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluène
- CI<sub>50</sub>** : Concentration en antioxydant pouvant réduire 50% du radical DPPH
- DBO** : Demande biologique en oxygène
- DCO** : Demande chimique en oxygène
- DPPH** : 1.1- Diphényl-2- Pycrilhydrazyl
- Δ** : Taux d'insaturation
- ERO** : Espèces réactives oxygénées
- HOV** : Huile d'olive vierge
- II**: Indice d'iode
- IP**: Indice de peroxyde
- LDL** : Lipoprotéines à basse densité (Low Density Lipoproteins)
- O<sub>2</sub><sup>°</sup>** : Ion superoxyde
- O<sub>2</sub><sup>1</sup>** : Oxygène singulet
- O<sub>2</sub><sup>3</sup>** : Oxygène à l'état fondamental (atmosphérique)
- OH<sup>°</sup>**: Radicale hydroxyle
- ORAC**: Oxygen Radical Absorbance Capacity
- R<sup>°</sup>**: Radical alkyle
- RO<sup>°</sup>**: Radical alkoxyde
- ROO<sup>°</sup>**: Radical hydroperoxyde
- ROOH** : Radical hydroperoxyde
- T<sub>f</sub>** : Température de fusion
- TIR** : Temps d'induction au test Rancimat
- ppm** : Particule Par Million

<b>Figure 1</b> : Structure d'un glycérol et d'un triglycéride.....	8
<b>Figure 2</b> : Schéma simplifié des voies d'altération des lipides.....	13
<b>Figure 3</b> : Peroxydation lipidique induite par le radical OH°.....	15
<b>Figure 4</b> : Représentation simplifié de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes.....	16
<b>Figure 5</b> : Schéma simplifié de l'auto-oxydation.....	18
<b>Figure 6</b> : Système discontinu d'extraction par presse.....	23
<b>Figure 7</b> : Système continu d'extraction avec centrifugation à 3phases.....	24
<b>Figure 8</b> : Système continu d'extraction avec centrifugation à 2 phases.....	25
<b>Figure 9</b> : Réaction de l'oxygène singulet avec un lipide insaturé.....	38
<b>Figure 10</b> : Structure des composés à action vitaminique E (tocophérols).....	45
<b>Figure 11</b> : Structure des principaux caroténoïdes.....	46
<b>Figure 12</b> : Structure de l'acide benzoïque.....	47
<b>Figure 13</b> : Structure de l'acide cinnamique.....	47
<b>Figure 14</b> : Structure des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.....	48
<b>Figure 15</b> : Structure des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.....	49
<b>Figure 16</b> : Structure de base des flavonoïdes.....	50
<b>Figure 17</b> : Structure des acides hydroxycinnamiques du raisin.....	51
<b>Figure 18</b> : Structures des tannins du raisin (Les monomères).....	52
<b>Figure 19</b> : Structures des tannins du raisin (Les proanthocyanidols).....	52
<b>Figure 20</b> : Structure de l'oleuropéine.....	55
<b>Figure 21</b> : Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol.....	56
<b>Figure 22</b> : Schéma donnant un exemple d'extraction liquide-liquide.....	63
<b>Figure 23</b> : Schéma donnant un exemple d'extraction solide-liquide.....	64
<b>Figure 24</b> : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques.....	71
<b>Figure 25</b> : Evolution de l'acidité des échantillons d'huile en fonction de la durée de stockage et de la concentration en composés phénoliques.....	73
<b>Figure 26</b> : Evolution des indices de peroxyde (meq/kg) des échantillons d'huile en fonction de la durée de stockage et de la concentration en composés phénoliques.....	76

<b>Figure 27:</b> Evolution des indices d'iode (g I <sub>2</sub> /100g de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.....	80
<b>Figure 28:</b> Evolution des indices d'iode (g I <sub>2</sub> /100g de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques du raisin et de la durée de stockage.....	80
<b>Figure 29:</b> Evolution des indices d'iode (g I <sub>2</sub> /100g de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.....	81
<b>Figure 30:</b> Evolution des indices d'iode (g I <sub>2</sub> /100g de corps gras) du témoin et les échantillons d'huile auxquels sont rajoutés les antioxydants de synthèse en fonction de la durée de stockage.....	81
<b>Figure 31:</b> Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.....	85
<b>Figure 32:</b> Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des raisins et de la durée de stockage.....	85
<b>Figure 33:</b> Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.....	86
<b>Figure 34:</b> Evolution des absorbances à 232 nm des échantillons d'huile d'olive aux quels sont ajoutés les antioxydants des margines (500ppm), des raisins (200ppm), des feuilles d'olivier (100ppm) et de synthèse ainsi que celle du témoin.....	86
<b>Figure 35:</b> Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.....	89
<b>Figure 36:</b> Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des raisins et de la durée de stockage.....	89
<b>Figure 37:</b> Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.....	90
<b>Figure 38:</b> Evolution des absorbances à 270 nm des échantillons d'huile d'olive aux quels sont ajoutés les antioxydants des margines (500ppm), des raisins (200ppm), des feuilles d'olivier (100ppm) et de synthèse ainsi que celle du témoin.....	90

<b>Tableau 1:</b> Classement des acides gras en fonction du degré d'insaturation et du degré du nombre de carbones.....	7
<b>Tableau 2:</b> Teneur en lipides totaux et en acides gras des principales graisses et huiles alimentaires (g/100g) .....	8
<b>Tableau 3:</b> Les principales altérations que peuvent subir les corps gras.....	14
<b>Tableau 4:</b> Rendement en huile des sous-produits obtenus avec les différents systèmes d'extraction.....	26
<b>Tableau 5:</b> Caractéristiques des huiles obtenues issues de trois systèmes d'extraction d'huile.....	27
<b>Tableau 6:</b> Caractéristiques et limites prévues par la norme commerciale internationale applicable aux huiles d'olive et grignon d'olive.....	28
<b>Tableau 7:</b> Acidité des huiles issues de trois systèmes d'extraction d'huile.....	29
<b>Tableau 8:</b> Les fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile d'olive et de grignon d'olive .....	34
<b>Tableau 9:</b> Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse.....	43
<b>Tableau 10:</b> Effet synergique de l'association de plusieurs antioxydants .....	44
<b>Tableau 11:</b> Les principales classes de composés phénoliques.....	47
<b>Tableau 12:</b> Les principaux composants des margines .....	53
<b>Tableau 13:</b> Répartition des échantillons de l'huile d'olive.....	69
<b>Tableau 14:</b> Teneur en composés phénoliques des trois substances étudiées .....	71
<b>Tableau 15:</b> Evolution de l'acidité des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.....	72
<b>Tableau 16:</b> Evolution de l'indice de peroxyde des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.....	75
<b>Tableau 17:</b> Evolution de l'indice d'iode des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.....	79
<b>Tableau 18:</b> Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.....	84
<b>Tableau 19:</b> Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.....	88
<b>Tableau 20 :</b> Valeurs des extinctions spécifiques à 232, 264, 270 et 274 nm et de $\Delta K$ de tous les échantillons d'huile d'olive à l'état initial.....	91
<b>Tableau 21 :</b> Valeurs des extinctions spécifiques à 232, 264, 270 et 274 nm et de $\Delta K$ de tous les échantillons d'huile d'olive à la fin de la conservation.....	92

# ***INTRODUCTION***

## ***INTRODUCTION***

Les lipides sont un élément essentiel de notre alimentation. Qu'ils soient appelés corps gras, matières grasses ou graisses, ils sont consommés à l'état naturel ou bien ils sont présents dans un aliment. Les lipides sont bien sûr une source de saveur et de plaisir pour le palais et contribuent aussi au bon fonctionnement de l'organisme et à son développement. Les acides gras sont les principaux constituants des lipides, le plus fréquent est l'acide oléique ; il se trouve dans beaucoup de corps gras et en grande quantité dans l'huile d'olive.

Un aliment fonctionnel est un aliment ordinaire doté de propriétés propres ou ajoutées qui le rendent capable d'agir favorablement sur l'état de santé. Les nutraceutiques, un concept proche, sont catégorisés comme un groupe d'aliments se déclinant sous diverses formes pharmaceutiques (comprimés par exemple) et classés à mi-chemin entre les aliments et les médicaments. Grâce à l'expérience de masse, elle-même forgée par des siècles de pratique et de savoir faire populaire, il est aisé de reconnaître un classique, parmi tant d'autres, dans cette catégorie « *l'huile d'olive* ». C'est par excellence un authentique remède universel de tout les temps dans le pourtour méditerranéen (nutritif, combat le diabète, diurétique, anti-inflammatoire...) [1].

L'huile d'olive vierge est considérée meilleure de toutes les huiles d'olive par rapport à ses caractéristiques organoleptiques, sa stabilité et sa composition chimique [2] parce qu'elle est le jus des olives récoltées à une maturité optimale. L'oxydation des lipides est l'une des fameuses réactions fondamentales de la chimie des lipides. Quand les acides gras insaturés sont exposés à l'air, la molécule d'oxygène réagit avec eux selon un mécanisme de chaînes radicalaires en produisant des hydroperoxydes. Ceux-ci vont se décomposer en une variété de produits d'oxydation secondaires. Enfin, des composés volatils sont formés conduisant l'huile à une dégradation de sa qualité [3].

Cependant, l'huile d'olive vierge a une grande résistance à la détérioration oxydative, cela est dû à sa composition triacylglycérol pauvre en acides gras polyinsaturés, et à la présence d'un groupe d'antioxydants phénoliques qui comprend des polyphénols et des tocophérols.

Les polyphénols ont une grande importance pour la stabilité de l'huile d'olive vierge comparativement à d'autres huiles raffinées où ces derniers sont éliminés durant les processus du raffinage [4]. Les composés phénoliques majoritaires dans les huiles d'olives vierges sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol, suivis de traces d'acides cinnamiques substitués dont l'acide caféique, d'oléuropeilaglycone et d'oléuropéine [5].

Cette résistance à l'oxydation peut être améliorée par plusieurs méthodes. L'une des approches les plus appropriées consiste en l'incorporation d'antioxydants naturels. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail dont l'objectif est l'étude de l'effet des antioxydants des margines, des feuilles d'olivier et des raisins sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge.

Cette étude est constituée de trois parties :

Tout d'abord, la partie bibliographique qui comprend trois chapitres dont le premier détaille les lipides et leur dégradation, le deuxième chapitre traite les caractéristiques chimiques et physico-chimiques de l'huile d'olive ainsi que sa composition et les facteurs influençant sa dégradation. Le troisième chapitre présente les différents types d'antioxydants et leurs mécanismes d'action.

Dans la partie "Matériel et Méthode", les méthodes d'analyses classiques utilisées dans ce travail, la préparation des échantillons et l'instrumentation utilisés sont décrites.

La partie consacrée à la présentation des résultats et à la discussion est divisée en deux parties : la première est consacrée en la détermination de la teneur en composés phénoliques extraits à partir des margines, des feuilles d'olivier et des raisins. La deuxième partie traite l'évaluation du pouvoir antioxydant de ces derniers vis-à-vis d'une huile d'olive vierge à travers la détermination de l'acidité, de l'indice de peroxyde, de l'indice d'iode et des coefficients d'absorption molaire par rayonnements UV Visible. Les échantillons d'huile ayant fait l'objet de ce travail sont étuvés à 40°C et à l'obscurité en fonction de la durée de conservation.

***PREMIERE PARTIE***  
***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

# ***CHAPITRE 1***

## ***LIPIDES***

### 1.1. Définition des lipides

La plupart des familles de molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques. Les lipides (du grec lipos, graisse) sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais par contre élevée dans les solvants organiques (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther diéthylique, acétone,...). Les termes d'huiles, beurres, graisses, cires ne désignent que leur état physique liquide ou solide à la température ambiante.

Un lipide est une molécule :

- soit complètement apolaire (lipide neutre)
- soit bipolaire, molécule amphiphile (ou amphipathique), avec une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire (queue).

### 1.2. Rôle des lipides dans l'organisme

- Les lipides entrent dans la composition des membranes cellulaires (les membranes qui entourent les cellules). Les acides gras essentiels sont des constituants des membranes cellulaires notamment au niveau des neurones.
- Les lipides sont stockés dans les cellules graisseuses (adipocytes) où ils forment une réserve d'énergie.
- Les lipides servent à transporter des vitamines (liposolubles) et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions vitales (reproduction, immunité, coagulation, inflammation, vision...)

### 1.3. Classification des lipides

#### 1.3.1. Lipides vrais

Ils résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par une liaison ester ou amide, et nous les subdivisons en :

1- Lipides simples ou homolipides qui sont neutres comme les :

- glycérolipides : l'alcool est le glycérol
- cérides : les alcools sont à longue chaîne (gras)
- stérides : l'alcool est un stérol (polycyclique)

2- Lipides complexes qui contiennent en plus des précédents du phosphore, de l'azote, du soufre ou des oses.

### 1.3.2. Composés à caractère lipidique (lipoïdes)

- Isoprénoïdes, dérivés d'unités isoprène : nous trouvons aussi le groupe des composés terpéniques et les dérivés du stérol.
- Eicosanoïdes : des médiateurs dérivés d'un acide gras.

### 1.3.3. Associations de lipides simples et les lipides conjugués

Les lipides participent à des édifices supramoléculaires non covalents qui incluent des protéines. Dans quelques cas, des protéines peuvent avoir une fraction lipidique liée de manière covalente.

## 1.4. Composition des lipides

### 1.4.1. Constituants majeurs

#### 1.4.1.1. Acides gras

Les acides gras peuvent exister à l'état libre dans la nature. Ce sont des composés organiques à base de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue et d'un groupe carboxyle.

La chaîne aliphatique hydrocarbonée peut être saturée ou peut présenter une ou plusieurs doubles liaisons. Les acides gras diffèrent donc entre eux par la longueur de la chaîne aliphatique, le nombre et la localisation des doubles liaisons éventuelles.

Les acides gras sont symbolisés par la notation (C<sub>n</sub> : x), avec « n » qui représente le nombre de carbones de la chaîne et « x » le nombre de doubles liaisons.

Près d'une centaine d'acides gras ont été isolés et étudiés; leur étude a permis les généralisations suivantes [6] :

- Les acides gras les plus abondants ont un nombre pair d'atomes de carbone compris entre 14 et 22 (16 et 18 prédominent)
- Les acides gras insaturés sont les plus fréquents que les saturés, surtout chez les plantes et les animaux vivants à basse température.
- La plupart des acides gras monoinsaturés ont une double liaison qui se situe entre C<sub>9</sub> et C<sub>10</sub>.
- Les acides gras polyinsaturés ont la première double liaison entre C<sub>9</sub> et C<sub>10</sub> et les suivantes sont séparées par un groupement méthylique, dans quelques cas elles peuvent être conjuguées.
- Les doubles liaisons sont en configuration Cis, rarement Trans.

- Les acides gras à nombre impair de carbones se trouvent dans les tissus d'animaux marins, les microorganismes et la flore intestinale des animaux tels que les bovins.

Le tableau 1 montre quelques acides gras selon leurs degrés d'insaturation et leur nombre de carbones.

**Tableau 1** : Classement des acides gras en fonction du degré d'insaturation et du nombre de carbones [7].

Acide gras	Nombre de carbones	Longueur de la chaîne carbonée	Degré de saturation	Aliments
Caproïque	6	Courte	saturé	Beurre
Caprylique	8	Moyenne	saturé	Noix de coco
Caprique	10	Moyenne	saturé	Palmiste, noix de coco
Laurique	12	Moyenne	saturé	Noix de coco
Myristique	14	longue	saturé	Muscade
Palmitique	16	longue	saturé	Huile de palme
Stéarique	18	longue	saturé	Graisses animales
Oléique	18	longue	monoinsaturé	Huile d'olive
Linoléique	18	longue	polyinsaturé	Huile de maïs
Linoléinique	18	longue	polyinsaturé	Huile de soja

#### 1.4.1.2. Triglycérides

Les triglycérides sont des triesters résultant de la combinaison de trois molécules d'acide gras par leur fonction carboxyle avec les fonctions alcooliques du glycérol.

La synthèse des lipides par estérification des acides gras se fait sur différents alcools [8] : glycérol (glycérides), cholestérol (stérides) et aussi par amidification de la sphingosine (sphingolipides).

On peut obtenir des mono-glycérides, des diglycérides, ou des triglycérides qui sont les plus répandus. C'est la forme de réserve d'énergie chez l'homme, stockée dans les adipocytes sous forme de gouttelettes dans le cytosol.

Dans la figure 1, sont données les structures d'un glycérol et d'un triglycéride.



**Figure 1** : Structure d'un glycérol et d'un triglycéride

Lorsque le glycérol est lié à trois molécules d'un même acide gras, le triglycéride est dit homogène, dans le cas contraire, le triglycéride est dit hétérogène. Selon la combinaison et l'assemblage des acides gras sur le glycérol, le glycéride aura une structure différente et pourra être monoacide, symétrique ou asymétrique.

Le tableau 2 illustre la teneur en lipides totaux et en acides gras des principales graisses et huiles alimentaires.

**Tableau 2:** Teneur en lipides totaux et en acides gras des principales graisses et huiles alimentaires (g/100g) [7].

Graisses et huiles	Lipides totaux	AG saturés	AG monoinsaturés	AG polyinsaturés
Beurre	83,4	52,0	21,0	3,1
Lard	99,0	48,0	37,7	7,4
Margarine	84,0	50,0	23,0	11,0
Huile d'olive	100	17,2	72,5	9,9
Huile d'arachide	100	19,5	52,5	26,4
Huile de maïs	100	31,3	20,7	47,2
Huile de soja	100	15,8	23,5	59,7
Huile de tournesol	100	7,5	34,0	58,0

### 1.4.2. Constituants mineurs

Ce sont des composés importants par le rôle qu'ils jouent dans le métabolisme et la structure cellulaire. Ils sont très répandus dans le règne animal.

Parmi les produits mineurs, on peut distinguer les phospholipides, les cérides et les produits insaponifiables.

#### 1.4.2.1. Phospholipides

Ce sont des esters de glycérol dont une fonction alcool est naturellement estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, elle-même associée à une amine ou à un sucre (inositol). On parle ainsi de phosphatidylsérine, phosphatidylcholine (ou lécithine), phosphatidylinositol et phosphatidyléthanolamine. Ces molécules sont dites amphiphiles car elles possèdent un pôle hydrophile et un pôle lipophile. Elles ont donc des propriétés émulsifiantes.

#### 1.4.2.2. Monoglycérides et diglycérides ou glycérides partiels

Ces molécules sont des mono ou des diesters de glycérol et d'acides gras provenant de l'hydrolyse partielle des triglycérides ; leur(s) fonction(s) alcool libre(s) leur confère(nt) une certaine hydrophilie et des propriétés émulsifiantes.

#### 1.4.2.3. Insaponifiables

L'insaponifiable est constitué de composés qui après hydrolyse basique (saponification) sont très peu solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants traditionnels des corps gras (cyclohexane, éther éthylique, acétone,...).

La proportion d'insaponifiable varie pour un corps gras non raffiné (brut) de 0,2 à 2% (moyenne aux environs de 1%) [9] ; elle est fonction de l'origine et des traitements subis par le corps gras (raffinage).

#### • Stérols

Ce sont des molécules à plusieurs cycles, de poids moléculaire élevé, avec une fonction alcool. Ils se trouvent à l'état libre ou estérifié par un acide gras. Dans le règne animal, le principal stérol est le cholestérol ; dans le règne végétal, on parle de phytostérols dont le principal est le  $\beta$ -sitostérol. Ils représentent 30 à 60% de l'insaponifiable [10].

### • Tocophérols

Ils sont au nombre de quatre isomères ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) constitués d'une chaîne carbonée associée à un groupement quinone ; ils ont essentiellement des propriétés antioxydantes (en particulier vis à vis des acides gras polyinsaturés). Ils se trouvent en quantité notable dans les huiles végétales (tournesol, maïs, soja, colza), ils possèdent également une activité vitaminique E, la plus forte étant celle de l' $\alpha$ -tocophérol. Leur teneur varie de 200 à 1200 mg/kg dans les huiles végétales et de 10 à 20 mg/kg dans les graisses animales [10].

### • Pigments

Les carotènes, caroténoïdes (xanthophylles) et chlorophylles contribuent à la couleur des huiles, ces pigments naturels sont éliminés en grande partie par le raffinage. A titre indicatif, l'huile de palme particulièrement riche en carotènes en contient de 500 à 800 mg/kg [10].

#### 1.4.2.4. Cire

Les cires sont des esters d'acides gras et de monoalcools aliphatiques (alcools gras principalement). Chez les végétaux, elles contribuent à la formation de pellicules protectrices des graines et des fruits. Il en existe aussi dans le règne animal (principalement cétacés et poissons). Dans les huiles, surtout le tournesol, leur présence est responsable de l'apparition de trouble par début de cristallisation à basse température ou à température ambiante.

## 1.5. Propriétés physico chimiques des lipides

### 1.5.1. Propriétés physiques

#### 1.5.1.1. Point de fusion

Le point de fusion des lipides dépend de deux critères :

a) **Longueur de la chaîne** : nous citons trois exemples

✓ Acide butyrique (C<sub>4</sub>) :  $T_f = - 8 \text{ C}^\circ$

✓ Acide palmitique (C<sub>16</sub>) :  $T_f = + 63\text{C}^\circ$

✓ Acide stéarique (C<sub>18</sub>) :  $T_f = + 69\text{C}^\circ$

Une augmentation du nombre d'atomes de carbone entraîne une augmentation du point de fusion.

Donc à température ordinaire, les acides gras à nombre d'atomes de carbone inférieur à 10 sont liquides et ceux à nombre d'atomes de carbone supérieur à 10 sont solides.

**b) Taux d'insaturation :** nous citons quatre exemples :

- ✓ Acide stéarique (0 $\Delta$ ) :  $T_f = + 69C^\circ$
- ✓ Acide oléique (1 $\Delta$ ) :  $T_f = + 16 C^\circ$
- ✓ Acide linoléique (2 $\Delta$ ) :  $T_f = - 5 C^\circ$
- ✓ Acide linoléique (3 $\Delta$ ) :  $T_f = - 11 C^\circ$

Une augmentation du nombre de doubles liaisons entraîne une diminution de la température de fusion.

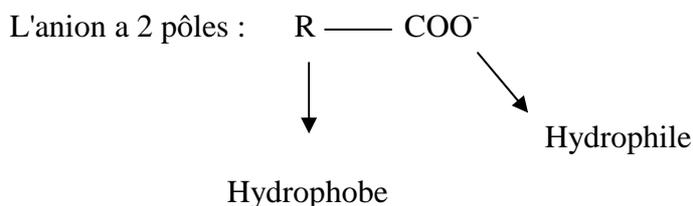
### 1.5.1.2. Solubilité

La solubilité des lipides est liée à la structure de type bipolaire de leurs molécules. L'hydrophobie de leur chaîne hydrocarbonée apolaire l'emporte sur la faible hydrophilie de leur groupement carboxylique peu dissocié. Seuls les premiers termes sont solubles dans l'eau, les homologues supérieurs étant insolubles.

### 1.5.2. Propriétés chimiques

#### 1.5.2.1. Formation de sels de sodium ou potassium

Ce sont des savons à propriétés moussantes, mouillantes et émulsionnantes. Dans l'eau les savons se dissocient en  $Na^+ + R-COO^-$



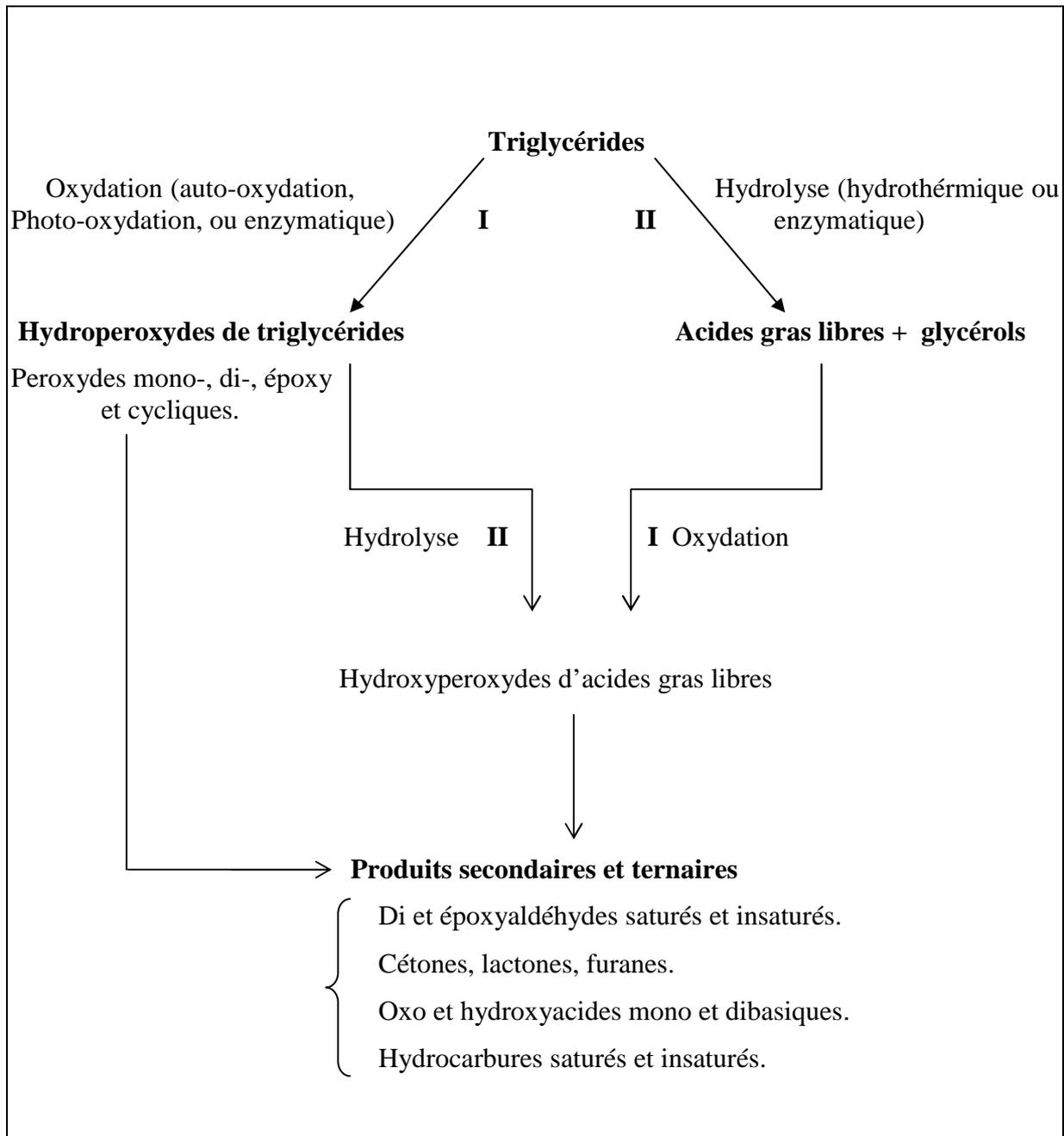
Ces molécules appelées amphiphiles ou amphipathiques, sont tensioactives, elles abaissent la tension superficielle de l'eau d'où leurs propriétés.

## **1.6. Altération des lipides**

Tous les corps gras subissent au cours de leur conservation ou de leur utilisation des altérations oxydatives. Les principaux composés oxydables sont les acides gras insaturés, à l'état libre ou estérifiés en triglycérides, d'autres composés de nature lipidique sont par ailleurs oxydables : vitamines liposolubles, stérols... Le phénomène d'oxydation des acides gras conduit à une dégradation organoleptique, avec apparition d'une flaveur caractéristique « rance » qui modifie la qualité marchande du produit.

### **1.6.1. Types d'altération des lipides**

L'hydrolyse et l'oxydation sont les principales voies d'altération des lipides au cours de la production, du stockage et de la transformation des huiles. La figure 2 et le tableau 3 résument les principales altérations que peuvent subir les corps gras. Ces modifications affectent la durée de vie, la qualité organoleptique, nutritionnelle et la sécurité alimentaire de ces dernières.



**Figure2** : schéma simplifié des voies d'altération des lipides

**Tableau 3** : Les principales altérations que peuvent subir les corps gras [10].

Altérations	Facteurs déclenchant	Composés produits
<b>Hydrolytique</b>	Eau  Enzymes	Formation de : acides gras libres, glycérides partiels (mono et di- glycérides)
<b>Oxydative</b> : La stabilité des corps gras à l'oxydation est influencée négativement par l'air, la lumière et plus précisément par l'énergie rayonnée par les radiations courtes (UV). Les traces métalliques (Fe et surtout Cu) sont des catalyseurs d'oxydation,	Air	1- Formation de composés volatils responsables du phénomène de rancissement.  2- Formation de produits non volatils : composés polaires d'oxydation, polymérisés ou non polymérisés.
<b>Thermique</b>	Chauffage	Réactions de polymérisation, Cyclisation.

#### 1.6.1.1. Hydrolyse

L'hydrolyse des lipides est principalement le fait d'enzymes lipolytiques. Pour les noix et graines, il s'agit de lipases, de phospholipases et d'estérases. Les lipases et les estérases hydrolysent les liaisons esters des glycérides et libèrent à partir des triglycérides des acides gras, des diglycérides et des monoglycérides. Les acides gras libres formés peuvent ensuite servir de substrats pour les réactions d'oxydation [11].

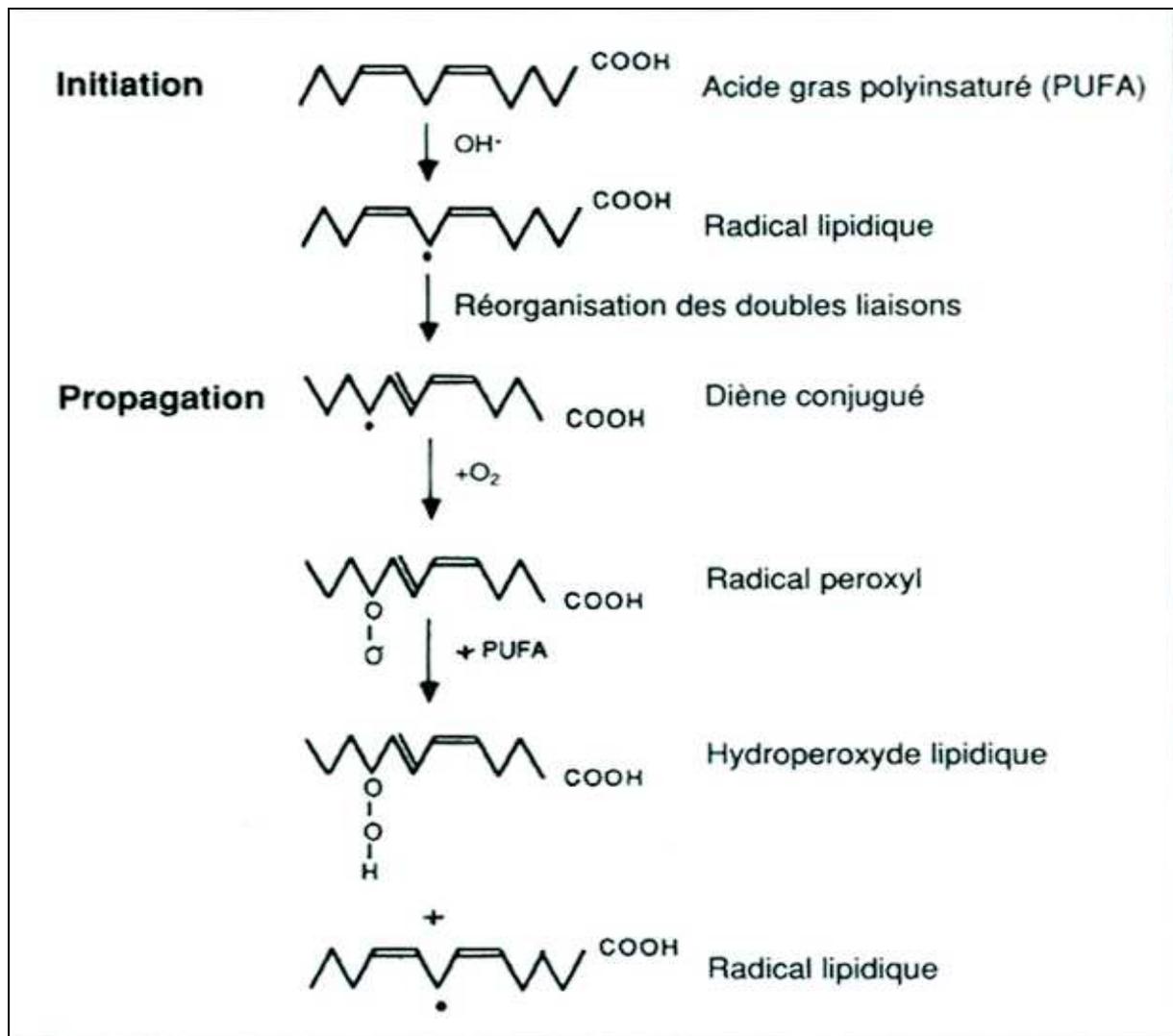
#### 1.6.1.2. Altération thermique

Le chauffage des lipides à des températures supérieures à 100 voire 150 °C, conduit à la formation de polymères, de composés cycliques ou isomérisés.

#### 1.6.1.3. Oxydation

L'oxydation des lipides a été reconnue comme un problème majeur affectant les huiles comestibles, ceci en influençant négativement leurs propriétés chimique, nutritionnelle et sensorielle. Initialement, l'oxydation des lipides se fait de manière lente, ensuite, elle augmente soudainement, et la durée de la première étape est appelée « période d'induction » ou « temps d'induction » [4].

L'oxydation des lipides peut se dérouler selon diverses voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs. La figure 3 illustre une oxydation lipidique induite par un radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$ .



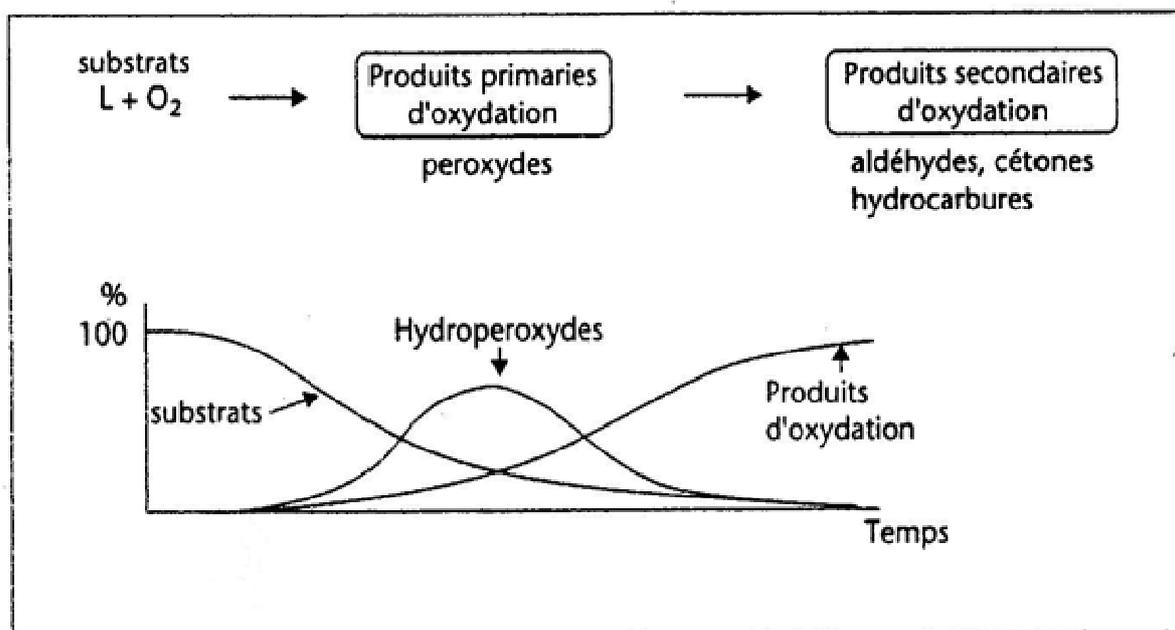
**Figure 3 :** Peroxydation lipidique induite par le radical  $\text{OH}^\bullet$ .

#### a. L'oxydation enzymatique

L'enzyme principalement impliquée est la lipoxygénase [12]. La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique, et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases.

### b. L'auto-oxydation

L'auto-oxydation de la matière grasse abandonnée au contact de l'oxygène constitue un ensemble complexe de réactions non encore complètement élucidées. Elles conduisent à la rupture des chaînes carbonées avec le développement de produits pour la plupart volatils, à structure carbonylée. Les propriétés organoleptiques de la matière grasse sont altérées. La figure 4 montre le schéma simplifié de l'auto-oxydation.



**Figure 4 :** Représentation simplifiée de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes et de la cinétique de formation des produits secondaires d'oxydation [13].

#### 1.7. Mécanisme réactionnel de l'oxydation

L'oxydation concerne les matières grasses insaturées et comporte trois étapes qui sont l'initiation, la propagation et la terminaison. Au cours de l'initiation, il y a formation de radicaux libres puis de radicaux hydroperoxydes en position  $\alpha$  d'une double liaison. La chaleur, la présence de traces de sels de métaux de transition et la lumière ultraviolette sont des agents d'initiation. Cette première étape, appelée également période d'induction, correspond à une période d'absorption lente de l'oxygène atmosphérique. La deuxième étape est la propagation, au cours de laquelle on assiste à une formation plus accélérée d'hydroperoxydes, ce qui se traduit par une forte consommation d'oxygène. La dernière étape consiste en la combinaison des radicaux formés au cours des deux premières étapes en composés non radicalaires. Le mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides comprend trois phases [11] :

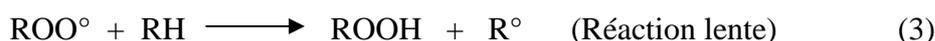
### 1.7.1. Initiation

En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre centré sur le carbone ( $R^\circ$ ) (radical alkyle).



### 1.7.2. Propagation

Le radical alkyle, très réactif, fixe une molécule d'oxygène, pour former un radical hydroperoxyde instable, centré sur l'oxygène (2). Celui-ci arrache à son tour un hydrogène labile d'un deuxième acide gras, formant un hydroperoxyde non radicalaire plus stable (3), mais générant une nouvelle espèce radicalaire sur le deuxième acide gras.



Comme le montre la figure 4 citée ci-dessus, la phase de propagation peut elle-même être décomposée en deux étapes séquentielles [13]:

1- La première étape correspond à l'apparition des peroxydes, composés primaires d'oxydation, à partir des radicaux libres instables : la quantité de peroxydes formés peut être évaluée analytiquement grâce à la détermination de l'indice de peroxyde.

2- La deuxième étape se traduit par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation, par deux voies principales :

- La scission : conduisant par coupure à la libération de composés volatiles (chaînes carbonées courtes et moyennes), notamment aldéhydiques, responsables des saveurs de rance, caractérisés par un seuil de détection très faible.
- Le remaniement : conduisant suite à différents types de pontage intra- ou inter-acides gras ou suite à l'apparition de fonctions oxydées. À ce stade dit de rancissement, le goût rance est bien entendu perceptible.

### 1.7.3. Terminaison

Pendant cette phase, les espèces radicalaires réagissent entre elles pour donner des espèces non radicalaires, mettant ainsi fin aux cycles réactionnels.



La figure 5 représente un schéma simplifié des stades primaires et secondaires de l'auto-oxydation d'une matière grasse insaturée (RH).

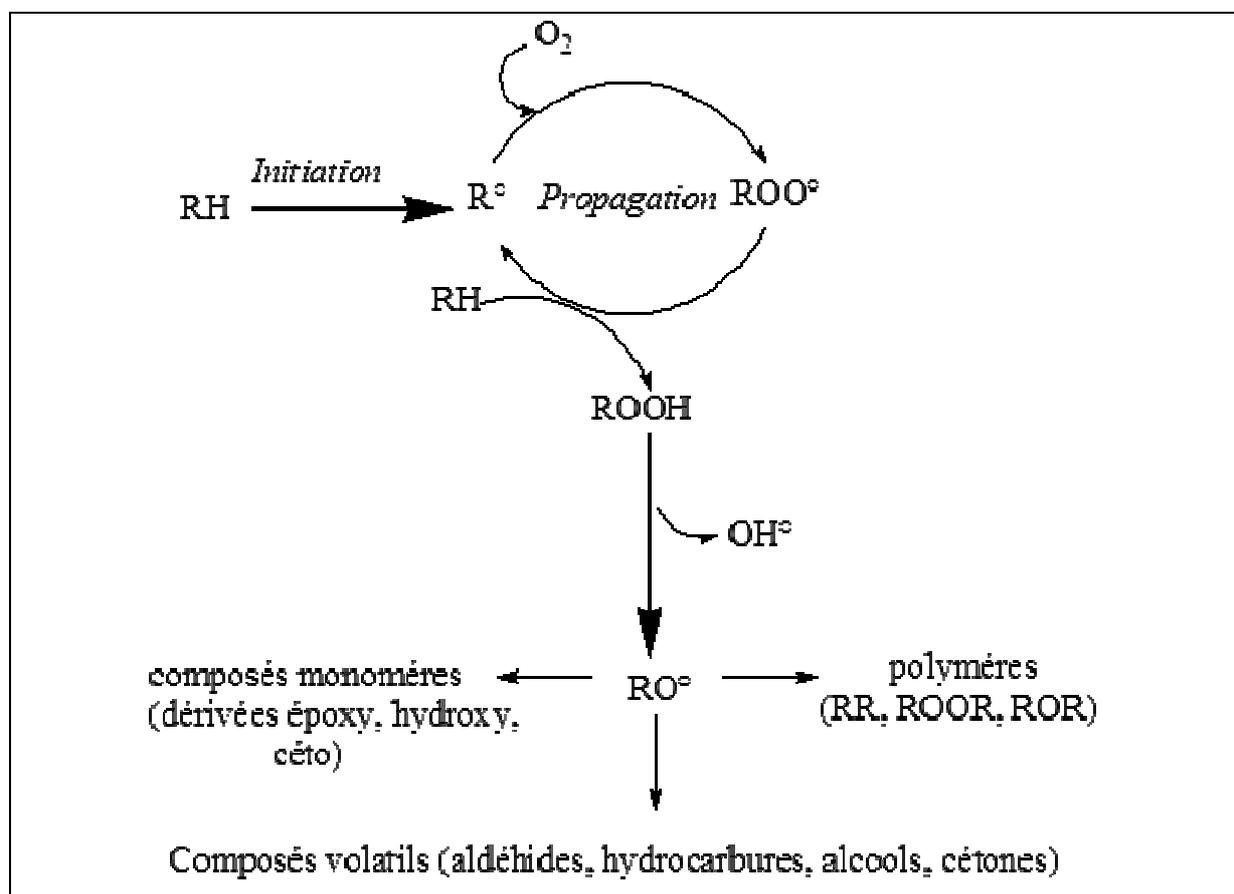


Figure 5 : Schéma simplifié de l'auto-oxydation [4].

## **1.8. Réaction de Maillard**

Nous sommes aujourd'hui en mesure de réaliser individuellement la condensation d'un aminoacide défini sur un sucre défini. C'est ainsi que Louis-Camille Maillard fit part de sa découverte surprenante à l'Académie des Sciences le 8 janvier 1912. Alors qu'il travaillait sur la synthèse de protéines par chauffage, il obtint par hasard des substances aromatiques et colorées qu'il identifia comme étant des mélanoidines, polymères bruns responsables de la couleur et de la saveur de nombreux aliments : croûte du pain, bière, café et chocolat torréfiés [14]. Cette réaction est aussi connue sous le nom de brunissement non enzymatique. En agro-alimentaire, ces réactions sont recherchées et contrôlées dans le but d'améliorer les qualités organoleptiques de certains aliments.

### **1.8.1. Interaction entre réaction d'oxydation lipidique et réaction de Maillard**

La réaction de Maillard génère des radicaux libres et des composés prooxydants, alors que par ailleurs elle est activée par les radicaux libres. De son côté l'oxydation des lipides est favorisée par la présence de radicaux libres, donc par certains produits de Maillard. Mais cette réaction à son tour génère des composés aldéhydiques réactifs vis-à-vis des amines.

### **1.8.2. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'oxydation des lipides**

Les produits de Maillard favorisent l'oxydation des lipides. De même augmentent l'oxydation des phospholipides. La glycation des phospholipides favorise aussi la peroxydation lipidique. Ceci est vraisemblablement lié à la formation d'intermédiaires radicalaires pro-oxydants tels que le radical pyridinium. Cependant, un effet antioxydant des produits de Maillard a également été montré. Le mécanisme semble pourtant légèrement différent puisqu'il met en jeu les mélanoidines chélateurs de métaux et de radicaux libres, donc à activité antioxydante [11].

## **1.9. Méthodes de détermination de la stabilité oxydative des lipides**

### **1.9.1. Mesure de l'oxygène absorbé**

Cette méthode permet de suivre simultanément le cours de l'oxydation et de mesurer l'indice d'oxydation de l'huile traitée. L'oxygène absorbé est mesuré par des méthodes volumétriques ou électrochimiques.

### **1.9.2. Test de stabilité de Swift**

Il est surtout appliqué pour les graisses animales. Dans sa version initiale, ce test consiste à oxyder par l'air, la matière grasse maintenue à 98°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde en fonction du temps. Cette façon de faire est assez complexe et peu reproductible. La modification faite à ce test consiste à décolorer un indicateur de pH (rouge de crésol) par les produits volatils acides formés lors de l'oxydation [15]. Le temps (heures) nécessaire à la décoloration de l'indicateur coloré, encore appelé « temps de Swift » mesure la résistance de la matière grasse à l'oxydation [16].

### **1.9.3. Méthode à l'étuve ou test Schaal**

Ce test consiste à oxyder la matière grasse dans une étuve portée à 60°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde sur des prélèvements faits toutes les 4, 8, ou 24h [15]. Cette méthode présente l'avantage de se rapprocher des conditions réelles de stockage (cas des flacons transparents d'huiles conservés à la lumière du jour et à température ambiante).

### **1.9.4. Test au Rancimat**

Ce test est très utilisé pour évaluer la stabilité oxydative des matières grasses. La spécification de TIR (Temps d'Induction au test Rancimat, exprimé en heures) correspond au temps pendant lequel la matière grasse a résisté à un stress oxydatif. Le principe du test consiste à vieillir prématurément les matières grasses par décomposition thermique à 98°C, sous un bullage intensif d'air. Les acides organiques, produits de dégradation de cette oxydation poussée, sont entraînés par un courant d'air et recueillis dans une cellule de mesure remplie d'eau distillée. Le temps d'induction est déterminé par conductimétrie et correspond au TIR.

***CHAPITRE 2***  
***HUILE D'OLIVE***

## 2.1. Définition

L'huile d'olive fait partie de la culture méditerranéenne. Si l'huile est constituée pour l'essentiel d'acides gras liés au glycérol (> 95 %), c'est-à-dire de triglycérides, elle contient, par ailleurs, un grand nombre d'autres composants, présents en faibles quantités. Ces composants dits «mineurs» n'en sont pas moins très importants : certains ont des effets bénéfiques sur la santé humaine, d'autres renforcent la stabilité de l'huile, d'autres encore sont responsables de son parfum délicat et unique. Le principal atout nutritionnel de l'huile d'olive réside cependant dans sa richesse en composés phénoliques ayant des propriétés antioxydantes.

## 2.2. Technologie d'extraction de l'huile d'olive

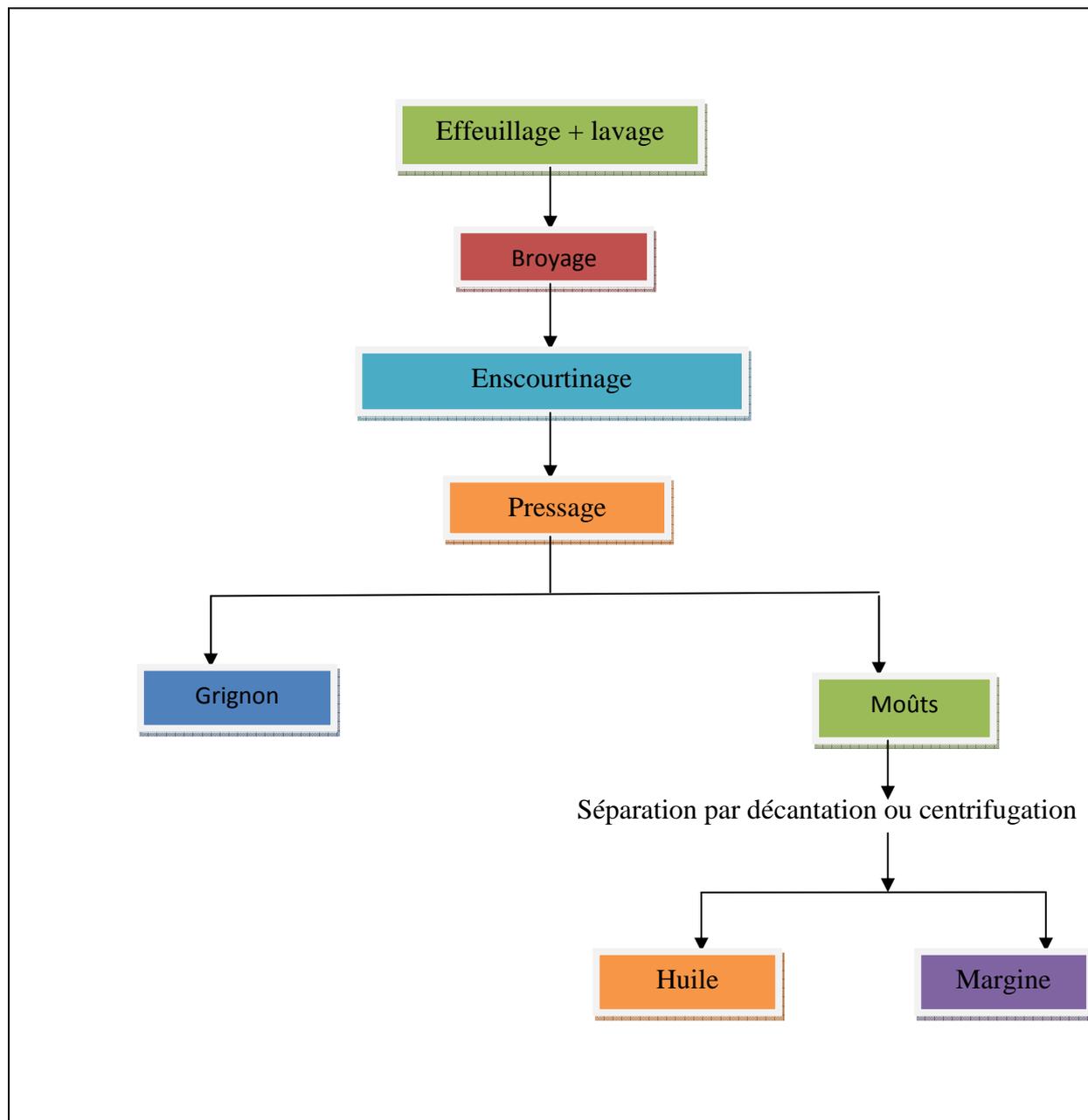
Le traitement des olives en vue de l'extraction de l'huile peut se faire par des moyens mécaniques (par pression ou centrifugation). Divers systèmes d'extraction sont employés pour extraire l'huile des olives.

### 2.2.1. Système discontinu d'extraction par presse

Ce système utilise des presses métalliques à vis ou, le cas échéant des presses hydrauliques. La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtins, à raison de 5 à 10 Kg par scourtin. L'application de la pression sur la charge des scourtins doit être réalisée de manière progressive. L'opération de pressage dure au moins 45 mn. Les scourtins doivent être lavés, selon la norme internationale en vigueur et à raison d'une fois par semaine pour éviter d'augmenter l'acidité de l'huile. Le système discontinu d'extraction par presse est représenté par la figure 6.

Les avantages et les inconvénients de ce système sont :

Les opérations de broyage et de pressage de la pâte des olives, conduites en pleine air, peuvent entraîner l'altération des huiles. En effet, l'auto oxydation de l'huile déclenchée par la présence de l'air, provoque la dégradation des acides gras insaturés et par conséquent la formation des hydroperoxydes qui peuvent se décomposer et donner lieu à des produits volatils conduisant à un état de rancissement de l'huile. Un autre inconvénient de ce système, est qu'il génère des quantités importantes de margines (60 à 70 L par 100 Kg d'olives) [17]. Ce système d'extraction par presse permet l'obtention d'une huile non piquante et riche en polyphénols.



**Figure 6 :** Système discontinu d'extraction par presse

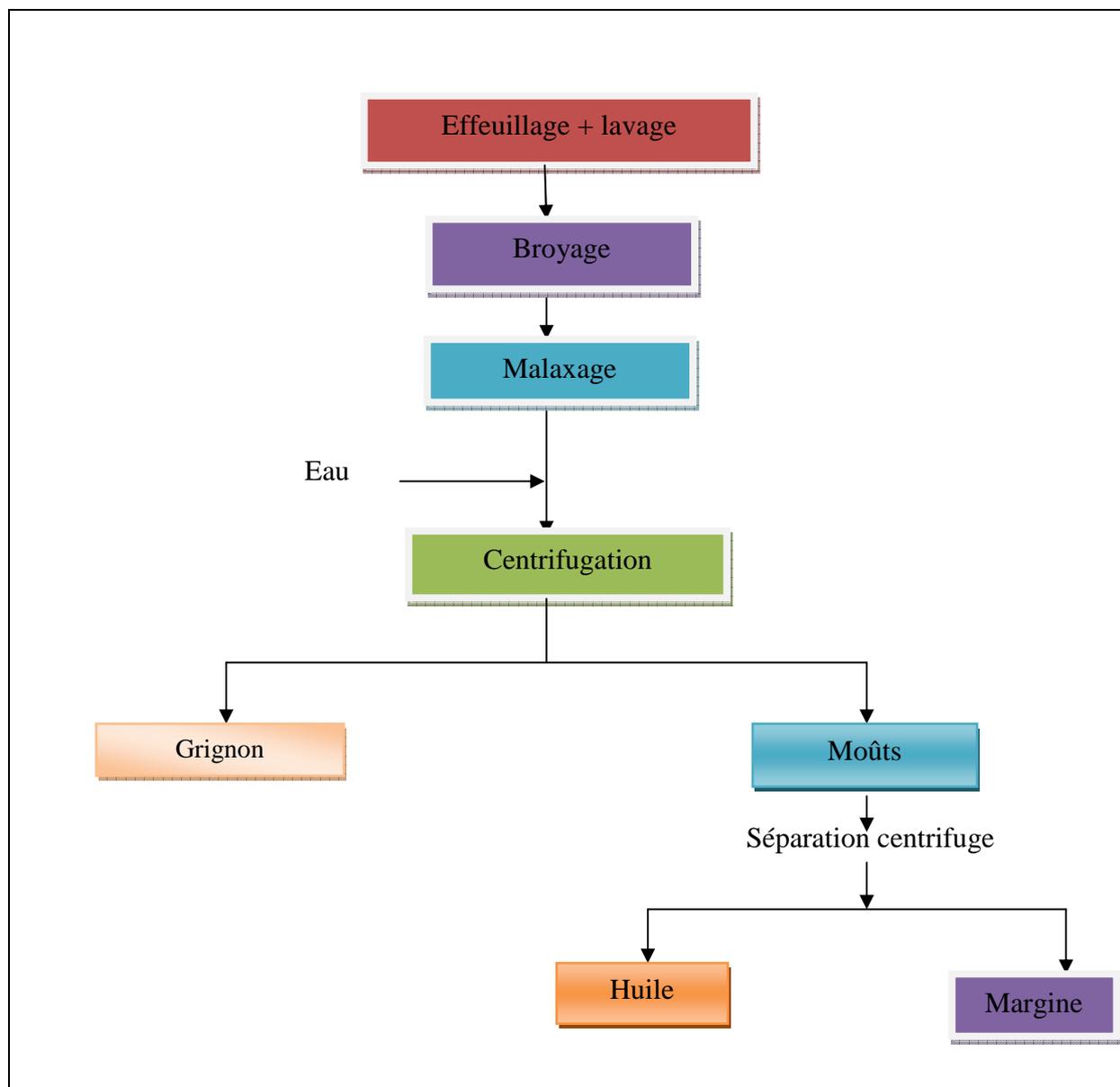
### 2.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à trois phases

Les trois phases sont : huile, margines et grignon. L'introduction de ces installations « continues » a permis de réduire les coûts de transformation et la durée de stockage des olives avec comme conséquence une production oléicole de moindre acidité. Le système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases est représenté par la figure 7.

Néanmoins, ce système présente les inconvénients suivants :

Les apports élevés en eau chaude (40 à 60 % du poids de la pâte) [17] font que l'huile extraite se trouve appauvrie en composés aromatiques et en composés phénoliques. Ces

composés passent partiellement dans les margines. Ce système donne aussi lieu à des grignons à teneurs élevées en humidité (45 à 55%) [17].



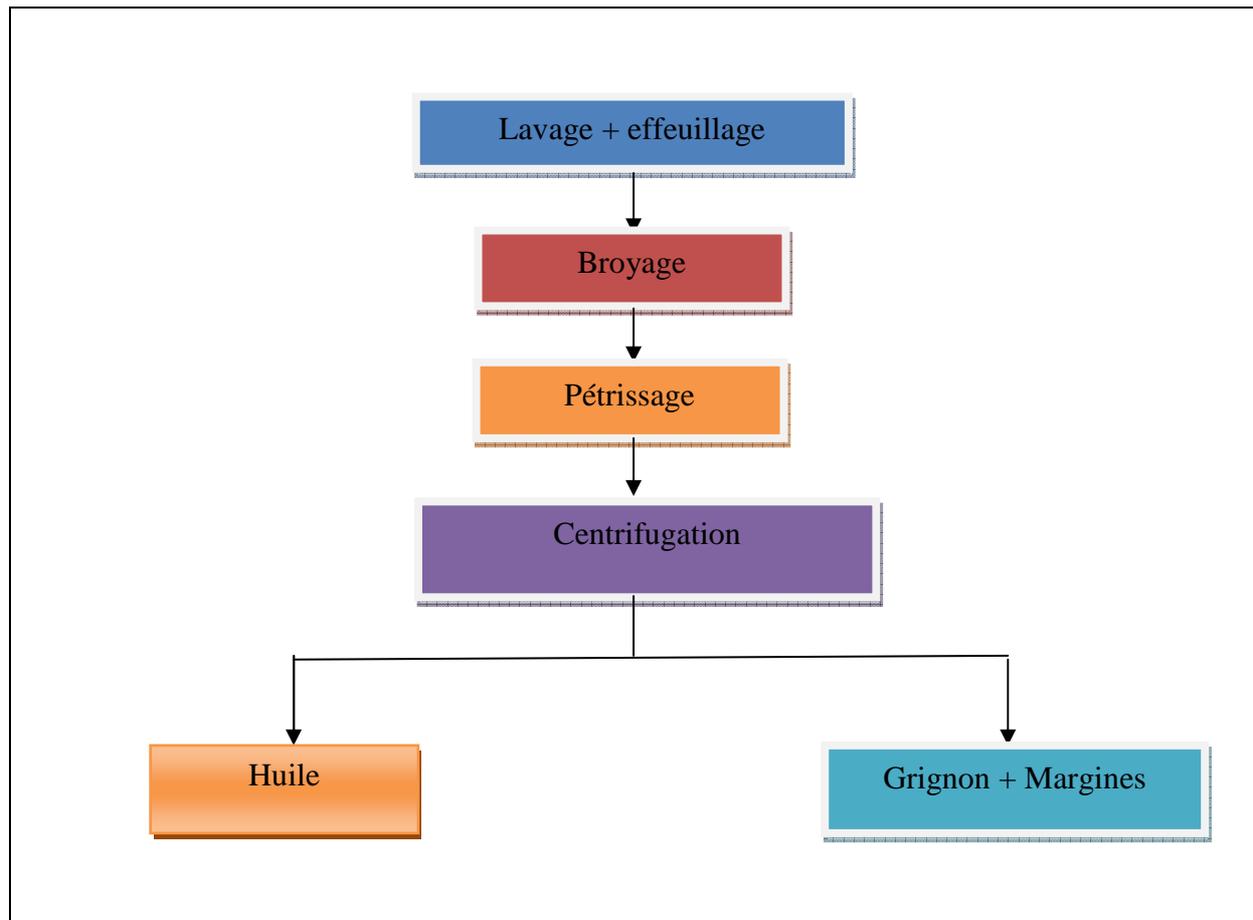
**Figure 7 :** Système continu d'extraction avec centrifugation à 3phases

### 2.2.3. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases

Le procédé technologique d'extraction des huiles d'olive fonctionne avec un nouveau décanteur avec centrifugation à deux phases (huile et grignon) qui ne nécessite pas l'ajout d'eau pour la séparation des phases huileuse et solide contenant le grignon et les margines. Le système continu d'extraction avec centrifugation à deux phases est représenté par la figure 8.

Les avantages de ce système sont :

Le rendement en huile généré par ce système est légèrement plus élevé que les autres. Le décanteur à deux phases permet d'obtenir une huile riche en polyphénols totaux et en ortho-diphénols, il est donc plus stable. Ce système est plus respectueux de l'environnement car il ne procède pas à l'augmentation du volume d'effluent liquide (margines).



**Figure 8** : Système continu d'extraction avec centrifugation à 2 phases

En conclusion, nous pouvons dire que le système super presse est celui qui permet l'obtention d'une huile plus riche en polyphénols totaux mais il est le moins stable. Ce système est le plus performant du point de vue stabilité oxydative et organoleptique (fruité) des huiles obtenues. Les travaux effectués dans ce domaine montrent que parmi les systèmes d'extraction d'huile d'olive employés, celui à deux phases est le plus fiable et le plus efficace.

### 2.3. Rendement et qualité des huiles issues des trois systèmes d'extraction

Suivant le système d'extraction utilisé, le rendement industriel en huile varie. Il est légèrement amélioré, passant de 84,5% (système presse) à 85,5% (décanteur à 3 phases) à 86,1% (décanteur à 2 phases) [18]. Le tableau 4 donne le rendement en huile des sous-produits obtenus avec les différents systèmes d'extraction d'huile.

**Tableau 4** : Rendement en huile des sous-produits obtenus avec les différents systèmes d'extraction [18].

Déterminations	Décanteur à 2 phases	Décanteur à 3 phases	Super-presse
Rendement(%)	86,1	85,5	84,5
<u>Grignon</u>			
Quantité (kg/100kg d'olives)	75,5	57,5	45,5
Humidité (%)	57,3	55,4	35,5
Huile (%)	3,5	3,6	6,8
<u>Margine</u>			
Volume (L /100kg d'olives)	3,6	90	75
Huile (kg/100kg d'olives)	0,06	1,05	2,4
Huile totale dans les sous-produits (kg/100kg d'olives)	2,8	3,1	7,8

Parfois, les facteurs liés aux bonnes pratiques de fabrication ne sont pas respectés. L'enscourtinage et la décantation peuvent conférer à l'huile le goût « scourtin » et « margine ». Tous ces facteurs conditionnent dans une large mesure la qualité de l'huile d'olive produite. Le tableau 5 donne les caractéristiques des huiles obtenues avec les différents systèmes d'extraction d'huile.

**Tableau 5** : Caractéristiques des huiles obtenues issues de trois systèmes d'extraction d'huile [18].

Déterminations	Décanteur à 2 phases	Décanteur à 3 phases	Super-presse
Acidité (%)	0,5	0,6	0,8
Indice de peroxyde (meq/kg)	5,3	5	8,3
Polyphénols totaux (mg/l tyrosol)	198	100	183
O-diphénols (mg/l acide caféique)	116	79	105
Stabilité oxydative (jours)	269	146	210
Polyphénols totaux dégradés	20	39,8	25,5
K270	0,17	0,18	0,25
$\Delta K$	0,01	0,01	0,01

### 3.4. Classification des huiles d'olive

L'huile d'olive vierge qui doit être obtenue par simple pression des fruits murs ou par centrifugation à froid comprend diverses appellations : vierge extra, vierge ou vierge fine, vierge courante et vierge lampante. Ces diverses catégories qui correspondent à une certaine qualité sont définies en fonction de l'acidité de l'huile (elle s'exprime en pourcentage d'acide gras libre dans l'huile), de son indice de peroxyde (représentant le nombre de microgrammes actifs de peroxyde) ainsi que d'autres critères chimiques et aussi de qualité organoleptique qui représente une première approche de la qualité de l'huile et comprend l'odeur, la couleur et l'aspect à 20°C. Les différentes dénominations et définitions des huiles d'olives et des huiles de grignon d'olive sont représentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques et limites prévues par la norme commerciale internationale applicable aux huiles d'olive et grignon d'olive [19.20]

	Huile d'olive vierge extra	Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge courante	Huile d'olive vierge lampante	Huile d'olive raffinée	Huile d'olive	Huile de grignon d'olive brute	Huile de grignon d'olive raffiné	Huile de grignon d'olive
<b>Caractéristiques organoleptiques:</b>									
-odeur	Irréprochable	Irréprochable	Bonne	Défectueuse	Acceptable	Bonne		Acceptable	Bonne
-gout	Irréprochable	Irréprochable	Bon	Défectueux	Acceptable	Bon			
-couleur	Clair (jaune à vert)	Clair (jaune à vert)	Clair (jaune à vert)		Clair (jaune à vert)	Clair (jaune à vert)		Clair (jaune à vert)	Clair (jaune à vert)
Acidité libre en % exprimée en acide oléique.	≤0,80	≤0,20	≤3,30	>3,30	≤0,30	≤1,00	Non limité	≤0,30	≤1,00
Indice de peroxyde en meq d'O <sub>2</sub> de peroxyde par kg d'huile	≤20	≤20	≤20	Non limité	≤5	≤15	Non limité	≤5	≤15
Absorbance dans l'ultra-violet - à 270nm	≤0,22	≤0,25	≤3,00		≤1,10	≤0,90		≤2,00	≤1,70
- à 232nm	≤2,50	≤2,60			≤0,16	≤0,15		≤0,20	≤0,18
Teneur en eau et en matière volatiles%	≤0,20	≤0,20	≤0,20	≤0,30	≤0,10	≤0,10	≤0,15	≤0,10	≤0,10
Traces métalliques mg/kg									
-Fer	≤3,00	≤3,00	≤3,00	≤3,00	≤3,00	≤3,00		≤3,00	≤3,00
-Cuivre	≤0,10	≤0,10	≤0,10	≤0,10	≤0,10	≤0,10		≤0,10	≤0,10

## 2.5. Caractéristiques de l'huile d'olive

### 2.5.1. Caractères organoleptiques

L'huile d'olive est un liquide limpide, transparent, jaune ou jaune vert, d'odeur caractéristique, pratiquement insoluble dans l'alcool, miscible à l'éther diéthylique et à l'éther de pétrole [7].

### 2.5.2. Caractères physico-chimiques

#### 2.5.2.1. Indice d'acidité

L'indice d'acidité est un indicateur qui permet d'évaluer l'altération de la matière grasse, consécutive à de mauvais traitements ou à une mauvaise conservation. Il est exprimé en pourcentage (%) d'acide oléique et est mesuré par la quantité de potasse nécessaire à la neutralisation des acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras. Ce critère conduit à la classification donnée dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Acidité des huiles issues de trois systèmes d'extraction d'huile [18].

Catégories d'huile d'olive	Pourcentage d'acidité %
Vierge Extra	<0,8
Vierge	<2
Vierge lampante	> 2
Raffinée	<0,3
Grignons d'olive	<1,5

#### 2.5.2.2. Indice de peroxyde

L'altération chimique des corps gras provoquée par l'oxygène de l'air débute par la formation d'un peroxyde. La détermination de cet indice est basée sur l'oxydation des iodures en iode par l'oxygène actif du peroxyde. Les résultats sont exprimés en milliéquivalents d'oxygène actif par kg de corps gras. La norme internationale recommandée pour les huiles d'olive [19], fixe le minimum de cet indice à 20 meq d'oxygène actif par kg d'huile.

### 2.5.2.3. Spectre en lumière ultra-violette

La spectrophotométrie UV est utilisée pour déceler les composés oxydés dans une huile d'olive vierge. Cette huile accuse un pic d'absorption à 203-208 nm et est transparente au-delà de 210 nm. Les composés provenant de l'oxydation de l'huile présentent des absorptions pour les radiations de longueur d'onde suivantes:

- 232 nm pour les hydroperoxydes
- 270 nm pour les composés carbonylés
- 260, 268, 280, nm pour les triènes conjugués

La norme commerciale du COI [21] recommande que l'huile d'olive vierge extra présente un coefficient d'extinction à 270 nm inférieur à 0,20.

Ces trois paramètres permettent d'évaluer le degré de dégradation de l'huile d'olive.

## 2.6. Composition chimique de l'huile d'olive

Comme toutes les huiles végétales, l'huile d'olive est composée d'une fraction saponifiable (triglycérides) et d'une fraction insaponifiable (composants mineurs).

### 2.6.1. Fraction saponifiable

Cette fraction représente 99 % de l'huile d'olive. Elle est composée essentiellement de triglycérides et d'acides gras (AG). La composition en acides gras et triglycérides de l'huile d'olive dépend du climat, de la variété, de la latitude et du degré de maturité des olives. Le pourcentage des deux acides gras insaturés majoritaires de l'huile d'olive sont respectivement de 55 à 83% et de 3,5 à 21% pour les acides oléique et linoléique [4].

#### 2.6.1.1. Acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides, ils ont un goût aigre et une odeur prononcée. Ils peuvent se présenter à l'état saturé, monoinsaturé ou polyinsaturé.

##### a) Acides gras saturés

Ils représentent 12 à 18 % (selon les productions) des lipides totaux de l'huile d'olive. Exemples : L'acide palmitique ( $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$ ) et l'acide stéarique ( $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$ ).

**b) Acides gras monoinsaturés**

Ils représentent 72% des lipides totaux. Parmi les acides gras monoinsaturés, nous citons deux exemples :

- L'acide oléique:  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$
- L'acide palmitoléique:  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

**c) Acides gras polyinsaturés**

Ils constituent 7 à 13 % (selon les productions) de la teneur en lipides de l'huile d'olive. On distingue deux familles selon la place de la première double liaison sur la chaîne carbonée:

- L'acide linoléique qui est un AGPI composé de 18 atomes de carbone et qui compte deux doubles liaisons, dont la première en position 6 d'où le nom de cette famille « ω6 » :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

- L'acide α-linolénique qui est un AGPI composé de 18 atomes de carbone et qui comprend trois doubles liaisons dont la première en position 3 d'où le nom de cette famille « ω3 » :  $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

**2.6.2. Composants mineurs**

On peut séparer les composants mineurs de l'huile d'olive en tocophérols, phénols, composés aromatiques, hydrocarbures et stérols.

**2.6.2.1. Tocophérols**

L'huile d'olive contient l'α-tocophérol qui est le tocophérol doté de la plus forte activité vitaminique E, à des teneurs variant de 1,2 à 43 mg/100 g [22]. Sa teneur moyenne dans l'huile d'olive est d'environ 12 à 25 mg/100 g [23]. D'autres recherches ont abouti à des valeurs encore plus élevées, de 24 à 43 mg/100g [24]. Les tocophérols constituent le groupe d'antioxydants lipophiles, ils sont remarquables pour leur protection contre le rancissement de toutes les huiles végétales.

### 2.6.2.2. Composés phénoliques

La classe des phénols regroupe toute une gamme de substances diverses, dont des composés phénoliques simples comme l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide coumarique, l'acide caféique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol. En moyenne, ces phénols simples sont présents à la concentration de 4,2 mg/100 g dans l'huile d'olive vierge extra et de 0,47 mg/100 g dans l'huile raffinée. Par ailleurs, l'huile d'olive contient des sécoiridoïdes comme l'oleuropéine et le ligstroside (respectivement 2,8mg/100g dans l'huile vierge extra et 0,93 mg/100g dans l'huile raffinée), ou des molécules plus complexes comme des lignanes (4,15 mg/100g dans l'huile vierge extra et 0,73 mg/100g dans l'huile raffinée) et des flavonoïdes comme l'apigénine ou la lutéoline [25]. La teneur de l'huile en composés phénoliques est fonction de la variété des olives et de leur maturité au moment de la récolte.

### 2.6.2.3. Composés aromatiques

La feuille et le fruit de l'olivier sont connus pour leur résistance naturelle aux microbes et aux insectes. Kubo et son équipe [26] ont découvert l'une des raisons qui expliquent ce phénomène, en observant l'activité antimicrobienne des molécules appartenant au vaste groupe des composés aromatiques. Parmi ces molécules, figuraient des composés non cycliques comme l'hexanal, le nonanal, le 1-hexanol, le 3-hexanal, le 2-heptenal ou le 2-nonanal, ainsi que des hydrocarbures cycliques mono- et sesquiterpéniques comme le 3-carène ou le  $\beta$ -farnesène.

### 2.6.2.4. Hydrocarbures

Le principal hydrocarbure de l'huile d'olive est le squalène. Celui-ci apparaît dans la voie de la biosynthèse du cholestérol. L'huile d'olive vierge extra contient du squalène à raison d'environ 400 - 450 mg/100 g; tandis que l'huile d'olive raffinée en contient 25 % de moins [25]. Le squalène présente un effet protecteur à des faibles températures et à l'obscurité [4]. Outre le squalène, l'huile d'olive contient aussi d'autres hydrocarbures : le  $\beta$ -carotène (une provitamine A), mais en très faibles quantités (0,03 – 0,36 mg/100 g) [22].

### 2.6.2.5. Stérols

Les stérols sont des constituants essentiels des membranes cellulaires, on les trouve aussi bien chez les animaux que dans les végétaux. Tous les stérols ont en commun le même noyau (noyau stérol) et ils diffèrent par leur chaîne latérale. Le cholestérol est surtout d'origine

animale. A présent, il a été identifié plus de 40 phytostérols. Selon les travaux réalisés dans ce domaine, la quantité totale de stérols dans l'huile d'olive vierge extra varie de 113 à 265 mg/100 g [4].

Parmi les facteurs qui influent cette teneur, figurent : la variété des olives et leur degré de maturité [24]. Dans l'huile d'olive, le principal stérol est le  $\beta$ -sitostérol.

#### **2.6.2.6. Chlorophylles et dérivées**

La chlorophylle est présente dans l'huile d'olive sous ses formes dégradées comme la phéophytine. La composition d'huile d'olive en chlorophylle dépend du stade de la maturation des olives qui diminue continuellement du début jusqu'à la fin de la récolte [4]. En présence de la lumière, la chlorophylle et ces dérivées sont dotées d'un pouvoir photosensibilisateur, alors qu'à l'obscurité elle possède une activité antioxydante [7]. C'est l'une des raisons pour lesquelles il est conseillé de conserver l'huile d'olive à l'abri de la lumière.

Selon la norme internationale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive [19,20], les constituants chimiques de l'huile d'olive vierge peuvent être subdivisés en deux catégories : la fraction saponifiable (triglycérides, phospholipides, etc.) et la fraction insaponifiable (stérols, alcools tri-terpéniques, etc.). Le tableau 8 indique ces différents constituants.

**Tableau 8 :** Les fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile d'olive et de grignon d'olive [27].

Composants	Teneurs
<b>1-Acides gras</b>	
- Acide myristique	≤ 0,05%
- Acide palmitique	7,5-20,0%
- Acide palmitoléique	0,3-3,5%
- Acide heptadécanoïque	≤ 0,3%
- Acide héptadécénoïque	≤ 0,3%
- Acide stéarique	0.5-5.0%
- Acide oléique	55,0-83,0%
- Acide linoléique	3,5-21,0%
- Acide linoléinique	≤ 1,0%
- Acide arachidique	≤ 0,6%
- Acide gadoléique (éicosénoïque)	≤ 0,4%
- Acide béhénique	≤ 0,2%
- Acide lignocérique	≤ 0,2%
<b>2-Acides gras trans</b>	
- C18 :1 T	≤ 0,05 %
- C18 :2 T + C18 :3 T	≤ 0,05 %
<b>3-Stérols et dialcools triterpéniques</b>	
➤ Desméthylstérols	
- Cholestérol	≤ 0,5 %
- Brassicastérol	≤ 0,1%
- Campesterol	≤ 4,0%
- Stigmastérol	-
- Delta – 7-stigmastérol	≤ 0,5 %
- Bêtastérol+delta-5-avénostérol+delta-5-23-stigmastadiénol+clérostérol +sistostanol+delta-5-24-stigmastadiénol.	≥ 93,0%
➤ Stérols Totaux	≥ 1000 mg/kg
➤ Erythrol et uvaol (% des stérols totaux)	≤ 4,5 %
<b>4-Cires</b>	
- C40+C42+C44+C46	≤ 250 mg/kg
<b>5-Stigmastadiènes</b>	≤ 0,5 mg /kg
<b>6-Acides gras saturés en position 2 dans les triglycérides:</b> somme des acides palmitique et stéarique (% des acides gras en position 2)	≤ 1,5%
<b>7-Insaponifiable</b>	≤ 15 g/kg

## **2.7. Stockage des olives**

Le stockage s'impose quand la cadence de réception est supérieure à la capacité de trituration. Au cours du stockage, les olives subissent des altérations plus au moins profondes selon la durée et les conditions. Ces altérations sont dues à l'activité enzymatique propre à la matière elle-même (lipolyse), mais également au développement microbien durant la période de stockage. Avec l'allongement de la durée de stockage, on assiste à une augmentation de l'acidité, de l'indice de peroxyde et à une détérioration des propriétés organoleptiques de l'huile. La seule manière de limiter l'altération des olives est de réduire la durée de stockage au minimum possible (2 à 5 jours), limiter l'épaisseur de la couche entre 20 et 30 cm en cas de stockage en vrac pour permettre l'aération du tas [18].

## **2.8. Conservation de l'huile d'olive**

### **2.8.1. Conditionnement et emballage**

L'huile d'olive conservée dans des récipients en plastique ou en verre perd sa qualité organoleptique durant la période de stockage, alors que celle stockée dans des bouteilles en zinc ou en fer blanc (inox) qui présente une bonne résistance mécanique, est mieux protégée contre l'oxydation [2].

Par ailleurs, les récipients utilisés pour la conservation de l'huile d'olive doivent être en bon état, étanches et inertes à l'égard de l'huile. En ce qui concerne la tolérance de remplissage des récipients, le volume occupé par le contenu ne devra en aucun cas être inférieur à 90% de la capacité du récipient, exception faite aux récipients en fer blanc (inox) d'une capacité égale ou inférieure à 1 litre et dans lesquels le volume occupé par le contenu ne devra en aucun cas être inférieur à 80% [27].

### **2.8.2. Conditions de stockage**

Les normes imposées par le COI sont très pointilleuses sur le conditionnement des huiles d'olive car sa fraîcheur est une qualité prioritaire.

Bien qu'elle soit plus stable que la plupart des huiles de graines, l'huile d'olive doit être conservée dans de bonnes conditions: à l'abri de l'air et de la lumière pour éviter le rancissement causé par l'oxydation. Cependant, l'huile se conserve parfaitement entre 15 et 18°C, dans un endroit frais et sombre, ceci grâce aux antioxydants dont l'huile est dotée.

Lorsque la température descend au-dessous de 8°C, l'huile d'olive risque de se figer et présente un aspect trouble qui est toutefois réversible et non préjudiciable à sa qualité.

Toutefois, il faut éviter les variations de températures qui nuisent à son goût. Une fois ouvertes, les bouteilles doivent être refermées immédiatement après chaque usage pour protéger l'huile de la perte d'arôme et de goût ainsi que des odeurs extérieures. La conservation maximale est de deux ans [18].

## **2.9. Bienfaits de l'huile d'olive**

### **2.9.1. Action de l'huile d'olive sur quelques maladies et cancers**

Les huiles végétales comme l'huile de noix de coco ou l'huile de palme contiennent des acides aminés saturés, semblables à ceux d'origine laitière comme le beurre par exemple. L'huile d'olive par contre, riche en acides gras mono-insaturés, est responsable des bienfaits cardiovasculaires, elle diminue la sécrétion acide de l'estomac et l'acide oléique permet aussi d'améliorer l'absorption intestinale de calcium et de la vitamine D [7].

Des études réalisées en Grèce et à Harvard ont mis en évidence une réduction de plusieurs types de cancers lors de la consommation d'huile d'olive tels que : les cancers du sein, du colon, de l'épidermoïdes de l'œsophage et de la prostate) [28, 29, 30,31], cela grâce à sa forte proportion en AGMI et un taux élevé d'antioxydants.

Des études épidémiologiques [32] démontrent que le régime méditerranéen, riche en huile d'olive, est associé à une diminution des valeurs de la pression artérielle. Le seul facteur nutritionnel significativement influant sur la densité osseuse est la consommation régulière d'huile d'olive [33].

### **2.9.2. L'huile d'olive lutte contre l'oxydation des LDL**

Remplacer les graisses saturées par des graisses mono- insaturées, réduit le cholestérol LDL, en réduisant ainsi le risque cardiovasculaire. Néanmoins, tous les effets bénéfiques de la consommation d'huile d'olive ne sont pas dus à l'acide oléique. D'autres composants secondaires de l'huile d'olive ont des effets bénéfiques sur la santé. Il a été montré que l'oleuropéine et le tyrosol inhibent l'oxydation in vitro des LDL [7].

En conclusion, l'huile d'olive possède deux atouts antioxydants : l'acide oléique, peu oxydable, et des antioxydants, surtout les composés phénoliques, potentiellement actifs aux très faibles concentrations. Dans l'état actuel des connaissances, on ne sait pas lequel est le plus actif dans la prévention de l'athérosclérose, mais il est reconnu que l'acide oléique et les antioxydants agissent en synergie.

## 2.10. Variables externes influençant l'oxydation de l'huile d'olive

### 2.10.1. Influence de la température et de la concentration en oxygène

Ce n'est pas facile de différencier les effets individuels de la température et d'oxygène sur les processus d'oxydation de l'huile d'olive car il y'a une grande interaction entre eux.

Joaquin Velasco et al [4] ont expliqué les différentes étapes de l'oxydation de l'huile d'olive à différentes températures:

- A pression atmosphérique et à température faible ou modérée, la solubilité de l'oxygène est élevée, cela a pour conséquence l'apparition de radicaux hydroperoxydes ( $\text{ROO}^\circ$ ). Au démarrage de l'étape d'initiation, la réaction entre l'oxygène et les lipides est très rapide et les radicaux hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$ ) formés sont les produits majoritaires. Sous les mêmes conditions, la vitesse de formation de ces hydroperoxydes est plus élevée par rapport à celle de leur décomposition.

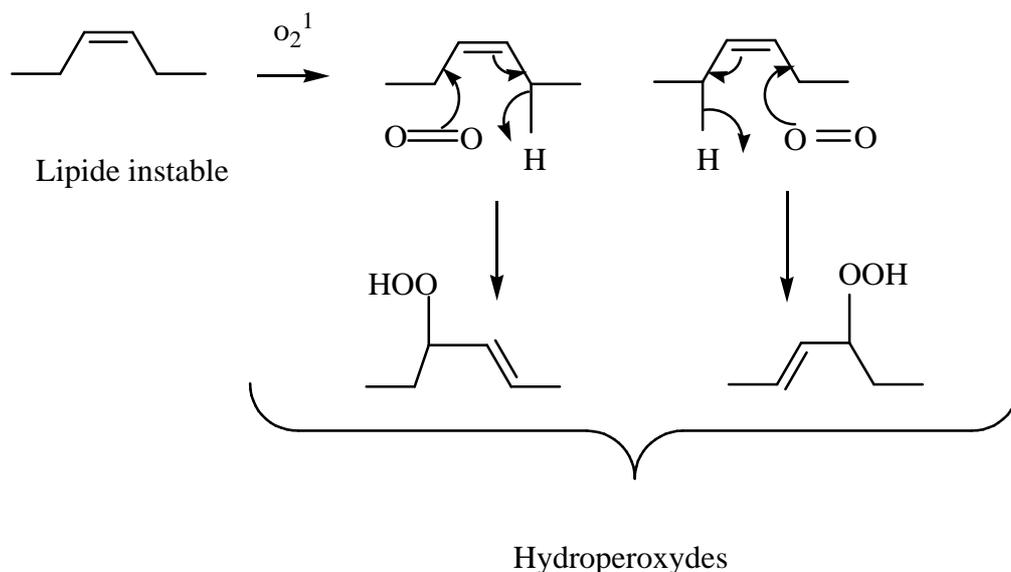
Les composés formés à partir des réactions terminales sont majoritaires uniquement au stade accéléré de l'oxydation, c'est - à - dire à la fin du temps d'induction, quand la concentration initiale des substances oxydables commence à diminuer.

- L'affinité de l'oxydation à des températures élevées, dans les processus de la cuisson par exemple, est beaucoup plus complexe. Les réactions thermique et oxydative interviennent simultanément. La température augmente et la solubilité de l'oxygène diminue rapidement et les réactions d'oxydations sont accélérées. Puisque la pression en oxygène est réduite, la réaction initiale devient alors la plus importante, par conséquent la concentration des radicaux alkyles ( $\text{R}^\circ$ ) diminue, de même pour celle des radicaux hydroperoxydes ( $\text{ROO}^\circ$ ) et les composés polymériques sont formés par l'association des radicaux alkyles ( $\text{R}^\circ$ ) et alkoxydes ( $\text{RO}^\circ$ ). Les radicaux ( $\text{ROOH}$ ) sont pratiquement absents à  $150\text{C}^\circ$ , cela signifie que la vitesse de leur décomposition devint plus importante que celle de leur formation.

### 2.10.2. Influence de la lumière

Les chlorophylles a et b et leurs produits de dégradation phéophytines a et b, sont des photosensibilisateurs. En présence de la lumière, ces pigments passent de leur état singulet fondamental à un état singulet excité puis à un état triplet excité métastable. Les pigments ont alors tendance à revenir à leur état fondamental en transformant l'oxygène atmosphérique ( $\text{O}_2^3$ ) en oxygène singulet très réactif ( $\text{O}_2^1$ ). Ce dernier réagit directement sur les acides gras insaturés de l'huile en donnant des hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$ ) très instables qui sont à l'origine du rancissement [34].

Le mécanisme réactionnel de l'oxygène singulet avec un lipide insaturé est illustré en figure 9. L'oxygène singulet réagit directement par simple addition sur chaque carbone de la double liaison du lipide pour donner un hydroperoxyde. Selon ce mécanisme, le nombre d'isomères hydroperoxydes produits à partir d'un acide gras insaturé donné est toujours double de celui du nombre de double(s) liaison(s) dans l'acide gras insaturé [35].



**Figure 9** : Réaction de l'oxygène singulet avec un lipide insaturé

Le bêta-carotène, un antioxydant naturel, agit comme protecteur en désactivant l'oxygène singulet produit par les chlorophylles en filtrant les longueurs d'onde actives des radiations lumineuses et protège ainsi l'huile contre l'activation de l'oxygène par la lumière [34].

***CHAPITRE 3***  
***ANTIOXYDANTS***

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

### **3.1. Radicaux libres**

#### **3.1.1. Définition**

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses, Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers [36] :

- La première voie consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu), ils transforment  $H_2O_2$  en radical hydroxyle ( $OH^\circ$ ), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

#### **3.1.2. Nature des radicaux libres**

##### **3.1.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)**

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme.

##### **a. Ion superoxyde : $\cdot O_2^\circ$**

L'ion superoxyde ( $\cdot O_2^\circ$ ) est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

**b. Radical libre hydroxyle : OH°**

Le radical libre hydroxyle (OH°) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons une réaction à titre d'exemple:

- la réaction de Fenton : elle est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux.



Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante :

**c. Oxygène singulet:  $^1\text{O}_2$** 

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

**3.1.2.2. Espèces libres non oxygénées**

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives.

### 3.2. Antioxydants

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

#### 3.2.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL [37] comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

#### 3.2.2. Utilisation des antioxydants

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation;
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture.

#### 3.2.3. Classification des antioxydants

Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes :

- 1- Les antioxygènes de synthèses
- 2- Les substances synergiques
- 3- Les antioxygènes d'origine végétale

##### 3.2.3.1. Antioxygènes de synthèses

Les antioxydants de synthèse sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

- le butylhydroxytoluène (BHT)
- le butylhydroxyanisole (BHA)
- les gallates de propyle, octyle et de dodécyle.

Le tableau 9 montre quelques limites d'utilisation des antioxydants de synthèse.

**Tableau 9:** Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse [38].

Nature de l'aliment	Antioxydant	Concentration maximale (ppm)
Saindoux, graisse de bœuf, de volaille et de mouton, huile de poisson.	Gallates et BHA seuls ou en mélange	200
	BHT	100
Compléments alimentaires	Gallates, BHT et BHA	400
Soupes et viandes déshydratées, lait en poudre	Gallate et BHA seuls ou en mélange	200

### 3.2.3.2. Substances synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent :

Les acides lactique, tartrique et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants [39]. Le temps en jours, mis pour atteindre un indice en peroxyde de 20 meq/kg pour un saindoux stocké à 65 °C en récipients ouverts est donné dans le tableau 10.

**Tableau10:** Effet synergique de l'association de plusieurs antioxydants [39].

Antioxygènes et synergistes (mg/kg de saindoux)				
Echelle	Palmitate d'ascorbyte	dl- $\alpha$ -tocophérol	Lécithine	Durée (jours)
Témoin	0	0	0	1
1	250	0	0	4
2	0	50	0	4
3	0	0	700	1
4	250	50	0	17
5	250	50	700	30

### 3.2.3.3. Antioxygènes d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols.

#### a. Tocophérols

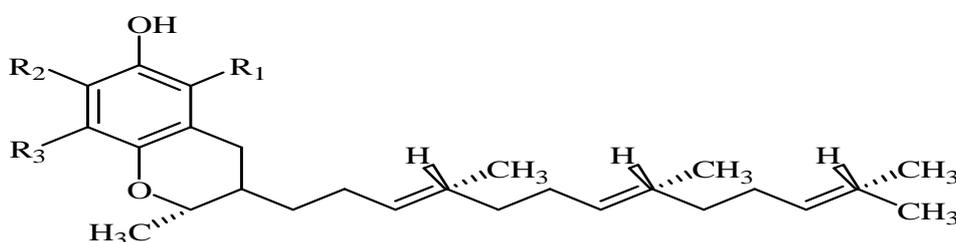
La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Sebie.K et al [40] ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI. Son activité anti-oxydante repose principalement sur l'existence du système de réduction tocophérol - tocophérylquinone. En effet, une molécule de tocophérol peut réduire deux radicaux lipidiques en formant une molécule de l' $\alpha$  tocophérylquinone, en revanche, deux radicaux tocophéryls peuvent s'associer entre eux pour former des dimères qui peuvent avoir des propriétés antioxydantes.

Certains auteurs ont démontré, en utilisant des analyses statistiques appropriées, que pour les huiles végétales, il y a une corrélation positive entre l' $\alpha$  tocophérol et l'acide linoléique (C18:2) et probablement entre le  $\gamma$  tocophérol et l'acide linoléique (C18:3). Il y a une indépendance complète entre les teneurs en tocophérols et les taux des acides gras saturés (C16:0 et C18:0) et monoinsaturés (C16:1 et C18:1) [40].

### Exemple de tocophérol : la vitamine E

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central).

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocophérol, tocotriénols, ...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols). La figure 10 montre la structure des composés à action vitaminique E.



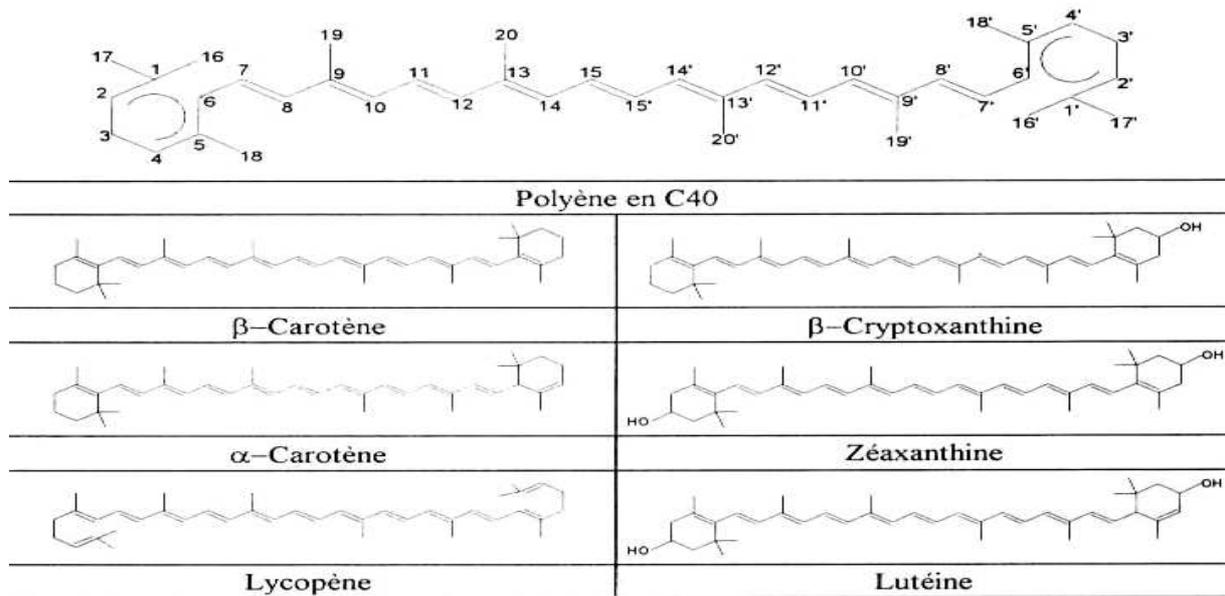
Nom	R1	R2	R3
$\alpha$ -tocophérol	Me	Me	Me
$\beta$ -tocophérol	Me	H	Me
$\gamma$ -tocophérol	H	Me	Me
$\delta$ -tocophérol	H	H	Me

**Figure10:** Structure des composés à action vitaminique E (tocophérols).

### b. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, l' $\alpha$ -Carotène, et la zéaxanthine [41].

Dans la figure 11 sont données les structures des principaux caroténoïdes.

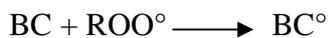


**Figure11** : Structure des principaux caroténoïdes (d'après LE MOEL, 1998) [42].

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le  $\beta$ -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A.

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes:

- Ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



BC :  $\beta$ -carotène

- Ils empêchent l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet.

Néanmoins, tous les caroténoïdes n'ont pas la même efficacité pour inactiver l'oxygène singulet. Par ordre décroissant d'efficacité on classe : le lycopène, puis le  $\beta$ -carotène et enfin la lutéine [43].

### c. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont constitués de trois grandes catégories : Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins [44]. Ils ne se rencontrent pas dans la nature à l'état libre mais sous forme d'esters ou plus généralement sous forme d'hétérosides [45].

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau 11) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) [46].

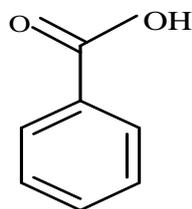
**Tableau 11** : Les principales classes de composés phénoliques (Harborne et al, 1980) [47]

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férule scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes, Flavonols Anthocyanes, -Flavanols Flavanones, Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine, pélagonidine, Cyanidine Catéchine, épicatechine Naringénine, Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs fruits rouges, Pomme, raisin Citrus, Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	pénorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>	tannins		Raisins rouges, kaki

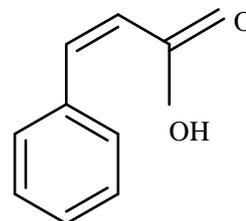
#### c<sub>1</sub>. Acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique [48].

Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces derniers sont des dérivés des molécules non phénoliques qui sont respectivement l'acide benzoïque (figure 12) et l'acide cinnamique (figure 13) [49].



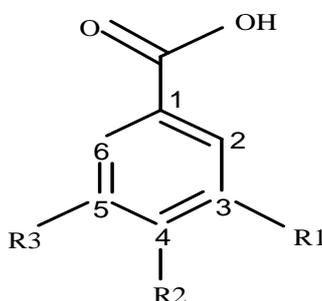
**Figure12** : Structure de l'acide benzoïque



**Figure13** : Structure de l'acide cinnamique

- **Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque**

Les acides phénoliques en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque sont très commun aussi bien sous forme libre que combiné, à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère sont les éléments constitutifs des tanins hydrolysables [48]. La figure14 montre quelques structures de ce type d'acide phénolique [40].

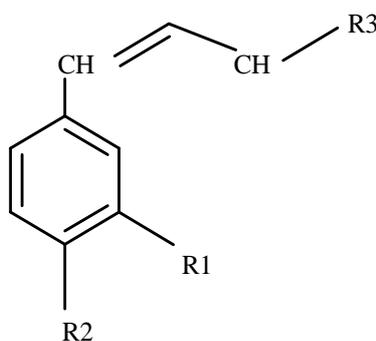


Nom	R1	R2	R3
Acide benzoïque	H	H	H
Acide hydroxy-4- benzoïque	H	OH	H
Acide méthoxy-4- benzoïque	H	OCH <sub>3</sub>	H
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide vanillique	OCH <sub>3</sub>	OH	H

**Figure 14** : Structure des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

### • Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

La plus part des acides phénoliques en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> dérivés de l'acide cinnamique (figure15) comme l'acide p-coumarique, caféique et férulique ont une distribution très large [45]; les autres (Ex : acide 2-coumarique) sont peu fréquents. Rarement libres, ou alors sont des artefacts, ils sont souvent estérifiés [48].



Nom	R1	R2	R3
Acide cinnamique	H	H	COOH
Acide p-coumarique	H	OH	COOH
Acide caféique	OH	OH	COOH
Acide Férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	COOH
Acide Isoférulique	OH	OCH <sub>3</sub>	COOH

**Figure15:** Structure des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

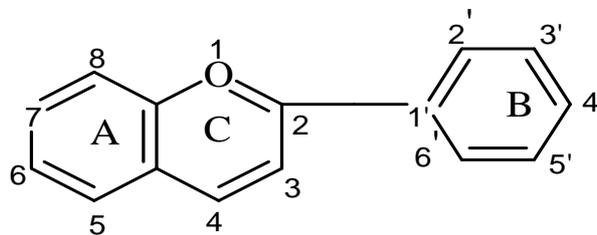
### c<sub>2</sub>. Flavonoïdes

D'après Jeremy Paul Edwards [50], les flavonoïdes constituent le groupe le plus important de substances naturelles polyphénoliques de notre alimentation, ils se trouvent dans le règne végétal. Les sources alimentaires principales incluent les jus de fruits, les légumes, les céréales, le thé, le vin et les fruits. Leur structure se compose de deux cycles aromatiques de carbone formant un noyau benzopyranique (cycles A et C) et d'un noyau benzénique (cycle B) (figure 16). Basé sur le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatiques et sur le degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C, les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous-groupes. Parmi ceux-ci nous trouvons :

- Les flavonols (kaempferol, quercetine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux, le brocoli.
- Les flavones (apigenine, luteoline), qui sont retrouvés dans le persil et le cèleri.
- Les isoflavones (daidzeine, genisteine), majoritaires dans les produits issus du soja.

- Les flavanones (hesperetine, naringenine), qui sont particulièrement abondants dans les agrumes et les tomates.
- Les flavanols ((+)-catechine, (-)-epicatechine, epigallocatechine, epigallocatechine gallate (EGCG), qui sont retrouvés dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat.
- Les anthocyanes (pelargonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies.

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer, qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [51]. Ils sont des substances liposolubles et hydrosolubles.



**Figure16** : Structure de base des flavonoïdes

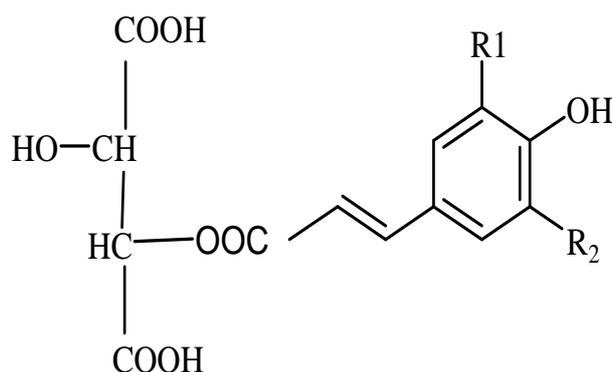
### c3. Tannins

On peut indiquer d'un point de vue général que les tanins sont des composés phénoliques présents dans la nature sous forme polymérisée. Dans les végétaux, il existe en effet deux types de polymères phénoliques ayant des propriétés complexes : les tanins et les lignines. Les tanins sont des polymères ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 [52]. Ils peuvent se diviser en deux classes :

- Les pyrogalliques (ou hydrolysables)
- Les catéchiques (ou condensés non hydrolysables).

### d. Composés phénoliques des raisins

Le raisin renferme trois dérivés hydroxycinnamiques, sous forme d'esters tartriques [53] (figure 17) : les acides caféoyltartrique (caftarique), p-coumaroyltartrique (coutarique) et féruloyltartrique (fertarique). La forme naturelle est le trans (E) mais les isomères cis (Z), existent en faible quantité.



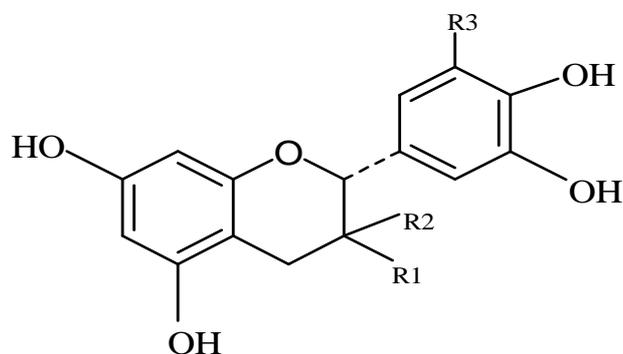
Nom	R1	R1
Acide trans-p coumarocyltartrique	H	H
Acide trans-caféoyltartrique	OH	H
Acide trans- féruloyltartrique	OH	OCH3

**Figure 17:** Structure des acides hydroxycinnamiques du raisin

Les propriétés des pigments, et notamment la couleur et la stabilité, sont directement liées à leur structure. Par exemple, le 3-glucoside de cyanidol est plus rouge que le 3-glucoside de malvidol, particulièrement abondant dans le raisin, qui est plus violacé. Par ailleurs, la présence de sucres et leur substitution, en particulier par des acides hydroxycinnamiques, modifient la nuance et augmentent la stabilité des molécules anthocyaniques. Les flavanols existent sous forme d'oligomères et de polymères, appelés tannins condensés ou proanthocyanidines parce qu'ils libèrent des anthocyanidines par chauffage en milieu acide (Réaction de Bate-Smith) [53].

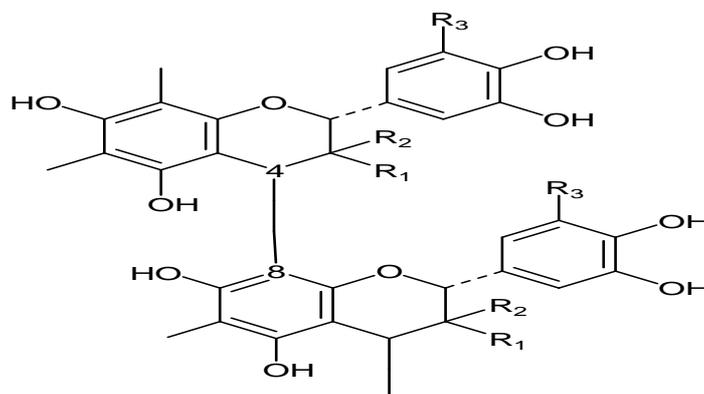
Les tannins du pépin sont des procyanidines, partiellement galloylés, basés sur des unités catéchine, épicatechine et 3-o-gallate d'épicatéchine, liées entre elles par des liaisons C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Les tannins de pellicule comprennent aussi des prodelpinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à ceux des tannins de pépins.

Les figures 18 et 19 représentent les structures des tannins du raisin.



Nom	R1	R2	R3
(+) - catechine	OH	H	H
(-) - épicatechine	H	OH	H
(+) - gallocatechine	OH	H	OH
(-) - épigallocatechine	H	OH	OH

Figure18 : Les monomères



R3 = H : Procyanidols

R3=OH : Prodelfinidols

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, OH, O-G

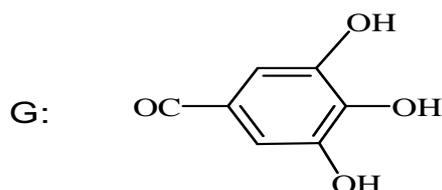


Figure19: Les proanthocyanidols

### e. Composés phénoliques des margines

A l'origine, la margine est un liquide de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noir, d'aspect trouble et d'une odeur spécifique d'huile d'olive.

Elle est caractérisée par un pH acide entre 4,2 et 5,9 et une très grande conductivité électrique entre 18 et 50 ms.cm<sup>-1</sup> [54]. Sa couleur noir est dû à la présence des polyphénols.

La margine peut être considérée comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Sa composition massique est de 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de sels minéraux [55].

La fraction organique contient 2 à 15 % de composés phénoliques ce qui correspond à une concentration de 10 g/l [56]. Les margines d'olive ont un pouvoir polluant très important avec une demande biologique en oxygène (DBO) de 100 g/l et une demande chimique en oxygène (DCO) de 200 g/l [54]. Ces valeurs sont 200 à 400 fois supérieures à celles des eaux municipales.

Les principaux composants des margines sont consignés dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Les principaux composants des margines (Nefzaoui, 1991) [57].

Composants		Pourcentage %
Eau		83,4
Matières organiques (14,8%)	-Matières grasses	0,02 - 1,00
	- Protéines	1,20 - 2,40
	- Glucides	2,00 - 8,00
	- Autres	0,50 - 1,50
	- Polyalcools	1,00 - 1,50
	- Pectines, gommes, tanins	0,50 - 1,50
	- Glucosides	traces
Matières minérales (1,8%)	Carbonates	21
	- Phosphates	14
	- Sels potassiques	47
	- Sels sodiques	7
	- Autres	7

Le fruit d'olive est très riche en composés phénoliques, mais seulement 2% du contenu total du fruit passe dans la phase huileuse, et le reste se trouve dans la phase liquide (approximativement 53%) et dans le grignon (résidu sec 45%) [58].

La composition phénolique des margines a été étudiée dans différents travaux récents [59] qui ont montré que la composition phénolique est très différente que celle du fruit d'olive, tel

que les margines contenant une concentration élevée d'hydroxytyrosol et dialdéhyde formé de décarboxyméthyle oleuropeinglycon.

D'autres chercheurs, tels que Lasage et al [60], ont identifié plusieurs composés phénoliques des margines, en incluant les dérivés suivants :

- dérivés d'acide cinnamique : acide caféique, acide p-coumarique et acide férulique.
- dérivés d'acide benzoïque : acide protocatéchique, p-hydroxybenzoïque, acide gallique et acide vanillique.
- dérivés  $\beta$ -3,4-dihydroxyphényl éthanol : p-tyrosol et hydroxytyrosol.

Parmi les composés phénoliques existant dans les margines nous citons aussi : acide syringique, vanilline, acide phénylacétique et catéchine.

L'activité anti-oxydante spécifique d'un extrait de margine est de 0,71 AA à 234 nm [61]. Atanassova et al [62] ont trouvé que cette activité est très élevée pour les margines issues d'un système à 3 phases comparativement à celle d'un système à 2 phases.

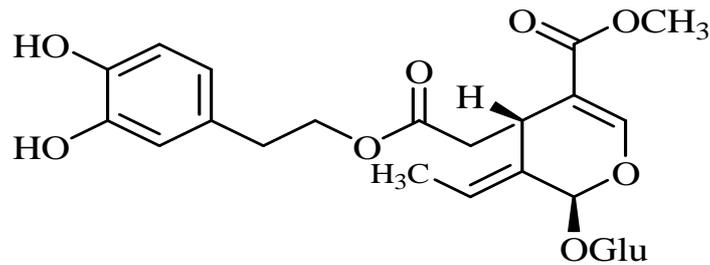
#### **f. Composés phénoliques des feuilles d'olivier**

Les feuilles de l'olivier sont persistantes, elles ont une moyenne de vie de trois ans. Elles sont simples, lancéolées, pointues. Sur le rameau, elles sont opposées et le pétiole est court.

Les feuilles sont glabres et à bords révolutés. La face supérieure est luisante de couleur vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à une pruine.

Le dessus des feuilles exposé au soleil est protégé par une cuticule verte sombre d'une texture vernissée, imperméable. La face inférieure est duveteuse et contrôle la sortie des eaux par un poil qui le coiffe à la manière d'un parasol. En moyenne, les feuilles de l'olivier mesurent de 2 à 8 centimètres de long et de 0,5 à 1,5 centimètres de large.

Les feuilles représentent une source naturelle de plusieurs antioxydants qui peuvent avoir diverses applications dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Les analyses montrent que l'oleuropéine (figure20) est le composé majoritaire, elle atteint un pourcentage de 14,2% de la matière sèche [63] et l'hydrolyse acide de l'extrait des feuilles produit une concentration élevée en hydroxytyrosol (2,3g d'hydroxytyrosol / 100g de feuilles fraîches).



**Figure20** : Structure de l'oleuropéine

L'effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles d'olivier pour empêcher l'oxydation de l'huile d'olive et celle de tournesol est supérieur à celui du BHT et BHA [64].

#### 3.2.3.4. Contenu en composés phénoliques des olives de tables et activité antioxydante

L'analyse chromatographique des composés phénoliques contenus dans la pulpe et dans la saumure des olives révèle que [65] :

- Dans la préparation des olives de table vertes, un seul composé phénolique est prépondérant, tant dans la pulpe des olives que dans la saumure, il s'agit de l'hydroxytyrosol.
- Dans la préparation des olives de table noires, quatre composés phénoliques sont présents en quantité non négligeable, il s'agit de l'hydroxytyrosol, de l'acide dihydro-caféique, du tyrosol et de l'acide phlorétique, encore appelé acide dihydro-p-coumarique.

Cependant, l'hydroxytyrosol est tout de même majoritaire puisqu'il représente 35% des composés phénoliques totaux.

- Après élaboration, la teneur en composés phénoliques des olives noires est 3,66 fois plus élevée que celle observée pour les olives vertes. En revanche, la teneur en composés phénoliques de la saumure des olives noires est 1,45 fois plus faible que celle observée dans la saumure des olives vertes. Ceci indique que les composés phénoliques des olives vertes diffusent plus facilement dans la saumure que ceux contenus dans les olives noires, vraisemblablement en raison du traitement alcalin.

Le potentiel antioxydant des olives ainsi que de leur saumure a été évalué.

- Les olives noires présentent un potentiel antioxydant 2 à 4 fois plus élevé que celui observé avec les olives vertes. Ce résultat peut s'expliquer par la plus forte teneur en composés phénoliques des olives noires.
- Les saumures des 2 types de préparation d'olives présentent un potentiel antioxydant similaire.

Quant aux flavonoïdes, M. Bouaziz [63] a remarqué que le profil flavonoïdique montre une augmentation de la concentration des flavonoïdes glucosides durant la maturation des

olives vertes alors que la concentration des flavonoïdes aglycone augmente durant la maturation des olives noires.

### 3.3. Mécanismes d'action des antioxydants

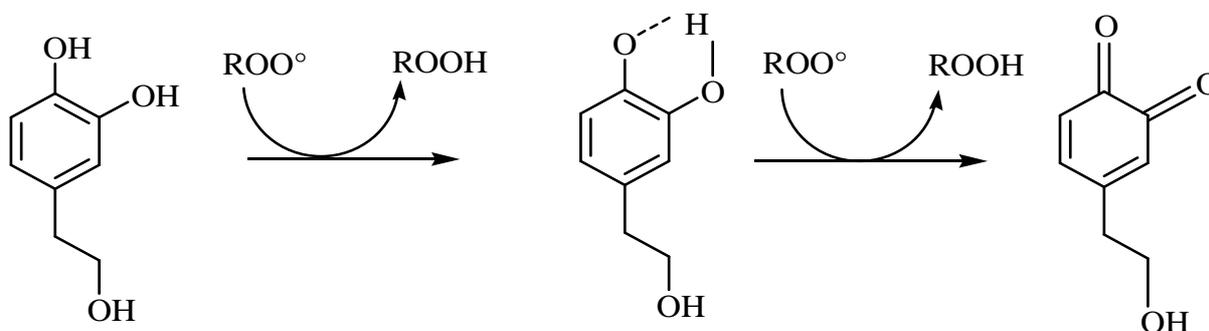
Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation [66] :

- Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- Soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action.

#### 3.3.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne

Ils sont caractérisés par la possession d'atomes d'hydrogènes faibles à soustraire. Ces antioxydants jouent le rôle d'évacuateurs de radicaux. Dès lors qu'ils fonctionnent au stade de la propagation, leur action est essentiellement palliative. On notera bien que les antioxydants primaires sont consommés au cours de la transformation. Les phénols, dont l'activité stérique est réduite, et les amines aromatiques secondaires constituent les deux classes chimiques les plus importantes dans cette catégorie. La figure 21 montre une stabilisation d'un radical hydroperoxyde ( $\text{ROO}^\circ$ ) par un phénol qui est l'hydroxytyrosol.



**Figure 21:** Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol

#### 3.3.2. Antioxydants secondaires

Ils fonctionnent au moyen de la décomposition des hydroperoxydes en produits inertes, et évitent ainsi ou ralentissent le taux d'initiation de la chaîne. Pour cette raison, on fait parfois référence aux antioxydants secondaires sous le nom d'antioxydants préventifs. Les antioxydants secondaires sont presque toujours utilisés en conjonction avec les antioxydants

primaires, ils sont connus également sous le nom d'agents synergiques. Les phosphites et les thioesters constituent les deux types chimiques les plus importants au sein de cette catégorie.

### 3.4. Efficacité des antioxydants

Les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui ont les énergies de liaison les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène. L'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux phénoxyliques par la délocalisation des électrons autour du cycle aromatique. L'efficacité d'un composé phénolique dépend également du nombre de fonction OH à hydrogène labile [11].

#### 3.4.1. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests in vitro

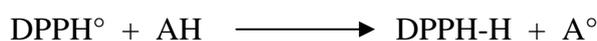
Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène. Les méthodes ABTS<sup>•+</sup> Decolorization Assay (ou TEAC) et DPPH jouent sur le transfert l'électron singulet, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène.

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

**3.4.1.1. Test TEAC (ou ABTS) :** Trolox Equivalent Antioxydant Capacity ou test ABTS<sup>•+</sup> Decolorization Assay. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

**3.4.1.2. Test ORAC :** Oxygen Radical Absorbance Capacity. La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant.

**3.4.1.3. Test DPPH :** Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH<sup>•</sup>. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A<sup>•</sup>.



### **3.4.2. Effet des antioxydants sur la santé humaine**

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances antioxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisées. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par notre organisme quand on consomme des végétaux ou des produits dérivés de ceux ci. Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus antvieillissement et leurs implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif. Les potentiels antioxydants, comparés à celui de la vitamine E, les plus élevés pour les fruits et légumes sont respectivement ceux de la fraise (15,36) et l'ail (19,4) [67, 68].

***DEUXIEME PARTIE***  
***ETUDE EXPERIMENTALE***

***MATERIELS ET  
METHODES***

Au cours de ce travail, nous avons d'abord extrait les composés phénoliques à partir des margines, des feuilles d'olivier et des raisins, ensuite nous avons procédé à l'étude comparative de leurs effets antioxydants sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. L'effet de ces extraits est comparé aussi à celui de l'acide gallique qui est pris comme antioxydant de référence.

## **1. Matériel**

Le matériel utilisé au cours de notre étude consiste en : l'huile d'olive vierge, margine d'olive, feuilles d'olivier et raisin rouge.

### **1.1. Huile d'olive vierge**

L'huile d'olive vierge utilisée lors de la réalisation de notre travail provient d'une huilerie semi moderne située dans un village d'Ifri-Ouzellaguen à 60km du port de Bejaïa. C'est une huile extraite par première pression à froid. Les olives triturées sont de variété « Chamlal ». Cette huile provient de la campagne oléicole 2009/2010.

### **1.2. Margines**

Les margines ayant fait l'objet de notre étude proviennent d'une huilerie moderne située à Boudjima à l'est et à 21 km du chef-lieu de la wilaya de Tizi-Ouzou. Celles-ci proviennent de la campagne oléicole 2009/2010. Les olives triturées sont de variété « Chamlal ».

### **1.3. Feuilles d'olivier**

Les feuilles d'olivier utilisées dans notre étude proviennent d'un vieil olivier de variété « Chamlal » planté dans la région de Tizi-Ghennif (Willaya de Tizi-Ouzou). Nous les avons prélevées en Février 2010.

### **1.4. Raisins**

Le raisin utilisé est rouge et est de variété Redglobe provenant d'Argentine. L'année de la récolte est 2010.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Extraction**

Deux types d'extraction ont été effectués lors de notre travail: extraction liquide-liquide et extraction liquide-solide. L'extraction liquide-liquide consiste en la délipidation des margines et la récupération des composés phénoliques de celles-ci ainsi que ceux du jus de raisin. Tandis que l'extraction liquide-solide est employée dans le cas de la récupération des polyphénols des feuilles d'olivier. Toutes ces extractions se font en employant l'éther diéthylique comme solvant.

#### **2.1.1. Margines**

Avant de procéder à l'extraction des composés phénoliques à partir des margines, il est nécessaire d'extraire les lipides.

##### **2.1.1.1. Extraction des lipides**

L'extraction des lipides est effectuée dans une ampoule à décanter. Une prise d'essai de 100ml de margines est mélangée avec 100ml d'hexane. L'opération est répétée deux fois afin d'extraire le maximum de lipide. La durée d'une extraction est de 10mn.

##### **2.1.1.2. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des composés phénoliques est effectuée dans une autre ampoule à décanter de capacité 500 ml. Une prise d'essai de 100ml de margines délipidées est mélangée avec 100ml de solvant. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation pendant 10mn. L'opération d'extraction est répétée quatre fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques (le rapport d'extraction liquide/liquide utilisé est 1/4). La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. La durée d'une extraction est de 20mn.

## 2.1.2. Raisins

### 2.1.2.1. Prétraitement

Le jus de raisin est obtenu à partir du pressurage des baies au mortier et de la trituration de la pulpe à l'aide d'un extracteur à jus de fruit de marque SEB.

### 2.1.2.2. Extraction des composés phénoliques

Une prise d'essai de 100ml de jus de raisin est soumise à l'extraction dont le principe est le même que celui suivi dans le cas des margines. Un exemple d'extraction liquide-liquide est donné par le schéma représenté par la figure 22.

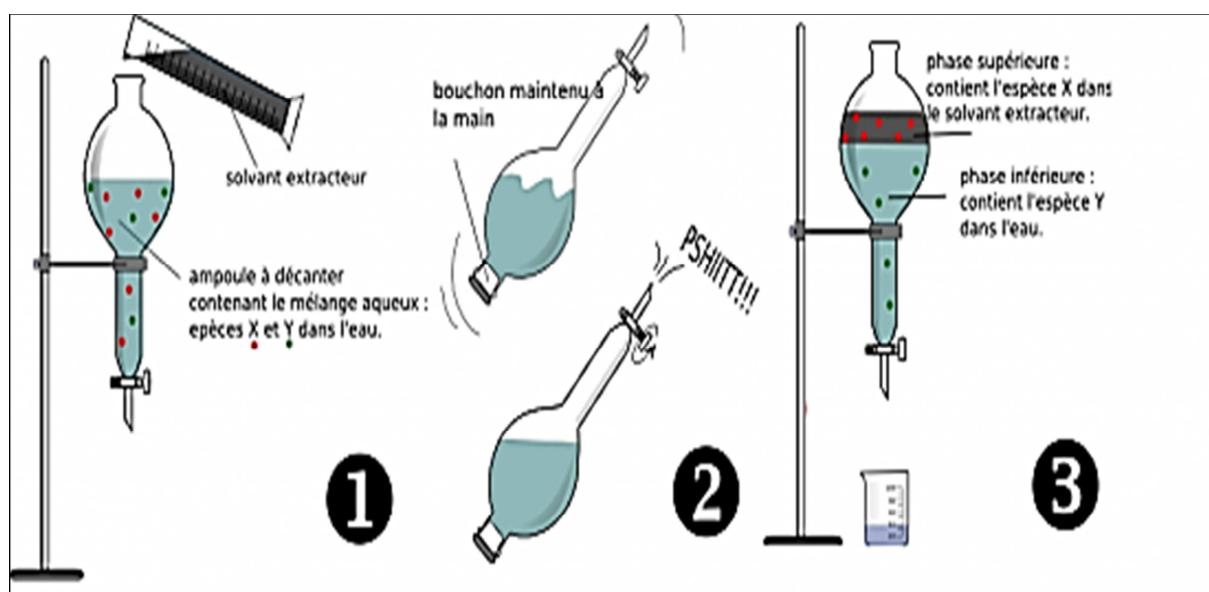


Figure 22 : Schéma donnant un exemple d'extraction liquide-liquide

## 2.1.3. Feuilles d'olivier

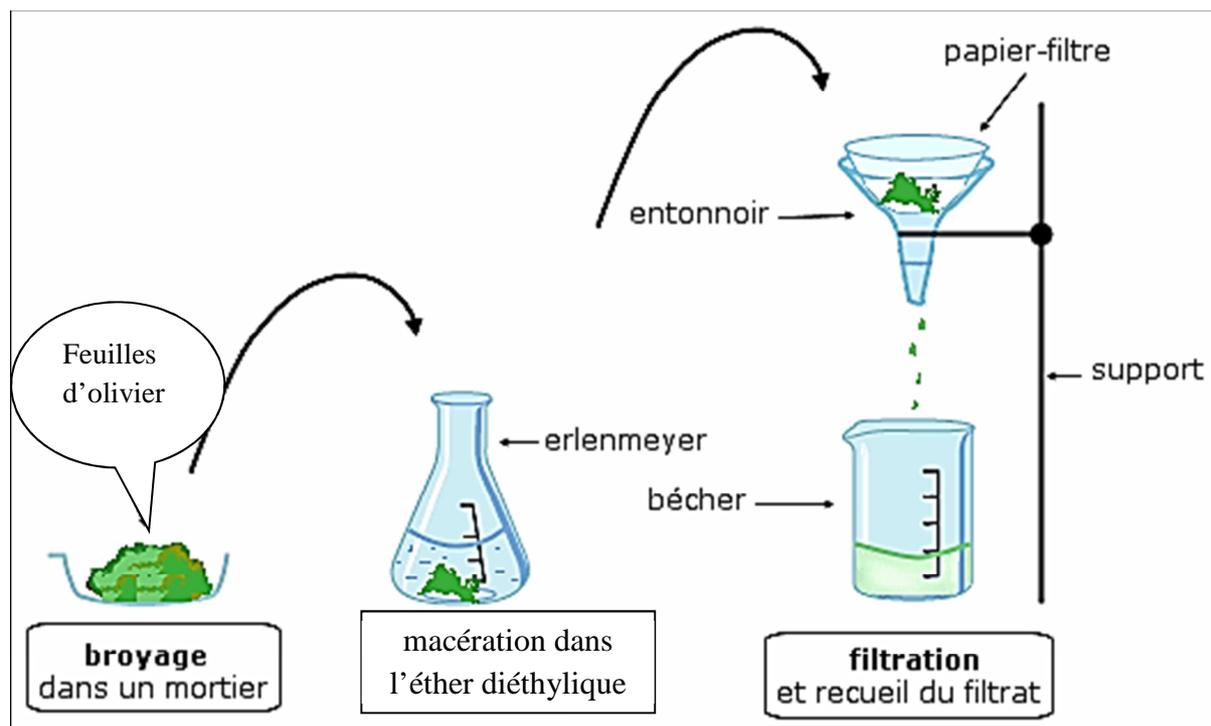
### 2.1.3.1. Prétraitement

Pour faciliter l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier, deux opérations de prétraitement de ce matériel ont été effectuées : séchage et broyage.

- Séchage : Le séchage des feuilles d'olivier est effectué dans une étuve portée à une température voisine de 40°C. L'humidité de ces feuilles est 55%.
- Broyage : les feuilles séchées sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique à couteau (Moulinex).

### 2.1.3.2. Extraction des composés phénoliques

30g de farine de feuilles d'olivier sont mélangés avec 120ml de solvant, soit un rapport solide-liquide de 1/4. Ce mélange est placé dans un bêcher de volume 250ml sous agitation magnétique pendant 5mn. Une filtration sous vide permet de récupérer le solvant riche en polyphénols. Ce solvant est chassé ensuite par une évaporation dans un évaporateur rotatif sous vide à 40C°. Ce procédé est décrit par le schéma donné par la figure 23.



**Figure 23** : Schéma donnant un exemple d'extraction solide-liquide

## 2.2. Analyses

### 2.2.1. Dosage des composés phénoliques

La concentration en composés phénoliques est déterminée en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphorique qui seront réduits par les composés phénoliques pour donner une coloration bleue, et ceci en milieu alcalin. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la concentration des polyphénols dans la solution.

La courbe d'étalonnage, ainsi que les valeurs d'absorbance à 750nm obtenues par spectrophotométrie (UV-visible) des solutions analysées, nous permettent de déterminer leur teneur en composés phénoliques. (Annexe 1)

### 2.2.2. Acidité

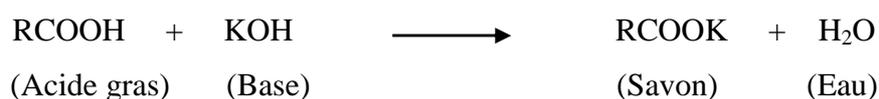
L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres contenus dans un corps gras, par convention, elle s'exprime en pourcentage d'acide oléique pour les huiles d'olive.

L'indice d'acide représente le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans 1g de corps gras. Il est exprimé en mg/g.

La détermination de l'acidité des huiles a été effectuée conformément à la norme AFNOR NF T60-204 de Décembre 1985 dont le principe est le suivant :

On met en solution une prise d'essai dans un mélange de solvant (éthanol/éther diéthylique), puis on titre les acides gras présents à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium en présence de la phénolphthaléine comme indicateur coloré (Annexe 2).

Le principe de la détermination de l'acidité d'une huile consiste en un dosage acido-basique correspondant à la neutralisation dont le schéma réactionnel est le suivant :



Expression des résultats :

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{N \times V \times 282,5}{m \times 1000} \times 100$$

m : Masse de la prise d'essai en gramme ;

N : Normalité de la solution d'hydroxyde de potassium en eq.g/l;

V : Volume de titrage en ml ;

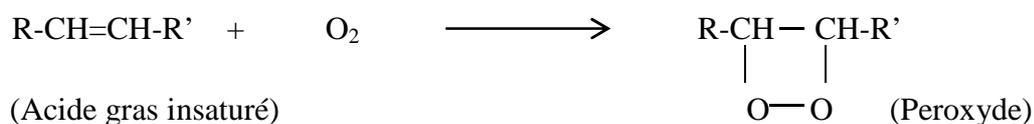
282.5g/mol : Masse molaire de l'acide oléique.

### 2.2.3. Indice de peroxyde

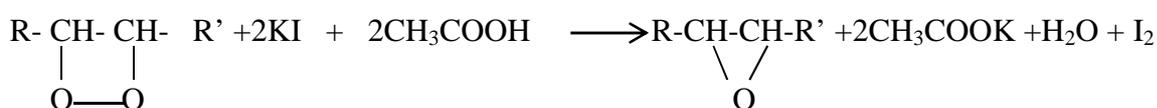
L'indice de peroxyde d'un corps gras représente le nombre de microgramme d'oxygène actif présent dans 1g de matière grasse. L'oxygène actif est l'oxygène existant sous forme de peroxyde, d'hydroperoxyde ou d'époxyde dans une matière grasse. Il est déterminé conformément à la norme AFNOR NF T60-220 de décembre 1968 dont le principe est le suivant :

Une prise d'essai est mise en solution dans un mélange d'acide acétique et de chloroforme, traitée ensuite par une solution d'iodure de potassium. On titre l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon (indicateur coloré) (Annexe 3).

En présence de l'oxygène de l'air, les acides gras insaturés s'oxydent en donnant les peroxydes selon la réaction suivante :



Sur une molécule de peroxyde, une molécule d'oxygène est fixée. Sur les deux atomes d'oxygène fixés, un seul est actif et est capable d'oxyder les iodures selon la réaction suivante :



Expression des résultats:

$$\text{IP } (\mu\text{g/g}) = \frac{(\text{V} - \text{V}_0) \times \text{N} \times 8000}{\text{P}}$$

$\text{V}_0$  : Volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc en ml ;

$\text{V}$  : Volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour la prise d'essai en ml ;

$\text{N}$  : Normalité de la solution de thiosulfate de sodium ;

$\text{P}$  : Masse de la prise d'essai en gramme.

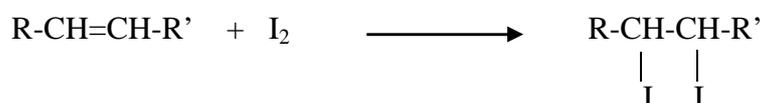
Dans le cas où  $\text{P} = 2\text{g}$ , l'indice de peroxyde IP peut alors s'exprimer de trois façons :

- $\text{IP} = (\text{V} - \text{V}_0) \times 2,5$  en millimoles/kg ;
- $\text{IP} = (\text{V} - \text{V}_0) \times 5$  en milliéquivalents/kg ;
- $\text{IP} = (\text{V} - \text{V}_0) \times 40$  en microgrammes/g.

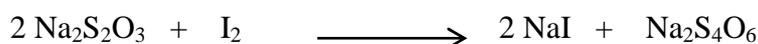
#### 2.2.4. Indice d'iode

L'indice d'iode est la masse d'iode en gramme nécessaire pour saturer les doubles liaisons contenues dans 100g de matière grasse. Il est déterminé selon la méthode décrite par Thyrsine en 1980 (Annexe 4). Cette méthode est utilisée pour déterminer quantitativement l'insaturation globale de l'huile d'olive.

Quelque soit le réactif halogéné utilisé, le principe est le même. Les liaisons éthyliques, en particulier celles des acides gras, fixent les halogènes. L'iode se fixe sur les insaturations des chaînes grasses en les saturant selon la réaction suivante :



Le corps gras dissous dans l'alcool éthylique est additionné d'une quantité d'iode alcoolique. L'excès d'iode non fixé est titré par une solution réductrice (thiosulfate). L'iode fixé par le corps gras est déterminé selon la réaction suivante :



Expression des résultats :

$$\text{II (g/100g)} = \frac{(\text{V}_0 - \text{V}) \times 0,01269}{\text{P}} \times 100$$

$\text{V}_0$  : Volume de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc en ml ;

$\text{V}$  : Volume de thiosulfate de sodium utilisé pour la prise d'essai ;

$\text{P}$  : Poids de la prise d'essai ;

0,01269 : Nombre de gramme d'iode correspondant à 1ml de thiosulfate.

### 2.2.5. Absorbance aux rayonnements ultraviolets.

On dissout la matière grasse étudiée dans le solvant requis (hexane), puis on détermine l'extinction de la solution à la longueur d'onde prescrite, par rapport au solvant pur. Les extinctions spécifiques sont déterminées à partir des lectures spectrophotométriques (Annexe 5). La loi de Beer Lambert précise que, pour un corps donné en solution à une longueur d'onde  $\lambda$ , l'absorption  $A$  est proportionnelle à l'épaisseur de la couche liquide traversée (l'épaisseur "l" de la cuve) par le faisceau lumineux et à la concentration  $C$  du corps dans la solution.

$$A_{(\lambda)} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

Avec :  $A(\lambda)$  : l'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$ .

$C$  : la concentration, en grammes par 100 ml, de l'échantillon.

$l$  : longueur de la cuve.

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire.

En vue de déterminer la variation de l'extinction spécifique ( $\Delta K$ ), on mesure les absorbances de l'échantillon d'huile d'olive aux longueurs d'onde 264 nm et 274 nm. Les valeurs d'extinctions spécifiques à 232 nm et 270 nm et le  $\Delta K$  sont calculées selon la formule suivante :

$$\Delta K = K_{270} - \frac{1}{2}(K_{264} + K_{274})$$

$K_{232}$  : extinction spécifique à  $\lambda = 232$  nm

$K_{270}$  : extinction spécifique à  $\lambda = 270$  nm

$K_{264}$  : extinction spécifique à  $\lambda = 264$  nm

$K_{274}$  : extinction spécifique à  $\lambda = 274$  nm

### 3. Préparation des échantillons d'huile d'olive

Afin d'étudier l'influence des composés phénoliques extraits à partir des feuilles d'olivier, des margines et des raisins sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, quatre séries d'échantillons notées A, B, C et R d'une même huile d'olive vierge ont été utilisées au cours de cette étude.

Les trois premières séries (A, B, C) comportent chacune cinq échantillons de 160ml d'huile, tandis que la série R comporte deux échantillons de 160ml d'huile.

Ces échantillons d'huile d'olive vierge sont répartis comme suit :

- Série A : contenant cinq échantillons de concentrations différentes en composés phénoliques des margines.
- Série B : contenant cinq échantillons de concentrations différentes en composés phénoliques des raisins.
- Série C : contenant cinq échantillons de concentrations différentes en composés phénoliques des feuilles d'olivier.
- Série R : contenant deux échantillons de concentrations différentes en acide gallique notés AG.
- Echantillon témoin (T) : huile d'olive vierge sans aucun additif.

Les 18 échantillons sont entreposés dans une étuve portée à 40C° dans des flacons en verre opaque de capacité 160ml pendant 60 jours.

Le tableau 13 donne la répartition des échantillons d'huile d'olive selon le type et la concentration d'antioxydants ajoutés.

**Tableau 13 :** Répartition des échantillons de l'huile d'olive

Séries	Concentration (ppm)	Qualité d'antioxydant ajoutée dans l'huile
Série (A)	A1 (100ppm) A2 (200ppm) A3 (300ppm) A4 (400ppm) A5 (500ppm)	160ml d'huile+100ppm d'extrait phénolique des margines 160ml d'huile+200ppm d'extrait phénolique des margines 160ml d'huile+300ppm d'extrait phénolique des margines 160ml d'huile+400ppm d'extrait phénolique des margines 160ml d'huile+500ppm d'extrait phénolique des margines
Série (B)	B1 (100ppm) B2 (200ppm) B3 (300ppm) B4 (400ppm) B5 (500ppm)	160ml d'huile+100ppm d'extrait phénolique des raisins 160ml d'huile+200ppm d'extrait phénolique des raisins 160ml d'huile+300ppm d'extrait phénolique des raisins 160ml d'huile+400ppm d'extrait phénolique des raisins 160ml d'huile+500ppm d'extrait phénolique des raisins
Série (C)	C1 (100ppm) C2 (200ppm) C3 (300ppm) C4 (400ppm) C5 (500ppm)	160ml d'huile+100ppm d'extrait phénolique de feuilles d'olivier 160ml d'huile+200ppm d'extrait phénolique de feuilles d'olivier 160ml d'huile+300ppm d'extrait phénolique de feuilles d'olivier 160ml d'huile+400ppm d'extrait phénolique de feuilles d'olivier 160ml d'huile+500ppm d'extrait phénolique de feuilles d'olivier
Série (R)	AG (100ppm) AG (200ppm)	160ml d'huile+100ppm d'acide gallique 160ml d'huile+200ppm d'acide gallique
Témoin	T (0ppm)	160ml d'huile

Au total, nous disposons de 18 échantillons étuvés à 40C° et à l'obscurité. L'évolution de l'autooxydation a été suivie dans le temps par la mesure des indices de peroxyde et des absorbances à 232nm et à 270nm. Le degré d'insaturation a été révélé par la mesure de l'indice d'iode. On a aussi suivi l'évolution de l'acidité.

Ces différentes analyses ont lieu tous les 10 jours et ceci pendant une durée de deux mois.

***RESULTATS ET  
DISCUSSION***

Les graisses et huiles alimentaires ont tendance à subir une détérioration oxydative entraînant le développement d'un goût et d'une odeur désagréables. La prévention de cette oxydation dépend essentiellement de la présence d'inhibiteurs naturels que sont les composés phénoliques.

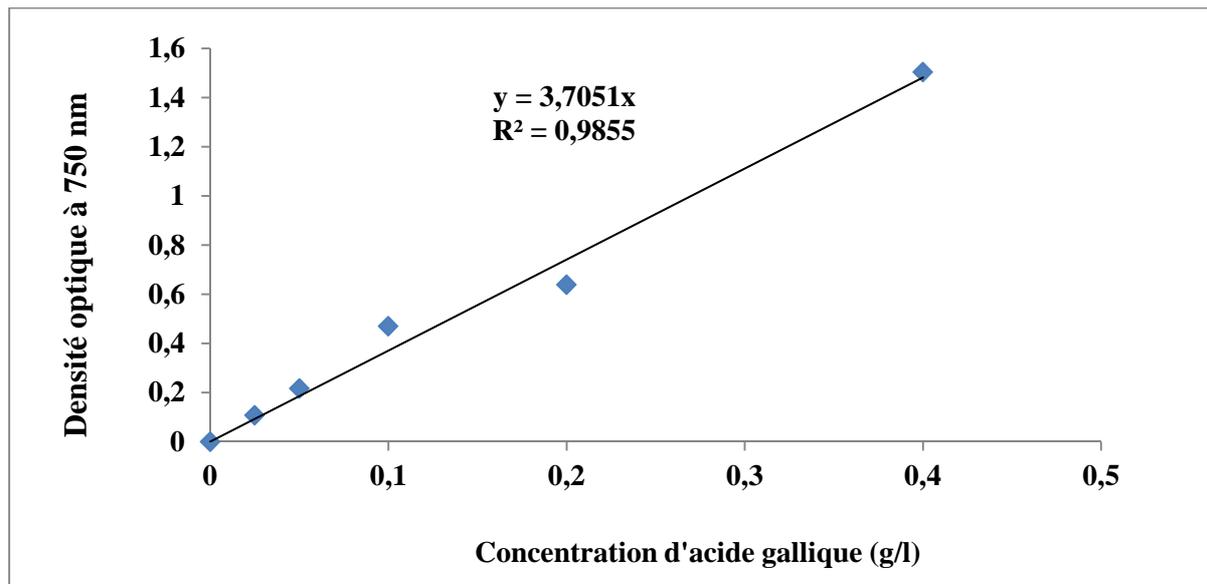
Ces composés phénoliques sont présents dans les feuilles d'olivier et dans les margines, lesquels constituent pour le premier un déchet solide et pour le deuxième un résidu liquide. Ces antioxydants sont aussi présents dans les raisins et dans d'autres fruits et plantes telles que : pommes, poires, romarin, etc. Ces composés phénoliques méritent une attention particulière par leur valorisation en tant qu'antioxydant naturel des huiles.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de faire des essais de mise en évidence du pouvoir antioxydant de ces composés phénoliques provenant des feuilles d'olivier, des margines et des raisins sur l'huile d'olive à différentes conditions de durée et de température de stockage. L'effet de ces antioxydants est comparé à celui de l'acide gallique utilisé comme antioxydant de référence.

### **1. Teneur en composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont été extraits à partir des feuilles d'olivier, margines et raisins à l'aide de l'éther diéthylique. Les rapports liquide- solide et liquide-liquide utilisés sont égaux à 4. Ces rapports sont les mêmes que celui utilisé par Moussaoui et al [69] dans l'extraction des polyphénols à partir des margines d'olive.

Avant de procéder à la détermination de la teneur en ces composés phénoliques, nous avons établi la courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme composé de référence. Cette courbe est donnée dans la figure 24.



**Figure 24 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques des feuilles d'olivier, margines et raisins sont consignées dans le tableau 14.

**Tableau 14 :** Teneur en composés phénoliques des trois substances étudiées

Matrice	Feuilles d'olivier	Margine	Raisins
Teneur en CP (g/l)	2,14	0,86	0,35

D'après ces résultats, la teneur la plus importante en composés phénoliques est celle correspondante aux feuilles d'olivier. Elle est 2,5 fois plus grande que celle des margines. Quant aux raisins, leur teneur en polyphénols est la plus faible.

Ces teneurs en composés phénoliques obtenues à partir des feuilles d'olivier, margines et raisins sont beaucoup plus importantes que celles des margines étudiées par Moussaoui et al. [69]. Ces valeurs sont aussi plus élevées que celles obtenues par Ünal [70] dans le cas de l'extraction des polyphénols totaux à partir des margines provenant d'une huilerie moderne d'Izmir (MAROC) à l'aide de deux types de solvants : l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle avec un rapport liquide-solide égal à 4.

Par ailleurs, les teneurs en composés phénoliques des margines et des feuilles d'olivier obtenues dans le cas de notre étude sont beaucoup plus faible que celles correspondant au

résultat du travail effectué par D.Almi [71] qui sont 16,78g/kg pour les feuilles d'olivier et 2,63g/kg pour les margines. Ces dernières proviennent d'une huilerie moderne.

La composition phénolique des margines dépend non seulement de la variété, de la maturité du fruit et des conditions climatiques mais aussi des procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse (margines) de la phase huileuse.

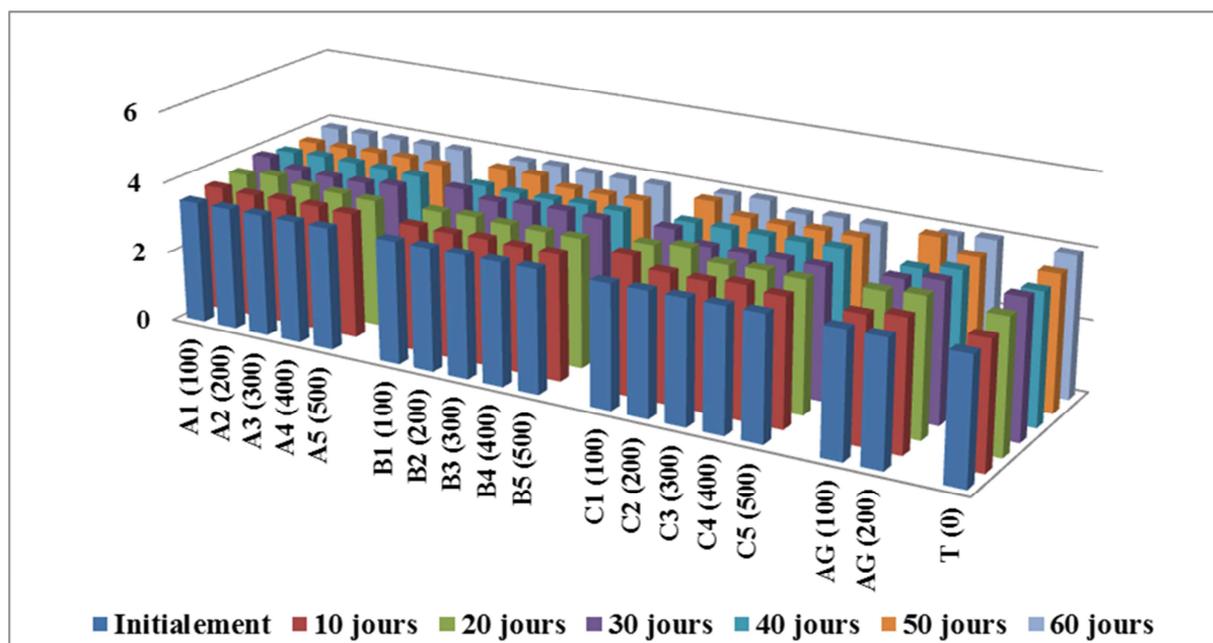
## 2. Analyses chimiques

### 2.1. Acidité

Les valeurs des acidités des 18 échantillons traités par les composés antioxydants extraits à partir des feuilles d'olivier, des margines et des raisins à différentes concentrations (allant de 100 à 500ppm) et en fonction de la durée de stockage, sont données dans le tableau 15 et illustrées par la figure 25.

**Tableau15** : Evolution de l'acidité des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.

Séries	Concentration (ppm)	Durée de stockage (jours)						
		0	10	20	30	40	50	60
Série (A)	A1 (100)	3,46	3,58	3,67	3,88	3,74	3,74	3,88
	A2 (200)	3,46	3,55	3,80	3,67	3,78	3,74	3,88
	A3 (300)	3,46	3,58	3,67	3,64	3,76	3,77	3,88
	A4 (400)	3,46	3,58	3,64	3,65	3,74	3,78	3,88
	A5 (500)	3,46	3,55	3,61	3,74	3,71	3,74	3,89
Série (B)	B1 (100)	3,46	3,56	3,65	3,99	3,78	3,95	3,88
	B2 (200)	3,46	3,54	3,69	3,81	3,74	3,95	3,92
	B3 (300)	3,46	3,57	3,65	3,88	3,74	3,74	3,88
	B4 (400)	3,46	3,53	3,64	3,91	3,78	3,74	3,88
	B5 (500)	3,46	3,53	3,64	3,86	3,76	3,76	3,88
Série (C)	C1 (100)	3,46	3,88	3,84	3,95	3,81	4,09	3,95
	C2 (200)	3,46	3,60	3,95	3,64	3,81	3,81	3,99
	C3 (300)	3,46	3,57	3,67	3,64	3,81	3,78	3,77
	C4 (400)	3,46	3,67	3,71	3,67	3,82	3,82	3,85
	C5 (500)	3,46	3,56	3,67	3,67	3,84	3,82	3,82
Série (R)	AG (100)	3,46	3,49	3,75	3,73	3,67	4,20	3,91
	AG (200)	3,46	3,62	3,83	3,88	3,83	3,84	3,99
Témoin	T (0)	3,46	3,49	3,70	3,84	3,66	3,78	3,95



**Figure 25:** Evolution de l'acidité des échantillons d'huile en fonction de la durée de stockage et de la concentration en composés phénoliques.

On remarque que l'acidité initiale de nos échantillons qui est de 3,46% est élevée et dépasse les limites établies par le COI (2003), qui se situent entre 1 et 3,3%. Cela peut être dû à la récolte tardive des olives et leur stockage pendant une longue durée à cause de la cadence de réception qui est inférieure à la capacité de trituration (compagne oléicole 2009/2010), la dégradation sera d'autant plus accentuée que le stockage sera long (plus de 48 heures) et effectué dans de mauvaises conditions. Ceci provoque des échauffements des olives et déclenche le processus de fermentation en augmentant le taux d'acidité. Les acides gras libres résultent de l'action des lipases sur les triglycérides, ou de toute autre activité hydrolytique de ces triglycérides pouvant se produire avant, pendant ou après la trituration des olives [72]. Cependant, un niveau élevé d'acidité peut être également attribué à l'état de maturité avancé du fruit, Dugo et al [73] ont montré que la récolte précoce produit des huiles dont l'acidité est inférieure à 1%.

D'après D. Boscou [74], des facteurs affectant défavorablement la qualité d'une huile d'olive peuvent être présents même aux premières étapes, par exemple, pendant la formation de l'huile dans le fruit. Des anomalies pendant le processus de la biosynthèse, des activités microbiennes et des conditions ambiantes sont toutes liées à la formation de l'huile à une acidité élevée.

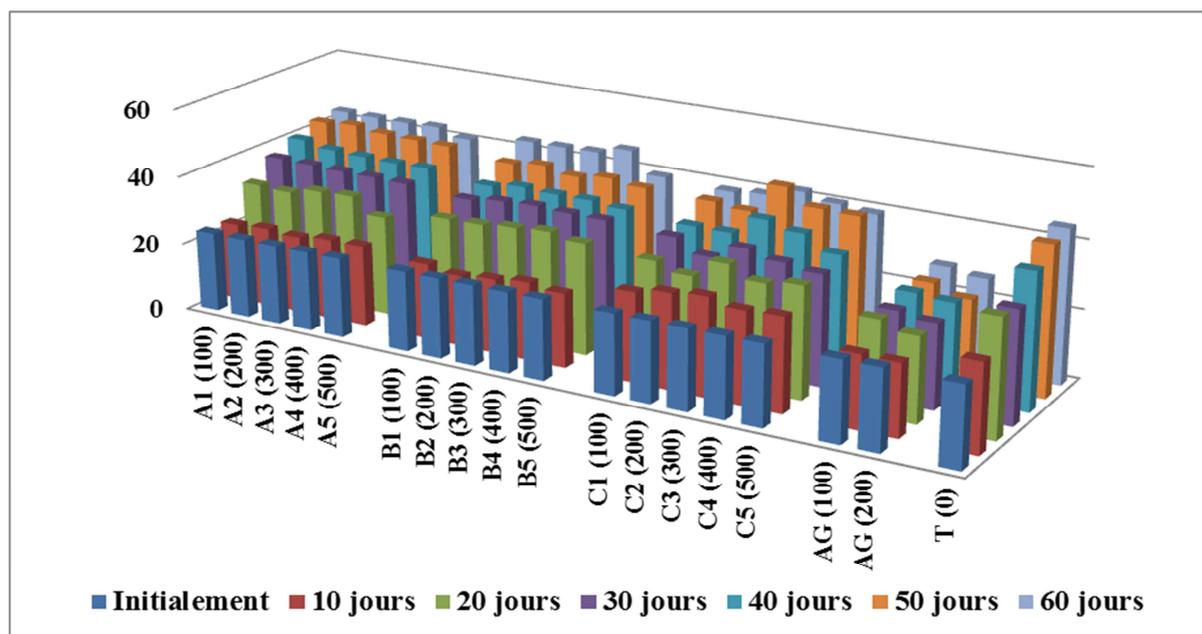
D'après les résultats consignés dans le tableau 15 et reportés dans la figure 25, nous remarquons que toutes les valeurs d'acidité exprimées en (% d'acide oléique) oscillent entre 3,46 et 3,89% pour les échantillons de la série A, entre 3,46 et 3,99% pour les échantillons de la série B et entre 3,46 et 4,09% pour ceux de la série C. Tandis que celles du témoin varient entre 3,46 et 3,95%. Les valeurs de l'acidité des échantillons d'huile d'olive auxquels est additionné l'acide gallique aux concentrations de 100 et 200ppm sont situées respectivement entre deux intervalles qui sont : 3,46 - 4,20% et 3,46 - 3,99%, ces valeurs semblent les plus élevées à cause de la fonction acide de l'antioxydant employé pour ces échantillons. Cette variation d'acidité (augmentation) est légère pour toutes les séries d'échantillons d'huile utilisée. Dans tous les cas, l'acidité de l'huile étudiée ne varie pas de manière significative avec l'ajout des antioxydants. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par N.Denisse [75] qui a trouvé que l'acidité des huiles de tournesol, noix et soja auxquelles sont additionnés 80 ppm et 160 ppm d'extrait phénolique des margines demeure constante pendant une durée de stockage de 22 jours à 60°C. Cette tendance a été remarquée par S.Fodil [76] lors de l'étude de l'effet du  $\beta$  carotène et de la vitamine E sur la stabilité oxydative de trois types d'huiles d'olives vierge.

## 2.2. Indice de peroxyde

Les valeurs de l'indice de peroxyde des différents échantillons d'huile ayant fait l'objet de notre étude sont données dans le tableau 16 et reportés sur la figure 26.

**Tableau16** : Evolution de l'indice de peroxyde des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.

Séries	Concentration (ppm)	Durée de stockage (jours)						
		0	10	20	30	40	50	60
Série (A)	A1 (100)	23,46	22,95	31,85	37,00	40,00	42,60	43,15
	A2 (200)	23,46	23,50	31,44	36,75	38,40	43,35	43,00
	A3 (300)	23,46	22,82	33,33	36,50	38,00	42,25	43,00
	A4 (400)	23,46	23,86	33,78	36,45	37,75	42,00	43,25
	A5 (500)	23,46	23,88	29,20	36,25	37,85	41,75	41,00
Série (B)	B1 (100)	23,46	22,27	32,42	35,00	36,00	39,75	43,50
	B2 (200)	23,46	20,73	32,63	36,25	37,40	40,90	43,55
	B3 (300)	23,46	21,67	33,53	36,75	37,00	39,25	43,75
	B4 (400)	23,46	22,75	34,25	36,35	37,05	40,50	45,90
	B5 (500)	23,46	21,59	32,80	36,25	36,20	39,40	39,60
Série (C)	C1 (100)	23,46	26,00	31,50	35,10	35,00	39,00	38,75
	C2 (200)	23,46	27,75	29,15	31,25	35,00	38,00	39,60
	C3 (300)	23,46	28,75	34,50	35,50	40,50	46,75	42,25
	C4 (400)	23,46	26,90	31,00	33,50	38,50	42,25	40,50
	C5 (500)	23,46	27,30	32,35	32,15	34,20	42,00	39,40
Série (R)	AG (100)	23,46	21,11	27,00	25,90	27,40	26,75	27,90
	AG (200)	23,46	20,94	24,50	24,40	26,60	24,00	26,50
Témoin	T (0)	23,46	25,62	34,00	32,50	39,40	43,50	44,60



**Figure 26 :** Evolution des indices de peroxyde (meq/kg) des échantillons d'huile en fonction de la durée de stockage et de la concentration en composés phénoliques.

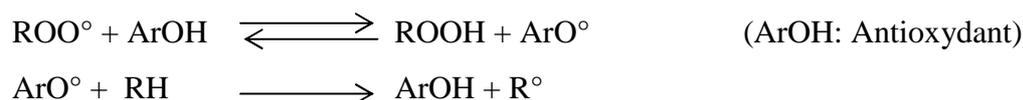
L'oxydation de l'huile d'olive commence après que les olives soient cueillies de l'arbre, et continue pendant le stockage des fruits et leur traitement. Les premiers produits formés par l'attaque de l'oxygène, activée sur les doubles liaisons des chaînes d'acides gras, sont des composés peroxydés instables, et des hydroperoxydes dont la structure va dépendre de la nature des acides gras attaqués (acides mono-, di-, tri- ou polyinsaturés).

La détermination de l'indice de peroxyde est la méthode la plus appropriée pour la mesure de ces composés peroxydés.

L'analyse des résultats du tableau 16 représentés sur la figure 26 montre une évolution de l'indice de peroxyde de toutes les séries d'échantillons ainsi que celui du témoin en fonction de la durée de stockage.

La valeur initiale de l'indice de peroxyde de l'échantillon d'huile témoin est de 23,46 meq/kg. Après 60 jours de stockage, celle-ci atteint une valeur de 44,6 meq/kg. Les autres échantillons d'huile auxquels sont additionnés les extraits phénoliques utilisés lors de ce travail semblent mieux protégés que le témoin contre l'oxydation. Les valeurs des indices de peroxyde obtenus après une durée de stockage de 60 jours sont : 41,0 meq/kg, 39,6 meq/kg et 39,6 meq/kg respectivement pour les échantillons A5, B5 et C2. Elles correspondent à des valeurs optimales pour la protection de l'huile d'olive de l'oxydation. Les résultats obtenus avec les composés phénoliques des margines et ceux des raisins sont conformes aux résultats

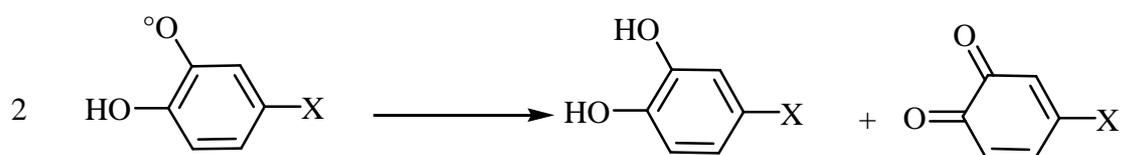
obtenus par L. Machlin [77] ainsi que ceux de M. Baldioli et al [78] qui ont trouvé que la stabilité des huiles est bien corrélée avec la teneur en phénols totaux et à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels, dont les plus importants sont les tocophérols. Tandis que les résultats trouvés avec l'incorporation des composés phénoliques des feuilles d'olivier sont optimum avec l'échantillon C2 (200ppm), cela est en accord avec les résultats de F. Pirisi et al [79] qui ont montré que la stabilité à l'oxydation, évaluée par le test de Swift avec le Rancimat, ne serait pas corrélée avec la teneur en composés phénoliques. De même pour Cillard et al [80] qui trouvent que les concentrations croissantes en antioxygène ajouté dans le milieu pourraient être responsables d'un effet prooxydant, comme cela a été démontré pour l' $\alpha$ -tocophérol. En effet, si la concentration de la forme radicalaire de l'antioxydant produite par oxydation augmente beaucoup, celle-ci peut se comporter en initiateur de la peroxydation lipidique selon la réaction proposée par H. Chimi et al [5]:



L'étude de l'effet des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier réalisée par Hartzalah et al [64] sur la stabilité oxydative de trois échantillons d'huile d'olive de variétés différentes en fonction du temps et à la température de 80°C a montré la même tendance que celle que nous avons observé. La meilleure stabilité oxydative obtenue par ces auteurs correspond dans tous les cas à une concentration de 200 ppm en extraits phénoliques. A partir du quatrième jour de stockage, l'indice de peroxyde des trois échantillons d'huile d'olive augmente fortement en fonction du temps. Cette augmentation est beaucoup plus importante que celle obtenue au cours de notre étude.

A 10 jours de stockage, la figure 26 nous indique que les échantillons d'huiles d'olive auxquels sont rajoutés les composés phénoliques des feuilles d'olivier présentent les valeurs de l'indice de peroxyde les plus élevées, cela est dû probablement à la dissolution incomplète de la chlorophylle que contient les feuilles d'olivier. Au-delà de cette période, ces composés phénoliques semblent exercer une meilleure activité antioxydante. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par I.Ben Tekaya et M.Hassouna [34] qui ont trouvé un effet prooxydant des chlorophylles à la lumière mais antioxydant à l'obscurité, en présence d'autres composés tel que le  $\beta$  carotène.

Cette meilleure activité antioxydante peut être aussi due à la composition de la graine d'olive riche en l'oleuropéine, ce dernier est aussi le composé phénolique principal et majoritaire des feuilles d'olivier [81], ainsi que sa structure chimique présentant deux fonctions phénols en position ortho. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par H. Chimi et al [5] qui ont démontré que si l'antioxydant utilisé est un phénol stériquement encombré ou un para ou ortho- diphénol, le radical  $ArO^\circ$  issu de l'antioxydant ne participe pas à la propagation de la réaction en chaîne, ces radicaux se recombinent alors très rapidement entre eux pour donner des quinones et l'ortho- diphénol de départ (produits non radicalaires) selon le mécanisme suivant :



Nous remarquons que les échantillons d'huile d'olive auxquels est incorporé l'antioxydant de synthèse (acide gallique) sont les moins peroxydés, avec des valeurs de l'indice de peroxyde à la fin de la durée de conservation (60 jours) égales à 27,90 meq/kg et 26,50 meq/kg respectivement pour les concentrations 100ppm et 200ppm. Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet synergique et par la structure de l'acide gallique qui a trois fonctions phénols pouvant par ailleurs céder trois hydrogènes aux radicaux peroxydes ( $RO^\circ$ ) et aux radicaux hydroperoxydes ( $ROO^\circ$ ). Par conséquent, il est susceptible de stabiliser trois fonctions radicalaires.

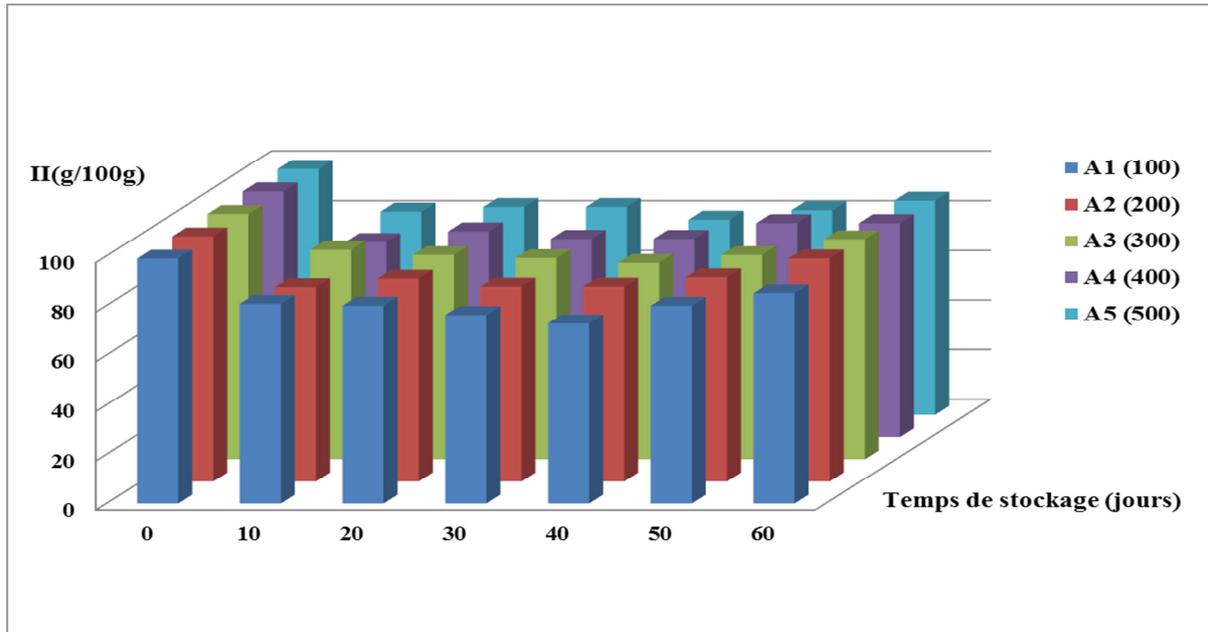
En conclusion, nous pouvons dire que l'indice de peroxyde représente un des paramètres de qualité de l'huile d'olive, mais ne peut être un indicateur de la stabilité oxydative de l'huile. Ces résultats concordent avec ceux de Kiritsakis et al [82] qui ont étudié trois échantillons de différentes huiles d'olive et qui ont trouvé que l'huile qui présentait une valeur initiale de peroxydes la plus basse était moins stable que les autres.

### 2.3. Indice d'iode

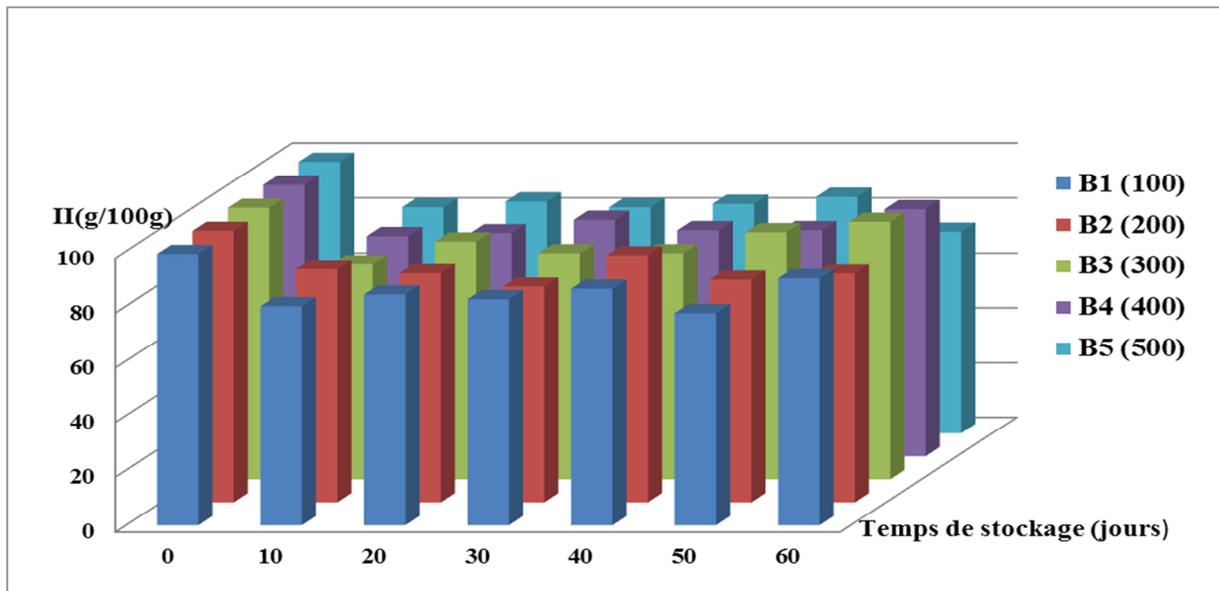
La détermination de l'indice d'iode permet de déterminer le degré d'insaturation global des huiles. Le tableau 17 et les figures 27, 28, 29 et 30 nous renseignent sur le degré d'insaturation des 4 séries d'huile étudiée, ainsi que celui du témoin.

**Tableau 17:** Evolution de l'indice d'iode des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.

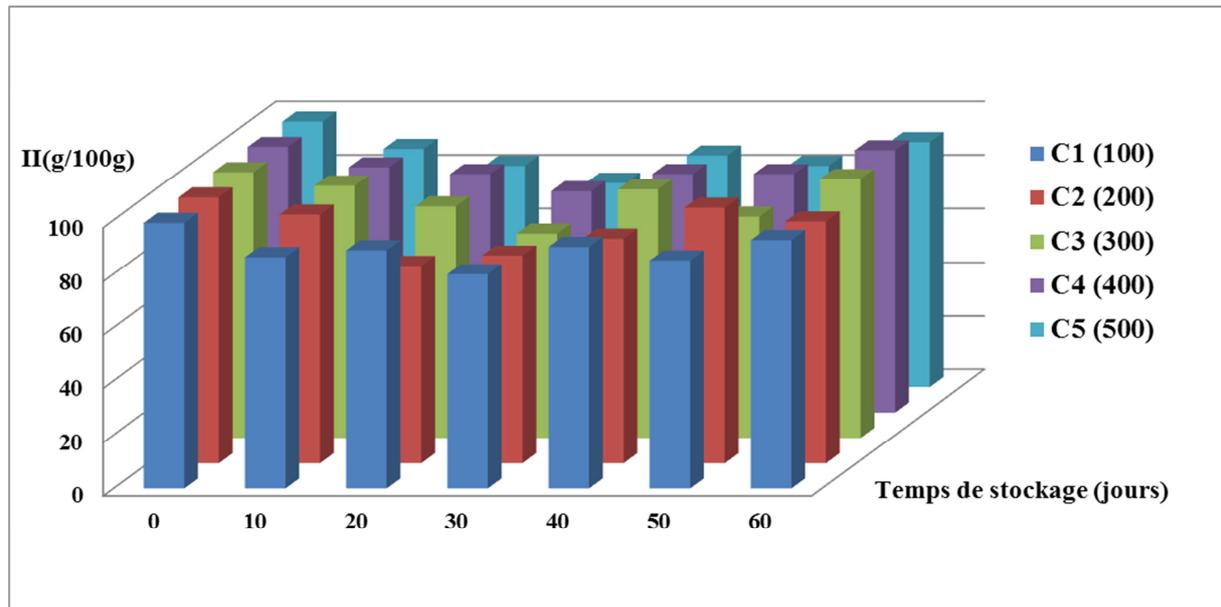
Séries	Concentration (ppm)	Durée de stockage (jours)						
		0	10	20	30	40	50	60
Série (A)	A1 (100)	98,98	80,75	79,95	76,14	72,73	79,94	85,02
	A2 (200)	98,98	78,44	81,90	78,68	78,68	82,48	90,09
	A3 (300)	98,98	84,60	82,48	81,21	79,31	82,48	88,83
	A4 (400)	98,98	78,67	82,97	79,95	79,95	86,29	86,29
	A5 (500)	98,98	81,90	83,75	83,75	78,68	82,48	86,29
Série (B)	B1 (100)	98,98	79,94	84,21	82,48	86,29	77,40	90,09
	B2 (200)	98,98	85,02	83,54	78,68	90,09	81,21	83,40
	B3 (300)	98,98	78,44	86,71	82,48	82,48	90,10	93,91
	B4 (400)	98,98	80,37	81,43	86,29	82,48	82,48	90,09
	B5 (500)	98,98	82,48	84,60	82,48	83,75	86,29	73,60
Série (C)	C1 (100)	98,98	86,29	88,83	79,95	90,09	85,02	92,63
	C2 (200)	98,98	92,63	73,60	77,41	83,75	95,17	90,09
	C3 (300)	98,98	93,91	86,29	76,14	92,63	82,48	96,44
	C4 (400)	98,98	91,36	88,83	82,48	88,83	88,83	97,71
	C5 (500)	98,98	88,83	82,48	76,14	86,29	82,48	91,36
Série (R)	AG (100)	98,98	72,76	80,75	83,75	82,48	82,48	88,83
	AG (200)	98,98	76,14	84,60	84,38	91,36	78,68	96,44
Témoin	T (0)	98,98	87,56	78,36	86,29	92,63	79,94	95,17



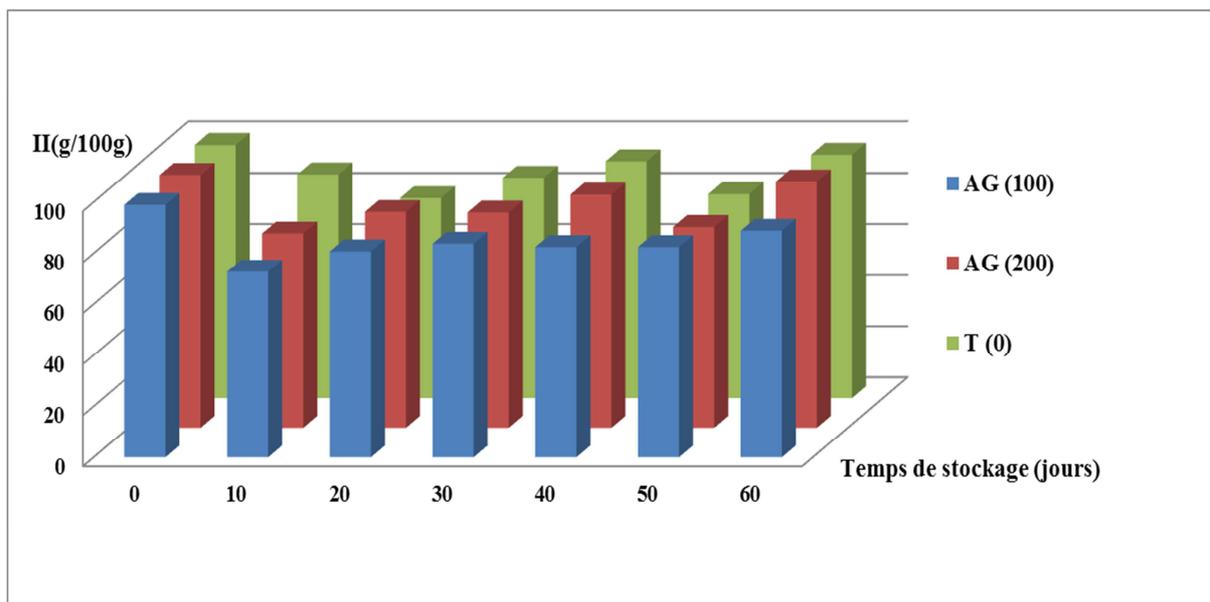
**Figure27:** Evolution des indices d'iode (g I<sub>2</sub>/100g de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.



**Figure28:** Evolution des indices d'iode (g I<sub>2</sub>/100g de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques du raisin et de la durée de stockage.



**Figure 29 :** Evolution des indices d'iode ( $\text{g I}_2/100\text{g}$  de corps gras) des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.



**Figure 30 :** Evolution des indices d'iode ( $\text{g I}_2/100\text{g}$  de corps gras) du témoin et les échantillons d'huile auxquels sont rajoutés les antioxydants de synthèse en fonction de la durée de stockage.

Nous remarquons d'après les résultats consignés dans le tableau 17 et représentés par les figures 27, 28, 29 et 30 que la variation de l'indice d'iode n'est pas significative pour toutes les séries d'échantillons d'huile d'olive, de même que pour celle du témoin. La valeur initiale de l'indice d'iode pour tous les échantillons était de 98,98 (g/100g). Après 60 jours de stockage, cette valeur varie entre 85,02 et 90,09 (g/100g) pour la série A, entre 70,60 et 93,91 (g/100g) pour la série B, et entre 90,09 et 97,71 (g/100g) pour la série C. Celles de la série R varient entre 88,83 et 96,44(g/100g) et passe à 95,17 (g/100g) pour le témoin. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par C.Tchiégang et al [83] qui ont trouvé que le temps de conservation n'a pas d'influence ni sur l'indice d'iode, ni sur l'indice de réfraction et ni sur la masse volumique des huiles végétales.

La composition en acide gras de l'olive est un paramètre important dans la durée de conservation qui est quantitativement affectée par le facteur principal tel que la variété de l'olive utilisée dans la production de l'huile [84]. Il est généralement bien admis que les acides gras les plus sensibles aux attaques radicalaires sont les acides gras polyinsaturés, dont la peroxydation est connue pour être d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est élevé, contrairement aux acides gras monoinsaturés qui ont une grande importance en raison de leurs effets sur la stabilité oxydative des huiles [85]. De ce fait, nous pouvons dire que l'huile étudiée au cours de ce travail est probablement très pauvre en acides gras polyinsaturés et riche en acide gras monoinsaturé. Cette composition en acides gras varie avec l'origine de l'huile, ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Ben Temmime et al [84]. Une étude réalisée par H. Benabid [86] a révélé que les huiles d'olive d'El Milia se distinguent par les taux les plus élevés en acide stéarique, (C18:0), par ailleurs, les huiles d'olive de la région de Tizi-ouzou se caractérisent par les taux les plus élevés en acide linoléique, (C18:2).

### 3. Analyse physique

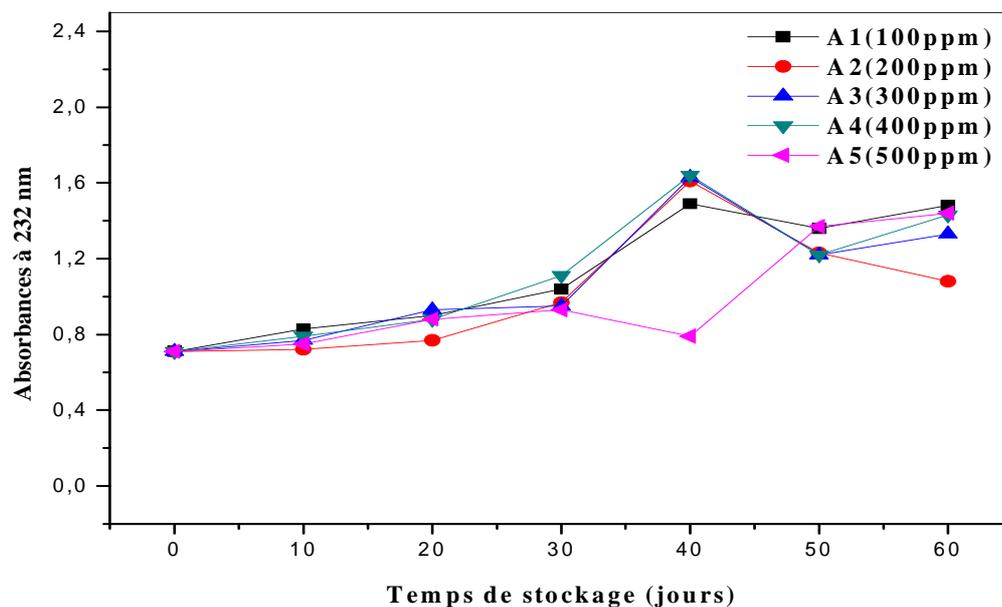
#### 3.1. Absorbances aux rayonnements UV

Tous les corps gras contiennent des époxydes et des hydroperoxydes en quantités plus ou moins importantes.

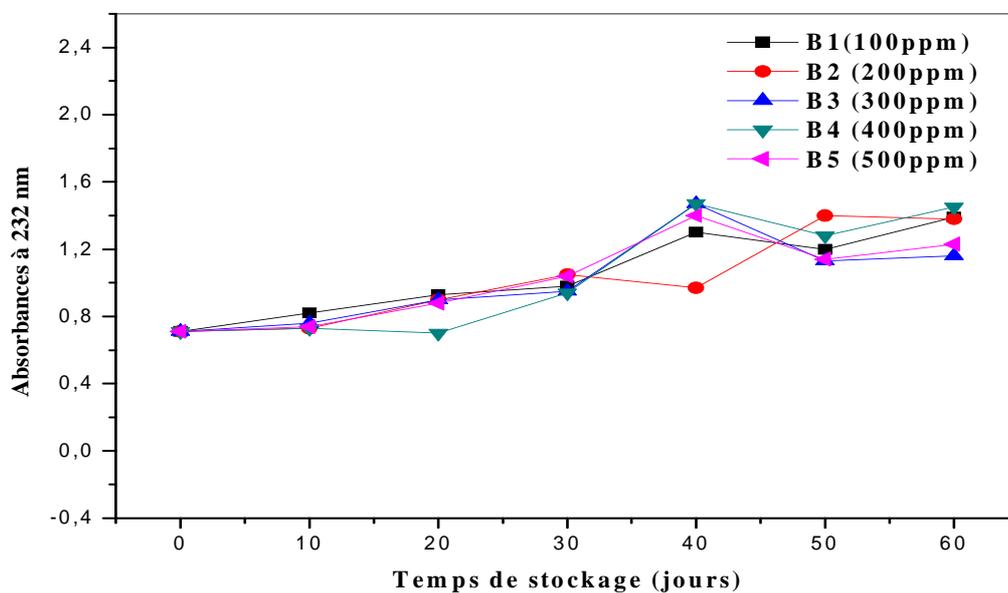
Les réactions d'isomérisation aboutissent à la formation de diènes et de triènes conjuguées qui absorbent la lumière dans le domaine UV entre 225 nm et 280 nm [87]. En effet, les diènes conjugués et les produits primaires d'oxydation des acides gras se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical alkyle des acides gras polyinsaturés, lorsqu'ils ont une structure diénique conjuguée tel que l'hydroperoxyde linoléique, absorbent la lumière au voisinage de 232 nm. Les triènes conjugués (dans le cas de la présence d'acides gras à trois doubles liaisons) et les produits secondaires d'oxydation tels que les aldéhydes et cétones  $\alpha$ -insaturés, absorbent la lumière vers 270 nm. La détermination des absorbances au voisinage de 232 nm et au voisinage de 270 nm permet de détecter et d'évaluer les quantités des produits d'oxydation : plus l'extinction à  $\lambda=232$  nm est forte, plus elle est peroxydée. De même plus l'extinction à  $\lambda=270$ nm est forte, plus elle est riche en produits d'oxydation secondaires et traduit une faible aptitude à la conservation [21]. Le tableau 18 ainsi que les figures 31, 32, 33 et 34 donnent l'évolution des absorbances à 232 nm pour tous les échantillons d'huile étudiée.

**Tableau 18 :** Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques.

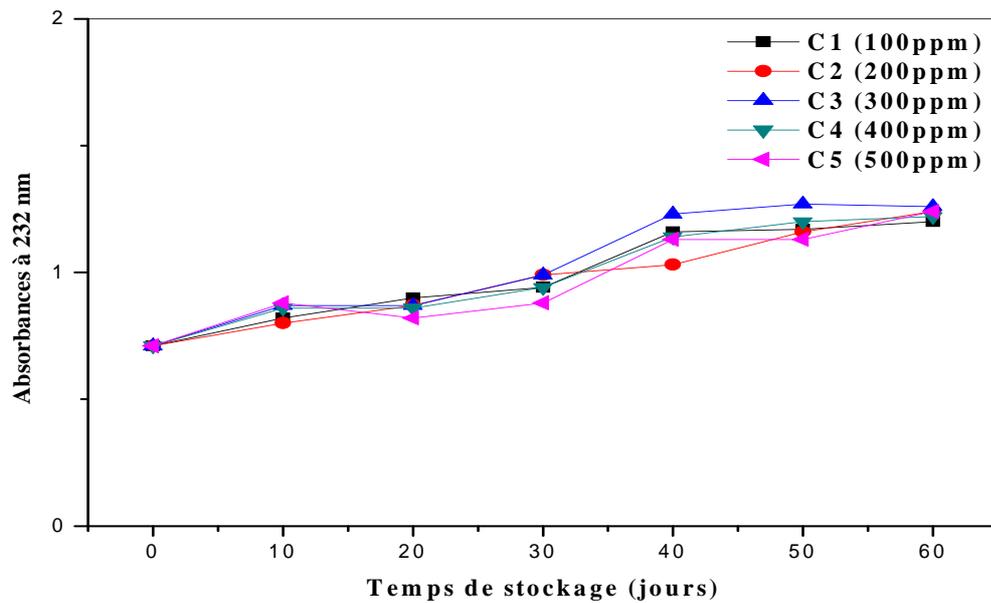
A <sub>232</sub>	Echantillon	A1 (100ppm)	A2 (200ppm)	A3 (300ppm)	A4 (400ppm)	A5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
	10	0,83	0,72	0,77	0,79	0,75
	20	0,90	0,77	0,93	0,88	0,88
	30	1,04	0,97	0,95	1,11	0,93
	40	1,49	1,61	1,63	1,64	0,79
	50	1,36	1,23	1,22	1,22	1,37
	60	1,48	1,08	1,33	1,43	1,44
	Echantillon	B1 (100ppm)	B2 (100ppm)	B3 (300ppm)	B4 (400ppm)	B5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
	10	0,82	0,73	0,76	0,73	0,74
	20	0,93	0,90	0,90	0,70	0,88
	30	0,98	1,05	0,95	0,94	1,04
	40	1,30	0,97	1,47	1,47	1,40
	50	1,20	1,40	1,13	1,28	1,14
	60	1,39	1,38	1,16	1,45	1,23
	Echantillon	C1 (100ppm)	C2 (100ppm)	C3 (300ppm)	C4 (400ppm)	C5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
	10	0,82	0,80	0,87	0,86	0,88
	20	0,90	0,87	0,87	0,86	0,82
	30	0,94	0,99	0,99	0,94	0,88
	40	1,16	1,03	1,23	1,14	1,13
	50	1,17	1,16	1,27	1,20	1,13
	60	1,20	1,24	1,26	1,22	1,24
	Echantillon	T (0ppm)	AG (100ppm)	AG (200ppm)		
Durée de stockage (jours)	0	0,71	0,71	0,71		
	10	0,70	0,81	0,72		
	20	0,91	0,86	0,69		
	30	1,02	0,78	0,75		
	40	1,58	1,14	0,89		
	50	1,39	1,00	0,88		
	60	1,41	0,87	0,88		



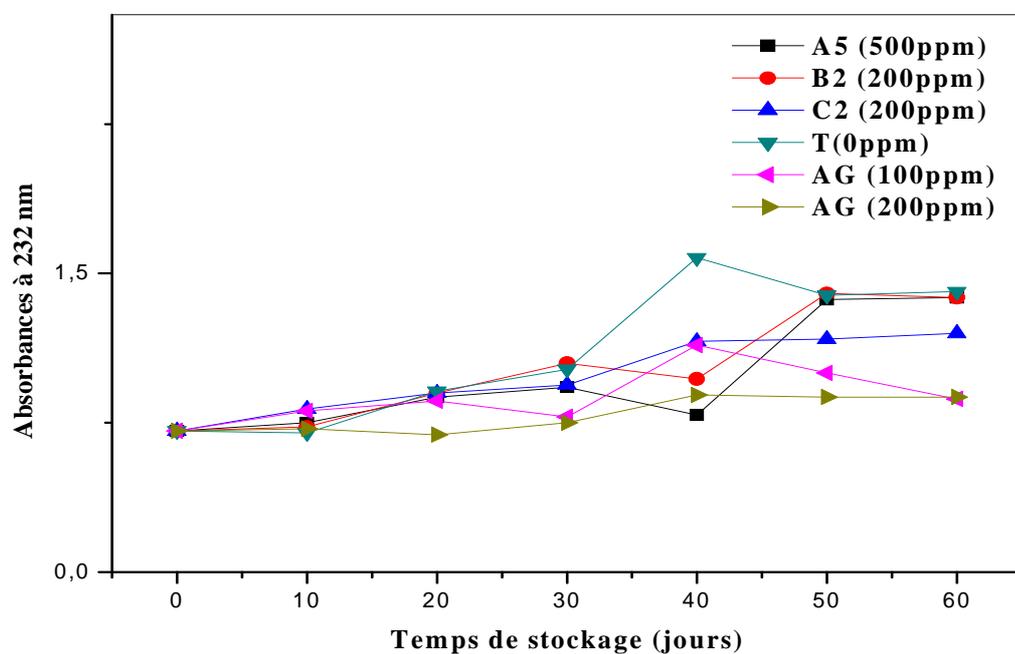
**Figure 31** : Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.



**Figure 32** : Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des raisins et de la durée de stockage.



**Figure 33** : Evolution des absorbances à 232nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.



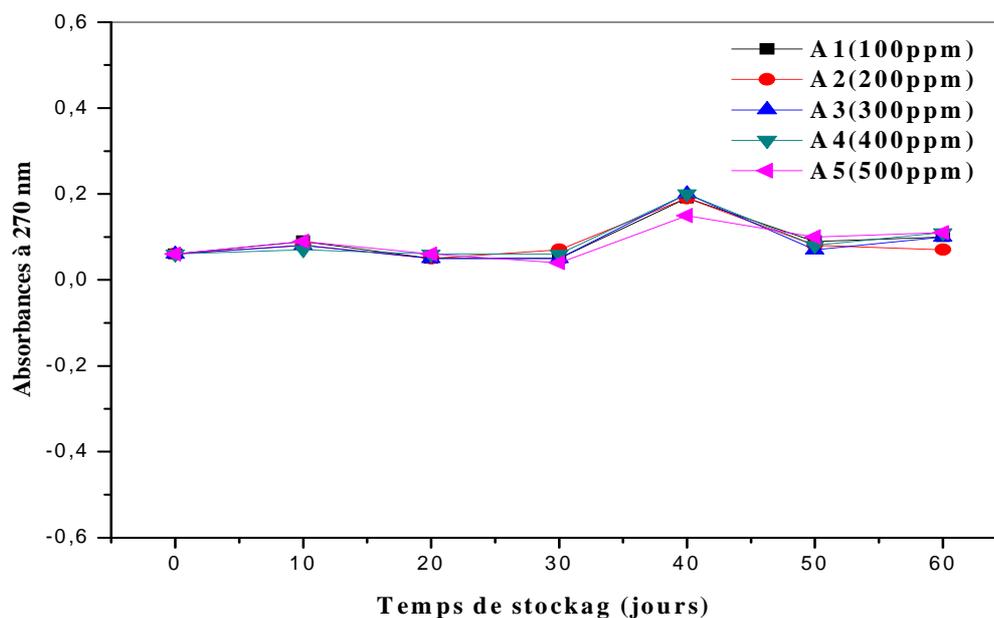
**Figure 34** : Evolution des absorbances à 232 nm des échantillons d'huile d'olive aux quels sont ajoutés les antioxydants des margines (500ppm), des raisins (200ppm), des feuilles d'olivier (200ppm) et de synthèse ainsi que celle du témoin.

D'après les valeurs dressées dans le tableau 18 et illustrées par les figures 31, 32, 33 et 34, les absorbances à 232 nm de tous les échantillons ont tendance à augmenter, celles-ci oscillent entre 0,71 et 1,64 pour les échantillons de la série A, entre 0,71 et 1,47 pour ceux de la série B et entre 0,71 et 1,26 pour ceux de la série C. Les valeurs les plus élevées pour la série A (figure 31) et la série B (figure 32) ainsi que celle de l'échantillon témoin (figure 34) sont remarquées après 40 jours de stockage, au-delà de cette période, ces valeurs commencent à diminuer à l'exception des valeurs des échantillons A5 (500ppm) et B2 (200ppm) qui ont tendance à augmenter durant toute la période de conservation. Cette diminution de l'absorbance à 232 nm de ces échantillons d'huiles d'olive ne peut pas être associée exclusivement à la décomposition des hydroperoxydes (diminution de l'indice de peroxyde), mais cela peut être expliqué par le type d'hydroperoxydes formés qui sont inactifs et restent stables après leurs formation (deuxième étape de la propagation). Par ailleurs, tous les échantillons de la série C (figure 33), ainsi que ceux de la série R (figure 34) présentent une légère augmentation continue des valeurs de l'absorbance pendant toute la période de stockage. Ils sont donc à la première étape de la propagation qui correspond à la formation des peroxydes mais pas des hydroperoxydes.

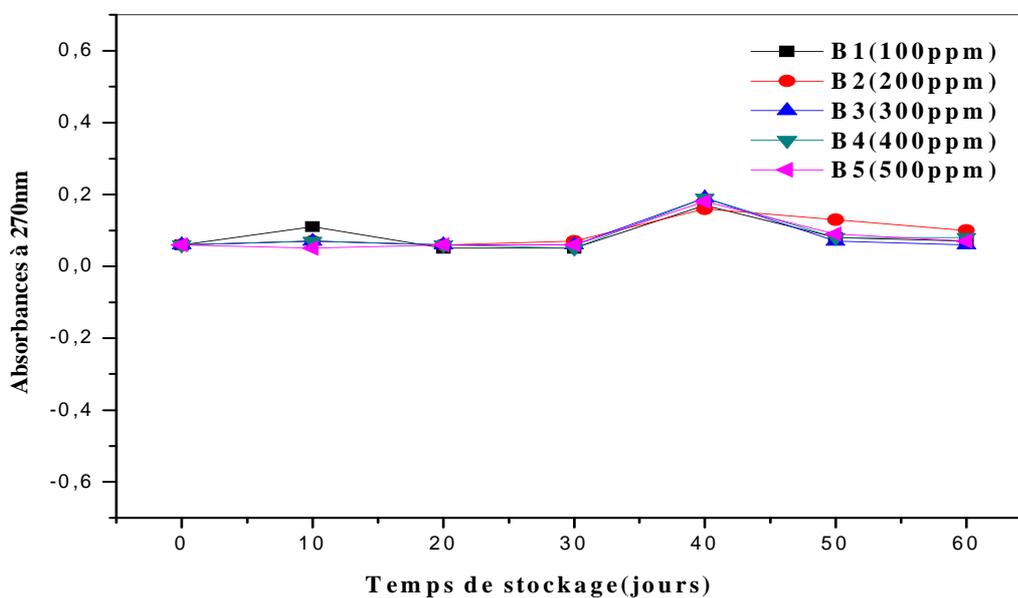
L'oxydation des lipides croît avec l'augmentation de la concentration en composés résultant de la dégradation des hydroperoxydes, cela est confirmé par une augmentation des valeurs de l'absorbance à 270 nm [2]. L'extinction à 270nm permet de déterminer la prolifération de l'oxydation, les produits secondaires d'oxydation et en particulier les  $\alpha$ -dicétones. Cette évolution de l'absorbance pour les échantillons d'huile d'olive est donnée par le tableau 19 et représentée par les figures 35, 36, 37 et 38.

**Tableau 19** : Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile d'olive en fonction de la durée de stockage et de la concentration en extraits phénoliques

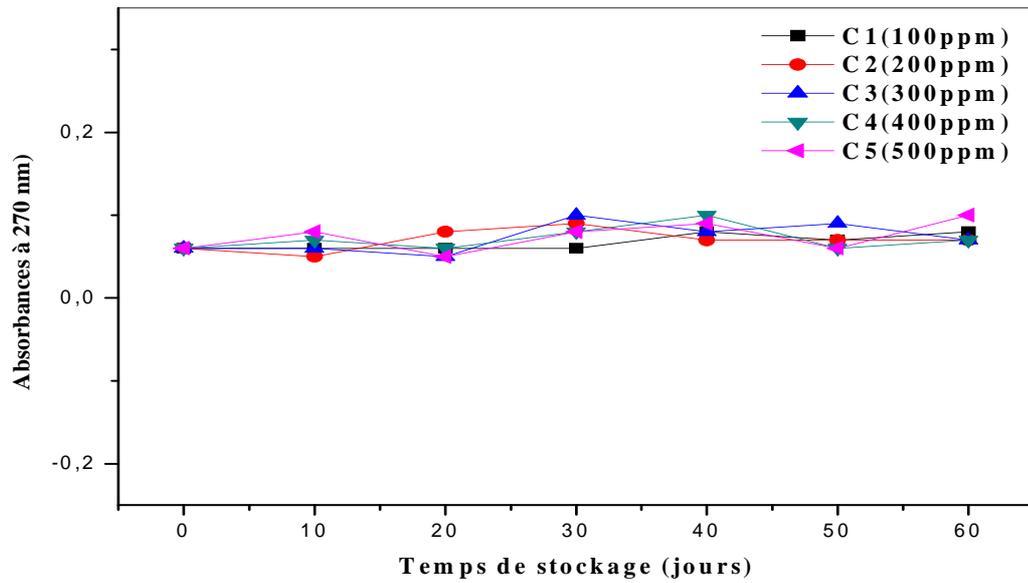
A <sub>270</sub>	Echantillon	A1 (100ppm)	A2 (200ppm)	A3 (300ppm)	A4 (400ppm)	A5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	10	0,09	0,08	0,08	0,07	0,09
	20	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06
	30	0,05	0,07	0,05	0,06	0,04
	40	0,19	0,19	0,20	0,20	0,15
	50	0,09	0,08	0,07	0,08	0,10
	60	0,10	0,07	0,10	0,11	0,11
	Echantillon	B1 (100ppm)	B2 (100ppm)	B3 (300ppm)	B4 (400ppm)	B5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	10	0,11	0,07	0,07	0,07	0,05
	20	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
	30	0,05	0,07	0,06	0,05	0,06
	40	0,17	0,16	0,19	0,19	0,18
	50	0,08	0,13	0,07	0,08	0,09
	60	0,07	0,10	0,06	0,08	0,07
	Echantillon	C1 (100ppm)	C2 (100ppm)	C3 (300ppm)	C4 (400ppm)	C5 (500ppm)
Durée de stockage (jours)	0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	10	0,06	0,05	0,06	0,07	0,08
	20	0,06	0,08	0,05	0,06	0,05
	30	0,06	0,09	0,10	0,08	0,08
	40	0,08	0,07	0,08	0,10	0,09
	50	0,07	0,07	0,09	0,06	0,06
	60	0,08	0,07	0,07	0,07	0,10
	Echantillon	T (0ppm)	AG (100ppm)	AG (200ppm)		
Durée de stockage (jours)	0	0,06	0,06	0,06		
	10	0,06	0,07	0,05		
	20	0,06	0,07	0,06		
	30	0,05	0,05	0,05		
	40	0,18	0,17	0,09		
	50	0,09	0,10	0,08		
	60	0,08	0,08	0,10		



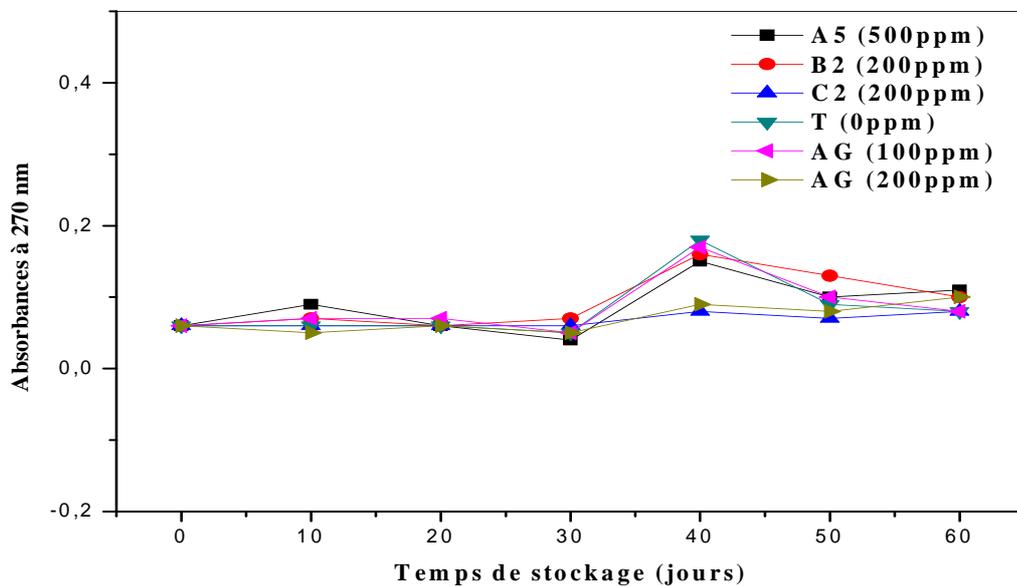
**Figure 35 :** Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des margines et de la durée de stockage.



**Figure 36 :** Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des raisins et de la durée de stockage.



**Figure 37 :** Evolution des absorbances à 270nm des échantillons d'huile en fonction de la concentration en extraits phénoliques des feuilles d'olivier et de la durée de stockage.



**Figure 38 :** Evolution des absorbances à 270 nm des échantillons d'huile d'olive aux quels sont ajoutés les antioxydants des margines (500ppm), des raisins (200ppm), des feuilles d'olivier (200ppm) et de synthèse ainsi que celle du témoin.

Les valeurs des absorbances à 270nm des échantillons d'huile auxquels sont incorporés les extraits phénoliques des margines oscillent entre 0,06 et 0,20 (figure 35), celles des échantillons d'huile auxquels sont additionnés les extraits phénoliques des raisins varient entre 0,06 et 0,19 (figure 36), tandis que celles de la série C et celles des échantillons auxquels est additionné l'antioxydant de synthèse à une concentration de 200ppm varient peu (figures 37 et 38), elles passent de 0,06 à 0,10. Les valeurs de l'échantillon témoin et celles des échantillons additionnés de l'acide gallique à une concentration de 100ppm varient respectivement entre 0,06 et 0,18 et entre 0,06 et 0,17. Cette augmentation est très légère pour tous les échantillons d'huile. Nous remarquons d'après la figure 38 que l'échantillon d'huile noté C2 ainsi que celui auquel est additionné l'acide gallique à 200ppm semblent avoir la même allure. Les résultats trouvés pour cette analyse coïncident avec les valeurs de l'indice de peroxyde qui ont tendance à augmenter légèrement durant toute la période de conservation, cela pourrait signifier que la propagation de l'oxydation de l'huile d'olive n'a pas atteint son stade final (décomposition des hydroperoxydes). Cette résistance à l'oxydation peut être due aux conditions de stockage (obscurité) car le mécanisme de la photo-oxydation est beaucoup plus rapide que celui de l'auto-oxydation. Caponio et al [88] ont trouvé qu'après deux mois de stockage, les composés d'oxydation secondaire sont majoritaires dans les huiles stockées sous lumière diffuse, comme en témoigne le  $K_{270}$ , tandis que dans les huiles d'olive stockées à l'obscurité, ce sont les composés d'oxydation primaire qui prédominent, comme en témoigne le  $K_{232}$ .

### 3.2. Calcul de $\Delta K$

Pour distinguer l'absorption due aux produits secondaires d'oxydation de celle due aux systèmes conjugués (la structure triénique), nous déterminons le paramètre  $\Delta K$  et ceci par mesure de l'absorption à 264 et à 274nm, c'est-à-dire les absorbances au voisinage de 270 nm. La valeur de  $\Delta K$  ne devrait pas dépasser 0,01 pour les huiles vierges. Le tableau 20 nous renseigne sur les caractéristiques physiques de l'huile d'olive étudiée.

**Tableau 20 :** Valeurs des extinctions spécifiques à 232, 264, 270 et à 274 nm et de  $\Delta K$  de tous les échantillons d'huile d'olive à l'état initial

Echantillon	K232	K264	K270	K274	$\Delta K$
HOV	3,55	0,30	0,30	0,25	0,02

D'après les valeurs consignées dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que les valeurs des extinctions spécifiques  $K_{232}$  et  $K_{270}$  de cette huile sont légèrement supérieures à celles fixées par le COI(2003) qui sont respectivement  $\leq 2,50$  et  $\leq 0,22$ . Pour cela nous pouvons dire que l'huile d'olive faisant l'objet de cette étude présentait initialement des produits primaires d'oxydation.

Après 60 jours de stockage, les valeurs des extinctions spécifiques  $K_{232}$  et  $K_{270}$  ainsi que celle de la variation de  $\Delta K$  de tous les échantillons d'huile d'olive sont représentées sur le tableau 21.

**Tableau 21** : Valeurs des extinctions spécifiques à 232, 264, 270 et 274 nm et de  $\Delta K$  de tous les échantillons d'huile d'olive à la fin de la conservation

Echantillon	K232	K264	K270	K274	$\Delta K$
A1 (100ppm)	7,40	0,55	0,50	0,40	0,02
A2 (200ppm)	5,40	0,35	0,35	0,30	0,02
A3 (300ppm)	6,65	0,50	0,50	0,50	0,00
A4 (400ppm)	7,15	0,60	0,55	0,50	0,00
A5 (500ppm)	7,20	0,60	0,55	0,50	0,00
B1 (100ppm)	6,95	0,40	0,35	0,30	0,00
B2 (200ppm)	6,90	0,55	0,50	0,45	0,00
B3 (300ppm)	5,80	0,35	0,30	0,25	0,00
B4 (400ppm)	7,25	0,40	0,40	0,35	0,02
B5 (500ppm)	6,15	0,35	0,35	0,30	0,02
C1 (100ppm)	6,00	0,40	0,40	0,35	0,02
C2 (200ppm)	6,20	0,40	0,35	0,30	0,00
C3 (300ppm)	6,30	0,40	0,35	0,30	0,00
C4 (400ppm)	6,10	0,40	0,35	0,40	-0,05
C5 (500ppm)	6,20	0,55	0,50	0,40	0,02
Témoin (0ppm)	7,05	0,45	0,40	0,35	0,00
AG (100ppm)	4,35	0,45	0,40	0,35	0,00
AG (200ppm)	4,40	0,50	0,50	0,45	0,02

Nous remarquons d'après le tableau 21 que les valeurs de  $K_{232}$  de tous les échantillons d'huile d'olive ont évolués d'une manière significative. Elle passe de 3,55 à 7,40 pour l'échantillon A1, elle atteint une valeur de 7,25 pour l'échantillon B4. L'augmentation est moins accentuée pour la série C. Les valeurs les plus petites de  $K_{232}$  sont observées pour les échantillons d'huile additionnés de l'acide gallique à deux différentes concentrations, elle est de 4,35 pour la concentration de 100ppm et de 4,40 pour celle de 200ppm. Quant aux valeurs

de  $K_{270}$ , elles semblent moins évoluées par rapport à celles de  $K_{232}$ . La valeur limite après 60 jours de conservation n'avait pas dépassé 0,5 pour tous les échantillons d'huile. Les résultats du tableau 21 confirment ceux trouvés avec l'indice de peroxyde qui montrent que cette huile n'a pas dépassé la deuxième étape de la propagation de l'oxydation (décomposition des hydroperoxydes et formation des composés non radicalaires). Quant à la valeur de  $\Delta K$ , elle semble un peu élevée par rapport à celle fixée par le COI (2003) malgré que l'huile d'olive étudiée n'a pas atteint l'étape de formation des composés secondaires d'oxydation, cela peut être alors expliqué par la migration des doubles liaisons le long de la chaîne grasse (triènes conjugués).

# ***CONCLUSION***

## **CONCLUSION**

L'objectif de ce travail était d'extraire les composés phénoliques à partir des margines, des feuilles d'olivier et des raisins. Ensuite, nous avons accentué notre étude sur l'effet antioxydant de ces derniers sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Cet effet est comparé aussi à celui de l'acide gallique employé comme référence.

Les premiers résultats de l'étude indiquent que la teneur la plus importante en composés phénoliques est celle correspondant aux feuilles d'olivier. Elle est 2,5 fois plus grande que celle des margines. Quant aux raisins, leur teneur en polyphénols est la plus faible.

L'analyse de l'acidité de l'huile étudiée montre que celle-ci appartient à la catégorie des huiles d'olive vierge lampantes, et que l'incorporation des antioxydants n'a pas d'influence sur ce paramètre.

L'indice d'iode est resté presque constant tout au long de la durée de conservation pour tous les échantillons d'huile car ce dernier n'est pas influencé par le temps mais il dépend de la composition de l'huile d'olive en acides gras.

En dehors de l'acidité, et de l'indice d'iode, tous les autres paramètres (indice de peroxyde et extinctions à 232 nm et à 270 nm) semblent évoluer de manière positive en présence d'antioxydants par rapport à ceux de l'échantillon témoin.

La valeur initiale de l'indice de peroxyde de l'huile ayant fait l'objet de cette étude est légèrement supérieur à la valeur donnée par le COI ce qui serait dû à l'existence de composés peroxydés, car l'oxydation de l'huile d'olive commence après que les olives soient cueillies de l'arbre, et continue pendant le stockage des fruits et leurs traitement (campagne oléicole 2009/2010 où le rendement en olive était faible).

L'indice de peroxyde diminue au fur et à mesure que la concentration en composés phénoliques des margines et ceux des raisins augmentent, la protection maximale correspond à des ajouts de 500ppm dans les deux cas. Quant aux extraits phénoliques des feuilles d'olivier, les concentrations qui exercent une meilleure protection antioxydante de l'huile d'olive est remarquée pour des concentrations de 100 et 200 ppm. L'antioxydant de synthèse (acide gallique) est plus efficace, l'huile additionnée de ce dernier est moins peroxydée avec un indice de peroxyde 1,6 fois inférieur à celui de l'huile d'olive témoin. La concentration de 200ppm en acide gallique protège mieux l'huile d'olive contre l'oxydation que la concentration de 100ppm.

Les mesures spectrophotométriques dans l'UV Visible montrent que l'huile étudiée présente des valeurs des extinctions à 232 nm et à 270 nm égales respectivement à 3,55 et 0,50. Ces valeurs sont légèrement élevées par rapport à celles fixées par les normes du COI. L'huile d'olive à laquelle sont incorporés les extraits phénoliques des margines et ceux des raisins a atteint la deuxième étape de propagation à 40 jours de stockage (formation des hydroperoxydes), cela est traduit par l'évolution de l'absorbance à 232 nm. Tandis que les échantillons d'huile additionnés de composés phénoliques des feuilles d'olivier restent à la première étape de propagation durant toute la période de conservation, cette étape correspond à la formation des peroxydes mais pas des hydroperoxydes. L'huile d'olive protégée par l'antioxydant de synthèse suit la même allure que l'huile d'olive à laquelle est ajouté l'acide gallique à 200ppm mais ce dernier semble exercer la meilleure protection comparativement à tous les autres antioxydants employés lors de la réalisation de cette étude. Quant à l'évolution de l'absorbance à 270 nm, elle est presque constante durant toute la période de stockage. Cette résistance à l'oxydation est due à l'absence de la lumière puisque l'huile est protégée par des composés phénoliques qui sont par ailleurs les plus sollicités pour résister à l'oxydation.

L'examen des résultats auxquels nous sommes parvenus nous mène à la conclusion suivante :

- la concentration optimale pour la protection de l'huile d'olive contre l'oxydation dans le cas de l'incorporation des extraits phénoliques des margines et ceux des raisins est observée pour des ajouts de 500 ppm. Cette protection est améliorée lors de l'addition des extraits phénoliques des feuilles d'olivier mais à une concentration minimale égale à 100 ppm. L'échantillon d'huile présentant des valeurs minimales de l'indice de peroxyde et de l'absorbance à 232 nm est celui auquel est additionné de l'acide gallique à 200 ppm.
- Lors du stockage des huiles d'olive vierges, la teneur en composés antioxydants décroît. Cependant, selon les conditions de stockage, lumière ou obscurité, ce ne sont pas les mêmes composés qui sont dégradés. Dans le cas d'un stockage à l'obscurité, ce sont les composés phénoliques qui sont les plus sollicités pour résister à l'oxydation.

Toutefois dans l'intérêt d'apporter un apport complémentaire à cette étude, il serait intéressant d'effectuer d'autres analyses telles que :

- la détermination des différents constituants des composés phénoliques étudiés.
- l'étude de l'influence de la lumière sur l'oxydation de ces composés phénoliques.
- la variation de la composition de l'huile en acides gras lors de la conservation.

***REFERENCES***

***BIBLIOGRAPHIQUES***

- [1]- Aliments fonctionnels ou possible appoint thérapeutique de demain. Journal « ELWatan » 9 septembre 2010.
- [2]- Ana Isabel Mendez, Elena Falqué (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra virgin olive oil. *Food control* 18 521-529.
- [3]- S.Gonez.Alonso, M.D Salvador and G.Fregapane. Evolution of The oxydation process in olive oil triacylglycerol under accelerated storage conditions (40-60°C).13071 Cindad Read, Spain.
- [4]- Joaquin Velasco, Carmen Dobarganes (2002). Oxydative stability of virgin olive oil. *Eur. J.Lipidsc Technol.*104 661-676.
- [5]- H.Chimi, A.Sadik, B Le Tutour, M Rahmani (1988). Contribution à L'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine et du BHT ; *Revue française des corps gras* ; N° 8/9 ; 339-343.
- [6]- Kessous.C. 1987. *Biochimie structurale*, édition OPU. p 9-42
- [7]- L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique ; thèse de doctorat soutenue par Stéphanie HENRY Le 26 septembre 2003 ; université Henri Poincaré - NANCY 1 ; faculté de pharmacie.
- [8]- Pr. A. Raisonnier. Lipides et lipoprotéines, Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie Métabolique et Régulations 2003-2004.
- [9]- Lavoisier, Paris. *Lipides et corps gras alimentaires*, édition technique et alimentaire.
- [10]- V.01 / 2002 Fiche d'information. Généralités corps gras.
- [11]- Yaacoub. R., Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux ; l'intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés ; thèse de doctorat; N° 2009AGPT 0048; Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).
- [12]- St Angelo. J. A 1996., *Lipid oxidation in foods. Critical reviews in food science and nutrition*, **36** (3), 175-224.
- [13]- Judde. A., Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *oclvol.* 11 N° 6 novembre-décembre 2004.
- [14]- Ames J.M., Defaye A.B., Bailey R.G., Bates L 1998. Analysis of the non-volatile Maillard reaction products formed in an extrusion-cooked model food system. *Food hem.*, 61, 521-524.
- [15]- Wolff. J.P (1968). In: *Manuel d'analyse des corps gras* ; Azoulay éditeur, Paris.
- [16]- Rialland. J.P (1972). « Proposition d'amélioration du test accéléré d'oxydation. Application aux suifs de boeuf » ; *Rev.Fse Corps Gras* 1 : 37-42.

- [17]- Ben Hassine.K.,Bouchoucha.S., Kamoun.N ., Impact de la variété et du système d'extraction de l'huile d'olive sur les préférences consommateurs ; Institut de l'olivier de Sfax et Institut National Agronomique de Tunisie.
- [18]- Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité ; bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA ; Juin 2006 ; N 141.
- [19]- Conseil oléicole international (COI) ; 2003 ; Normes internationales applicables aux huiles d'olives et aux huiles de grignon d'olives ; COI/ T15/NC N°3.
- [20]- Conseil oléicole international (COI) 1996 ; Normes commerciales applicables aux huiles d'olives et aux huiles de grignon d'olive ; COI/T15/NCN°2.
- [21]- Wolff J.P ;(1968). Méthodes générales d'analyse ; dosage des produits d'oxydation. Ed ; Azoulay ; Paris : 259-266 .
- [22]- Kiritsakis. A; Markakis. P; Olive oil: a review. Adv. Food Res ,1987,31:453-82.:453-82.
- [23]- Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D (2000). alpha-tocopherol content of Greek virgin olive oils. J Agric. Food Chem. 48:1770-5.
- [24]- Gutierrez F, Jimenez B, Ruiz A, Albi MA (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. J Agric. Food Chem; 47:121-7.
- [25]- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. (2000)., Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignansandsqualene. Food Chem. Toxicol. 38:647-59.
- [26]- Kubo A, Lunde CS, Kubo I. (1995)., Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. J Agric.FoodChem; 43:1629-33.
- [27]- Ahmidou Ouaouich (ONUUDI) et Hammadi Chimi (IAV Hassan II) ; (2007). Guide du producteur de l'huile d'olive ; Organisation des nations unies pour le développement industriel ; Vienne.
- [28]- Llor. X; (2003). The effects of fish oil, olive oil ,oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes ; Clinical Nutrition, 22 (1), p71-79.
- [29]- ALARGON DE LA LASTRA C; Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil; Curr.Pharm.Dis., 2001, jul, 7 (10), p933-950.
- [30]- Bosetti. C; (2000). Institut de recherche pharmacologique « Mario Negri» (Milan, Italie) ; Intertional Journal of Cancer, 87, 2, p289-294.
- [31]- Kushi. L.H; (1995). Health implications of mediterranean diets in light of contempory knowledge; Am.J.Clin.Nutr., 61, p1416-1427.
- [32]- Costa. F; (2002). Non-pharmacological treatment of hypertension in women; Journal of hypertension., 20, Sup n02: p57-61.

- [33]- Charbonnier. A ;(1996). L'huile d'olive, aliment santé ; Edition Frison Roche ; p 282
- [34]- Ben Tekaya.I; Hassouna.M; Effets des chlorophylles, du beta carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne ; OCL Vol 14 N°1 Janvier- Février 2007.
- [35]- M.Rahmani ; Photooxydation des huiles d'olive : Influence de la composition chimique ; Revue française des corps gras ; 36° année N° 9 /10- Septembre/ Octobre 1989.
- [36]- Turrens. JF., Alexandre .A., Lehninger. AL. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch BiochemBiophys, 237: 408-414.
- [37]- Halliwell. B. (1999). How to characterize a biological antioxidant.Free RadicRes Commun, 9, 1-32.
- [38]- Perrin J.L., (1992). Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. Revue française des corps gras. N° 39. P 25-32.
- [39]- Actifs et additifs en cosmétologie. Marie-Claude Martini, Monique Seiller Coordonnatrices. Éditions Tec & Doc ISBN : 2-7430-0191-7 .p.337 à 352.
- [40]- Sebei.K., Boukhchina.S., Kallel. H. (2007). Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*BrassicinapusL.*). C. R. Biologies 330 ,55–61.
- [41]- Rock.E ; stress oxydant, micronutriments et santé ; INRA – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments ; 63122 st genèschampanelle.
- [42]- Le Moel. G., Saverot-Dauvergne. A., Gousson. T.(1998). Le statut vitaminique. France : Editions Médicales Internationales, p 550.
- [43]- Justine PASTRE ., Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat. 2005-TOU3-4116.
- [44]- Ba.K., Tine.E., Destain.J., Cissé.N., Thonart.P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14(1), 131-139.
- [45]- Ribéreau-Gayon P, 1968. Les composés phénoliques des végétaux.
- [46]- Herbert, R.B., (1989). The Biosynthesis of secondary metabolites.2éme édition Chapman and Halle. p 2, 11-115.
- [47]- Harborne, J.B., (1980). Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds, Springer-Verlag, Berlin, p.329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux.
- [48]- Bruneton.J., Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, Eds. Technique etdocumentation Lavoisier, Paris (1999).

- [49]- Budic-Leto, T. Lovric, J. *Food Technol. and Biotechnol.*; 2002. 40 (3), 221–225.
- [50]- Spencer. J. P. E., et Vauzour. D. Les effets des flavonoïdes sur la mémoire et l'apprentissage ; *Molecular Nutrition Group, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading*; janvier 2009.
- [51]- Puppo, A. (1992). Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, 31(1):85-88.
- [52]- Doat. J. Les tanins dans les bois tropicaux. *Revue bois et forêts des tropique* N°182, Novembre- Décembre 1978.
- [53]- V.V.Cheyrier, J.M.Souquet, H.Fulcrand, P.Sarni, M.Moutounet ; Stabilisation tannins-anthocyanes données générales. 8 juillet 1998. Extrait de " les composés phénoliques" journée technique (compt rendu).
- [54]- Khoufi. S; Feki. F; Sayadi. S., (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*. 142, 58-67.
- [55]- Bazoti F.N., Gikas E., Skaltsounis A.L, Tsiropoulos A., (2006). Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta*. 573–574, 258–266.
- [56]- Noubih .A; Abderrabba; M. Provost E ; (2007). Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J.Chem.Thermodynamics*. 39, 297-303.
- [57]- Nefzaoui. A ; (1991). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Options méditerranéens*. 153-173.
- [58]- Rodis P.S; Karathanos V.T; Mantzavinou A; (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 596-601.
- [59]- Servili .M; Baldioli M; Selvaggini R; Miniati E; Macchioni A; Montedoro G; (1999). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 76, 873-882.
- [60]- Lasage. Meesen L; Navarro D ; Maunier S ; Sigoillot J-C ; Lorquin J ; Delattre M ; et al. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as function of extraction systems. *Food Chem*. 75: 501-7.
- [61]- Léger C.L; Coproduits de l'huilerie d'olive : les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *Oléagineux corps gras lipides: volume 6, numéro 1, Janvier/Février 1999*.

- [62]- Atanassova D; Kefalasa P; Psillakis E.,(2005). Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environment International*. 31, 275– 280.
- [63]- Bouaziz.M : Production et caractérisation de molécules bioactives à partir de deux plantes médicinales : oleaeuropaeal. et hyparrheniahirtal. stapf. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en chimie, faculté des sciences de sfax.
- [64]- Hartzallah.H et Kiritsakis.A ; Effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier ; N°77. Juin1999.
- [65]- Owen. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 2003 May; 41(5):703-17.
- [66]- Kouame. A. E .F : Etude de la migration des antioxydants phénoliques dans les boissons en sachet (Abidjan- cote d'ivoire). Thèse de doctorat en pharmacie .28 juin 2004 N° 26. Université Cheikh anta diop de Dakar.
- [67]- *Biochemical Society Transactions* 24 (1996): 790-794.
- [68]- *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996): 3426-3431.
- [69]- Moussaoui.R ; Siziani.D; Youyou.A; Sharrock.P and M.L.Fiallo.M. (2010). Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol.8 (3& 4): 8 6 - 8 9.
- [70]- Ünal, M. K., (1994). Polyphénols, o-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et les margines. *Olivæ*. 51:34–35.
- [71]- Almi, D. 2010. Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits phénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété chemlal sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation: huile d'olive et huile de tournesol. Mémoire de magister en sciences biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
- [72]- Chimi H., (2010). Qualité des huiles d'olive au Maroc, programme national de transfert devirgin olive oil. Prediction of storage time beyondwhich the oilis no longer of “extra” quality. *technologie en agriculture–bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA*..Vol.79, p: 1-4.
- [73]- Dugo G; Turco V L ; Pomllicino D; Mavrogeni E et Pipitone F ; (2004). Caractérisation d'huiles d'olive vierges sicillienne ; *Olivæ* ; N°101 :44-52.
- [74]- Boscou D; (1996). Olive Oil Composition. In *Olive Oil: Chemistry and Technology*. AOACS Press, USA, 52-83, 85-127.

- [75]- Denisse.N., Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire de diplôme d'études approfondies (DEA). Option contrôle et qualité. Agence universitaire de la Francophonie.
- [76]- Fodil.S., Etude de l'effet synergique du bêta carotène et de la vitamine E sur la stabilité oxydative de trois types d'huile d'olive issues de trois régions différentes ; Côtière, plaine et montagnaise. Mémoire d'ingénieur. Option contrôle qualité et analyses. Université Mouloud Mammeri de tizi ousou.
- [77]- Machlin.L. (1980). Vitamin E., A Comprehensive Treatise, Marcel Decker Inc., New York.
- [78]- Baldioli M; Servili I. M; Perreti G; Montedoro G.F; (1996). Antioxydant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. JAOCS 73, 1589-1593.
- [79]- Pirisi F; Angioni A; Cabras P; Garau V; Sanjust di Teulada M.T; Karim dos Santos M., Bandino G.,(1997). Phenolic compounds in virgin olive oils I. low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performanceliquid chromatography under isocratic elution. J. Chromatogr. 768, 207-213.
- [80]- Cillard, J; Cillard, P. (1980). Pro-oxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation,
- [81]- Baldioli.M., Servili.M., Perretti.G., Montedoro.G.(1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil, J. Am. OilChem. Soc; 73, 1589-1593.
- [82]- Kiritsakis. A; C.M.Stine and L.R. Dugan. (1983). Effect of selected antioxidants on the stability of virgin olive oil; J. Am. OilChem. Soc; 50; 1289-1290.
- [83]- Tchiégang.C., Ngo Oum.M., Dandjouma.A.A., Kapseu.C; Qualité et stabilité de l'huile extraite par pressage des amandes de Ricinodendron heudelotii (Bail.) Pierre ex Pax pendant la conservation à température ambiante ; Mars(2004) ; volume 62 ; pp 69-77.
- [84]- Ben Temmime S., Taamalli W., Baccouri B., Abaza L., Daoud. D et Zarrouk M. (2006). Changes in olive oil quality of Chétoui variety according to origin of plantation. Journal of Food Lipid. 13 : 88-99.
- [85]- Martinez Suarez J ; (1973). Recientes estudios de la almazara experimental del instituto de la grasa. Riv. Ital. Dell Sost. Gr, 50 : 325-330.
- [86]- Benabid.H : Caractérisation de l'huile d'olive algérienne ; Apports des méthodes chimiométriques ; thèse de doctorat. Option Sciences Alimentaires. Université Mentouri de Constantine.
- [87]- Yadav.M.K., Chudasama.C.D., Jasra.R.V. (2004). Isomerisation of  $\alpha$ -pinene using modified montmorillonite clays, J. Mol. Catal. A Chem., 216, 51-59.
- [88]- Caponio et al., (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage; European Food Research and Technology. 221(1-2), 92-98.

# ***ANNEXES***

**Annexe 1 : Détermination de la teneur en composés phénoliques :****1.1. Réactifs**

- Hexane pur
- Méthanol pur
- Réactif de Folin Ciocalteu
- Solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) saturée
- Solution standardisée d'acide gallique de concentration pondérale égale à 0,4g/l
- Eau distillée

**1.2. Mode opératoire**

On détermine d'abord la courbe d'étalonnage : on dilue la solution standardisée d'acide gallique de manière à avoir les concentrations suivantes : 0,2, 0,1, 0,05 et 0,025g/l. on dilue 0,5ml de chacune de ces solutions dans 10ml d'eau distillée puis on ajoute 0,5ml du réactif de Folin Ciocalteu et on laisse reposer trois minutes. On ajoute ensuite 1ml de la solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , la couleur bleue commence à apparaître. Après 1 heure du temps, on mesure la densité optique de ces solutions avec un spectrophotomètre UV-Visible à 750 nm.

Pour déterminer la teneur des composés phénoliques, on dissout d'abord ces extraits phénoliques dans du méthanol pur puis on effectue les mêmes opérations que celles employées pour les solutions standardisées.

**Annexe 2 : Détermination de l'acidité :****2.1. Réactifs**

- Ether diéthylique
- Ethanol à 96% en volume
- Solution d'hydroxyde de potassium (0,1N)
- Phénol phtaléine (10g dans 1litre d'éthanol 96%)

**2.2. Mode opératoire**

Le dosage de l'acidité consiste à mesurer la quantité d'hydroxyde de sodium nécessaire pour neutraliser 2 gramme de matière grasse en présence de 50 ml de solvant organique (25ml d'éthanol à 95% et 25ml d'éther diéthylique) et d'un indicateur coloré (phénol phtaléine). La solution vire au rose persistant pour un volume de NaOH correspondant à l'équilibre acido-basique.

---

### **Annexe 3 : Détermination de l'indice de peroxyde :**

#### **3.1. Réactifs**

- Chloroforme
- Acide acétique
- Solution saturée d'iodure de potassium récemment préparée
- Solution de thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,01N)
- Empois d'amidon (solution aqueuse à 1%)

#### **3.2. Mode opératoire**

On pèse environ 1 g d'huile dans un erlenmeyer de 250ml auquel on ajoute 10ml de chloroforme et 15ml d'acide acétique et immédiatement après 1 ml d'une solution aqueuse saturée d'iodure de potassium. On agite pendant une minute et on met à l'obscurité pendant 5 mn. On ajoute 75ml d'eau distillée en agitant rigoureusement et quelques gouttes d'empois d'amidon (Indicateur). Le dosage se fait alors avec une solution de thiosulfate de sodium 0,01N. Un essai à blanc sans le corps gras est effectué parallèlement au premier essai.

### **Annexe 4 : détermination de l'indice d'iode**

#### **4.1. Réactifs**

- Hexane Pur
- Acide acétique
- Réactif de Wijs
- Solution saturée d'iodure de potassium
- Solution aqueuse de thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,1N)
- Empois d'amidon (solution aqueuse à 1%)

#### **4.2. Mode opératoire**

On pèse, au mg près, une prise d'essai de 0,2g de corps gras dans un ballon à fond plat puis on ajoute à cette masse 10ml d'hexane et 10ml d'acide acétique et enfin 25ml du réactif de Wijs. On laisse le mélange reposé à l'obscurité pendant 1 heure. Une fois ce laps de temps écoulé, on introduit au mélange 20ml de la solution saturée d'iodure de potassium et 150ml d'eau distillée puis on bouche le ballon et on agite pendant 5 mn. On titre le mélange avec la solution de thiosulfate de sodium jusqu'à apparition de la couleur jaune. On ajoute ensuite l'empois d'amidon et la coloration devient bleue foncée puis on continue le dosage jusqu'à

disparition de cette couleur. Un essai à blanc sans le corps gras est effectué parallèlement au premier essai.

## **Annexe 5 : Détermination de l'absorbance et de l'extinction spécifique :**

### **5.1. Réactifs**

- Hexane pur

### **5.2. Mode opératoire**

Les échantillons d'huile d'olive (0,05g à 0,25g) sont dilués dans de l'hexane (25ml) jusqu'à l'obtention de densités optiques (DO) inférieures à 1. La lecture des absorbances est effectuée dans une cuve en quartz par rapport à celle du solvant, sur un spectrophotomètre UV visible, équipé d'une cellule d'1 cm d'épaisseur. Les valeurs sont exprimées comme extinction spécifique  $E^{1\%}$  notée de façon conventionnelle par  $K$  et exprimé comme suit :

$$K = A_{\lambda} / C \times S$$

$A_{\lambda}$  : Absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$ ,

$C$  : Concentration de la solution en g/100ml,

$S$  : chemin optique (1cm).

Dans notre cas, nous avons dissout 0,05g d'huile dans 25ml de l'hexane. Cela implique que la concentration de notre solution est de 0,2g/100ml.