



**Faculté des Sciences  
Département de Chimie**

**Laboratoire de Recherche  
Spectrochimie et Pharmacologie Structurale**

**MEMOIRE DU MASTER EN CHIMIE**

**Option : Chimie Physique et Analytique**

**Académique**

**Thème**

**Détermination de la capacité antioxydante des huiles végétales :  
Huile d'olive de la wilaya de Tlemcen**

**Présenté par : DJAMAI Wissem**

Soutenu le 12 Septembre 2013

**Membres de Jury :**

Président	B. BELHACHEMI	Maître de conférences A	U.A.B.B. Tlemcen
Examinatrice	L. NEGADI	Professeur	U.A.B.B. Tlemcen
Examineur	Y. HAREK	Professeur	U.A.B.B. Tlemcen
Examineur	O. DJELLOULI	Maître assistant A	U. Bechar
Encadreur	B. DAHMANI	Professeur	U.A.B.B. Tlemcen

Année Universitaire 2012/2013

## **DEDICACES**

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers parents*

*A mes grands parents*

*A ma sœur et mes deux frères*

*A mes collègues de la promotion*

*Et à toute ma famille et chers amis(es)*

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Recherche Spectrochimie et Pharmacologie Structurale à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen sous la direction du professeur B. DAHMANI. Je tiens ici à lui exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail dans un environnement aussi enrichissant tant sur le plan scientifique que personnel.*

*L'enseignement de qualité dispensé par le Master « CPA » a également su nourrir mes réflexions et a représenté une profonde satisfaction intellectuelle, merci donc aux enseignants d'équipe de formation et chercheurs.*

*J'adresse également ma profonde reconnaissance aux enseignants de département de chimie*

*Je souhaite exprimer ma plus sincère reconnaissance à monsieur B.DAHMANI qui a dirigé mon travail. Il a su me guider dans un sujet riche tout en m'accordant sa confiance, ses compétences et son enthousiasme scientifiques, ont été des sources permanentes de soutien et de motivation.*

*Je tiens aussi à remercier vivement Mr O. DJELLOULI pour sa permanente disponibilité, la pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.*

*Mes remerciements vont aux membres de jury pour m'avoir fait l'honneur de consacrer de leur temps précieux à la lecture de ce manuscrit et qui ont bien voulu juger ce travail :*

*Mr BELHACHEMI B. maître de conférences A à l'université de Tlemcen qui m'a fait l'honneur de présider ce jury,*

*Melle NEGADI L., professeur à l'université de Tlemcen qui a bien voulu examiner ce travail,*

*Mr Y. HAREK, professeur à l'université de Tlemcen qui a bien voulu participer à ce jury,*

*Mr O.DJELOULI, maître assistant à l'université de Bechar qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Je tiens à dire un immense merci à mes collègues de laboratoire, à mes amis (es) et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cet ouvrage, « Ikram, Nousseiba, Nabila et Mansouriya ».*

*Enfin je remercie ma famille en particulier ma tante Leïla et plus particulièrement mes parents pour leur soutien permanent tout au long de ce mémoire et plus généralement tout au long de ma vie universitaire.*

## TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction Générale .....	1
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>LES LIPIDES</b>	
I.1. Définition des lipides .....	4
I.2. Rôle biologique des lipides .....	4
I.3. Classification des lipides .....	4
I.3.1. Lipides saponifiables .....	4
I.3.1.1. Les lipides simples ou ternaires .....	5
I.3.1.2. Les lipides complexes .....	5
I.3.2. Les acides gras .....	5
I.3.2.1. La nomenclature .....	5
I.3.2.2. Les acides gras saturés .....	7
I.3.2.3. Les acides gras insaturés .....	7
I.3.2.4. Propriétés des acides gras .....	8
I.4. Source des lipides alimentaires .....	11
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>LES ANTIOXYDANTS</b>	
II.1. Les radicaux libres .....	13
II.1.2. Nature des radicaux libres .....	13
II.1.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) .....	13
II.1.2.2. Espèces libres non oxygénées .....	14
II.2. Antioxydant .....	15
II.2.1. Définition .....	15
II.2.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique .....	15
II.2.2.1. Les antioxydants naturels .....	15
II.2.2.2. Les antioxydants synthétiques .....	21
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>L'HUILE D'OLIVE</b>	
III.1. Généralité .....	23
III.2. De l'olivier à l'huile d'olive .....	23
III.3. Techniques de transformation de l'olive à l'huile .....	25

	Pages
III.3.1. Le lavage, le broyage, le malaxage.....	25
III.3.2. Méthodes d'extraction d'huile d'olive.....	25
III.3.2.1. Système discontinu d'extraction par presse.....	25
III.3.2.2. Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases .....	26
III.3.2.3. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases .....	27
III.3.3. Le stockage .....	28
III.4. La production mondiale.....	28
III.5. Consommation mondiale.....	30
III.6. Classification des huiles d'olives .....	31
III.7. Compositions d'huile d'olive .....	33
III.8. Caractéristiques de l'huile d'olive.....	34
III.8.1. Caractères organoleptiques.....	34
III.8.2. Caractères physico-chimiques .....	34
III.8.2.1. Indice d'acidité.....	34
III.8.2.2. Indice de peroxyde.....	35
III.8.2.3. Spectre en lumière ultra-violette.....	35
III.9. Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé.....	35
III.10. Techniques instrumentales d'analyse de l'huile d'olive .....	36
III.10.1. Chromatographie liquide à haute performance.....	36
III.10.1.2. Généralité.....	36
III.10.1.3. Principe de la méthode.....	37
III.10.1.4. Sélection des solvants utilisés en HPLC .....	38
III.10.1.4.1. Propriétés des solvants .....	38
III.10.1.4.2. Solvant et élution.....	39
III.10.1.4.3. Sélection des solvants .....	39
III.10.1.5. Optimisation.....	39
III.10.1.6. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC .....	40
III.10.1.6.1. Principe .....	40
III.10.1.6.2. L'étalonnage externe.....	41
III.10.2. Spectrométrie d'absorption moléculaire ultraviolet-visible .....	41
III.10.2.1. Domaine spectral .....	42

	Pages
III.10.2.2. Principe .....	42
III.10.2.3. Loi d'absorption de la lumière - loi de Beer-Lambert .....	42
III.10.2.4. Validité de la loi de Beer-Lambert.....	43

## **CHAPITRE IV**

### **MATERIELS ET METHODES**

IV.1. Echantillonnage .....	45
IV.2. Solvants et réactifs .....	46
IV.3. Analyse par chromatographie liquide haute performance « HPLC » d' $\alpha$ -tocophérol	47
IV.3.1. Description du système RP-HPLC utilisé .....	47
IV.3.2. Traitement d'échantillon pour le dosage d' $\alpha$ -tocophérol.....	49
IV.4. Détermination des caractéristiques chimiques d'huile d'olive .....	50
IV.4.1. Acidité .....	50
IV.4.2. Indice de peroxyde .....	52
IV.4.3. Analyse spectrophotométrique dans l'ultra-violet.....	53

## **CHAPITRE V**

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

V.1. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive .....	56
V.2. Quantification d' $\alpha$ -tocophérol dans différents échantillons d'huile d'olive .....	57
V.3. Détermination des caractéristiques chimiques d'huile d'olive.....	59
V.3.1. Acidité.....	59
V.3.2. Indice de peroxyde.....	60
V.3.3. Extinction spécifique .....	62
Conclusion générale .....	66
Références bibliographiques.....	68

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<b>Tableau I.1</b> : Les acides gras les plus répandus .....	7
<b>Tableau I.2</b> : Des acides gras naturels.....	11
<b>Tableau II.1</b> : Apport nutritionnel recommandé (ANR) en vitamine E (d-alpha-tocophérol, la forme naturelle) .....	21
<b>Tableau III.1</b> : Production mondiale d'huile d'olive par pays.....	29
<b>Tableau III.2</b> : Consommation mondiale d'huile d'olive par pays.....	30
<b>Tableau III.3</b> : Données physico-chimiques de classification des huiles .....	33
<b>Tableau III.4</b> : Composition en acide gras d'une huile d'olive selon les résultats d'Olivier et coll. (2003) et selon la norme du codex alimentaires .....	34
<b>Tableau IV.1</b> : Caractéristiques des échantillons d'huile d'olive .....	45
<b>Tableau IV.2</b> : Solvants et réactifs utilisés au cours des travaux.....	46
<b>Tableau V.1</b> : Les résultats d'analyse par RP-HPLC d'alpha-tocophérol des échantillons d'huile d'olive .....	57
<b>Tableau V.2</b> : Pourcentage d'acidité de l'huile d'olive selon les différentes régions .....	59
<b>Tableau V.3</b> : Indice de peroxyde de l'huile d'olive selon les différentes régions .....	60
<b>Tableau V.4</b> : Extinction spécifique et variation de l'extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions .....	62



## LISTE DES FIGURES

	Pages
<b>Figure I.1</b> : Fragment de chaîne d'acide gras et configuration des doubles liaisons.....	8
<b>Figure I.2</b> : Température de fusion des acides gras saturés.....	9
<b>Figure II.1</b> : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène .....	17
<b>Figure II.2</b> : Structure de la vitamine C .....	17
<b>Figure II.3</b> : Structure de la $\beta$ -carotène .....	18
<b>Figure II.4</b> : Structure de la vitamine E.....	19
<b>Figure II.5</b> : Structure et dénomination des quatre tocophérols.....	19
<b>Figure III.1</b> : Arbres d'olivier et leurs fruits .....	24
<b>Figure III.2</b> : Le système discontinu d'extraction par presse.....	26
<b>Figure III.3</b> : Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases .....	27
<b>Figure III.4</b> : Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases .....	28
<b>Figure III.5</b> : Principe de la HPLC.....	37
<b>Figure III.6</b> : Principe d'UV-visible .....	42
<b>Figure IV.1</b> : Système HPLC du Laboratoire de Recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».....	47
<b>Figure V.1</b> : Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol (A : Echantillon d'huile d'olive dopé, B : Echantillon d'huile d'olive et C : étalon pur).....	56
<b>Figure V.2</b> : Courbe d'étalonnage .....	57
<b>Figure V.3</b> : Teneur d' $\alpha$ -tocophérol dans l'huile d'olive selon les différentes régions.....	58
<b>Figure V.4</b> : Pourcentage d'acidité de l'huile d'olive selon les différentes régions.....	59
<b>Figure V.5</b> : Indice de peroxyde de l'huile d'olive selon les différentes régions.....	61
<b>Figure V.6</b> : Spectres UV des huiles d'olives .....	62
<b>Figure V.7</b> : Extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions .....	63
<b>Figure V.8</b> : Variation de l'extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions .....	64

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>°C</b>	degré celsius
<b>µl</b>	Microlitre
<b>1O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>A</b>	Acidité
<b>Abs</b>	Absorbance
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribo Nucléique
<b>AG</b>	Acide gras
<b>AGI</b>	Acide gras insaturé
<b>AGMI</b>	Acide gras monoinsaturé
<b>AGPI</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>AGS</b>	Acide gras saturé
<b>ANR</b>	Apport nutritionnel recommandé
<b>BHA</b>	butylhydroxyanisole
<b>BHT</b>	butylhydroxytoluène
<b>COI</b>	Conseil Oléicole International
<b>DO</b>	Densité optique
<b>Eq</b>	Equivalent
<b>ERO</b>	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
<b>G6PD</b>	glucose-6-phosphate-déshydrogénase
<b>GPx</b>	Glutathion Peroxydase
<b>GR</b>	Glutathion Réductase
<b>RP-HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GSHPX</b>	Glutathions Peroxydases et réductases
<b>GSSG</b>	glutathion-disulfure
<b>HPLC</b>	high performance liquide chromatography
<b>IP</b>	Indice de peroxyde
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>·O<sub>2</sub></b>	Ion superoxyde
<b>OH</b>	Radicale hydroxyle
<b>PG</b>	Gallate Propylée
<b>ROO</b>	Radical hydroperoxyde
<b>ROOH</b>	Radical hydroperoxyde
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>SOD</b>	Superoxydes Dismutases
<b>TBHQ</b>	Tétra-butylhydroquinone
<b>T<sub>f</sub></b>	Température de fusion
<b>UI</b>	Unité Internationale
<b>UV</b>	Ultra Violet

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

L'huile d'olive, aliment de base des populations vivant sur le pourtour du bassin méditerranéen, joue un rôle prédominant dans le domaine des produits de terroir, à mesure que des études complémentaires viennent confirmer les avantages pour la santé. (Boskou Dimitrios 2012).

La qualité de l'huile d'olive vierge, la seule huile alimentaire pouvant prétendre à la qualification de «naturelle », est un atout majeur parce qu'elle est intimement liée aux valeurs nutritionnelle, biologique et organoleptique de l'huile.

En plus de l'authenticité de l'huile, le terme « qualité » englobe de nombreuses caractéristiques chimiques, physiques et organoleptiques qui peuvent être mesurées par des méthodes d'analyses tout à fait objectives.

La qualité de l'huile d'olive varie non seulement en fonction de la variété du sol et des conditions climatiques mais également avec de nombreux facteurs ayant trait au cycle de production, de transformation et de commercialisation des olives et des huiles (Hammadi, C. 2006)

L'une des principales causes de perte de la qualité de l'huile d'olive est l'oxydation. Parmi les facteurs technologiques qui influencent la composition et la stabilité à l'oxydation des huiles d'olive, la méthode d'extraction et les conditions de stockage jouent un rôle essentiel dans la qualité. L'oxydation a lieu soit en présence de lumière (photo-oxydation) ou dans l'obscurité (auto-oxydation) et également par l'effet des enzymes (oxydation enzymatique). L'huile d'olive est considérée comme résistante à l'oxydation par rapport à d'autres huiles végétales en raison de sa faible teneur en acides gras polyinsaturés et de la présence d'antioxydants naturels. Abondance de l'acide oléique, de 56 à 84% des acides gras totaux, est la caractéristique qui définit l'huile d'olive se distingue des autres huiles végétales. L'huile d'olive est une source riche en antioxydants naturels.

Ceux-ci comprennent les caroténoïdes, les tocophérols et des composés phénoliques qui peuvent agir, par des mécanismes différents, à conférer un système de défense efficace contre les attaques des radicaux libres (Yildirim, G. 2009)

Les tocophérols sont une classe des composés chimiques de la vitamine E dont l' $\alpha$ -tocophérol est la molécule la plus active qui est préférentiellement absorbée et accumulée par les humains. Elle est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques. A cet égard, elle participe avec nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène, c'est-à-dire la lutte contre

les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation des radicaux libres.

Celui-ci a pour objectif de caractériser ces huiles d'olive par leurs teneurs en -tocophérol dosé en utilisant la chromatographie liquide à haute performance que son développement au cours de ces dernières années a en effet permis d'ouvrir de nouveaux horizons pour la conception de méthodes très spécifiques pour le dosage de cette vitamine.

En outre, le Conseil oléicole international (COI) et de la législation des Communautés européennes (CE) définissent les caractéristiques de l'identité de l'huile d'olive, précisent les méthodes d'analyse et les valeurs limites standard des paramètres de qualité tels que l'indice de peroxyde (PV), l'acidité, les valeurs d'absorbance UV (K232 et K270) des huiles d'olive afin d'améliorer la qualité des produits, l'expansion du commerce international, d'augmenter sa consommation.

L'objectif de cette étude est de caractériser des huiles d'olive selon des différentes régions par leurs teneurs en -tocophérol en les comparant à celle de la Wilaya de Tlemcen, et l'évaluation du pouvoir antioxydant à travers la détermination de l'acidité, de l'indice de peroxyde, et des coefficients d'absorption molaire par rayonnements UV-Visible (K232 et K270). Le thème de cette étude est « Détermination de la capacité antioxydante des huiles d'olive de la wilaya de Tlemcen »

Ce projet est réalisé au laboratoire de recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen de la faculté des sciences. Le dosage de l' -tocophérol se fait par chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée RP-HPLC, qui est considérée comme la méthode analytique la plus utilisée et la plus fiable pour la mesure de la concentration de ce composé dans l'huile d'olive.

Cette étude est constituée de cinq chapitres :

Dont le premier détaille les lipides et leur dégradation, le deuxième chapitre traite les antioxydants et le troisième chapitre présente les caractéristiques chimiques et physico-chimiques de l'huile d'olive ainsi que sa composition et ses techniques instrumentales d'analyse utilisées ; dans le chapitre qui suit « Matériels et Méthodes » une indication sur les méthodes d'analyses utilisées dans ce travail, la préparation des échantillons et l'instrumentation utilisée sont décrites et dans le cinquième chapitre on a présenté des résultats et discussion, où cette partie décrits la détermination de la teneur en alpha-tocophérol dans les huiles d'olives et l'évaluation du pouvoir antioxydant de ces dernières. Les échantillons d'huile ayant fait l'objet de ce travail sont mis à l'obscurité durant l'analyse.

# CHAPITRE I

## *LES LIPIDES*

## I.1. Définition des lipides

On regroupe sous le nom de lipides (du grec *lipos*, graisse) des substances naturelles insolubles dans l'eau mais solubles dans certains solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, l'acétone. (Serge,W. Pierre,M.2004)

Les lipides sont des molécules comportant au moins une chaîne aliphatique, c'est-à-dire chaîne hydro-carbonée constituée de carbone et d'hydrogène, longue de quatre atome au moins. (Michel,G.2005). 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). (Biochimie 1. s.d)

## I.2. Rôle biologique des lipides

- Les lipides représentent environ 20% du poids du corps.
- Ils sont une réserve énergétique mobilisable : 1g lipides = 9Kcal
- Ils ont un rôle de précurseurs : stéroïdes, vitamines, prostaglandines.
- Deux acides gras polyinsaturés sont des facteurs nutritionnels essentiels car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent lui être apportés par l'alimentation. Ce sont des acides gras indispensables : acide linoléique et acide linoléique.
- Les membranes ont une structure lipidique.
- Les plaques d'athérome constituées de dépôt lipidique entraînent le durcissement des artères (athérosclérose).

## I.3. Classification des lipides

On classe les lipides en fonction de leur nature chimique et du rôle qu'ils tiennent dans la structure et le fonctionnement des organismes. (Serge,W. Pierre,M.2004)

### I.3.1. Lipides saponifiables

Ce sont des dérivés naturels, résultant de la combinaison d'acide gras avec un alcool ou une amine.

Selon la composition chimique de leur molécule, on distingue ;

### I.3.1.1. Les lipides simples ou ternaires

Les lipides simples, encore appelés homolipides sont des corps ternaires, qui ne renferme dans leurs structures que du C, H<sub>2</sub>, et O<sub>2</sub>.

On les classe selon la nature de l'alcool qui estérifie les acides gras :

- Les acylglycérols (ou glycérides) sont des esters du glycérol.
- Les cérides sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras).
- Les stérides sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

### I.3.1.2. Les lipides complexes

Les lipides complexes renferment en plus de C, H<sub>2</sub>, et O<sub>2</sub> de l'azote (N<sub>2</sub>), du phosphore (P) ou/et des oses.

On distingue :

- Les phospholipides ou phosphatides divisés en deux grandes classes selon l'alcool :
  - Les glycérophospholipides ou phosphoglycérides, l'alcool est le glycérol dans une des fonctions alcool primaire est estérifiée par de l'acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.
  - Les sphingolipides, l'alcool est la sphingosine c'est un alcool aminé à longue chaîne carbonnée.
- Les glycolipides : ce sont des sphingolipides présentant à leur extrémité un ou plusieurs résidus osidiques.
- Les plasmogène : ce sont des phosphoglycérides dans lesquels un acide gras est remplacé par une longue chaîne aliphatique. (Kessous,C.2005)

## I.3.2. Les acides gras

Les acides gras sont des acides **monocarboxyliques** à longue chaîne carbonnée linéaire.

La chaîne aliphatique hydrocarbonée peut être saturée ou présentée une ou plusieurs doubles liaisons, rarement une triple liaison.

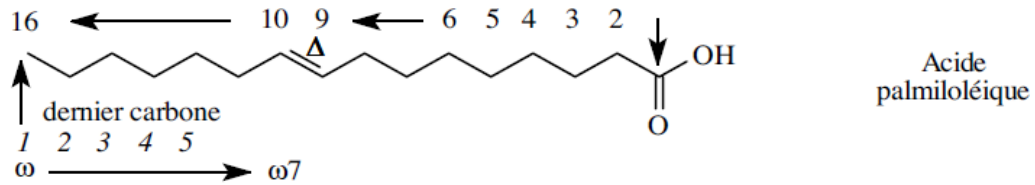
Les acides gras diffèrent donc entre eux par la longueur de la chaîne aliphatique, le nombre et la localisation des doubles liaisons éventuelles. (Kessous,C.2005)

### I.3.2.1. La nomenclature

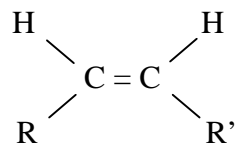
Des dénominations parallèles coexistent : la nomenclature systématique s'efface souvent devant les noms d'usage. Deux numérotations coexistent, l'une systématique et l'autre utilisée en diététique qui permet de regrouper les acides gras insaturés en série.



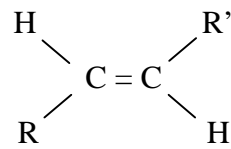
Il faut tout d'abord indiquer le nombre de carbone de l'acide gras, ensuite indiquer le nombre de double liaisons ( ), leurs positions et leurs configurations (**cis** ou **trans**).



Pour la double liaison entre les carbones **C9** et **C10** de l'exemple, les chaînes aliphatiques peuvent avoir deux configurations :



Configuration *cis*



Configuration *trans*

- Pour les acides gras saturés :

Le nom systématique s'écrit : **n- [nC] an oïque**

- **n** : indique que l'acide gras est normal (chaîne non branchée)
- **[nC]** : nombre de carbones
- **an** : indique que la chaîne est saturée
- le symbole est **Cn : 0** (0 indique que la chaîne est saturée)
- le nom courant rappelle son origine

- Pour les acides gras insaturés :

Le nom systématique s'écrit : **conf-p-[nC] x én oïque**

- **conf-p** : configuration et position des doubles liaisons
- **[nC]** : nombre de carbones
- **X** : nombre de doubles liaisons (di, tri...)
- le symbole est Cn: m (p, p'..)
- **Cn** : nombre de carbones
- **m** : nombre de doubles liaisons
- **(p, p'...)** : positions des doubles liaisons en numérotation normale

- La série est de la forme  $\omega_n$  où n est la position de la première double liaison notée par rapport à la position  $\omega$ , dernier carbone de la chaîne aliphatique.

- Le nom courant rappelle son origine. (Biochimie1. s.d)

**Tableau I.1** : Les acides gras les plus répandus. (Serge,W. Pierre,M. 2004)

Nom	Nombre de carbone		Nombre de doubles liaisons				Formule
			Position des doubles liaisons				
Laurate	12	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$
Myristate	14	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$
Palmitate	16	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$
Palmitoléate	16	1	9				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
Stéarate	18	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$
Oléate	18	1	9				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
Linoléate	18	2	9, 12				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
$\alpha$ -Linoléate	18	3	9, 12, 15				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
Arachidate	20	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$
Arachidonate	20	4	5, 8, 11, 14				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$
Béhénate	22	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$
Lignocérate	24	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COO}^-$

### I.3.2.2. Les acides gras saturés

Les acides gras saturés sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée ne comportant pas de doubles liaisons carbone-carbone. Leur formule générale est :  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ . Le plus souvent la chaîne possède un nombre pair de carbones.

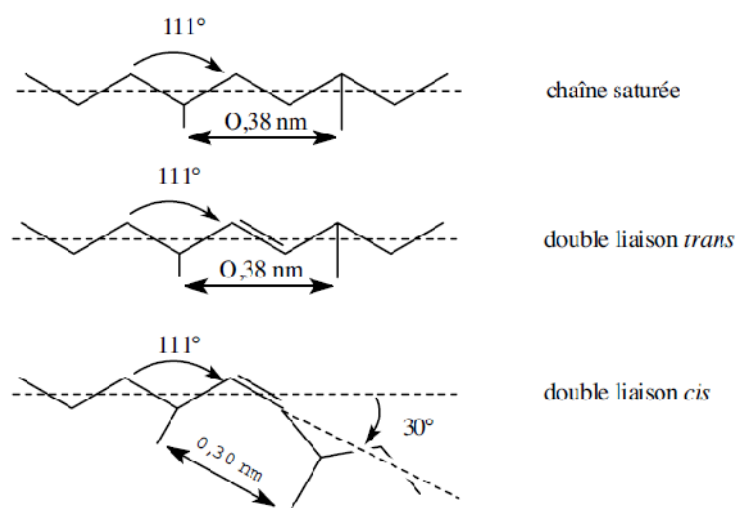
Dans la chaîne hydrocarbonée des acides gras saturés, l'angle formé par deux liaisons successives C-C-C est de  $111^\circ$  (fig. I.1). Il est à remarquer que la chaîne hydrocarbonée des acides gras saturés est en zigzag, rectiligne dans l'ensemble, quoique non rigide. Une flexibilité subsiste car les groupes  $-\text{CH}_2-$  peuvent tourner librement autour de toutes les liaisons C-C. Les molécules d'acide gras établissent entre elles des liaisons non covalentes, elles s'unissent par des liaisons de Van Der Waals dont le nombre est proportionnel à la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

### I.3.2.3. Les acides gras insaturés

Les acides gras insaturés ont une ou plusieurs doubles liaisons entre deux atomes de carbone successif  $-\text{HC}=\text{CH}-$ . Dans les acides gras insaturés naturels, les doubles liaisons sont en configuration isomère *Cis*.

Dans les mono-insaturés, l'unique double liaison se trouve le plus souvent entre C9 et C10.

Les acides gras polyinsaturés portent plusieurs doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées (liaisons simples et doubles liaisons en alternance :  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ), mais toujours séparées par un ou plusieurs groupes méthylène :  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ . Chaque double liaison introduit une flexion de la chaîne de  $30^\circ$  environ (*fig.1.1*), et si plusieurs doubles liaisons se succèdent, la molécule se vrille. La présence de doubles liaisons empêche la rotation des deux carbones impliqués, il s'ensuit une flexibilité plus réduite de ces chaînes d'acides gras insaturés (Michel,G. 2005)



*Figure 1.1* : Fragment de chaîne d'acide gras et configuration des doubles liaisons. (Biochimie1. s.d)

#### I.3.2.4. Propriétés des acides gras

##### A. Propriétés physiques

###### A.1. Solubilité

Les acides gras à courte chaîne carbonée sont solubles dans l'eau, mais dès que la chaîne carbonée augmente ils deviennent insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques.

Les acides gras insaturés sont plus solubles que les saturés surtout s'ils sont sous formes *cis*.

###### A.2. Point de fusion

Le point de fusion augmente par l'augmentation de nombre de carbone (*Fig.1.2*), et diminue quand le nombre de doubles liaisons augmente. Quand le nombre d'atome

de C est inférieur à 10 et à température ordinaire, les acides gras sont liquides et solides si  $n=10$  C nombre de carbone.

Ainsi :

18 : 0	acide stéarique	Pf = 69,6°C
18 : 1 ; 9	acide oléique	Pf = 13,4°C
18 : 2 ; 9 ; 12	linoléique	Pf = -5°C
18 : 3 ; 9 ; 12 ; 15	linoléinique	Pf = -11°C

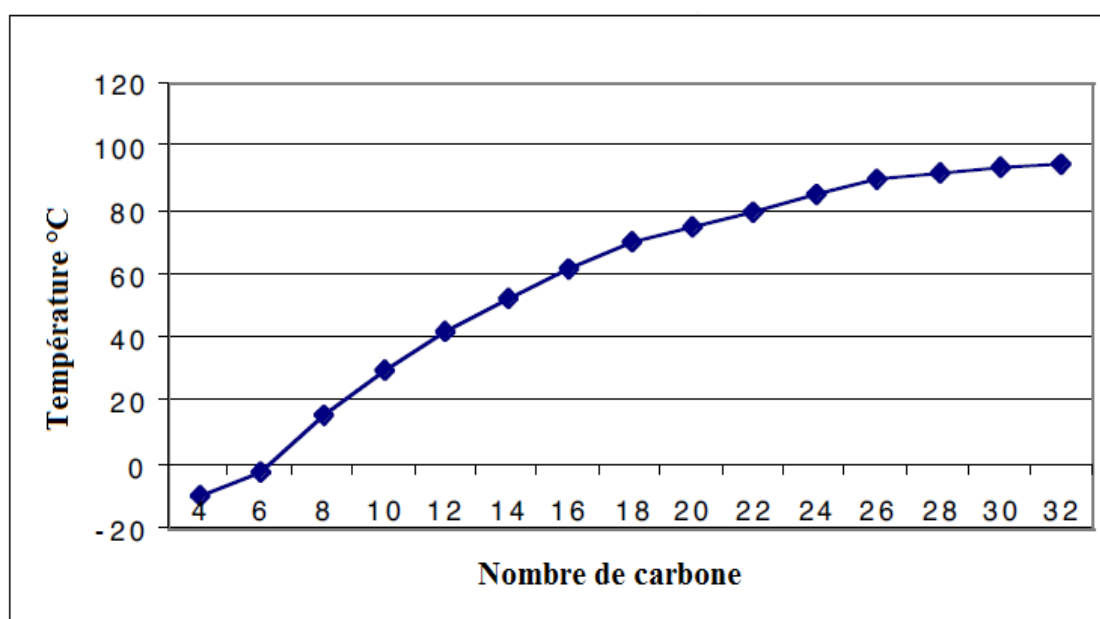


Figure 1.2 : Température de fusion des acides gras saturés (Biochimie 1. s.d)

### A.3. Point d'ébullition

Plus la chaîne carbonée est longue, plus le point d'ébullition est élevé. La présence de double liaison n'influence pratiquement pas sur le point d'ébullition.

Ainsi :

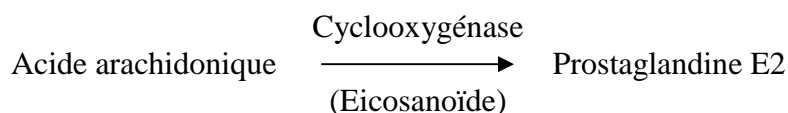
18 : 0	acide stéarique	$P_{\text{éb}} = 166^{\circ}\text{C}$
18 : 1 ; 9	acide oléique	$P_{\text{éb}} = 165^{\circ}\text{C}$
18 : 2 ; 9 ; 12	Linoléique	$P_{\text{éb}} = 164^{\circ}\text{C}$
18 : 3 ; 9 ; 12 ; 15	Linoléinique	$P_{\text{éb}} = 163^{\circ}\text{C}$

## ***B. Propriétés chimiques***

### ***B.1. Oxydation des doubles liaisons***

L'oxydation par l'oxygène de l'air conduit au rancissement des graisses.

L'oxydation enzymatique intracellulaire de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase (cyclisation+oxydation) conduit aux prostaglandines qui sont des médiateurs très actifs, très rapidement dégradés.



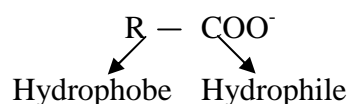
Action biologique des prostaglandines. Elles interviennent dans :

- la contraction des muscles lisses (intestin, utérus, vaisseaux);
- la régulation des métabolismes;
- l'agrégation plaquettaire. L'inhibition de la cyclooxygénase des plaquettes par l'aspirine est utile en thérapeutique (antiagrégant plaquettaire).

### ***B.2. 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  $\text{Na}^+ + \text{R-COO}^-$

L'anion à 2 pôles :



Ces molécules appelées amphiphiles ou amphipathiques, sont tensioactives : elles abaissent la tension superficielle de l'eau d'où leurs propriétés. (Touitou, Y.2005)

### ***B.3. Formation d'ester***

Avec l'alcool, les acides gras donnent des esters. Le méthanol ( $\text{CH}_3\text{-OH}$ ) donne des esters méthyliques, plus volatiles que les acides gras qui leur ont donné naissance. Cette réaction est utilisée pour l'analyse des mélanges complexes d'acides gras obtenus après hydrolyse des lipides naturels. Les esters méthyliques volatiles sont séparés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse (comme pour les acides aminés). (Kessous, C.2005)

**Tableau I.2** : Des acides gras naturels (Biochimie 1. s.d)

longueur relative	nC	nom systématique	nom courant de l'acide	
<b>Chaîne courte</b>	4	n-butanoïque	Butyrique	<i>Beurre</i>
	6	n-hexanoïque	Caproïque	<i>lait de chèvre</i>
	8	n-octanoïque	Caprylique	...
	10	n-décanoïque	caprique	...
<b>Chaîne moyenne</b>	12	n-dodécanoïque	laurique (laurier)	<i>huile, graisses animales et végétales</i>
	14	n-tétradécanoïque	myristique (muscade)	
	16	n-hexadécanoïque	palmitique (palmier)	
	18	n-octadécanoïque	stéarique (suif)	
<b>Chaîne longue</b>	20	n-icosanoïque	Arachidique	<i>Graines</i>
	22	n-docosanoïque	Béhénique	
	24	n-tétracosanoïque	Lignocérique	
	26	n-hexacosanoïque	cérotique	<i>cires des plantes bactéries insectes</i>
	28	n-octacosanoïque	montanique	
	30	n-triacontanoïque	mélissique	
	32	n-dotriacontanoïque	acéroïque	

#### I.4. Source des lipides alimentaires

Il existe deux grandes sources de lipides alimentaires :

- les aliments et leurs dérivés contenant des lipides constitutionnels comme les aliments carnés, le jaune d'œuf et les produits laitiers, riches en acides gras saturés et en cholestérol ; ou comme les poissons gras, riches en acides gras polyinsaturés de la famille n3, et les oléagineux (noix, olives, amandes) riches en acides gras monoinsaturés et polyinsaturés.
- les huiles et matières grasses alimentaires extraites de produits bruts et utilisés couramment pour la cuisson et l'assaisonnement ou pour tartiner. Ce sont des sources concentrées de lipides.

Les huiles contiennent toutes 100% de lipides, elles ont donc toutes la même valeur calorique. (Jean-Robert, B. Gérard, M. Denise, A. 1998)

# CHAPITRE II

## LES ANTIOXYDANTS

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques. (Lesgards,2000)

## II.1. Les radicaux libres

Cette expression désigne une molécule ou un groupe d'atomes portant un électron célibataire sur sa périphérie et pouvant se former par la perte ou le gain d'un électron lors de la rupture d'une liaison. Les mouvements électroniques suivent des règles désormais bien connues qui régissent leur positionnement à distance du noyau. La plupart du temps, les deux électrons qui forment la liaison chimique se retrouvent, lors de la rupture, sur le même fragment de molécule, ce qui donne des ions, particules bien plus stables que les radicaux, dont les électrons non appariés ne demandent qu'à réagir. (Goussard,J-P.s.d)

Les sources des radicaux libres sont nombreuses, Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers. (Turrens,JF. Alexandre,A.Lehninger et AL.1985)

- 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 $\cdot$ ), 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.

### II.1.2. Nature des radicaux libres

#### II.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*

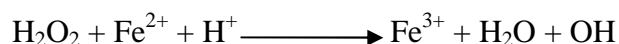
L'ion superoxyde ( $\cdot O_2$ ) est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.



**B. Radical libre hydroxyle**

Le radical libre hydroxyle (OH<sup>•</sup>) 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**

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 :

**II.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.

## II.2. Antioxydant

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction 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.

### II.2.1. Définition

Ce sont tous des réducteurs capables d'interrompre la réaction de peroxydation et d'empêcher la formation des hydroperoxydes et des peroxydes à partir des huiles insaturées en particulier.

Ils 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%. (Marie-Claude Martini. s.d)

### II.2.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation.

Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation.

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow.1990; Evans et *al.*1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées. (Namiki.1990; Wanasundara et *al.*, 1994; Larson. 1997; Pietta. 2000; Moure et *al.* 2001)

#### II.2.2.1. Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

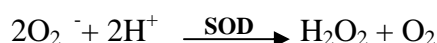
### A. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (La superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

#### A.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

La famille des superoxydes dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$ . (Antwerpen. 2006)

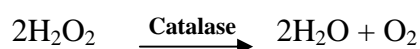
L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre



#### A.2. Les catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  en libérant de l'oxygène et de l'eau.

Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux. (Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993)



#### A.3. Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxy des organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG). (Marfak. 2003)

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG.

Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du  $\text{NADP}^+$  qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase) :

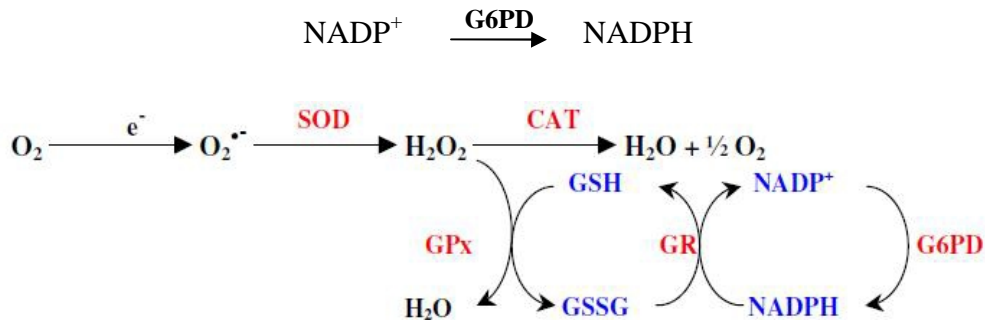


Figure II.1 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.

### B. Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols.

#### B.1. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (Curtay et Robin,2000). Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  et l' $\text{OH}^{\bullet}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E(Fig.4).(Evans.2002;Packer *et al.* 1997).

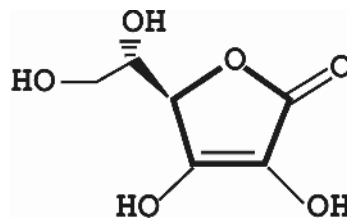


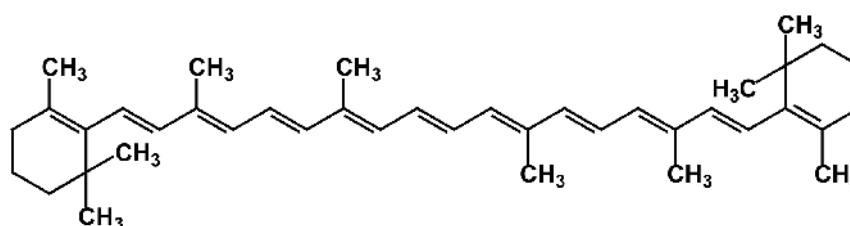
Figure II.2 : Structure de la vitamine C

#### B.2. La $\beta$ -carotène

La  $\beta$ -carotène est apporté par l'alimentation. Elle est douée de plusieurs capacités : elle est précurseur de la vitamine A, elle capte l'oxygène singulet sous faible pression

d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, elle a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Elle protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : elle s'oppose à la génotoxicité de nombreux agents. (Allard *et al.* 1994)

La présence de nombreuses doubles liaisons au sein de leurs structures (*Fig II.3*) en fait des antioxydants reconnus, notamment par leur effet protecteur vis-à-vis des radiations solaires (UVA). (Biesalski *et al.* 1996)



*Figure II.3 : Structure de la  $\beta$ -carotène*

### **B.3. Glutathion**

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. (Stamler et Slivka. 1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E. (Gerard Monnier et Chaudière. 1996)

### **B.4. Les oligoéléments**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. (Garait. 2006)

### **B.5. Les composés phénoliques issus des végétaux**

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress

oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (Rock.2003). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins. (Boizot et Charpentier. 2006)

### B.6. La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les -, -, - et -tocophérols et tocotriénols (Ohrvall et al. 1996). Nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs (du grec *tokos*, progéniture et *Pherein*, porter).

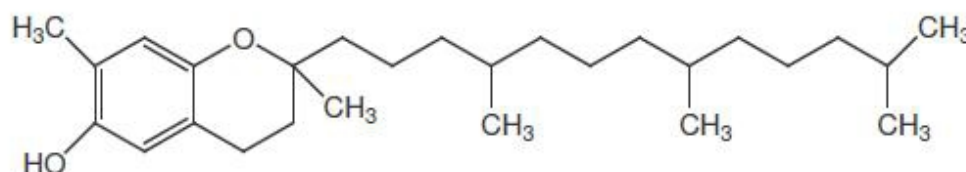


Figure II.4 : Structure de la vitamine E

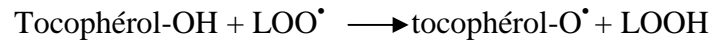
Les tocophérols sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur cette chaîne latérale.

La différence entre les formes alpha, bêta, gamma et delta réside dans le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau chromanol, Selon des études menées sur des animaux, l'efficacité décroît fortement de l'alpha-tocophérol au delta-tocophérol. L'efficacité des tocotriénols est encore beaucoup plus faible.

Substituants des tocophérols	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Nom
	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-tocophérol
	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	-tocophérol
	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-tocophérol
	H	H	CH <sub>3</sub>	-tocophérol

Figure II.5 : Structure et dénomination des quatre tocophérols

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. (Evans. 2002 ; Packer et *al.* 1997)



**N** :: *LOO*<sup>•</sup> : radical libre lipidique

- **Source de la vitamine E**

Les huiles et graisses végétales sont les plus importantes sources de vitamine E. Dans ces aliments, la vitamine E joue le rôle d'un antioxydant naturel dont la présence est corrélée avec la teneur en acides gras insaturés. On la trouve aussi dans les fruits à coque. Parmi les aliments d'origine animale, elle est surtout présente dans la graisse lactique.

- **Le rôle de la vitamine E**

- Le tocophérol est un puissant anti-oxydant qui neutralise les radicaux libres, protégeant ainsi les structures membraneuses des cellules de notre organisme ce qui ralentit le vieillissement oculaire, celui de la peau et celui de la prostate et retarde de l'usure des cartilages.
- Elle protège des maladies cardio-vasculaires et de certains cancers.
- Elle a une action anti-infectieuse et renforce les défenses immunitaires.
- Elle permet un bon maintien de l'hydratation de la peau et un bon état des tissus.
- Elle participe à la formation et à la protection des globules rouges.
- Elle est nécessaire au développement des cellules sexuelles.
- Elle interagit avec la vitamine K, la progestérone et les hormones hypophysaires, la vitamine A et la vitamine C.

- **Besoins quotidiens en vitamine E**

Les apports journaliers recommandés en vitamine E de type alpha-tocophérol est de l'ordre de 10 à 15mg par jour pour un adulte. Cette valeur varie selon l'âge, l'activité et l'état physiologique de chaque personne.

Pour un nourrisson le besoin en vitamine E est de 4mg, pour un sportif ou une femme allaitante le besoin est d'environ 20mg et pour une personne âgée il est de 50mg. (Table de composition nutritionnelle des aliments Ciquel 2008)

**Tableau II.1** : Apport nutritionnel recommandé (ANR) en vitamine E (d-alpha-tocophérol, la forme naturelle)

Age	Quantité (mg/UI*)
de 0 à 6 mois	4 mg/6 UI**
de 7 à 12 mois	5 mg/7,5 UI**
de 1 à 3 ans	6 mg/9 UI
de 4 à 8 ans	7 mg/10,5 UI
de 9 à 13 ans	11 mg/16,5 UI
14 ans et plus	15 mg/22,5 UI
Femmes enceintes	15 mg/22,5 UI
Femmes qui allaitent	19 mg/28,5 UI

**Source** : Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, 2000. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Ces données sont le résultat d'un consensus entre les autorités canadiennes et américaines.

N :\* Les apports nutritionnels recommandés sont désormais donnés en milligrammes. Cependant, sur les suppléments, la posologie de la vitamine E est souvent indiquée en unités internationales (UI), une mesure ancienne. Un milligramme d'alpha-tocophérol (la forme naturelle de la vitamine E) équivaut à 1,5 UI.

\*\* En l'absence de données scientifiques suffisantes, les autorités ont fixé, non pas un apport nutritionnel recommandé (ANR), mais un apport suffisant (AS). L'apport suffisant en vitamine E a été déterminé en se basant sur les apports moyens observés chez les bébés nord-américains en bonne santé.

#### II.2.2.2. Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu et *al.* 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu et *al.* 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow. 1990)



## CHAPITRE III

### *L'HUILE D'OLIVE*

### III.1. Généralité

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé « Olea » et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est « l'Oléa europaea », dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé « Oléa europaea sativa ».

L'olivier cultivé est un arbre de 5 à 10m de haut au tronc sinueux dont l'écorce est crevassée qui présentent des feuilles lancéolées et des fruits de forme et de teneur en huile assez variables selon la variété considérée.

L'étude de l'huile d'olive mérite une attention particulière, compte tenu de la place spécifique qu'elle occupe parmi les huiles de table, c'est à l'antiquité que sa consommation remonte, elle est considérée la plus ancienne huile connue, sa zone de production correspond à celle de la civilisation gréco-romaine, la production et la consommation de l'huile d'olive se sont répandues dans tout le bassin méditerranéen. (Uzzan,A. 1992)

L'huile qui est le jus d'un fruit est presque uniquement consommée à l'état vierge. Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies. (L'AFIDOL.2013)

### III.2. De l'olivier à l'huile d'olive

L'olivier a un développement plutôt lent, sa vie peut ainsi être divisée en 4 périodes :

- la période de jeunesse 1-7ans.
- la période d'entrée en production 7 à 35 ans.
- la période adulte 35 à 150 ans.
- la période de sénescence au-delà de 150 ans.

Le déroulement annuel du cycle végétatif de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques de son aire d'adaptation.

Après la période de repos hivernal (novembre-février), le réveil printanier (mars-avril) se manifeste par l'apparition de nouvelles pousses terminales et l'éclosion des bourgeons qui donneront soit du bois, soit des fleurs.

Puis, avec la montée des températures printanières l'olivier fleurit (en mai-juin), la fécondation de ces fleurs conduit à la formation des olives (juin-juillet), cette étape est la nouaison. Seules 1 à 3% des fleurs se transformeront en fruits.

En juillet-août, les fruits grossissent pour atteindre leur taille définitive fin septembre-début octobre. Puis, débute leur changement de couleur qui passe du vert au vert-violacé, fruits dits tournants, puis au noir, le changement de couleur des olives est appelée la véraison.

La récolte s'effectue de fin août pour les olives vertes de table précoces à fin février pour les olives à huile tardives. (L'AFIDOL. 2013)



*Figure III.1: Arbres d'olivier et leurs fruits*

### **III.3. Techniques de transformation de l'olive à l'huile**

Le procédé de fabrication de l'huile d'olive est relativement simple mais nécessite de respecter avec soin ses différentes étapes: lavage, broyage, pressurage, décantation et stockage.

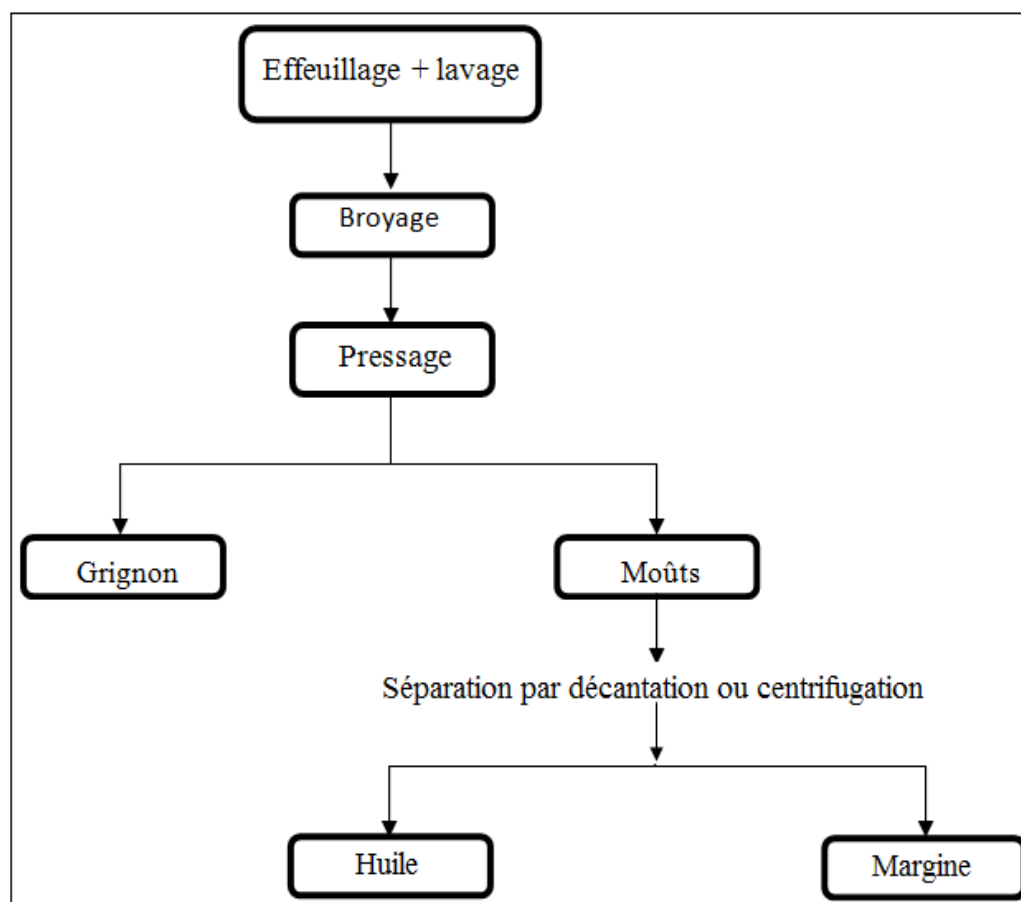
#### **III.3.1. Le lavage, le broyage, le malaxage**

Au plus tôt après la cueillette, les olives destinées à la fabrication de l'huile sont triées pour éliminer les brindilles et les feuilles, puis lavées à l'eau froide. Ensuite, les olives sont broyées immédiatement, pour éviter toute oxydation, avec les noyaux, qui contiennent un antioxydant, comme conservateur naturel. Le broyage peut être effectué avec des meules en pierre ou avec un broyeur métallique. Le broyage ne suffit pas à briser la totalité des vacuoles contenant l'huile. Pour libérer le maximum d'huile, un malaxage est appliqué à la pâte jusqu'à l'obtention d'une pâte onctueuse pour faciliter l'extraction.

#### **III.3.2. Méthodes d'extraction d'huile d'olive**

##### **III.3.2.1. Système discontinu d'extraction par presse**

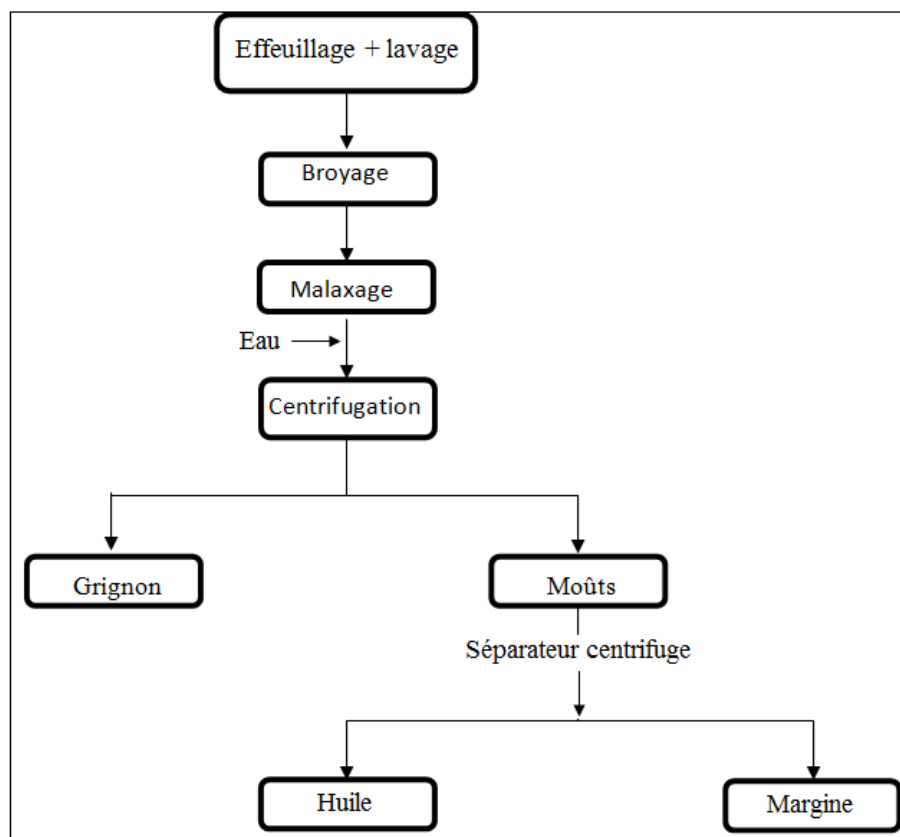
Ce système utilise des presses métalliques à vis ou, le cas échéant des presses hydrauliques. La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtins, à raison de 5 à 10Kg par scourtin. L'application de la pression sur la charge des scourtins doit être réalisée de manière progressive. L'opération de pressage dure au moins 45mn. 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 III.2.



*Figure III.2 : Le système discontinu d'extraction par presse*

### III.3.2.2. Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive. Et donc les trois phases sont : huile, margines et grignon.



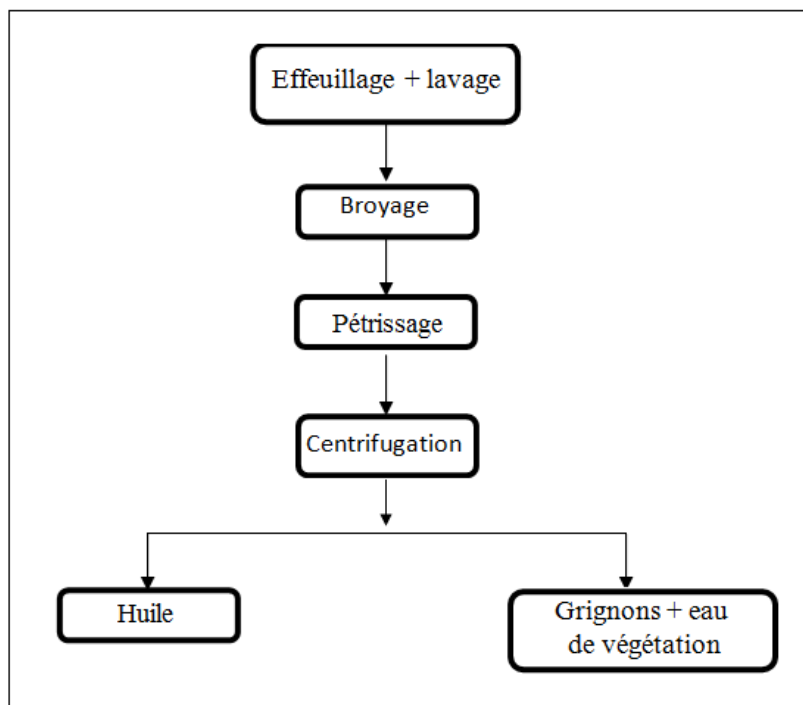
*Figure III.3: Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases*

### III.3.2.3. 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 III.4.

Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité sans production d'effluents d'huileries d'olive. Son seul inconvénient est la production de grignons humides.

En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons.



*Figure III.4 : Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases*

### III.3.3. Le stockage

L'huile d'olive est immédiatement stockée dans des cuves en inox afin d'éviter l'oxydation, par contre, l'huile d'olive conservée dans des récipients en plastique ou en verre perd sa qualité organoleptique. L'huile peut alors être filtrée pour la rendre limpide et brillante ou bien être mise en bouteille en l'état. Une fois embouteillée, l'huile d'olive doit être conservée à l'abri de l'air, de la chaleur et de la lumière, elle se conserve parfaitement entre 15 et 18°C. La conservation maximale est de deux ans. (Chimi, H.2006)

### III.4. La production mondiale

La production d'huile d'olive destinée à l'obtention d'huile d'olive est principalement concentrée dans les pays du bassin méditerranéen.

Les estimations du Conseil Oléicole International (COI) pour la campagne 2011-2012 indiquent une production mondiale autour de 3,1 millions de tonnes, en hausse de 3% environ par rapport à l'année précédente. Près des trois quarts de la production (2,18 millions de tonnes) proviennent de l'Union Européenne, un chiffre en baisse légère par rapport à la campagne 2010-2011. Dans la Communauté Européenne, l'Espagne arrive

en tête avec 62% de la production totale : 1,35 millions de tonnes. Parmi les autres pays méditerranéens, la Tunisie fait partie des plus productifs selon les données estimées et devrait atteindre des niveaux en hausse de 50% par rapport à la campagne de production précédente; de plus, la Turquie devrait enregistrer une progression de 13% par rapport à l'année précédente et la Syrie une hausse de 11% environ. Parmi les autres producteurs du bassin méditerranéen, on enregistre une baisse de production au Maroc, tandis que l'Algérie a progressé de 9%, toujours par rapport à la campagne précédente. Les productions de ces deux derniers pays devraient être autour de cent vingt mille et cinquante-cinq mille tonnes respectivement.

Quant à la production nationale d'huile d'olives, elle s'élèverait à 45.000 tonnes pour la campagne oléicole 2012-2013, selon les estimations de l'Institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV).

**Tableau III.1 : Production mondiale d'huile d'olive par pays**

Pays	2006/07	2007/08	2008/09	2009 /10	2010/11*	2011/12	Var. 11-12/10- 11	Quota camp 2011-12
(.000 ton)								
Algérie	21,5	24,0	61,5	26,5	50,0	54,5	9,00%	1,76%
Argentine	15,0	27,0	23,0	17,0	15,0	15,0	0,00%	0,48%
Australie	9,0	12,0	15,0	18,0	18,0	19,0	5,56%	0,61%
Union Européenne	<b>203,0</b>	<b>2118,5</b>	<b>1939,0</b>	<b>2224,5</b>	<b>2205,0</b>	<b>2180,5</b>	<b>-1,11%</b>	<b>70,38%</b>
Chili	5,0	6,5	8,5	12,0	16,0	22,0	37,50%	0,71%
Israël	8,5	4,0	9,0	3,5	9,5	7,5	-21,05%	0,24%
Jordane	37,0	21,5	18,5	17,0	21,0	22,0	4,76%	0,71%
Liban	6,0	10,5	12,0	9,0	14,0	18,0	28,57%	0,58%
Libye	11,0	13,0	15,0	15,0	15,0	15,0	0,00%	0,48%
Maroc	75,0	85,0	85,0	140,0	130,0	120,0	-7,69%	3,87%
Palestine	31,5	8,0	20,0	5,5	25,0	12,0	-52,00%	0,39%
Syrie	154,0	100,0	130,0	147,0	160,0	180,0	12,50%	6,46%
Tunisie	160,0	170,0	160,0	150,0	120,0	180,0	50,00%	5,81%
Turquie	165,0	72,0	130,0	147,0	160,0	180,0	12,50%	5,81%
Egypte	10,5	7,5	5,0	3,0	3,0	10,0	233,33%	0,32%
Iran	4,0	4,5	4,5	4,0	2,5	6,0	140,00%	0,19%
Autres pays	23,0	29,0	33,6	31,5	34,5	36,5	5,80%	1,18%
<b>Monde</b>	<b>2767,0</b>	<b>2713,0</b>	<b>2669,6</b>	<b>2973,5</b>	<b>3018,5</b>	<b>3098,0</b>	<b>2,63%</b>	<b>100,00%</b>

Source : Projections élaborées en interne et basées sur les données COI et ISTAT  
« Institut national de statistique »

N. : \*Données provisionnelles

\*\* Données prévisionnelles



### III.5. Consommation mondiale

Les estimations du Conseil Oléicole International (COI) indiquent un niveau de consommation égale à 3,078 millions de tonnes pour la campagne 2011-2012 avec une hausse de 3,2% par rapport à la campagne précédente.

**Tableau III.2 : Consommation mondiale d'huile d'olive par pays**

Pays	2006/07	2007/08	2008/09	2009 /10	2010/11*	2011/12	Var. 11-12/10-11	Quota camp 2011-12
(,000 ton)								
Algérie	23,00	25,00	55,00	33,50	45,00	57,00	26,6%	1,85%
Arabie Saoudite	6,00	7,50	6,50	6,50	6,50	6,50	0,00%	0,21%
Argentine	3,00	7,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00%	0,16%
Australie	47,50	35,00	37,00	44,00	44,00	45,00	2,27%	1,46%
Brésil	34,50	40,00	42,00	50,00	61,50	62,00	0,81%	2,01%
Canada	32,50	29,00	30,00	37,00	40,00	40,00	0,00%	1,30%
Union Européenne	<b>1.905,00</b>	<b>1.866,00</b>	<b>1.856,00</b>	<b>1.846,00</b>	<b>1.856,00</b>	<b>1.889,50</b>	<b>1,80%</b>	<b>61,38%</b>
Chili	4,50	5,50	7,50	9,00	11,00	13,00	18,18%	0,42%
Croatie	5,00	5,00	7,00	6,50	7,00	7,00	0,00%	0,23%
Egypte	8,00	7,00	5,00	7,00	6,00	8,00	33,33%	0,26%
Japon	30,50	29,00	30,00	40,50	35,50	35,00	-1,41%	1,14%
Jordan	21,00	23,50	23,50	2,00	20,00	21,00	5,00%	0,68%
Iran	5,50	7,50	7,00	6,50	5,00	10,00	100,00%	0,32%
Israël	15,00	16,00	17,00	16,50	16,00	15,00	-6,25%	0,49%
Liban	5,00	9,00	20,00	9,50	10,00	12,00	20,00%	0,39%
Lybie	11,00	13,00	15,00	15,00	15,00	15,00	0,00%	0,49%
Maroc	65,00	65,00	70,00	90,00	90,00	85,00	-5,56%	2,76%
Mexique	10,00	10,00	9,50	9,00	10,00	10,00	0,00%	0,32%
Norvège	3,50	3,50	3,00	3,50	3,00	3,00	0,00%	0,10%
Palestine	15,00	13,00	14,00	8,00	16,00	13,00	-18,75%	0,42%
Russie	10,50	17,00	15,00	22,00	22,00	23,00	4,55%	0,75%
Syrie	110,00	80,00	110,00	120,50	128,50	150,00	17,12%	4,89%
États-Unis	248,00	246,00	256,00	258,00	275,00	277,00	0,73%	9,00%
Suisse	12,00	12,50	6,00	13,00	13,00	13,00	0,00%	0,42%
Taiwan	3,50	4,00	3,00	4,00	5,00	5,00	0,00%	0,16%
Tunisie	45,00	50,00	21,00	30,00	30,00	40,00	33,33%	1,30%
Turquie	80,00	85,00	108,00	110,00	115,00	125,00	8,70%	4,06%
Autres pays	39,00	39,00	33,00	48,00	48,00	48,00	0,00%	1,56%
<b>Monde</b>	<b>2.798,50</b>	<b>2.754,50</b>	<b>2.831,50</b>	<b>2.902,00</b>	<b>2.984,00</b>	<b>3.078,50</b>	<b>3,1%</b>	<b>100,00%</b>

Source : Projections élaborées en interne et basées sur les données COI.

\*Données provisionnelles

\*\* Données prévisionnelles

### III.6. Classification des huiles d'olives

Pour qu'une huile d'olive être nommée en tant que telle, elle ne peut être obtenue que par des procédés physiques sans intervention de solvants. Cette définition est cependant incomplète et d'autres critères permettent de diviser les huiles en différentes sous-catégories (Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement, (CNUCED),2005)

#### - **Huiles d'olive vierges**

Huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques, dans les conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile, et qui n'a subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration, à l'exclusion des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de réestérification, et de tout mélange avec des huiles d'autre nature.

#### - **huile d'olive vierge extra**

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, est au maximum de 1g pour 100g et dont la note de dégustation est supérieure ou égale à 6,5. Les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

#### - **huile d'olive vierge**

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, est au maximum de 2g pour 100g et dont la note de dégustation est supérieure ou égale à 5,5. Les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

#### - **huile d'olive vierge courante**

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, est au maximum de 3,3g pour 100g et dont la note de dégustation est supérieure ou égale à 3,5. Les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

#### - **huile d'olive vierge lampante**

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, est supérieure à 3,3g pour 100g ou la note de dégustation est inférieure à 3,5.

Les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

- **Huile d'olive raffinée**

Huile obtenue par le raffinage d'huiles d'olive vierges, dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, ne peut être supérieure à 0,5g pour 100g et dont les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

- **Huile d'olive**

Huile constituée par un coupage d'huile d'olive raffinée et d'huiles d'olive vierges autres que lampante, dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, ne peut être supérieure à 1,5g pour 100g et dont les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

- **Huile de grignons d'olive brute**

Huile obtenue par traitement au solvant des grignons d'olive, à l'exclusion des huiles obtenues par des procédés de réestrication et de tout mélange avec des huiles d'autre nature, et dont les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

- **Huile de grignons d'olive raffinée**

Huile obtenue par le raffinage d'huile de grignons d'olive brute, dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, ne peut être supérieure à 0,5g pour 100g et dont les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie.

- **Huile de grignons d'olive**

Huile constituée par un coupage d'huile de grignons d'olive raffinée et d'huiles d'olive vierges autres que lampante, dont l'acidité libre, exprimée en acide oléique, ne peut être supérieure à 1,5g pour 100g et dont les autres caractéristiques sont conformes à celles prévues pour cette catégorie

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.

**Tableau III.3 :** Données physico-chimiques de classification

des huiles (Food and Agriculture Organisation (FAO), 2001 et Codex Alimentaires, 1989)

	Densité relative (à 20°C)	Acidité (% acide oléique)	Indice peroxyde (meq O <sub>2</sub> /kg)	Extinction Spécifique (à 270nm E <sub>1cm</sub> <sup>%</sup> )	Acide gras Saturé en position 2(%)
Huile d'olive Vierge extra		<1	<20	<0.25	<1.5
Huile d'olive Vierge		<2	<20	<0.3	<1.5
Huile d'olive Vierge Ordinaire	0.910	<3.3	<20	<0.3	<1.5
Huile d'olive raffiné	0.916	<0.3	<5	<1.1	<1.8
Huile d'olive		<1.5	<15	<0.9	-
Huile de grignon d'olive raffiné		<1.5	<5	<2.0	<2.2
Huile de grignon d'olive		<1.5	<15	<1.7	-

### III.7. Compositions d'huile d'olive

L'huile d'olive se compose généralement de 98% de triglycérides qui sont essentiellement monoinsaturés. Le principal AG de l'huile d'olive est l'acide oléique (18:1n-9). Il représente 55 à 83% des AG totaux. Les principaux AGS sont l'acide stéarique (18:0) et l'acide palmitique (16:0). Parmi les AGPI, on note une majorité d'acide linoléique. L'huile d'olive en contient de 3,5 à 21% selon les conditions climatiques, les conditions de culture et bien entendu la variété de l'olivier. Les constituants mineurs de l'huile d'olive (0,5 à 2%) sont présents dans la fraction insaponifiable. Cette fraction est composée essentiellement de phénols qui sont des antioxydants et protègent l'huile contre le vieillissement, de vitamines dont les principales sont les vitamines E, K, D et A, d'alcools (stérols, méthyle-stérols, alcools tri-terpéniques, alcools aliphatiques....) et de pigments qui donnent la couleur jaune ou verte à l'huile. Ce sont principalement la chlorophylle (verte) et le carotène (jaune). Leur proportion dépend beaucoup de la maturité des olives. (Benzaria, A. 2006)

**Tableau III.4** : Composition en acide gras d'une huile d'olive  
selon les résultats d'Olivier et coll. (2003) et selon la norme du codex alimentaires.

Acide gras	Formule brute	Olivier et coll.(%)	Codex alimentarius (%)
Acide myristique	C14 :0	Tr	<0.1
Acide palmitique	C16 :0	7.5-15.6	7.5-20
Acide sapiénique	C16 :1n-9	0.1-0.2	0.3-3.5
Acide palmitoléique	C16 :1n-7	0.3-1.9	
Acide margarique	C17 :0	<0.3	<0.5
Acide margaroléique	C17 :1n-8	<0.5	<0.6
Acide stéarique	C18 :0	1.4-3.4	0.5-5
Acide oléique	C18 :1n-9	60.9-82.1	55-83
Acide vaccinique	C18 :1n-7	0.7-3.6	-
Acide linoléique	C18 :2n-6	4.5-16.1	3.5-21
Acide -linoléinique	C18 :3n-3	0.4-1.2	<1.5
Acide arachidonique	C20 :0	0.3-0.5	<0.8
Acide gadoléique	C20 :1n-9	0.2-0.5	-
Acide béhénique	C22 :0	<0.2	<0.2
Acide lignocérique	C24 :0	<0.1	<1

## III.8. Caractéristiques de l'huile d'olive

### III.8.1. 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. (Boskou, D. 1996)

### III.8.2. Caractères physico-chimiques

#### III.8.2.1. 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.

### III.8.2.2. 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 (Sherwin,E,R. 1976), fixe le minimum de cet indice à 20meq d'oxygène actif par kg d'huile.

### III.8.2.3. 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 203-208nm et est transparente au-delà de 210nm. Les composés provenant de l'oxydation de l'huile présentent des absorptions pour les radiations de longueur d'onde suivantes:

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

La norme commerciale du COI (Gille,L.Rosenau,T.Koslov,A,V.and Gregor,W.2008) recommande que l'huile d'olive vierge extra présente un coefficient d'extinction à 270nm inférieur à 0,20.

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

## III.9. Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé

De nombreuses recherches récentes ont confirmé les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé. Riche en acides gras insaturés, principalement l'acide oléique, en antioxydants (polyphénols), en vitamine E et autres constituants, l'huile d'olive diminue le risque des maladies cardiovasculaires, le taux du mauvais cholestérol (LDL) (Pelletier et al. 1995) dans le sang et protège contre la formation de cellules cancérogènes.

En effet, depuis la fin des années 50, des études épidémiologiques ont permis de constater que les maladies cardio-vasculaires, c'est-à-dire l'athérosclérose, la maladie coronarienne et l'infarctus et la mortalité dont ils sont responsable, n'avaient pas du tout la même fréquence dans les pays du Nord de l'Europe et ceux du pourtour méditerranéen.

Dans les pays méditerranéens où l'huile d'olive constitue la principale source de matières grasses dans l'alimentation quotidienne, on constate qu'il y a moins des gens souffrant de maladies cardio-vasculaires (Hertog et al. 1995; Jialal et Devaraj. 1996 ; Mata et al. 1996)

L'huile d'olive contient des anti-oxydants qui s'opposent à l'oxydation des lipoprotéines LDL, une des premières étapes importantes dans le développement de l'athérosclérose.

Elle s'oppose, dans une certaine mesure, à l'agrégation des plaquettes et à la formation des caillots qui peuvent déclencher l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'un supplément en vitamine E entraîne une augmentation des taux d' tocophérol, aussi bien dans le plasma que dans les particules des LDL. (Reavan. 1996 ;Simons et al. 1996)

### **III.10. Techniques instrumentales d'analyse de l'huile d'olive**

#### **III.10.1. Chromatographie liquide à haute performance**

HPLC et méthodes chromatographiques combinées à une grande importance dans les techniques d'analyse de l'huile d'olive. Plusieurs composants mineurs de l'huile d'olive tels que les composés phénoliques, des pigments, des stérols, tocophérols et triacylglycérols peuvent être identifiés et quantifiés avec cette technique.

##### **III.10.1.2. Généralité**

La chromatographie liquide haute performance est une forme moderne des méthodes chromatographiques dont l'intitulés sont rassemblés sous le vocable général de chromatographie liquide sur colonne, qui, quel que soit le phénomène physique invoqué (adsorption, partage, échange d'ion...) est assez peu utilisée en raison :

- De la teneur de séparation.
- De l'absence de détection aisée et rapide.

La mise au point de phases stationnaire de granulométrie fine et homogène a permis d'améliorer l'efficacité de la chromatographie (qui est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules de phases stationnaire) et d'accélérer considérablement la vitesse des analyses (ordre de grandeur des durées 5min à 1h pour une HPLC et 1h à 20h pour une chromatographie liquide « ancienne »). De plus le couplage à la colonne de chromatographie de détecteur fonctionnant selon plusieurs principes a permis de simplifier les manipulations.

### III.10.1.3. Principe de la méthode

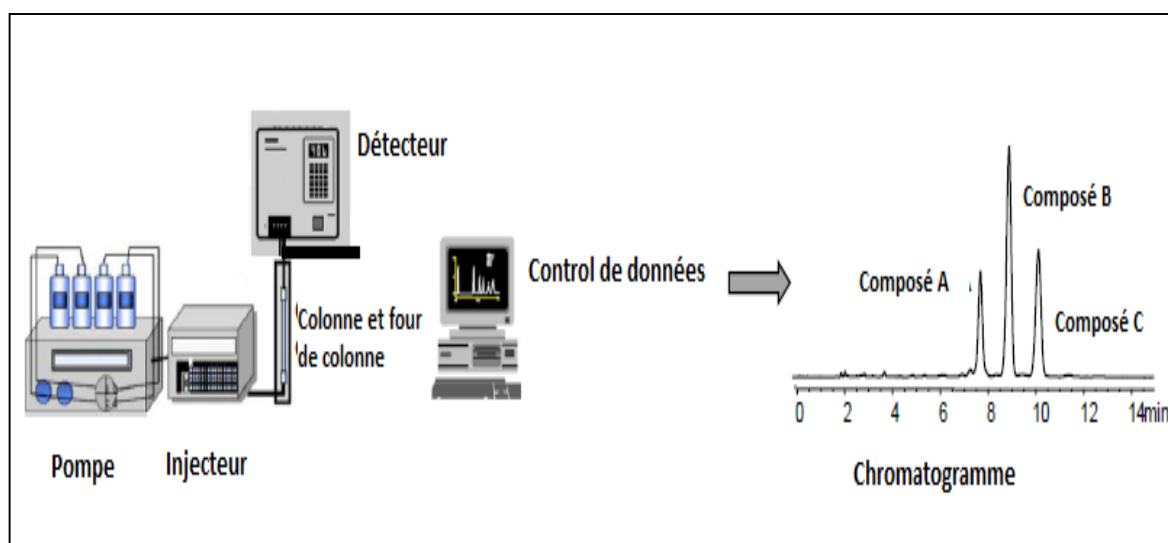
La HPLC est une technique de séparation qui implique l'injection d'un petit volume d'échantillon liquide dans une colonne contenant de petites particules de l'ordre de 3 à 5 microns de diamètre appelée phase stationnaire.

Les composants de l'échantillon se déplacent dans la colonne avec la phase mobile de haut en bas par la haute pression exercée par une pompe. Ces composants sont séparés l'un de l'autre par la colonne qui implique des interactions chimiques et/ou physiques diverses entre leurs molécules et les particules de remplissage.

Au niveau de détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme (Rosset,R.1991)

La détection la plus couramment utilisée en HPLC est :

- Détection Spectroscopique
- Détection à indice de Réfraction
- Détection à Fluorescence



**Figure III.5 :** Principe de la HPLC [Notions de base de la chromatographie liquide (HPLC)

« Agilent Technologies, Inc ».]



Il y a quatre modes de séparation majeurs utilisés pour séparer la plupart des composés :

- Chromatographie de phase inversée.
- Chromatographie d'adsorption.
- Chromatographie d'échange d'ions.
- Chromatographie d'exclusion stérique.

Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) est actuellement la technique la plus populaire et fiable pour l'analyse de l'huile d'olive.

- **Chromatographie de phases inversées (RPC)**

La phase stationnaire de la colonne est non-polaire (par exemple. C18, C8, C3, phényle, etc.) et la phase mobile est composée d'un mélange de solvant organique ou d'eau plus solvant organique miscible avec l'eau (par exemple le méthanol, acétonitrile).

La technique peut être utilisée pour les molécules non-polaires, polaires, ioniques... Pour des échantillons contenant une vaste gamme de composants, le gradient d'élution est souvent utilisé. On commence par la phase mobile à base d'eau et on ajoute ensuite le solvant organique comme une fonction de temps. Le solvant organique augmente la force dissolvante et élue les composés qui sont très fortement retenus sur la phase stationnaire de RPC. (Agilent Technologies, Inc)

### **III.10.1.4. Sélection des solvants utilisés en HPLC**

#### **III.10.1.4.1. Propriétés des solvants**

La réussite d'une séparation dépend de l'adéquation soluté-phase stationnaire-phase mobile.

En chromatographie, le terme polarité d'un solvant est la résultante des différentes interactions soluté-solvant, qu'on distingue trois groupes :

Les forces intermoléculaires de dispersion (dipôle instantané-dipôle instantané), d'induction (dipôle permanent-dipôle induit) et d'orientation (dipôle permanent-dipôle permanent) qui sont plus ou moins spécifiques. Au deuxième groupe appartiennent les forces de liaison hydrogène et de transfert de charge qui sont spécifiques du couple soluté-solvant. Enfin, le dernier groupe renferme les interactions électrostatiques entre les espèces ionisées en solution. (Marcel, C. Alain, J. s.d)

#### III.10.1.4.2. Solvant et élution

Il est souvent nécessaire en HPLC de faire des mélanges de solvants pour obtenir la polarité souhaitée. Les solvants doivent bien entendu être miscibles entre eux. Il est bon de rappeler que les solvants doivent avoir une qualité HPLC et qu'ils doivent être dégazés. Lorsque l'eau est utilisée comme solvant elle doit avoir une résistivité de minimum de 18Mohms. Le choix du solvant dépend également de la colonne utilisée : type de colonne, domaine pH d'utilisation.

Afin de prévoir l'ordre d'élution des composés, il est nécessaire de connaître le type de colonne, la polarité des produits chimiques en fonction de leur famille et la force éluante de la phase mobile (classement proche de la polarité du solvant). (Sarl ARKANYS)

#### III.10.1.4.3. Sélection des solvants

Pourtant, en pratique, la plupart des séparations effectuées en chromatographie d'adsorption et de partage sont réalisées avec une dizaine de solvants.

De grandes variations de la sélectivité sont généralement observées lorsque l'on modifie la nature et l'intensité des interactions soluté-solvant. Par exemple, le remplacement dans une phase éluante du méthanol (solvant polaire) par l'éthanol n'entraîne pas de modification notable de la sélectivité car ces deux solvants sont essentiellement accepteurs de protons, alors que l'addition de chlorure de méthylène (fortes interactions dipôle-dipôle) ou de chloroforme (donneur de protons) provoque d'importantes modifications de la sélectivité.

Les facteurs de capacité sont ajustés en choisissant, dans le premier cas, un solvant de base de type alcane ou cycloalcane n'entraînant aucune sélectivité particulière et, dans le second cas, l'eau qui n'a aucune affinité pour les chaînes alkyle des silices greffées. On peut ensuite, pour une polarité globale fixée, faire varier la sélectivité en sélectionnant un solvant (ou des solvants) appartenant à un (ou aux trois) groupe(s) de sélectivité.

#### III.10.1.5. Optimisation

Dans la mise au point d'une séparation, il faut, certes, obtenir une résolution satisfaisante, mais aussi prendre en compte certaines contraintes pratiques telles la durée de la séparation, la perte de charge (généralement limitée vers 200 à 300 bar), la détectabilité (qui doit être aussi bonne que possible dans l'analyse de traces).

Dès lors, une stratégie d'optimisation consiste à déterminer un point de fonctionnement expérimental constituant un compromis vis-à-vis de contraintes contradictoires.

Ainsi, une augmentation de la longueur de la colonne pour accroître l'efficacité et partant la résolution de la séparation entraîne, toutes choses égales par ailleurs, une augmentation de la perte de charge, de la durée de l'analyse, de la dilution des solutés dans l'effluent. Néanmoins l'objectif prioritaire étant la qualité de la séparation, nous examinerons dans un premier temps l'optimisation de la résolution avant de traiter l'optimisation multiparamètre. (Marcel, C. Alain, J. s.d)

### III.10.1.6. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC

#### III.10.1.6.1. Principe

L'analyse quantitative en chromatographie à phase liquide est essentiellement une méthode comparative, elle est basée sur la relation reliant l'aire ( $A_i$ ) ou la hauteur ( $H_i$ ) du pic de l'analyte à sa concentration. Cette relation est établie par le détecteur qui mesure les variations des signales selon les équations suivantes :

$$C_i = K_i \cdot A_i \quad (1)$$

$$C_i = K_i \cdot H_i \quad (2)$$

Avec  $K_i$  : coefficient de réponse du détecteur

La stabilité des conditions d'analyse laisse le coefficient constant, ce qui donne une linéarité entre la variation des paramètres et les différentes concentrations de l'analyte. Cette linéarité est la base des différentes méthodes qui permettent la détermination de la concentration d'un échantillon inconnu. Parmi ces méthodes, la méthode d'étalonnage qui est la plus utilisée en CPL. Son principe est de tracer une courbe représentant la variation de signal (aire ou hauteur) en fonction de la quantité d'analyte.

Cette courbe est traduite par l'équation :

$$y = ax + b \quad (3)$$

$a$  : pente de la droite

$b$  : ordonné à l'origine

Le dosage de l' -tocophérol par RP-HPLC est généralement réalisé par la méthode **d'étalonnage interne ou externe**, que ce dernier on l'a utilisé en mesurant l'aire de pic de l'analyte. (Rosset,R.1991)

### III.10.1.6.2. L'étalonnage externe

Consiste à réaliser l'injection d'un volume reproductible et identique des solutions étalons, préparées avec des concentrations bien précises à partir du l'étalon de pureté connu. Les valeurs des aires des pics correspondants à chaque concentration sont représentées sur une droite d'étalonnage d'équation de type :

$$A_r = f(C_r) \quad (4)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être écrite comme suit :

$$A_{ét} = a \cdot C_{ét} + b \quad (5)$$

Où :

$A_{ét}$  : Aire du pic de l'étalon pur ;

$C_{ét}$  : Concentration de l'étalon pur ;

$a$  : Pente de la droite ;

$b$  : Ordonnée à l'origine.

Pour déterminer la concentration de l'analyte dans un échantillon inconnu, il suffit d'injecter le même volume de celui-ci après traitement, et dans les mêmes conditions. La concentration  $C_{éch}$  est calculée à partir de l'aire de pic obtenu ( $A_{éch}$ ) par deux manières :

- Soit par l'équation de la droite suivant la relation :

$$C_{éch} = \frac{A_{éch} - b}{a} \quad (6)$$

- Soit par projection de la valeur d'aire sur la droite en utilisant un logiciel approprié.

La précision des résultats dépend :

- des pesées de la substance de référence et de l'échantillon.
- des dilutions, de la reproductibilité du volume de l'injection.

L'avantage de la méthode est que le volume de l'injection n'a pas une grande importance à condition qu'il demeure constant lors de l'étalonnage et l'analyse dans des conditions chromatographiques strictement invariantes. (Rosset, R. 1991)

### III.10.2. Spectrométrie d'absorption moléculaire ultraviolet-visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

### III.10.2.1. Domaine spectral

Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm.

- UV-lointain : 10 nm-200 nm ;
- Proche-UV : 200 nm-400 nm ;
- Visible : 400 nm (indigo)-800 nm (rouge).

### III.10.2.2. Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000cm<sup>-1</sup> soit 160 à 665kJ·mol<sup>-1</sup>). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

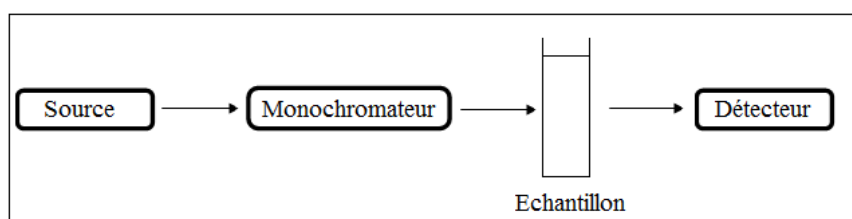


Figure III.6 : Principe d'UV-visible

### III.10.2.3. Loi d'absorption de la lumière - loi de Beer-Lambert

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration  $C$  contenue dans une cuve d'épaisseur  $l$ .

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre  $I_0$  et  $I$  : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-klC} \quad (7)$$

$I_0$  : l'intensité de la lumière incidente.

$I$  : l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)

$l$  : la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

$C$  : la concentration des espèces absorbantes

$k$  : une constante caractéristique de l'échantillon.

L'équation (7) peut se réécrire comme ci :

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = k l c / 2,3 = \varepsilon l C \quad (8)$$

- $\log(I_0/I)$  est appelé absorbance (Abs)
- $I/I_0 = T$  est la transmission
- % T est la transmittance

$\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire ; c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité,  $\varepsilon$  est en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ .

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log T = \varepsilon l C \quad (9)$$

#### III.10.2.4. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation...).

# CHAPITRE IV

## *MATERIELS ET METHODES*

## IV.1. Echantillonnage

Les échantillons d'huile d'olive sont collectés à partir d'unités d'extraction localisées dans plusieurs régions oléicoles. L'étude a porté sur 6 échantillons prélevés durant la saison 2012/2013 et répartis comme suit :

- Deux (2) échantillons de la wilaya de Tlemcen. «Sabra, Maghnia ».
- Un (1) échantillon de la wilaya de Mascara, «Sig».
- Un (1) échantillon de la wilaya de Tizi Ouzou.
- Un (1) échantillon de la wilaya de Bejaia (commercialisé).
- Un (1) échantillon d'Espagne (commercialisé).

Chaque échantillon est prélevé à partir d'un échantillon global par homogénéisation et réduction de la masse appropriée qui est représentative du lot et destinée à l'analyse au laboratoire. Les échantillons d'huile d'olive sont mis dans des flacons en verre foncé propres et secs d'une taille minimale de 250ml muni de bouchon, et placé à l'abri de la lumière selon la norme AFNOR T60-280. (1987). Une étiquette est collée sur chaque flacon indiquant la région oléicole.

**Tableau IV.1** : Caractéristiques des échantillons d'huile d'olive

Régions	Système d'extraction	Codage
Tlemcen « Sabra »	Centrifugation	A-1
Tlemcen «Maghnia»	Presse	A-2
Bejaia	Presse	B-1
Tizi Ouzou	Presse	C-1
Mascara « Sig »	Presse	D-1
Espagne	Presse	E-1



## IV.2. Solvants et réactifs

Le tableau suivant regroupe les solvants et les réactifs utilisés au cours des analyses réalisées.

**Tableau IV.2 :** Solvants et réactifs utilisés au cours des travaux

Nom du produit	CAS	Fabricant	M (g/mol)
<b>Acétonitrile HPLC</b>	75-05-8	VWR	41,05
<b>Acide acétique</b>	200-580-7	MERCK	60,05
<b>Alpha- tocophérol</b>	59-02-9	Fluka	430,71
<b>Chloroforme</b>	67-66-3	Scharlau	119,38
<b>Ethanol absolue</b>	64-17-5	VWR	46,07
<b>Ether diéthylique</b>	60-29-1	SIGMA-ALDRICH	74,12
<b>Hexane</b>	110-54-3	SIGMA-ALDRICH	86,19
<b>Iodure de potassium</b>	7681-11-0	SIGMA-ALDRICH	166,0028
<b>Isopropanol</b>	67-63-0	-----	60,1
<b>Méthanol HPLC</b>	67-56-1	SIGMA-ALDRICH	32,04
<b>Thiosulfate de sodium</b>	7772-98-7	-----	158,11

### IV.3. Analyse par chromatographie liquide haute performance « HPLC » d' $\alpha$ -tocophérol

#### IV.3.1. Description du système RP-HPLC utilisé

Le dosage de l'  $\alpha$ -tocophérol a été réalisé sur un système RP-HPLC Shimadzu équipée d'une colonne C18 de 25cm de longueur, 4,6mm de diamètre interne et de 5 $\mu$ m de diamètre de particules, d'une pompe « Model LC-10ADvp » et d'un contrôleur de gradient « Model FCV-10ALvp », auxquels sont connectés à un injecteur manuel et un détecteur UV-visible « Model SPD-10Avp ». Le volume de solution étalon ou de solution test injecté est de 20 $\mu$ l. Toutes les analyses ont été traitées par le logiciel « Lcsolution ».



*Figure IV.1 : Système HPLC du Laboratoire de Recherche  
« Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».*

Principe de différents composés de système :

#### - Réservoirs de la Phase mobile

La phase mobile utilisée est un seul solvant ou un mélange de solvant organique, elle doit être de pureté analytique et filtré avec un filtre en acier inoxydable d'une porosité de 2 $\mu$ m, le filtre est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Si la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants, ceux-ci doivent être complètement miscibles. En plus le soluté à séparer doit y être soluble.

- **Dégazeur DGU-14A, N° 228-35359-9, Shimadzu**

Afin d'assurer une analyse stable à tout moment, la phase mobile devra être dégazée. La phase mobile passe à travers une tuyauterie spéciale faite de films de résine. Le dégazage est réalisé par réduction de la pression entourant cette tuyauterie. Cet élément peut dégazer séparément.

- **Unité de gradient FCV-10ALvp, Shimadzu, N° 228-39500-91**

Elle permet de réduire au minimum le volume mort et de réduire le délai de gradient. L'unité de gradient peut commuter jusqu'à 4 phases mobiles.

- **Pompe LC-10ADvp, Shimadzu**

C'est une pompe d'échange à deux têtes ayant de petites chambres (10 $\mu$ L. par course), Cette pompe permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qui fonctionnent en alternance. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Cette pompe peut livrer un débit constant de 0,001 à 9,999ml par minute, avec des pressions allant de 10 à 392 bars. La gamme de température de fonctionnement est de 4 à 35°C.

- **Mixeur, N° 228-28000-91**

Il s'agit d'un accessoire qui permet de mélanger efficacement la phase mobile dans le cas d'élution en mode gradient.

- **Injecteur**

Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, cette boucle contient deux positions :

- *LOAD (charger)* : On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. L'excès du liquide injecté est évacué par l'ouverture de vidange.

- *INJECT (injecter)* : En tournant la vanne vers cette position, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne à travers la phase mobile. Dans cette position, on peut rincer les canaux des déviations de la vanne ; le solvant du lavage est évacué par une autre ouverture de vidange. Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

- **Colonne de garde**

Une colonne de garde peut être placée entre le dispositif d'injection et la colonne analytique. Comme son nom l'indique, cette dernière est utilisée pour protéger la colonne analytique contre la perte d'efficacité, qui peut être provoquée par la présence de matière particulaire. Elle doit être remplie avec la même phase stationnaire que celle de la colonne analytique.

- **Colonne analytique : RP-HPLC**

Elle est constituée par un tube en acier inoxydable rempli par une phase stationnaire, qui se compose de greffons organiques apolaires (octadécyle C18), fixés sur des particules de silice. C'est une phase inverse, RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography). La qualité de la séparation dépend de la géométrie de la colonne, de la granulométrie des particules qui constituent la phase stationnaire et de la qualité du remplissage. Cet élément représente le noyau du système chromatographique.

- **Détecteur SPD-10Avp, Shimadzu**

C'est un détecteur UV-Visible, dispersif à longueur d'onde variable. Il mesure l'absorbance pendant l'élution de l'échantillon de la colonne. Il offre deux modes de détection, détection à longueur d'onde fixe ou détection en mode duel, La source utilisée est une lampe de deutérium, elle fournit la gamme de longueur d'onde 190 à 600nm. (Cossut,J. et al.2002)

La longueur du chemin optique de la cellule est 1cm, et son volume est 8 $\mu$ L. La température de fonctionnement est 4 à 35°C.

- **Système de traitement des données**

C'est un ordinateur muni d'un logiciel, LC solution. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Les données traitées peuvent être imprimées.

### **IV.3.2. Traitement d'échantillon pour le dosage d'alpha-tocophérol**

Le dosage de l'  $\alpha$ -tocophérol dans l'huile d'olive a été fait en pesant dans un tube Eppendorf en plastique une masse d'environ 0,0365mg d'huile et la solubiliser dans 300 $\mu$ l de 2-propanol, en utilisant une micropipette de 40-500 $\mu$ L.

Le solvant 2-propanol a été choisi parce qu'il permet la solubilité d'huiles ainsi que

sa miscibilité avec les solvants utilisés en chromatographie (Gliszczynska,A. Swięto.Sikorska,E.2004), comme phase mobile (30% Acétonitrile/70% Méthanol) qu'est amené dans le système à un débit d'élution de 1,5mL/min.

L'échantillon agité dans le vortex pendant 15min et passé dans la centrifugeuse à 13000rpm pendant 5min après un repos de 15min, est directement injecté dans la colonne, à une température ambiante de la salle ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Le traitement et l'injection d'échantillon était fait dans l'obscurité, à la présence d'une lampe rouge, pour que la lumière ne cause pas la dégradation de la molécule d'alpha-tocophérol.

La concentration en alpha-tocophérol est ensuite calculée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée.

Le choix de la méthode de l'injection directe est dû à une réalisation de plusieurs essais d'autres techniques d'extraction avec évaporation, qu'on n'a même pas réussi à avoir un rendement de 80%.

### - **La courbe d'étalonnage**

Pour la réalisation de la courbe d'étalonnage on a préparé une solution mère de 10ml d'une concentration de  $400\mu\text{mol}$  d'alpha-tocophérol avec l'isopropanol comme solvant. Différentes concentrations d'étalons préparées (20,40 et  $60\mu\text{mol}$ ) sont ensuite injectées en HPLC afin de réaliser la courbe d'étalonnage.

## **IV.4.Détermination des caractéristiques chimiques d'huile d'olive**

Toutes les extractions et les analyses ont été réalisées en trois fois dans un même intervalle de temps et la moyenne de ces trois analyses ainsi que les écart-types sont présentés dans les différents tableaux de données (chapitre suivant).

### **IV.4.1. Acidité**

Elle correspond à la teneur en pourcentage d'acide gras (exprimée en acide oléique) présent dans l'huile d'olive et représente un paramètre important dans l'évaluation de sa qualité.

L'acidité est mesurée selon la norme AFNOR (1984).

- **Matériels**

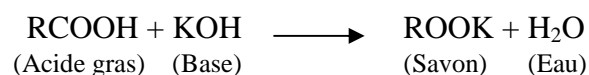
- Une burette de 10ml ;
- Une éprouvette de 25ml ;
- Un erlenmeyer de 250ml ;
- Une plaque chauffante munie d'un agitateur de marque LABINCO L34 ;
- Un barreau magnétique ;
- Une balance de marque OHAUS avec une précision de  $10^{-4}$ .

- **Réactifs**

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

- **Mode opératoire**

Le dosage de l'acidité consiste à mesurer la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser 2g de matière grasse en présence de 50ml 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 KOH correspondant à l'équilibre acido-basique. Selon la réaction suivante :



L'acidité, exprimée en pourcentage est égale à :

$$\% \text{ Acidité} = \frac{V \times C \times M}{10 \times m} \times 100 \quad (10)$$

Où :

V : le volume en ml de la solution titrée de KOH utilisé,

C : la concentration exacte, en moles /litre, de la solution titrée de KOH utilisé,

M : le poids molaire, en g/mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (=282),

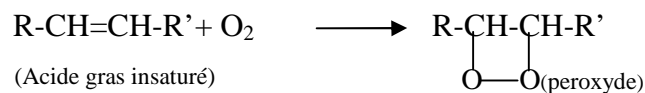
m : la prise d'essai en grammes.

#### IV.4.2. Indice de peroxyde

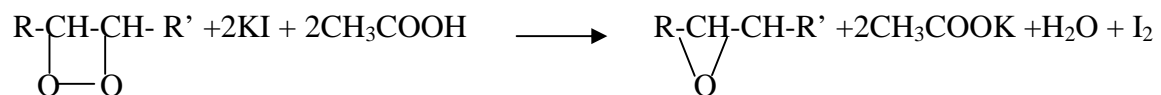
C'est la quantité de peroxyde présent dans l'échantillon, exprimée en milliéquivalents d'oxygène actif contenu dans un kilogramme de produit, oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'indice de peroxyde nous permet d'évaluer l'état de fraîcheur de l'huile.

Le principe repose sur le titrage de l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

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 :



##### - Matériels

- Une burette de 10ml ;
- Une éprouvette de 5ml ;
- Une éprouvette de 10ml ;
- Deux erlenmeyer de 250ml ;
- Une plaque chauffante munie d'un agitateur de marque LABINCO L34 ;
- Un barreau magnétique ;
- Une balance électronique de marque OHAUS avec une précision de  $10^{-4}$ .

##### - 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%).

### - Mode opératoire

Dans un erlenmeyer, 1g d'huile est pesé et mélangé avec 10ml de dichlorométhane ; le tout est agité. 15ml d'acide acétique glacial ainsi que 1ml d'Iodure de potassium (KI) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1mn et laissé reposer pendant 5mn à l'abri de la lumière et à une température ambiante (23°C). 75ml d'eau distillée sont additionnés suivi d'un titrage de l'iode libéré avec une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) à 0,01N en agitant vigoureusement et en employant la solution d'amidon (1g/100ml) comme indicateur, jusqu'à disparition de la couleur.

Un essai à blanc est effectué simultanément.

L'indice de peroxyde en milliéquivalent d' $\text{O}_2/\text{kg}$  est calculé selon l'équation :

$$\text{Indice de peroxyde} = \frac{V-V_0}{m} \times 1000 \times N \quad (11)$$

Où :

V : le volume de thiosulfate de Na de l'échantillon ;

$V_0$  : le volume requis pour titrer le blanc ;

N : normalité du  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,01)

m : la prise d'essai en grammes.

### IV.4.3. Analyse spectrophotométrique dans l'ultra-violet

#### Détermination de l'absorbance et de l'extinction spécifique

Les diènes et les triènes conjugués sont à doser dans l'huile d'olive selon la norme du Conseil Oléicole International (2010). Cet examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse.

La détermination de l'absorbance à 232nm et au voisinage de 270nm permet la détection des produits d'oxydation des acides gras insaturés, lorsqu'ils ont une structure diénique conjuguée (exp : hydroperoxyde linoléique C18 : 2), et des produits secondaires d'oxydation ayant une structure triénique (dans le cas de la présence d'acides gras à trois doubles liaisons).

### - Matériels

- Tubes à essai en verre ;
- Une éprouvette de 5ml ;
- Une balance électronique de marque OHAUS avec une précision de  $10^{-4}$  ;



- Un spectrophotomètre de marque Thermo corporation « Nicolet evolution 100 » équipé d'une cellule de 1cm d'épaisseur ;

- Une cuve en quartz.

- **Réactifs**

- Hexane pur

- **Mode opératoire**

L'échantillon d'huile d'olive (0,05g) est dilué dans l'hexane (5ml) 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 de marque Thermo corporation « Nicolet evolution 100 », équipé d'une fibre optique de 1cm d'épaisseur. Les valeurs sont exprimées comme extinction spécifique  $E^{1\%}$  notée de façon conventionnelle par K et exprimé comme suit :

$$K = \frac{A_i}{C \times S} \quad (12)$$

A : Absorbance à la longueur d'onde .

C : Concentration de la solution en g/100ml.

S : chemin optique (1cm).

Cette analyse prévoit aussi la détermination de la variation de l'extinction spécifique K selon l'équation suivante :

$$K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \quad (13)$$

Où  $K_m$  est l'extinction spécifique à la longueur d'onde d'absorbance maximale m, aux environs de 270nm.

Dans notre cas, nous avons dissout 0,05g d'huile dans 5ml de l'hexane. Cela implique que la concentration de notre solution est de 1g/100ml.

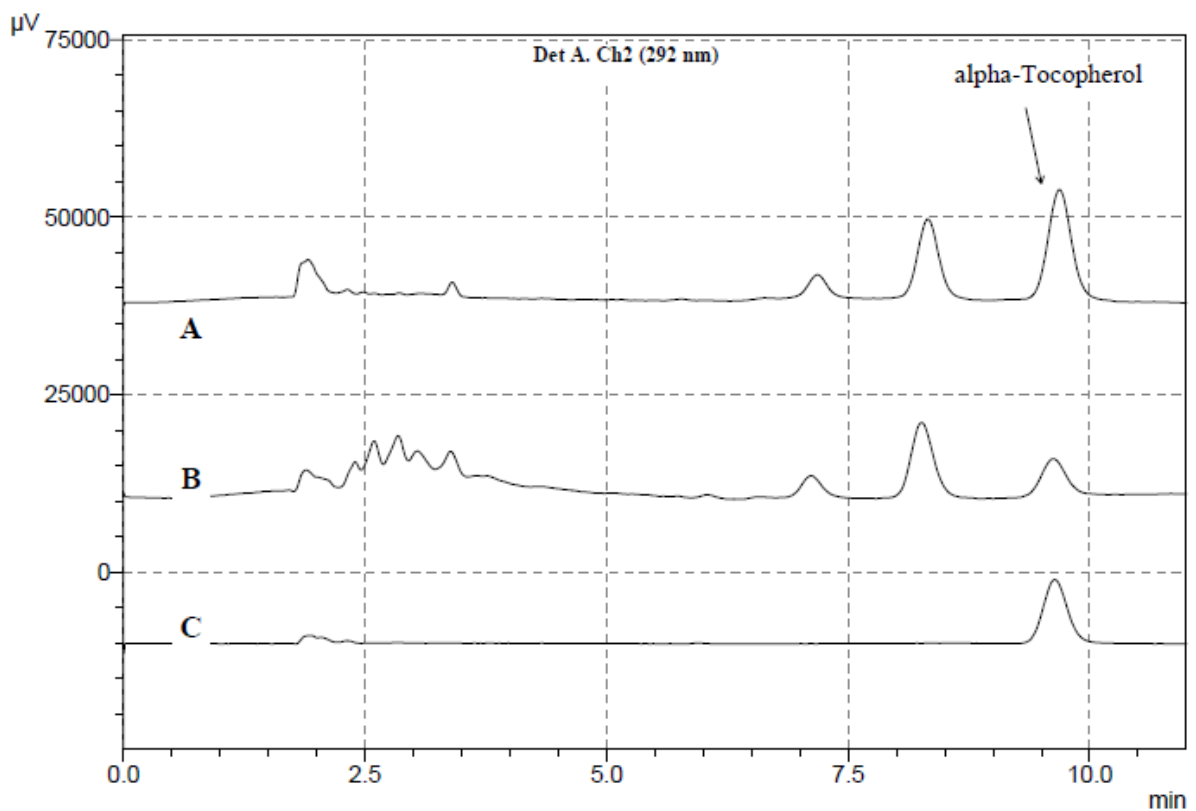
# CHAPITRE V

## *RESULTATS ET DISCUSSIONS*

## V.1. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive

L'identification est réalisée par HPLC, le principe est basé sur la comparaison de temps de rétention du pic de l'analyte dans l'échantillon d'huile d'olive avec celui de l'étalon pur, et aussi de doper le même échantillon par d'étalon pur. Le système RP-élution est conçu pour obtenir une séparation optimale d'alpha-tocophérol dans une période de temps raisonnable.

La figure.1 montre les chromatogrammes typiques obtenus pour un échantillon d'huile d'olive dopé (A), un échantillon de même huile d'olive (B) et un étalon pur (C), le temps de rétention d'alpha-tocophérol était environ 9 min, l'apparition du pic confirme la présence de la molécule dans notre échantillon.



**Figure V.1:** Identification du pic de l'  $\alpha$ -tocophérol

(A : Echantillon d'huile d'olive dopé, B : Echantillon d'huile d'olive et C : étalon pur)

## V.2. Quantification d'alpha-tocophérol dans différents échantillons d'huile d'olive

La quantification d'alpha-tocophérol a été réalisée en utilisant la méthode standard externe. La courbe d'étalonnage en quatre points a été préparée avec la solution standard d'alpha-tocophérol dans 2-propanol aux niveaux similaires à ceux présents dans les huiles évaluées.

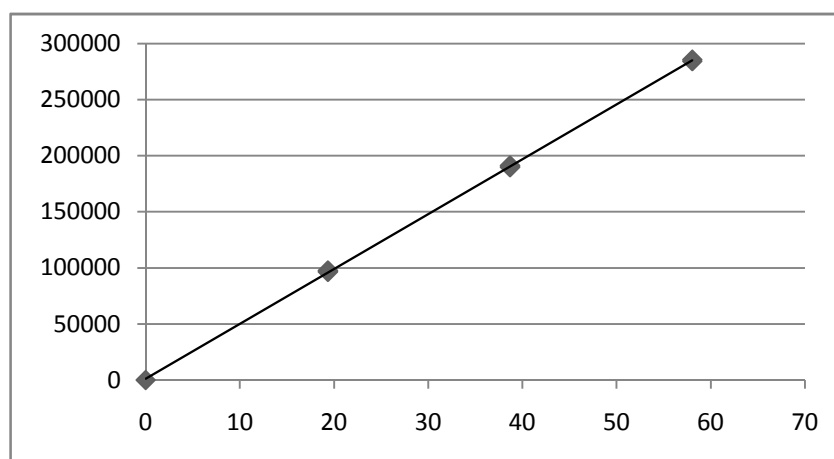


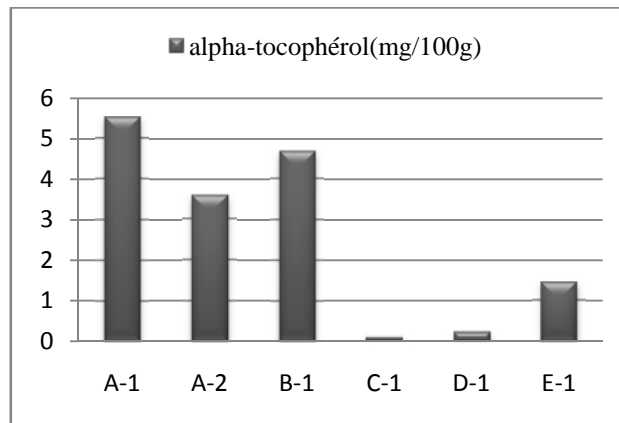
Figure V.2 : Courbe d'étalonnage

La courbe réalisée est donnée dans la figure 2, où  $y = 4887x + 1311$  est l'équation de la droite avec un coefficient de corrélation  $R^2=0,999$ .

**Tableau V.1** : Les résultats d'analyse par RP-HPLC d'alpha-tocophérol des échantillons d'huile d'olive.

Echantillon	Aire de pics	Concentration (µmol/L)	Concentration (mg/100g)
A-1	281762,667	57,387	5,514
A-2	182245,667	37,023	3,557
B-1	238498	48,534	4,663
C-1	5181	0,791	0,076
D-1	11761,5	2,138	0,205
E-1	74211,5	14,917	1,433

L'huile d'olive contient de l'alpha-tocophérol, le tocophérol doté de la plus forte activité vitamine E, à des teneurs variant de 1,2 à 43mg/100g (Kiritsakis,A. Markakis, P.1987- Psomiadou, E. Tsimidou, M. Boskou, D. 2000). D'après un groupe de chercheurs (Psomiadou E, Tsimidou M,Boskou D. 2000), la teneur moyenne est d'environ 12 à 25mg/100g. D'autres ont trouvé des valeurs encore plus élevées, de 24 à 43mg/100g (Gutierrez, F. Jimenez, B. Ruiz, A. Albi, MA. 1999)



**Figure V.3 :** Teneur d'alpha-tocophérol (mg/100g) dans l'huile d'olive selon les différentes régions

L'analyse d'alpha-tocophérol indique des teneurs variant de 0,076 à 5,514mg/100g; néanmoins, des différences significatives sont souvent notées entre les échantillons d'huiles.

L'huile provenant de la région de Tlemcen « Sabra » renferme la teneur la plus élevée en alpha-tocophérol avec 5,514mg/100g suivie de la région de Bejaïa avec une teneur de 4,663mg/100g et ensuite la région de Tlemcen «Maghnia» d'un taux de 3,557mg/100g, pour l'huile commercialisée d'Espagne on distingue une teneur de 1,433mg/100g.par ailleurs, la région de Tizi Ouzouz et mascara « Sig » se distinguent par une faible quantité de 0,076mg/100g et 0,205mg/100g respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Kiritsakis A, Markakis P.1987 et Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D.2000) qui ont trouvé des teneurs varient de 1,2 à 43mg/100g d'alpha-tocophérol dans l'huile d'olive.

Manifestement, la quantité de ces molécules présentes dans l'huile est fonction de plusieurs facteurs. Bien que les données scientifiques sur ce point soient relativement

minces, il semble que la variété de l'olive et sa maturité ainsi que les conditions et la durée de la conservation jouent un rôle capital. Pour la stabilité d'huile d'olive l'accord est moins large sur le point de savoir si le tocophérol contribue à la stabilité d'huile d'olive. Alors que Baldioli et son équipe n'ont observé aucune corrélation entre la stabilité de l'huile à l'oxydation et sa teneur en alpha-tocophérol (Baldioli, M. Servili, M. Perretti, G. Montedoro, GF.1996), d'autres ont attribué un petit rôle à l'alpha-tocophérol (Aparicio, R. Roda, L. Albi, MA. Gutierrez, F.1999), et un groupe espagnol a même constaté une forte corrélation entre la stabilité de l'huile à l'oxydation et sa teneur en alpha-tocophérol. (Gutierrez, F.Jimenez, B.Ruiz, A.Albi, MA.1999)

### V.3.Détermination des caractéristiques chimiques d'huile d'olive

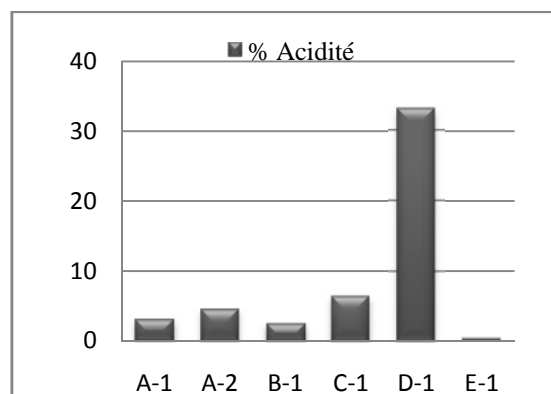
#### V.3.1. Acidité

L'acidité de l'huile d'olive est un facteur déterminant pour juger de sa qualité, elle permet de donner un niveau de l'état de dégradation de la matière grasse de l'huile d'olive, qui est constituée de triglycérides.

Les valeurs de pourcentage d'acidité des échantillons d'huile d'olive de différentes régions sont données dans le tableau ci-dessous et représentées dans la figure V.4.

**Tableau V.2 :** Pourcentage d'acidité de l'huile d'olive selon les différentes régions

	A-1	A-2	B-1	C-1	D-1	E-1
<b>% Acidité</b>	2,954	4,406	2,501	6,411	33,129	0,279



**Figure V.4 :** Pourcentage d'acidité de l'huile d'olive selon les différentes régions

Suivants les résultats d'acidités obtenus des huiles des régions de Tlemcen « Sabra », Bejaia et d'Espagne sont convenables aux celles établies par le Conseil Oléicole International (COI) (2003), qui se situent entre 1 et 3,3%. Par ailleurs les valeurs des régions de Tlemcen « Maghnia » et Tizi Ouzou dépassent souvent les limites établies par le (COI), alors que l'échantillon de Mascara « Sig » est largement le plus élevé d'un pourcentage de 33,1%.

Tous les facteurs qui mènent à l'acidité de l'huile d'olive sont donc liés à un manque de soin sur une partie de la chaîne. Des traitements subi par l'arbre jusqu'à la récolte et l'extraction.

Les facteurs d'altération sont : moisissures, fermentations, maturité trop élevée, mouche de l'olive. Pour produire une huile à faible acidité, il est nécessaire de triturer les olives saines, rapidement après récolte.

Une huile d'olive de qualité où les olives ont été récoltées avec soin, pressées à froid dans un délai le plus court possible après avoir été récoltées, garanti d'avoir une huile d'olive extra vierge avec un faible taux d'acidité, notre cas pour l'huile d'Espagne.

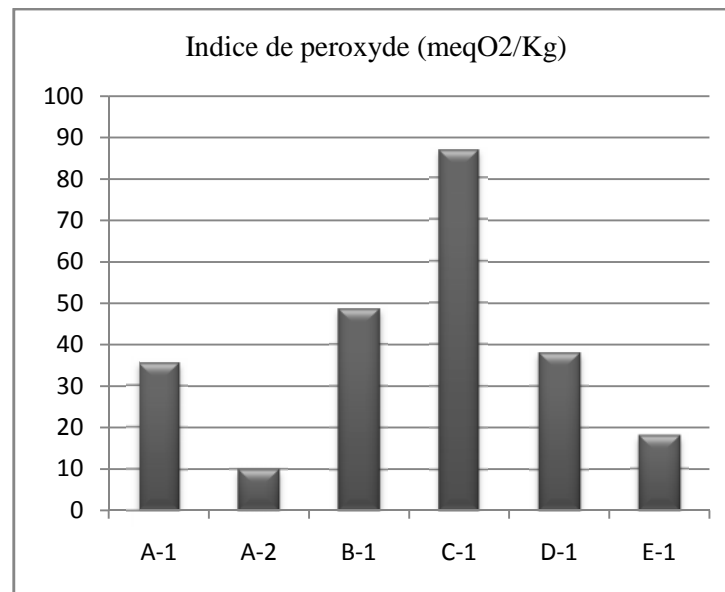
D'autre part, des procédures d'extraction sont conçues pour obtenir le rendement le plus élevé possible d'huile. De telles pratiques produisent une gamme d'olives caractérisées par différentes acidités.

### V.3.2. Indice de peroxyde

Les teneurs en indice de peroxyde des échantillons d'huile d'olive de différentes régions sont données dans le tableau suivant et présenté dans la figure V.5.

**Tableau V.3 :** Indice de peroxyde de l'huile d'olive  
selon les différentes régions

	<b>A-1</b>	<b>A-2</b>	<b>B-1</b>	<b>C-1</b>	<b>D-1</b>	<b>E-1</b>
<b>IP (meqO<sub>2</sub>/Kg)</b>	35,56	9,97	48,55	17,81	86,66	38,04



*Figure V.5 : Indice de peroxyde de l'huile d'olive selon les différentes régions*

A part l'huile d'olive de la région de Tlemcen « Maghnia » qui présente une valeur d'indice de peroxyde de 9,97meqO<sub>2</sub>/kg qui est considérée parmi nos résultats la plus faible valeur, et l'huile d'Espagne d'une valeur de 17.81 meqO<sub>2</sub>/kg. Les huiles d'olive de la région de Tlemcen « Sabra », Bejaia, Mascara « Sig » présentent des valeurs de IP de 35.56, 48.55, 38.04meqO<sub>2</sub>/kg respectivement. Alors que la teneur la plus élevée est celle la région de Tizi Ouzou de 86,66meqO<sub>2</sub>/kg.

Tous les échantillons ont montré des valeurs élevés de IP par rapport aux normes fixés par le COI (<20), a part les échantillons de Tlemcen « Maghnia » et « Espagne » ce qui indique la plus grande oxydation primaire, et cela reviens au stockage des échantillons à température ambiante. (YILDIRIM.G, 2009), et aussi il est claire que 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. Par ailleurs, une étude a révélé que les procédés technologiques adoptés durant le broyage des olives issues aussi bien d'une seule variété que d'un mélange de variétés n'avaient pas une grande influence sur l'augmentation de l'indice de peroxyde (Cecchi et al, 2006). De plus, il a été démontré dans d'autres études, qu'il n'y a aucune différence entre les huiles d'olive extraites par les procédés de centrifugation et de presse. (Caponino et al, 1999; Gimeno et al, 2002b; Salvador et al, 2003)



### V.3.3. Extinction spécifique

La figure ci-dessous représente les spectres ultra-violet des différentes huiles d'olive étudiées.

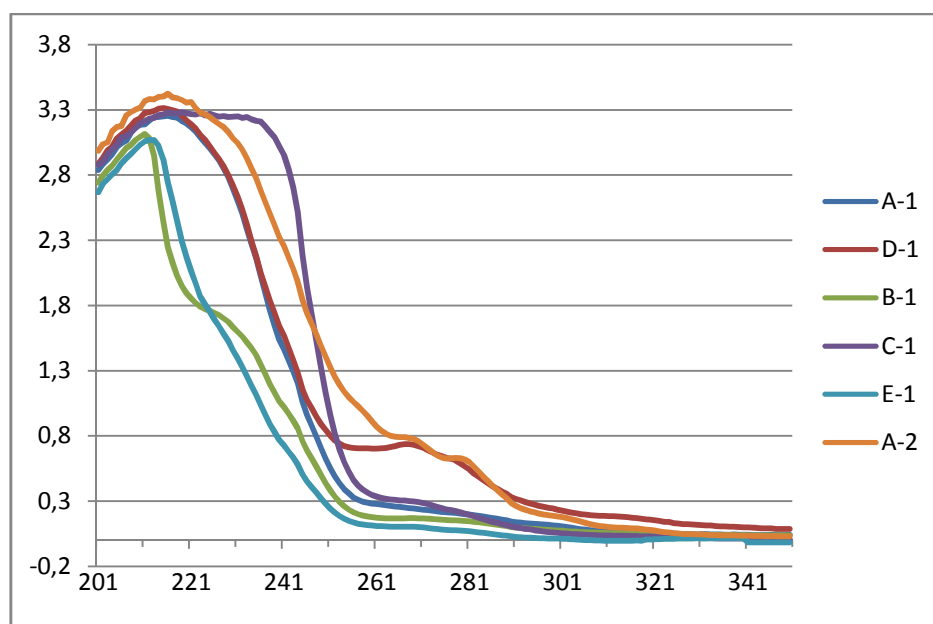


Figure V.6 : Spéctres UV des huiles d'olives

La détermination de l'absorbance à 232nm et au voisinage de 270nm fournis des informations au sujet de la présence des diènes conjugués ( $K_{232}$ ) et des triènes ( $K_{270}$ ) formés pendant l'autoxydation d'huile.

La figure ci-dessous nous montre les valeurs obtenues de  $K_{232}$  et  $K_{270}$  de l'huile d'olive de différentes régions.

**Tableau V.4 :** Extinction spécifique et variation de l'extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions

	<b>A-1</b>	<b>A-2</b>	<b>B-1</b>	<b>C-1</b>	<b>D-1</b>	<b>E-1</b>
<b><math>K_{232}</math></b>	2,50	2,99	1,56	1,33	3,23	2,54
<b><math>K_{270}</math></b>	0,23	0,75	0,16	0,10	0,29	0,72
<b>K</b>	0,001	0,037	0,005	0,012	0,029	0,005

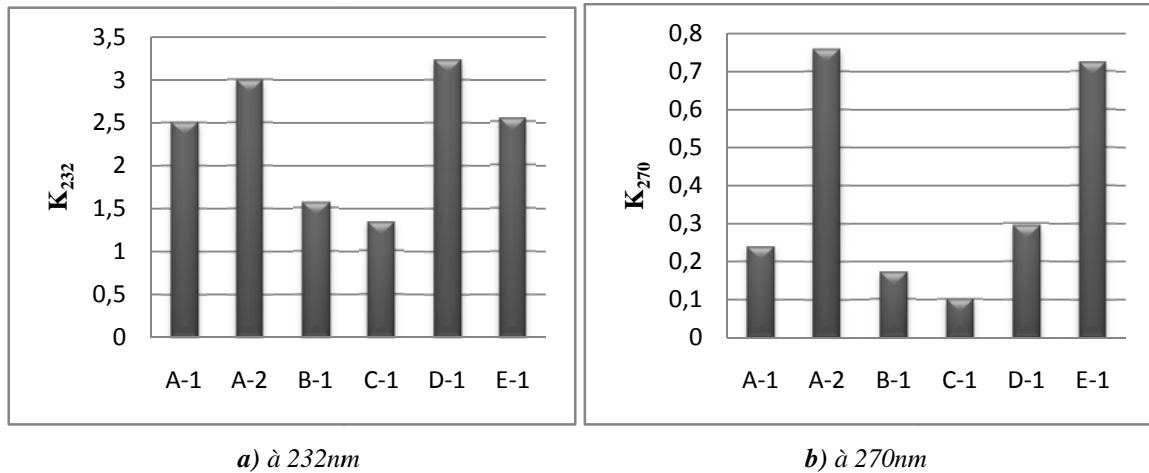


Figure V.7 : Extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions

Les valeurs obtenus de la mesure de l'absorbance à 232nm, indique que les résultats n'excèdent pas les limites fixées par le COI (2003) 2,60, à l'exception des deux échantillons de la région de Tlemcen « Maghnia » et la région de Mascara « Sig » dont les valeurs sont 2,99 et 3,23 à 232nm.

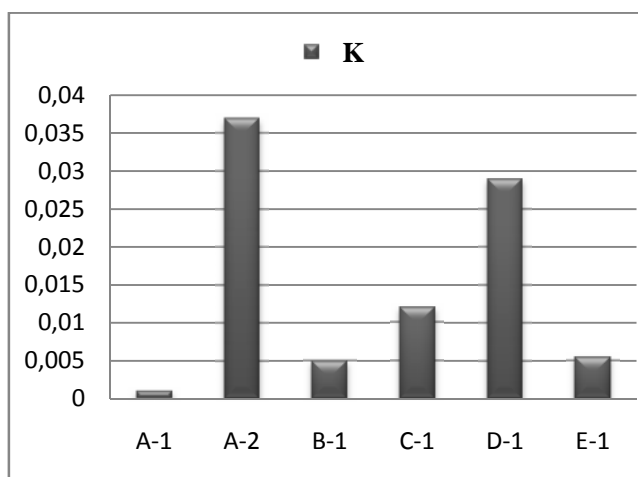
La mesure de l'absorbance à 270 montre que les valeurs obtenues aussi n'excèdent pas les limites fixées par le COI (2003) 0,25 à part celles des deux régions, Tlemcen « Maghnia » et Mascara « Sig » qui dépassent les limites fixés par le COI (2003), 0,75 et 0,29 à 270nm respectivement.

Les diènes et les triènes conjugués sont proportionnels au degré d'oxydation des acides gras insaturés en particulier à ses teneurs respectives en acides oléique, linoléique et linoléinique (Sciancalepore, 1998)

Ranalli et Angerosa (1996), et Kiritsakis (1998), signalent que l'origine géographique n'a aucune influence significative sur ces paramètres analytiques qui, sont fondamentalement affectés par des facteurs endommageant les fruits tels que l'attaque par les mouches, le matériel de la récolte, le transport et le stockage des olives.

Pour distinguer l'absorption due aux produits secondaires d'oxydation de celle due aux systèmes conjugués (la structure triénique), nous déterminons le paramètre K et ceci par mesure de l'absorption au voisinage de 270nm.

Quant à la valeur de  $K$ , la figure ci-dessous nous renseigne sur les variations de l'extinction spécifique des huiles d'olive étudiées.



**Figure V.8 :** Variation de l'extinction spécifique de l'huile d'olive selon les différentes régions

Selon les résultats obtenues de la valeur de  $K$ , elles sont convenables à celles établis par le COI (2003), sauf pour les régions de Tlemcen « Maghnia » et Mascara « Sig » semblent 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 GENERALE*

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette étude était de caractériser des huiles d'olive selon des différentes régions par l'évaluation du pouvoir antioxydant à travers leurs teneurs en  $\alpha$ -tocophérol et la détermination de l'acidité, de l'indice de peroxyde et des coefficients d'absorption molaire par rayonnements UV-Visible ( $K_{232}$  et  $K_{270}$ ).

Le dosage d' $\alpha$ -tocophérol indique des teneurs variant de 0,076 à 5,514 mg/100g; néanmoins, des différences significatives sont souvent notées entre les échantillons d'huiles d'olive.

Nos résultats montrent que la teneur en  $\alpha$ -tocophérol dans les huiles analysées est variable, elle est fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l'huile, l'origine géographique, la méthode d'extraction, la culture, le climat et la durée de la conservation jouent un rôle capital.

Les huiles A-1, B-1 et E-1 représentent une faible acidité ( $> 3, 3$ ), par contre les autres montres qu'elles sont des huiles extraites de mauvaises qualités d'olives par leurs teneurs qui dépassent les normes.

Les valeurs de l'indice de peroxyde des différents huiles ayant fait l'objet de cette étude sont largement supérieures à la valeur donnée par le COI sauf pour les échantillons A-2 et E-1, 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

Après l'ensemble des résultats obtenus, on peut conclure que les huiles A-2 et D-1 sont des huiles de mauvaises qualités.

Toutefois dans l'intérêt d'apporter un apport complémentaire à cette étude, il serait intéressant d'effectuer d'autres analyses telles que le dosage d'autres vitamines (A, D) et des micronutriments (Zn, Mg) dans l'huile d'olive de différentes régions.

L'effet du stockage sur la qualité d'huile d'olive doit être minimisé en les conservant dans les endroits frais, dans le noir si possible et ne pas dépasser la durée d'une année de stockage pour que l'oxydation n'altère pas l'huile.

Nous proposons aux fabricants d'huile d'olive d'acheter les olives directement sur les arbres et de les cueillir eux-mêmes pour améliorer sa qualité.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allard, J; Royall, D; Kurian, R; Muggli, R; Jeejee bhoy, K.(1994). Effects of  $\beta$ -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans, *Amj Clin Nutr*, 59 : 884-90.
- Amcha, A. (2012) *Détermination des antioxydants des huiles d'olives (N.W Algérie)*. (Post-graduation de Magister en Chimie Option : Spectrochimie et Méthodes d'Analyse). Université de Tlemcen.
- Antwerpen, P.V. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système mycloperoxydase/Peroxyole d'hydrogène/Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Aparicio R, Roda L, Albi MA, Gutierrez F. (1999) Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J Agric.Food Chem*; 47:4150-5.  
Plus d'info : <http://europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/index.htm>
- Association Française Interprofessionnelle De l'OLive (AFIDOL) (2013)-section spécialisée « olive » de l'ONIDOL (Organisation Nationale Interprofessionnelle Des OLéagineux). Institut du Monde de l'Olivier.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. (1996) Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAOCS*;73 :1589-93.
- Barlow, S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants* : 253-307.
- Barlow, S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants* : 253-307.
- Benzaria, A. (2006) *Etude biochimique et nutritionnelle de l'effet immunomodulateur des huiles d'argan, de poisson et d'olive. effets compares de leurs acides gras*. (Thèse de doctorat Inédite). La faculte des sciences et techniques de Mohammedia. Maroc . N° : 2006-Isal-0031
- Biesalski, H.K; Hemmes,C; Hopfenmaller, W; Schmid, C; Gollnick, H.P. (1996). Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of  $\beta$ -carotene, *Free Radio Res*, 24 : 215-224.
- Biochimie1. (s.d).Lipides.LicenseSTE. consulter le *site* : [univ-provence.fr/wabim/d\\_agora/d\\_biochimie/lipides.pdf](http://univ-provence.fr/wabim/d_agora/d_biochimie/lipides.pdf)

- Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
- Boskou Dimitrios, (2012) « Chapitre 13. Produits alimentaires méditerranéens : recherche et développement », in CIHEAM, Presses de Sciences Po « Annuels », p. 279-297.
- Boskou. D, (1996). (Ed.) Olive oil: chemistry and technology (1st edition). Champaign
- Bouhadjra, K. (2010). *Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge*. (Thèse de magister). Université Mouloud Mammeri, Tizi-uzou. Algérie.
- Caponino, F., Allogio, V. et Gomes, T. (1999) Phenolic compounds of virgin olive oil : influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64 : 203-209.
- Cecchi, T. De Marco, C. Passamonti, P. et Pucciarelli, F. (2006) Analytical definition of the quality of extra-virgin olive oil stored in polyethylene terephthalate bottles. *Journal of Food Lipid*, 13 : 251-258.
- Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement, (CNUCED), 2005.
- Cossut, J. Defrenne, B. Desmedt, C. Ferroul, S. Garnet, S. Humbert, S. Roelstraete, Costes,C. (1980). *Elément de biochimie structural. L'edit'offset à Saint-Etienne (Loire)*. France.
- Curtay, J.P ; Robin, J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie.
- Elizabeth Buehrer-Astfalk, (2011) nutrition humaine, Nutritionniste diplômée, Mars
- Evans, J.L; Goldfine, I.D; Maddux, B.A; Grodsky, G.M. (2002). Oxidative stress and stress- activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabets, *Endocr Rev*, 23 :599-622.
- Evans, R.J ; Reynhout, G.S. (1992). Alternates to synthetic antioxidants, *Food Science and human Nutrition*, 29 : 27-42.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble.
- Gerard-Monnier, D ; Chaudière, J., (1996). Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion, *Path Biol* , 44 : 77-85.



- Gille.L, Rosenau.T, Koslov.A.V, and Gregor.W, (2008). Ubiquinone and tocopherol: Dissimilar siblings. *Biochemical Pharmacology*. 76(3) :289-302.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., De la Torre, M.C., et López-Sabater, M.C. (2002) The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, atocopherol, and b-carotent) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78 : 207-211.
- Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la
- Goussard, J. P. (1999). Les radicaux libres et antioxydants, p 7-11.
- Goussard. J-P. (s.d). *Les radicaux libres et antioxydants...* Guide nutritionnel des sports d'endurance.
- 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.
- Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D.(2000) alpha-tocopherol content of Greek virgin olive oils. *J Agric. Food Chem.*;48:1770-5
- Chimi, H. (2006) TRANSFERT DE TECHNOLOGIE EN AGRICULTURE. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNNTA*. Département des sciences alimentaires et nutritionnelles IAV Hassan II, Rabat. ISSN : 1114-0852.
- Illinois : American oil chemists society. USA. 268 pages.
- Jean-Robert. B, Gérard. M, Denise. A.(1998). *Agroalimentaire. Nutrition humaine et industrie agroalimentaire*. Techniques de l'Ingénieur. f1080
- Kessous. C. (2005). *Biochimie structurale*. Benaknoun, Alger. Office des publications universitaires.
- KIRITSAKIS A, MARKAKIS P. (1987) Olive oil : a review. *Adv. Food Res.*;31 : 453-82. :453-82
- Kiritsakis, A.K. (1998) *Composition of olive oil. In Olive Oil from the tree to the table*. Second Edition. Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, 006611, USA. pp.113-154.
- Vanexeem, M. et Vidal, D. (2002). Les corps gras : Entre Tradition et Modernité. *Projet en Gestion de la qualité Nutritionnelle et Marketing des produits alimentaires*. 139p.

- Larson, R.A. (1997). Naturally occurring antioxidants, Ed. Boca raton.
- Lesgards, J.F. (2000). Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20.
- Lindau-sehpar, B; Shaffer, J. (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage, *Free rad boil Med*, 15 :581 8.
- Lisu. W ; Jui-Hung, Y ; Hsiao-Ling, L ; Ming-Jiuan, W. (2003). Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1) : 60-66.
- Marcel. C, Alain. J. (s.d). *Chromatographie en phase liquide. Théorie et méthodes de séparation*. Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides, etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.
- Marie-Claude Martini.(s.d), (ISBN : 2743005912), page 331
- Michel. G.(2005). Biochimie .Belgique. Dunod.
- Moure, A ; Franco, D ; Sineiro, J ; Dom.nguez, H ; N..ez, M.J, Lema, J.M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants, *J Agric Food Chem*, 48:3890-7.
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/Antimutagens in Food. CRC critical reviews in *Food Science and Nutrition*, 29: 273-300.
- Notions de base de la chromatographie liquide (HPLC) « Agilent Technologies, Inc ».
- Ohrvall, M; et al. (1996). Tocopherols and heart disease nutrition report: 20/Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients, *Journal of Internal Medicine*, 239:111-117.
- Packer, L; Tritschler, H.J ; and Wessel ,K .(1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid, *Free Radic Biol Med*, 22: 359-378.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63 : 1035 1042.
- Ranalli, A. et Angerosa, F. (1996) Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 73 : 417-422.

- Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra-CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition-Clemont- Fenand, 37-42.
- Rosset R., Cande M., Jardy A, (1991) Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson, Paris.
- Salvador, M. D., Aranda, F., Gomez-Alonso, S. et Fregapane, G. (2003) Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80 : 359-366.
- Sarl Arkany. *Chimie analytique, chromatographie*. Identifiée sous le numéro 504 681 347. Consulté de : lachimie.fr
- Sciancalepore, V. (1998) *In G. Utet Olive oil wine and milk industries* (155-166). Turin, Italy.
- Serge. W, Pierre. M. (2004) *Toute la biochimie*. Dunod, Paris.
- Sherwin.E.R, (1976) Antioxydants for vegetable oils. *Journal of the American Chemical Society*. 53 : 430-436.
- Stamler, J.S; slivka, A. (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular- related disease, *Nuts Rev* , 54 : 1-30.
- Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqua (2008). Agence Française de sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) site : [www.afssa.fr/TableCIQUAL/](http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/)
- 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.
- Toutou.Y. (2005). Biochimie : structure des glucides et lipides PCEM1. Faculté de médecine Pierre et Marie CURIE. Université Paris-VI.
- 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
- Uzzan.A, (1992) « Olive et huile d'olive ». In « Manuel des corps gras » Karleskind. A, Tome 1, Ed : Lavoisier, Paris, 221-228.
- Veillet, S. (2010). *Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation*. (Thèse de doctorat). Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France
- Wanasundara, U.N; Shahidi, F. (1994). Stabilization of canola oil with flavonoids. *Food Chemistry*, 50 : 393-396.

- Yildirim.G, (2009) *Effect of storage time on olive oil quality* (Degree of master of science). zmir Institute of Technology. Turkey
- Yu, R; Mandlekar, S ; Tony Kong, A.N. (2000). « Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisoleinduced toxicity : induction of apoptosis through direct release of cytochrome c ». *Molecular Pharmacology*, 58: 431- 437. EPHE

:

تحديد	زيت الزيتون	هذه الدراسة	تحديد فيها
تحديد	أشعة فوق البنفسجية مرئية ( $K_{232}$ , $K_{270}$ )	قيمة البيروكسيد،	
		كمية $\alpha$ توكوفيرول (Tocophérol - )	بمرحلة عكس الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (RP-HPLC)
70 )	2	عينة	للأشعة فوق البنفسجية عن طريق
			الميثانول 30 الأسيتونتريل)
		زيت الزيتون كروماتوجرافيا، $\alpha$ توكوفيرول،	:

### Résumé :

Dans cette étude, une détermination de la capacité antioxydante d'huile d'olive selon des différentes régions est réalisée, à travers la détermination de l'acidité, de l'indice de peroxyde, et des coefficients d'absorption molaire par rayonnements UV-Visible ( $K_{232}$  et  $K_{270}$ ), et par le dosage de l' -tocophérol qui est réaliser par chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée RP-HPLC doté d'un détecteur UV , par l'injection directe de l'échantillon après traitement par le 2-propanol en utilisant une phase mobile (70% Methanol ,30% Acétonitril) à débit constant.

**Mots clé :** Antioxydant, Huile d'olive, Chromatographie, -Tocophérol, Capacité antyoxidante.

### Abstract :

In this study, a determination of the antioxidant capacity of olive oil in different regions is carried out through the determination of acidity, peroxide value, and molar absorption coefficients for UV-visible ( $K_{232}$  and  $K_{270}$ ), and the determination of - tocopherol is carried out by liquid partition chromatography on reverse phase RP-HPLC with a UV detector, by direct injection of the sample after treatment with 2-propanol using a mobile phase (70% methanol, 30% acetonitrile) at a constant rate.

**Keywords:** Antioxydant, Olive oil, Chromatography, -Tocophérol, Antioxydant capacity.