



**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences et de l'Ingénieur

Département de Physique

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

En Sciences Chimiques

Option : Chimie Organique Appliquée

Présentée par :

M^r : Mahmoud CHAREF

THEME

Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*

Jury de thèse :

Mr. DADAMOUSA Belkheir	Professeur	Université d'Ouargla	Président
Mr. MEGHEZI Ahmed	Professeur	Université de Biskra	Examineur
Mr. DENDOUGUI Hocine	Professeur	Université d'Ouargla	Examineur
Mr. NADJEMI Boubekour	Professeur	ENS-Kouba - Alger	Examineur
Mr. SAIDI Mokhtar	Professeur	Université d'Ouargla	Rapporteur
Mr. YOUSFI Mohamed	Professeur	Université de Laghouat	Co-Rapporteur

Année Universitaire 2010/2011

ملخص

موضوع هذا العمل هو دراسة التركيب الكيميائي للزيوت الموجودة في ثمار شجرتي الضرو وشجرة البلوط. قمنا بتقدير كمية الزيوت المستخلصة من الثمار وتقدير تركيب الأحماض الدهنية. تمت الدراسة الكيميائية النباتية (phytochimie) والفوائد الغذائية، وذلك بتحديد كمية المركبات الفينولية والفلافونويدات والدهون والتوكوفيرولات، ثم حساب نشاط مضادات الأكسدة للزيوت المستخلصة من ثمار الأشجار.

من خلال النتائج نلاحظ أن هناك اختلاف من الناحيتين الكمية و النوعية في المركبات الليبيدية و الفينولية لشجرتي الضرو و البلوط. إن ثمار شجرة الضرو تحتوي على كمية أكبر من الزيت . أما كميتا الفينولات والفلافونويدات فهي متقاربة، وهذا يشكل صفات فردية مستقلة لكل شجرة مدروسة. وبيّن تقييم الفعالية المضادة للأكسدة أن لكل من الليبيدات والمركبات الفينولية نشاط جيد مقاوم للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: الضرو، البلوط، الليبيدات، المركبات الفينولية، الفلافونويدات و الفعالية المضادة للأكسدة.

Résumé

L'objet de ce travail est l'étude de la composition chimique des fruits de deux plantes *Pistacia lentiscus* et *Quercus* et l'étude de leurs propriétés photochimiques et nutritionnelles. Nous avons déterminé les teneurs en lipides et la composition en acides gras dans les fruits des deux plantes, d'une autre part, et nous avons analysé les composés phénoliques et flavonoïdiques et les tocophérols contenus dans les extraits lipidiques. L'activité antioxydante des extrais lipidiques des fruits a été évaluée.

D'après les résultats des analyses, nous avons constaté qu'ils existent des différences quantitatives et qualitatives entre les résultats d'analyse des lipides et des composés phénoliques dans les fruits des deux arbres. Les valeurs des résultats d'analyse montrent que les fruits du *Pistacia lentiscus* contiennent une grande quantité de lipides contrairement aux fruits du *Quercus*. Toutefois, mais les quantités des phénols et des flavonoïdes sont voisines.

L'évaluation de l'activité antioxydante montre que les lipides et les composés phénoliques présentent un bon pouvoir antioxydant.

Mots clés: *Pistacia lentiscus*, *Quercus*, acides gras, lipides, composés phénoliques, flavonoïdes et activité antioxydante.

DEDICACE

Je dédie cette thèse :

A la mémoire de mon **cher père**.

A la mémoire de **ma chère mère** sans laquelle ce travail n'aurait jamais pu aboutir

A ma chère épouse, pour m'avoir poussé et soutenu aux moments difficiles de mon travail et surtout pour sa patience. En témoignage de ma reconnaissance.

A mes chers enfants **Maria Widad & Bismala Nihad et Mohamed Ziyad El dine**

A mes chères frères et sœurs

A toute ma famille, pour leur aide, leur patience et pour m'avoir toujours encouragé, même de loin.

A tous mes amis qui ont répondu présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux.

CHAREF Mahmoud

إهداء

أهدي هذا الإنجاز المتواضع إلى:

روح أبي الطاهرة الزكية رحمة الله عليه

روح أمي الطاهرة الزكية طيب الله ثراها و التي بفضل دعواتها تحقق هذا العمل

زوجتي الحبيبة التي بفضلها تمكنت من تحقيق هذا النجاح

أبنائي وقرّة عيني مريم و داد ، بسمة نهاد و محمد زياد الدين.

إخوتي وأخواتي الأعزاء.

جميع أفراد العائلة.

محمود هارون



يقول الله تعالى « انما يحشى الله من عباده العلماء »

وفي موضع آخر «يرفع الله الذين امنوا منكم والذين اوتوا العلم درجات »

يقول علي بن ابي طالب - كرم الله وجهه - في فضل العلم

ما الفضل إلا لأهل العلم إنهم

على الهدى لمن استهدى أدلاء

و قيمة المرء ما قد كان يحسنه

و الجاهلون لأهل العلم أعداء

فقم بعلم و لا تطلب به بدلا

فالناس موتى و أهل العلم أحياء

كما يقول الإمام الشافعي رحمة الله تعالى عليه :

و العلم يبني بيوتا لا عمادا لها

والجهل يهدم بيوت العز و الكرم

وقل رب زدني علما

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein de Laboratoire de Recherche des Sciences Fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat. Je tiens vivement à remercier monsieur le Professeur BENBERTAL Djamel recteur de l'université Amar Telidji de Laghouat et (ex) directeur de Laboratoire de Recherche Sciences Fondamentales pour son soutien et aide, ainsi que pour ses nombreux conseils.

J'exprime également mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à monsieur SAIDI Mokhtar Professeur à l'université de Kasdi Merbah de Ouargla et monsieur YOUSFI Mohamed Professeur à l'université Amar Telidji de Laghouat d'avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour l'aide qu'ils m'ont apporté et pour leur intérêt constant qu'ils m'ont cessé d'accorder à l'orientation et à la réalisation de cette thèse. Qu'ils trouvent ici mes sentiments de gratitude.

J'exprime mes vifs remerciements à monsieur le Professeur Pierre STOCKER laboratoire BIOMAS de l'université de Paul Cézanne – Faculté de saint Jérôme (France) pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire dans le cadre d'une bourse algérienne (P.N.E) Projet National Exceptionnel de 18 mois et pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses par CPG et HPLC des acides gras des lipides.

Je tiens également à exprimer tous mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Dadamoussa Belkheir qui ma fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également Mr. MEGHEZI Ahmed Professeur à université de Mohamed Khider de Biskra, Mr. DENDOUGUI Hocine Professeur à l'université de Kasdi Merbah de Ouargla et Mr. NADJEMI Boubekour Professeur à l'Ecole Normale Supérieure "ENS" de Kouba pour avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à monsieur GUIBADJ Abdelnacer Maître de Conférences à l'université Amar Telidji de Laghouat et BENAHMED Ziyad Maître assistant à l'université Amar Telidji de Laghouat pour leurs aides et leurs soutiens dans les moments difficiles.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Que mes collègues les enseignants de l'université Amar Telidji de Laghouat trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1:

Figure 1.1 : Arbre de <i>Pistachier Lentisque</i>	7
Figure.1.2 : Feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	8
Figure 1.3 : Fleurs de <i>Pistacia lentiscus</i>	8
Figure 1.4 : Fruits de <i>Pistacia lentiscus</i>	8
Figure 1.5 : Fruits noir de <i>Pistacia lentiscus</i>	9
Figure 1.6 : Fruits rouge de <i>Pistacia lentiscus</i>	9
Figure 1.7 : Arbre de chêne vert.....	13
Figure 1.8 : Arbre de chêne liège.....	13
Figure 1.9 : Feuilles de chêne vert.....	14
Figure 1.10 : Feuilles de chêne-liège.....	14
Figure 1.11 : Fruits de chêne vert (<i>Q. ilex</i>).....	14
Figure 1.12 : Fruits de chêne-liège (<i>Q. suber</i>).....	14
Figure 1.13 : Fruits du <i>Quercus.ilex</i> (Quercus de Aflou).....	15
Figure 1.14 : Fruits du <i>Quercus. Suber</i> (Quercus de Médéa)	15

CHAPITRE 2 :

Figure 2.1 : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras (EMAG) de l'huile de <i>Pistacia lentiscus</i> noir.....	28
---	----

CHAPITRE 3 :

Figure 3.1 : Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff.....	35
Figure 3.2 : Différentes isomères de position d'un Triglycérides des acides gras (TAG) ABC.	42

CHAPITRE 4 :

Figure 4. 1 : Chromatogramme des lipides neutres des fruits de *Pistacia lentiscus* noir...52

Figure 4.2 : Chromatogramme des glycolipides des fruits de *Pistacia lentiscus* noir.....53

Figure 4.3 : Chromatogramme des phospholipides des fruits de *Pistacia lentiscus* noir...53

CHAPITRE 5 :

Figure 5.1 : Structure des caroténoïdes.....59

Figure 5.2 : Structure de l'acide ascorbique.....60

Figure 5. 3 : Réaction des flavonoxy avec les espèces réactives des oxygènes (EOR).....64

Figure 5.4: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....64

Figure 5. 5 : Structure moléculaire des tocophérols et tocotriénols.....69

Figure 5.6: Chromatogrammes HPLC des tocophérols de l'huile étudiée.....71

Figure 5.7: Chromatogrammes HPLC des tocophérols individuels standards.....71

Figure 5.8 : Structure chimique du radical libre 1,1-Diphényl-2-Picryl –Hydrazyl et de sa forme réduite.....73

Figure 5.9 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit de *Pistacia lentiscus* noir.....75

Figure 5.10 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit de *Pistacia lentiscus* rouge.....75

Figure 5.11 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit du *Quercus.ilex*.....76

Figure 5.12 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit du *Quercus.suber*.....76

Figure 5.13.: Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du Vitamine E....77

Figure 5.14 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de BHT.....77

Figure 5.15 : La concentration des extrais lipidiques et les standards pour inhiber 50 % des

radicaux libres (EC ₅₀).....	79
Figure 5.16 : Puissance antiradicalaire (ARP) des extrais lipidiques et les standards.....	79
Figure 5.17 : Activité anti-oxydante de l'isomère α -Tocophérols des huiles étudiées.....	80
Figure 5.18 : Activité anti-oxydante des isomères ($\beta + \gamma$)-Tocophérols des huiles étudiées.....	81
Figure 5.19 : Activité anti-oxydante de l'isomères δ -Tocophérols des huiles étudiées.....	82
Figure 5.20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	83
Figure 5.21 : Courbe d'étalonnage de la rutine.....	85
Figure 5.22: Activité anti-oxydante des tocophérols totaux.....	87
Figure 5.23 : Activité anti-oxydante des phénols totaux.....	87

LISTE DES ABREVIATIONS

A.Aox	Activité anti-oxydante
Abs	Absorbance
AG	Acides gras
AGI	Acides gras insaturés
AGL	Acides gras libres
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acides gras saturés
Aox	Anti-oxydant
ARP	Puissance antiradicalaire
CCM	Chromatographie sur couche mince
CEE	Comité économique européen
CLA	Acides linoléiques Conjugués
CLHP	Chromatographie liquide de haute performance
CPG	Chromatographie phase gazeuse
DAG	Diglycérides des acides gras
DPPH	1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil
EMAG	Les esters méthyliques des acides gras
GL	glycolipides
I.A	Indice d'acide
I.I	Indice d'iode
I.S	Indice de Saponification
LCE	Longueurs de chaines équivalentes
LN	lipides neutres
LT	lipides totaux
LX	Tromboxanes

MAG	Monoglycérides des acides gras
ml	Millilitre
MS	Spectrométrie de masse
PL	Phospholipides
PL	phospholipides
ppm	Parties par million
TAG	Triglycérides des acides gras
TR	Temps de rétention
TX	lipoxines
UV	Ultra Violet
µg	Microgramme
µl	Microlitre
%	pourcentage

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

Tableau 1.1 : Sources naturelles des matières grasses.....4

Tableau 1.2 : Caractéristiques chimiques des huiles des fruits étudiées.....19

CHAPITRE 2 :

Tableau 2.1 : Composition en acides gras des huiles étudiées29

CHAPITRE 3 :

Tableau 3.1 : Proportions des esters méthyliques des acides gras (EMAG) des triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits noir et rouge du *Pistacia lentiscus*37

Tableau 3.2 : Proportions des esters méthyliques des acides gras (EMAG) des triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits du *Quercus ilex et suber*.....37

Tableau 3.3 : Composition des principaux acides gras de l'huile des fruits noir et rouge de *Pistacia lentiscus* en position Sn-2 des triacylglycérols.....40

Tableau 3.4 : Composition des principaux acides gras de l'huile des fruits du *Quercus ilex et suber* en position Sn-2 des triacylglycérols.....41

Tableau 3.5 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits noir de *Pistacia lentiscus*.....43

Tableau 3.6 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits rouge de *Pistacia lentiscus*.....44

Tableau 3.7 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits du *Quercus ilex*.....45

Tableau 3.8 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits du *Quercus.suber*.....46

CHAPITRE 4 :

Tableau 4.1 : Teneur des différentes classes des lipides polaires	49
Tableau 4.2 : Composition en acides gras des différentes classes des lipides des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> noir et rouge.....	54
Tableau 4.3 : Composition en acides gras des différentes classes des lipides des fruits du <i>Quercus ilex</i> et <i>suber</i>	55

CHAPITRE 5 :

Tableau 5.1 : Quelques espèces réactives de l'oxygène.....	62
Tableau 5.2 : Les quatre formes des tocophérols selon la position des groupements méthyle sur le noyau 6-OH chromane.....	69
Tableau 5.3 : Teneurs en Tocophérol de quelques huiles végétales.....	70
Tableau 5.4 : Teneurs en Tocophérol des huiles étudiées (mg / kg).....	71
Tableau 5.5 : La concentration pour inhiber 50 % des radicaux libre (EC50) et puissance anti-radicalaire ou anti-oxydante (ARP des extrais lipidiques et les standards.....	78
Tableau 5.6 : Activité anti-oxydante de l'isomère α -Tocophérols.....	80
Tableau 5.7 : Activité anti-oxydante des isomères ($\beta + \gamma$)-Tocophérols	81
Tableau 5.8: Activité anti-oxydante de l'isomères δ -Tocophérols.	82
Tableau 5.9 : Quantité en phénols totaux dans les huiles	84
Tableau 5.10 : Quantité des flavonoïdes dans les huiles étudiées	86
Tableau 11 : Activité anti-oxydante. des tocophérols, phénols totaux et les flavonoïdes des huiles étudiées.....	87

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE 1 :

GENERALITES SUR LES CORPS GRAS

1.1. Aperçu historique sur les corps gras.....	3
1.2. Production des corps gras	3
1.3. Propriétés des corps gras.....	5
1.4. Utilisation des corps gras	6
1.5. Caractéristiques botaniques	7
1.5.1. Le <i>Pistachier lentisque</i>	7
1.5.2. Travaux antérieurs sur le <i>Pistacia lentiscus</i>	10
1.5.2. Le Chêne.....	11
1.5.3. Travaux antérieurs sur le <i>Quercus</i>	16
1.6. Extraction des lipides.....	16
1.6.1. Calcul de la teneur ou (rendement).....	16
1.6.2. Caractéristiques chimiques des huiles.....	17
1.7. Interprétation des résultats	18

CHAPITRE 2 :

ETUDE DE LA COMPOSITION DES ACIDES GRAS

2.1. Généralités.....	20
2.2. Les lipides.....	20
2.2.1. Définitions.....	20
2.3. Les acides gras.....	21
2.3.1. Données générales.....	21
2.3.2 Nomenclature et structure.....	23
2.3.2.1 Les acides gras saturés.....	23
2.3.2.2 Les acides gras monoinsaturés.....	24
2.3.2.3 Les acides gras polyinsaturés.....	24
2.3.2.4 Les acides gras essentiels.....	25
2.3.2.5 Les acides gras conjugués.....	26
2.3.3. Sources alimentaires.....	26
2.3.4. Analyse des acides gras	26

CHAPITRE 3 :

ETUDES DES STRUCTURES DES TRIACYLGLYCEROLS

3.1. Introduction.....	31
3.2. Méthodes d'analyse des triacylglycerols	33
3.3. Les acides gras des triacylglycérols.....	36
3.3.1. Acides gras totaux des TAG.....	36
3.3.2. Digestion des lipides alimentaires.....	38
3.3.2.1. Les enzymes.....	38
3.3.2.2. Acides gras en Sn-2 et Sn-3 pour hydrolyse enzymatique.....	38
3.3.3. Hydrolyse des triglycérides.....	39
3.3.4. Isolement des monoacylglycérols en position 2 par CCM.....	40
3.3.5. Détermination des triacylglycérols (TAG) à partir des acides gras en position Sn-2.....	41

CHAPITRE 4 :

ETUDE DES LIPIDES

4.1 Extraction des lipides :.....	48
4.2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide.....	49
4.3. Etude des acides gras des lipides polaires.....	50
4.4. Les phospholipides.....	50
4.5. Préparation des esters méthyliques des acides gras des lipides polaires	50

CHAPITRE 5 :

ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES

ET

ANALYSE DES TOCOPHEROLS

5.1. Activité antioxydante.....	56
5.1.1. Mesure de l'activité antioxydante.....	56
Problématique de la détermination de l'activité antioxydante.....	57
5.1.1.2. Définition.....	57
5.1.1.3. Méthode de détermination de l'activité antioxydante.....	58
5.2. Les systèmes de protection contre le stress oxydant (<i>les antioxydants</i>).....	58
5.2.1. Définition.....	58
5.2.2. Mécanismes d'action des antioxydants.....	58

5.2.3 Principaux antioxydants.....	58
5.2.3.1. Les antioxydants endogènes.....	58
5.2.3.2. Les antioxydants exogènes	59
a) Antioxydants synthétiques.....	59
b) Antioxydants naturels.....	59
5.2.4. Les flavonoïdes comme antioxydants.....	60
5.2.5. Les radicaux libres.....	60
5.2.5.1. Définition.....	60
5.2.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	61
5.2.5.3 Mécanisme d'action des radicaux libres.....	62
5.3. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires.....	63
5.3.1. Protéines et acides aminés.....	63
5.3.2. Lipides.....	63
5.3.3. Acides nucléiques.....	63
/5.3.4. Piégeage des radicaux libres.....	64
5.3.5. Chélation des ions métalliques	64
5.3.6./Inhibition de diverses enzymes.....	65
5.3.7. Evaluation de l'activité antioxydante.....	65
5.3.8. Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres.....	65
5.4. Analyse des tocophérols.....	66
5.4.1. Introduction.....	66
5.4.2. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	66
5.4.3. les tocophérols.....	67
5.4.4. Dosage quantitatif des tocophérols individuels.....	70
5.4.5. Le test au DPPH.....	72
5.4.5.1. Principe du test.....	73
5.4.5.2. Préparation de la solution DPPH.....	73
5.4.5.3. Préparation des extrais lipidiques	73
5.4.5.4. Essai au DPPH.....	74
5.4.6. Quantification des composés phénoliques	82
5.4.6.1. Dosage des phénols totaux	83
5.4.6.1.1. Courbe d'étalonnage.....	83
5.4.6.2. Dosage des flavonoïdes.....	85
5.4.6.2.1. Courbe d'étalonnage.....	85

CONCLUSION GENERALE.....88

BIBLIOGRAPHIE

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie en alimentation, en cosmétiques, et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolismes primaires et secondaires qui sont illustrés en thérapeutique.

Dans les zones arides et semi-arides et steppiques de l'Algérie, la liste des plantes entrant précisément de ce cadre est achevée et comme elles sont utilisées sous forme de tisanes extraits ou préparation complexe.

Cette étude est consacrée à la valorisation phytochimique de deux arbres ; l'arbre de pistachier lentisque et l'arbre du quercus « le chêne ». Cette valorisation consiste à étudier les principaux constituants chimiques des lipides des fruits d'une part et de mettre en évidence leurs importances sur le plan nutritionnel et pharmaceutique d'autre part.

- Le Pistachier lentisque (Le lentisque), ou *Pistacia lentiscus* est un arbre à mastic, au Languedoc il est appelé restincla. Il est nommé par les anglophones. « Mastic tree » ou « Lentisc ». Le nom pistachier vient du grec *pistakê*. Le nom lentisque vient du latin *lentus* (visqueux).). Le pistachier est un arbuste dioïque thermophile à l'écorce lisse et grise, plante de la famille des anacardiaceae (anacardiaceae).

- Le chêne est un arbre appartenant à la famille des fagacées, et un des arbres les plus caractéristiques du bassin méditerranéen.

Ce travail s'articule comme suit :

Le premier chapitre fait l'état des généralités sur les corps gras. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de deux fractions saponifiable et insaponifiable des huiles étudiées à notre connaissance, aucune analyse chimique de la fraction lipidique n'a été menée auparavant sur ces espèces de l'Algérie. Dans le troisième chapitre est la détermination de la composition en acides gras totaux et la nature des triacylglycérols par des méthodes chromatographiques ainsi que la distribution des acides gras sur les positions de la chaîne du glycérol. Dans le quatrième chapitre, nous étudions la composition qualitative et quantitative des tocophérols et à quantifier les phénols totaux et les flavonoïdes et d'étudier l'activité antioxydante.

Nous terminons par un cinquième chapitre qui sera abordé aussi l'étude des acides gras dans les lipides polaires à savoir les glycolipides et les phospholipides, car à notre

connaissance aucune analyse chimique de ce type de composés n'a été conduite auparavant sur ces extraits.

Enfin, d'après les résultats obtenus, nous pouvons classer ces espèces parmi les plantes médicinales qui sont réputées dans toute l'Algérie, Afrique du nord et le pourtour méditerranéen.

Ce travail une contribution à l'étude de la composition chimique des constituants des huiles extraite des fruits de pistacia lentiscus noir et rouge et du quercus ilex et suber.

CHAPITRE 1

Généralités sur les corps gras

GENERALITES SUR LES CORPS GRAS

1.1. Aperçu historiques des corps gras :

On définit un corps gras qu'il soit d'origine animal ou végétal, comme étant l'ensemble des constituants soluble dans les solvants non ou peu polaires (hexane, éther, chloroforme...). Les triglycérides sont les constituants majoritaires et essentiels des lipides neutres, mais elles contiennent bien d'autres composés liposolubles, tels que les phospholipides, les cérides, les constituants de l'insaponifiable (stérois, tocophérols, hydrocarbures...) (**Mukohata, Y et al. 1978**).

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a utilisé les corps gras pour leurs différentes propriétés, notamment en cosmétologie et en médecine. De nombreux textes anciens font ainsi références à diverses huiles de graines ou des graisses animales.

Il communément établit dans l'histoire des corps gras de distinguer deux périodes : la période qui précède les travaux de Chevreul et celle qui vient après. Il faut attendre la fin du XVII siècle pour que débutent les travaux de Tachen sur la connaissance chimique des corps gras. Un siècle plus tard, Scheele, Darcet, Berthollet et Vogel approfondissent l'étude de la structure chimique des corps gras (**Smith, D.A et al. 1986**).

En 1813, Chevreul travaille à l'analyse d'un savon préparé à partir de graisse de porc et de potasse. Il définit ainsi un savon comme un mélange des sels alcalins d'acides particuliers, ne provenant pas de l'oxydation de la graisse par l'oxygène de l'air, mais préexistant dans la graisse, combinés avec la glycérine anhydre.

Puis, Pelouze, Boudet et Berthelot continuent sur cette voie et précisent la structure de la fraction glycéridique. Parallèlement, bien d'autres chercheurs se sont intéressés à l'étude des phospholipides et des stérois. Benecke et Hesse ont ainsi mis en évidence l'existence dans les huiles végétales de substances très proches du cholestérol, les phytostérois (**Smith, D.A et al. 1986**).

1.2. Production des corps gras :

Au cours des quarante dernières années, la production mondiale annuelle des matières grasses est passée de 29 à 287,7 millions de tonnes dont 182 millions de tourteaux et 82 millions d'huiles végétales (**Djondjevic. M.A et al. 1987**).

Ces matières grasses proviennent de graines et fruits oléagineux, les corps gras d'origine animale étant représentés par le beurre, saindoux, le suif et les huiles marines. Le tableau 1.1 regroupe les différentes origines des matières grasses.

Les huiles de soja, de palme et du tournesol représentent à elles seules plus de 65% des huiles végétales produites, le reste de la production d'huiles végétales provient des huiles d'arachide, de coton, d'olive et de sésame. Les zones géographiques de production des matières grasses sont très diversifiées. L'Europe de l'Est, premier producteur mondial, et les Etats-Unis représentent à eux seuls 30% de la production mondiale. La Malaisie, la Chine, l'ex URSS, l'Inde, le Brésil, l'Indonésie, l'Argentine, le Japon et le Canada représentent quant à eux 49%.

L'huile de Soja est produite principalement par les Etats-Unis et la comité économique européen (CEE), l'huile de palme par la Malaisie et l'Indonésie, l'huile de Colza par l'Europe, la Chine et l'Inde et enfin l'huile de tournesol par l'ex URSS et la CEE.

Tableau 1.1 : Sources naturelles des matières grasses (Smith, D.A et al. 1986).

Origine	Matière grasse
Végétale :	
1. <i>graines oléagineuse</i>	• Tournesol, Colza, Moutarde, soja, Mais, Pépins de raisin, Carthame, sésame, Caméline, Oeillet, Lin, Amande, Noisette, Noix, onagre, Bourache, Pépins de cassis, Germe de blé.
2. <i>graines noyaux, fèves de régions tropicales</i>	• Arachide , coton, coprah, palmiste cacao, karité, Ricin. • Olive, Palme, Avocat
3. <i>Fruits oléagineux</i>	
Animale :	
1. <i>Porc, Bœuf, Mouton, Canard, Oie, Poulet, Hareng, Morue, Sardine</i>	• Saindoux, Suif, graisse d'os, graisse de volaille, huiles de marines.
2. <i>Vache, Brebis</i>	• Produits laitiers.

1.3. Propriétés des corps gras :

Les corps gras possèdent des propriétés biochimiques et nutritionnelles par leur apport en acides gras essentiels et vitamines liposolubles (**Smith. D.A et al. 1986 ; Fimin. J.I al. 1962**).

L'acide linoléique et ses dérivés en n-6 (acide dihomom- δ -linoléique, acide arachidonique), l'acide linoléique et ses dérivés en n-3 (acide eicosapentanoïque) sont considérés comme des acides gras essentiels car, non synthétisés par les mammifères, ils doivent être apportés par l'alimentation. On leur attribue de nombreuses vertus thérapeutiques (**Peters.N.K et al. 1986 ; Zaat. S.A.J al. 1987**), telles que des effets hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant (régulation de la lipémie), un rôle protecteur contre l'athérosclérose et la thrombose (fonction rénale). Ils participent également au maintien de l'intégrité de l'épiderme (fonction épidermique) (**Hamanure.Y et al. 1962**). En fin, ils interviennent dans la régulation de la fonction reproductrice et du système immunitaire.

Les matières grasses contiennent comme constituants mineurs certaines vitamines liposolubles telles que les vitamines A (rôle de la vision), D (antirachitique), E (antioxydant) et K (antihémorragique) (**Smith. D.A et al. 1986**).

Les corps gras se caractérisent également par leurs propriétés pharmacologiques, diététiques et cosmétiques. Ils peuvent être ainsi utilisés comme véhicule et excipient de principes actifs. Les feuilles d'amandes douces, d'olive, d'arachide, de maïs sont des exemples d'huiles végétales employées à cet effet (**Smith. D.A et al. 1986 ; Barhier. M, 1980 ; Lejeune.B et al. 1984**).

Certaines huiles végétales possèdent des applications thérapeutiques grâce à leurs propriétés antibiotiques et antifongiques. On peut citer l'huile de chaulmoogra, extraite de graines de plusieurs variétés d'*Hydrocarpus* (flacourtiacées), qui a été utilisée pour le traitement de la lèpre. Cette huile contient un acide gras particulier, l'acide chaulmoogrique ou cyclopentène tridécanoïque (**Smith. D.A et al. 1986**).

Les huiles poly-insaturées possèdent des effets pharmacologiques par leur teneur en acides gras essentiels. On peut citer les huiles d'onagre, de bourrache, de pépins de cassis comme caractéristiques de la famille n-6 et les huiles de poisson pour la famille n-3 (**Smith. D.A et al. 1986**).

Enfin, les phospholipides, stérols et autres constituants mineurs de l'insaponifiables confèrent aux huiles diverses propriétés, telles que des propriétés émulsifiantes pour les phosphatidyl-aminoalcools, une régulation du métabolisme du cholestérol pour les phytostérols.

Les insaponifiables totaux du soja et d'avocat ont trouvé des applications cosmétiques par leurs effets sur le métabolisme du tissu conjonctif (**Arthurson,G et al, 1975**).

1.4. Utilisation des corps gras :

La majorité de la production mondiale en matières grasses est destinée à l'alimentation humaine ou animale (**Smith, D.A et al, 1986**). Les corps gras subissent des transformations à des fins alimentaires comme l'hydrogénation, l'interstérification, margarines et l'émulsion, ou à des fins non alimentaires comme les huiles siccatives, les alcools gras, et les savons ; leurs principales utilisations industrielles étant donc comme tensio-actifs, lubrifiants, cosmétiques, additifs pour matières plastiques (**Hughes.R.E et al, 1977 ; Barbier. M, 1980 ; Hope. W.C et al, 1981**).

1.5. Caractéristiques Botaniques :

1.5.1. Le Pistachier lentisque :

Le Pistachier lentisque (Le lentisque), ou *Pistacia lentiscus* (figure 1.1) est un arbre à mastic, au Languedoc il est appelé restincla, nommé par les anglophones : « Mastic tree » ou « Lentisc ». Le nom *Pistachier* vient du grec *pistakê*. Le nom *lentisque* vient du latin *lentus* (visqueux). *Le Pistachier* est un arbuste dioïque thermophile à l'écorce lisse et grise, plante de la famille des anacardiacees (anacardiaceae), à feuillage persistant de couleur vert-gris à vert foncé, à fleurs rougeâtres en grappes et elle donne des fruits ronds rouges qui noircissent en mûrissant. L'arbre est de hauteur de 1 à 3 m, largeur jusqu'à 2 mètres, son origine est le pourtour méditerranéen, Afrique du nord et îles Canaries, Corse incluse, le long du littoral sur une bande assez étroite dans les stations chaudes en garrigue et dans le maquis de climat méditerranéen sur tous types de sol. On le cultive pour sa résine, que l'on récolte, après incision de l'écorce, en été et en automne.

Nom latin: *Pistacia lentiscus*

Famille: Anacardiaceae

Nom commun en arabe : الضرو



Figure 1.1 : Arbre de *Pistacia lentiscus*



Figure 1.2 : Feuilles de *Pistacia lentiscus*



Figure 1.3 : Fleurs de *Pistacia lentiscus*



Figure 1.4 : Fruits de *Pistacia lentiscus*

Les feuilles et les jeunes pousses sont utilisées en médecine pour leurs propriétés astringentes mais sa principale utilité vient de l'extraction de sa résine aromatique qui est utilisée comme vernis, ciment dentaire, ainsi que gomme à mastiquer pour fortifier les gencives et rafraichir l'haleine.

La résine contient des alphas et des bêtamasticorésines, une huile essentielle (principalement constituée d'alphapinène), des tanins, de la masticine et de l'acide masticique. La résine *de lentisque* était utilisée en Egypte pour embaumer les morts. Elle est peu employée aujourd'hui, mais elle serait efficace contre les affections bronchiques et la toux et pour soigner la diarrhée. On l'a aussi appliqué sur les ulcères et les furoncles. La résine, mélangée à d'autres composants, sert de pansement dentaire provisoire. Les pinènes, contenus dans l'huile essentielle, sont très antiseptiques.

Ils existent plusieurs espèces de Pistachier à savoir : *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* (les pistaches à manger !), *Pistacia chinensis* (variété chinoise) et *Pistacia atlantica*.



Figure1.5 : Fruits noir de *Pistacia lentiscus*.



Figure 1.6 : Fruits rouge de *Pistacia lentiscus*.

1.5.2. Travaux antérieurs sur le *Pistacia lentiscus* :

Les études des différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont été consacré surtout sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles du mastic dans l'Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia Zentiscus* var. *chia*) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model (**Chrysoula C et al, 1995**) . Une autre étude sur la détermination quantitative des vitamines E dans les différentes espèces de pistacia par la quantitative et détermination de α -tocopherol idans *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* par CCM- densitométrie et colorimétrie (**B. Kivc et al, 2005**) , et il ya aussi des travaux qui parlent sur l'identification et la quantification des composés qui se trouvent dans les fruits du pistacia lentiscus par Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. Innovative (**Luigia Longo et al, 2007**) et un autre article qui cherche l'effet des extraits aqueuses qui ont préparés à partir des feuilles de pistacia lentiscus dans The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease (**Predrag Ljubuncic et al, 2005**). Une hypothèse sur la distribution phénologiques thermophiles de *Pistacia lentiscus* via A phenological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus* L (**Sara Palacio et al, 2005**) et fin une autre tâche qui étudiée influence synergique de champignons mycorhiziens arbusculaires et amendement organique sur L.seendlings *Pistacia lentiscus* boisées dans un sol dégradé semi-arides, synergistic influence of arbuscular mycorrhizal fungus and organic amendment on *pistacia lentiscus* L.seendlings afforested in a degraded semiarid soil (**F.Caravaca et al, 2002**)

Par contre, aucune étude concernant la composition en acides gras des fruits de pistacia lentiscus de l'Algérie: et aussi la teneur des fruits en composés phénoliques de même pour la teneur des tourteaux en polyphénols et flavonoïdes, ainsi aucune référence bibliographique ne montre que l'activité antioxydant de cette plante a été étudiée.

1.5.3. Le Chêne :

Le chêne est un arbre appartenant à la famille des fagacées, et un des arbres les plus caractéristiques du bassin méditerranéen, de taille qui atteint une hauteur de 20 à 25 m. Son tronc est souvent tortueux et branchu. Sa cime est arrondie et son écorce est de couleur noire brunâtre ou noire, légèrement craquelée en petites plaques carrées, minces, sèches et souvent recourbées.

Les feuilles sont caduques et alternes sauf chez le chêne vert et le chêne-liège, elles sont persistantes (pendant 2 ou 3 ans) en général une plus grande largeur vers le tiers supérieur du limbe. Pour les différences entre les chênes, les fleurs mâles sont regroupées en chapelets pendants et discrets en avril, en même temps que l'apparition des feuilles, les femelles sont isolées ou réunies en petits en épis dressés. Elles portent 6 à 8 étamines.

La fleur est unisexuée, les mâles sont réunis en chatons souples à long pédoncule et les femelles en épis dressés. Son fruit est un gland généralement ovoïde protégé à moitié d'une cupule écailleuse longue, grises et duveteuses. Il tombe de lui même (quittant sa cupule) quand il est mûr, leur maturation annuelle a lieu en septembre et octobre. Le liège du chêne-liège sert à fabriquer des bouchons d'excellente qualité. On effectue environ 12 récoltes sur la vie d'un arbre. Le bois du chêne-liège est très dense et très dur, difficile à travailler et donc peu utilisé.

L'arbre de chêne est considéré comme l'un des arbres les plus significatifs et les plus magnifiques au monde entier. En tout il y a plus de 300 variétés de ces géants majestueux de forêt. Parmi ces variétés de chêne, il ya le chêne de liège (*Quercus. suber*) et le chêne vert (*Quercus. ilex*), le plus rare des chênes est le chêne de liège, et est prétendu parce que c'est l'arbre qui est employé pour faire une majorité des lièges de bouteille les plus fins.

Nom botanique : du latin *Quercus*, qui proviendrait du celte "kaerquez", "bel arbre" ; son nom grec, *drus*, est un terme générique pour désigner "l'arbre". Il est aussi appelé *aigilops* ou *phegos* (de *phagein*, manger, allusion au gland).

Nom français : Chêne

Nom anglais : Oak

Nom commun en arabe : شجرة البلوط

De façon générale l'arbre de chêne est un arbre «noble» qui est très utilisé en ébénisterie. L'arbre a déjà été utilisé pour certaines de ses propriétés médicinales. Les feuilles restées sur les branches tout l'hiver étaient bouillies et servaient à soigner les engelures. Le tanin que contient l'écorce du chêne peut aider à guérir les brûlures légères si on l'a fait bouillir dans un peu d'eau. L'écorce du chêne blanc a longtemps été utilisée comme astringent, tonique et antiseptique. Une fois l'écorce bouillie et mélangée avec de la verveine blanche (*Verbena urticifolia*), du lait et de l'eau on se servait de ce mélange comme antidote à l'herbe à puce (*Rhus radicans*).

En Europe, le chêne était l'arbre sacré des druides. On l'utilisait pour les propriétés astringentes de son écorce, de ses feuilles et de ses glands.

Dans les usages médicaux, en décoction, l'écorce du chêne est employée contre les irritations de la gorge et l'angine. On l'administre en lavement et on l'applique en onguent ou en lotion pour soigner les hémorroïdes, les fissures anales, les petites brûlures et les affections de la peau. On la prescrit moins fréquemment contre la diarrhée, la dysenterie et les saignements du rectum. L'écorce, en poudre, est inhalée pour traiter les polypes du nez, ou appliquée sur l'eczéma pour assécher la zone atteinte. La galle est très astringente, et peut être utilisée à la place de l'écorce.

Les deux variétés les plus connues du quercus sont :

-**Quercus ilex** (chêne vert) (yeuse).

Le chêne vert est un arbre au feuillage persistant. Les feuilles caduques sont vert foncé sur le dessus et d'une teinte grise en-dessous. Il aime les sols calcaires et peut grandir jusqu'à 25 mètres de haut par 20 m de large.

-**Quercus suber** : Chêne liège.

Le chêne-liège est un arbre à la cime arrondie et au feuillage persistant. Il produit une écorce épaisse de liège et ses feuilles sont ovales. Le feuillage est vert foncé sur le dessus et grises en-dessous. Il est assez rustique et va jusqu'à 22 mètres de hauteur.



Figure 1.7 : Arbre de chêne vert



Figure 1.8 : Arbre de chêne liège.



Figure 1.9 : Feuilles de chêne vert

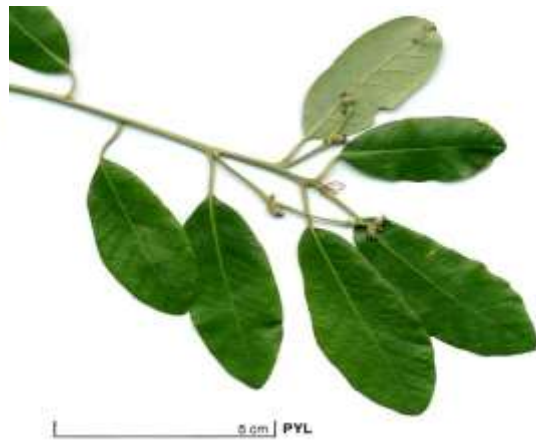


Figure 1.10 : Feuilles de chêne-liège



Figure 1.11 : Fruits de chêne vert (*Q. ilex*).



Figure 1.12 : Fruits de chêne-liège (*Q. suber*).



Figure 1.13 : Fruits du *Quercus ilex* (*Quercus* de Aflou)



Figure 1.14 : Fruits du *Quercus suber* (*Quercus* de Médéa).

1.5.4. Travaux antérieurs sur le *Quercus*

L'analyse phytochimique des différentes parties de l'arbre du chêne *Quercus* a été l'objet de quelques études via la composition du fruit en acides gras, en acides aminés, en éléments minéraux et le dosage quantitatif des protéines, des fibres de l'amidon (*Salmon Y*, 2004). En outre, les résultats d'une étude sur les feuilles de l'arbre de chêne *Quercus* ont montré que les feuilles sont riches en acide quinique libre et l'acide shikimique (*Equipe de recherche associée an C.N.R.S*, 1973).

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude comparative des populations de chêne *Quercus*, on trouve l'étude comparative de la micromorphologie de l'épiderme des feuilles dans huit populations de chêne *Quercus* issus de différentes régions algériennes (*Leila Allal*, 2006), qui montre l'existence d'une variabilité qui pourrait être due aux conditions écologiques. Par ailleurs, aucune référence bibliographique concernant la comparaison des populations du *Quercus* à travers leurs métabolites n'a été trouvée : la teneur de fruit en composés phénoliques de même pour la teneur des tourteaux en polyphénols et flavonoïdes, ainsi aucune référence bibliographique ne montre que l'activité antioxydant de l'arbre a été étudiée.

1.6. Extraction des lipides :

Les fruits du *Pistachier lentisque* (*Pistacia lentiscus*) sont récoltés d'une forêt située dans la région d'Oued Moussa à Tipaza à 70 Km de la capitale Alger tandis que les fruits du quercus sont achetés d'un herboriste connu dans la ville de Laghouat. Ces fruits proviennent de deux régions différentes ; le *Quercus.ilex* de la région d'Aflou à 110 Km au Nord Ouest de Laghouat ; et le *Quercus suber* de la région de Médéa à 90 Km au Sud d'Alger. Avant tout traitement de ces fruits ils sont séchés à l'étuve à 70°C pendant 24 heures pour inactiver les enzymes susceptibles d'hydrolyser les glycosides. En suite ces fruits sont broyés en poudre fine.

Les lipides sont extraits pendant 8h à l'aide d'un dispositif soxhlet, à raison de 7 cycles/h. Le solvant d'extraction utilisé est l'hexane. Une fois l'extraction est terminée, on ajoute à l'extrait brut du sulfate de sodium anhydre puis on filtre et on évapore à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite, ensuite on pèse la masse de l'extrait et on détermine la teneur en lipides dans la matière végétale.

1.6.1. Calcul de la teneur ou (rendement) :

La teneur en lipides est le rapport entre la masse de l'huile extraite en gramme et la masse de la matière végétale de la prise d'essai en gramme.

Concernant les fruits de *Pistachier lentisque*, les teneurs des extraits lipidiques sont respectivement 11,72 % pour les fruits rouges et 32,82 % pour les fruits noirs. Pour le *Quercus* la teneur en huile est de l'ordre 9,0 % dans les deux variétés étudiées. Si on compare ces teneurs en huile par rapport à d'autres graines et fruits oléagineuses, on peut classer les fruits noirs de *Pistachier lentisque* parmi les graines riches en huile comme l'huile d'olive, tournesol, arachide, palme et le soja et par conséquent ces fruits peuvent être utilisés comme source d'huile végétale. Par contre les fruits rouges du *Pistachier lentisque* et les fruits de *Quercus* où la teneur en huile ne dépasse pas les 12 % sont classés parmi les graines et fruits moyennement pauvres en matière grasse et donc ces huiles peuvent servir à des applications cosmétiques et pharmaceutiques.

1.6.2. Caractéristiques chimiques des huiles (Yousfi. M. (2005).

Les indices physico-chimiques qui caractérisent la matière grasse sont déterminés selon les normes AFNOR (Association Française de Normalisation).

Ces indices permettent de faire quelques estimations sur :

- indice d'acide (I.A) qui détermine la teneur en acides gras libres dans l'huile.
- indice de saponification (I.S) qui donne une idée sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et triacylglycérols.
- indice d'iode (I.I) mesure le nombre des insaturations.

a) Indice d'acide (IA) :

a.1) - Définition : c'est le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans un gramme de corps gras.

a.2) - Principe de la méthode: Il consiste en la mise en solution d'une prise d'essai dans un mélange de solvants, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution titrée d'hydroxydes de potassium (KOH).

b) Indice de Saponification (I.S)

b.1) - Définition : l'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un gramme de corps gras.

b.2) - Principe :

- Saponification de l'huile par une solution alcoolique de potasse.
- titrage de l'excès de la potasse par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique.

c) Indice d'iode (I.I) :

c.1) - Définition : L'indice d'iode d'un lipide est la masse d'iode (I_2) (exprimée en mg) capable de se fixer sur les insaturations (double liaison le plus souvent) des acides gras dans 100 g de matière grasse.

La méthode de Wijs nous permet de déterminer par expérimentation le nombre de doubles liaisons que possède un acide gras. Cela peut présenter un intérêt pour identifier un acide gras si l'on connaît d'autres de ses caractéristiques.

c.2) - Principe : Quel que soit le réactif halogène utilisé, le principe est le même. Les liaisons éthyliques, en particulier celles des acides gras, fixent les halogènes.

Dans cette méthode, on utilise le réactif de Wijs qui est une solution de monochlorure d'iode ICl , composé plus réactif que l'iode, mais strictement équivalent à celui-ci du point de vue du nombre de moles fixées sur les doubles liaisons. On fait alors agir le réactif de Wijs, que l'on met en excès connu, sur un corps gras non saturé, ICl se fixe sur les doubles liaisons.

Cette réaction d'addition peut être utilisée pour déterminer quantitativement l'insaturation globale du corps gras.

L'excès de réactif reste en solution, on ajoute alors de l'iodure de potassium en fort excès (ce composé sert également à solubiliser l'iode libéré) qui se combine à ICl en libérant du d'iode. Ainsi le d'iode libéré est dosé par une solution de concentration molaire connue de thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$, en présence d'empois d'amidon comme indicateur, ajouté en fin de dosage.

Il est indispensable, pour obtenir une addition quantitative, d'utiliser un excès de réactif pendant un temps de contact suffisamment long, ou en présence de catalyseur et de titrer ensuite l'excès de réactif (iode non fixé) par un réducteur (par exemple, thiosulfates). On détermine ainsi la quantité d'iode fixé par le corps gras.

1.7. Interprétation des résultats :

Les caractéristiques chimiques des huiles étudiées sont regroupées dans le tableau 1.3. On remarque que les valeurs des indices d'acidité des quatre huiles sont élevées et notamment dans l'huile du fruit rouge de *Pistachier lentisque* (24.07mgKOH/g) ce qui indique que ces huiles renferment des quantités importante d'acides gras libres. Cette teneur élevée en acides gras libres peut-être due soit à la mauvaise conservation des fruits depuis leurs cueillettes jusqu'à leurs extraction et analyse ou bien à la maturation incomplète des fruits. On ce qui concerne l'indice d'iode, on enregistre des valeurs relativement élevées ce qui montre que les

huiles étudiées contiennent des insaturations et certainement des proportions importante en acides gras insaturés. Les valeurs des indices de saponification des huiles des fruits de quercus sont un peu élevée (160,30- 166,77 mgKOH/g) par rapport aux huiles de fruits de *Pistachier Lentisque* qui varient de 147,85-154,6 mg KOH/g). Puisque l'indice de saponification est inversement proportionnel aux masses moléculaires des acides gras et triglycérides, on peut dire que nos huiles renferment des acides gras à chaine moyenne d'atome de carbone C₁₆ à C₁₈.

A l'exception des valeurs des indices d'acidité, l'examen des caractéristiques chimiques calculées des huiles étudiées sont en harmonies avec d'autres huiles végétales alimentaires reportées dans la littérature.

Tableau1.2 : Caractéristiques chimiques des huiles des fruits étudiées

	I.A(mg/g)	I.S(mg/g)	I.I(g/100g)
<i>Pistacia.L (Noir)</i>	7,76	147,85	87,30
<i>Pistacia.L.(Rouge)</i>	24,07	154,60	109,02
<i>Quercus.illex</i>	5,32	166,77	85,77
<i>Quercus.suber</i>	5,10	160,30	78,63

CHAPITRE 2

Etude de la composition des acides gras

ETUDE DE LA COMPOSITION DES ACIDES GRAS

2.1. Généralités :

La fraction lipidique totale d'un tissu végétal ou animal est l'ensemble des composés organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants non polaires. Elles comprennent des diverses catégories composées de :

- Lipides de réserve, constitués de triacylglycérols (TAG), constituants largement majoritaires, ainsi que de composés métaboliquement proches, les monoacylglycérols (MAG) et les diacylglycérols (DAG).
- Lipides de constitution, représentés par les phospholipides. Ce sont les constituants essentiels des membranes cellulaires.

Lors de la saponification d'une huile végétale par un hydroxyde alcalin, on obtient deux fractions :

- Une fraction majoritaire constituée de sels d'acides gras résultants de l'hydrolyse des TAG des DAG, des MAG, des phospholipides, des glycolipides. Cette fraction appelée saponifiable est soluble dans l'eau.
- Une fraction minoritaire constituée de divers composés, tels que les triterpènes, les vitamines liposolubles, les alcools gras, les hydrocarbures des carotènes et des caroténoïdes, les stérols et les tocophérols. Cette fraction appelée insaponifiable est soluble dans presque tous les solvants organiques non polaires.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'analyse quantitative et qualitative des acides gras des huiles des fruits de pistachier lentisque et de quercus. Nous établirons ensuite la structure triglycérique de ces huiles en étudions tout d'abord les acides gras en position sn-2 des triacylglycérols puis à leur composition.

2.2. Les lipides

2.2.1. Définitions

Les lipides forment une classe de constituants biologiques nutritionnellement importants pour la part calorique et l'apport indispensable d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles qu'ils présentent dans la ration alimentaire. Les graisses et les huiles, qui ne se distinguent que

par leur point de fusion, constituent les matières grasses ou corps gras. Ces corps gras sont des matières organiques insolubles dans l'eau, et plus ou moins hydrophobes. Ils peuvent être solubilisés par les solvants organiques peu ou non-polaires (éthanol, isopropanol, acétone, éther éthylique, etc.). Les corps gras naturels sont essentiellement constitués par les triesters entre des acides gras et du glycérol. Ils renferment, en outre, des phospholipides en faible quantité, les stérols, des alcools, des vitamines, des pigments, des hydrocarbures, désignés dans leur ensemble sous le nom de constituants non glycériques, ou constituants mineurs (Comes F. (1989).

La littérature ne fait mention d'aucune définition universelle satisfaisante d'un lipide (**Christie W.W. 1989**) propose de considérer les lipides comme des acides gras et leurs dérivés, ainsi que toutes substances biosynthétiquement ou fonctionnellement liées à ces composés. Les acides gras sont naturellement synthétisés par la condensation des unités malonyl-coenzyme A, par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique propre aux acides gras. Ces définitions permettent de considérer les lipides simples (esters de cholestérol, triacylglycérols) et les lipides complexes (phospholipides, glycolipides), comme des lipides. Les premiers se retrouvent habituellement sous la forme d'agrégats dans les tissus d'entreposage alors que les seconds sont généralement liés à des protéines et des polysaccharides dans la membrane des tissus.

Les acides gras sont les lipides les plus simples. Les liaisons du groupement carboxyle étant polaires, l'extrémité acide d'une molécule d'acide gras est hydrophile alors que les liaisons de la chaîne hydrocarbonée sont hydrophobes. L'extrémité hydrophile est soluble dans l'eau alors que l'extrémité hydrophobe se dissout dans les composés organiques non polaires. Les acides gras sont rarement libres; on les trouve généralement combinés à d'autres molécules pour former des glycolipides ou des lipoprotéines (**Arms K, Camp P.S. (1993)**).

Certains acides gras sont les précurseurs immédiats des eicosanoïdes. Ils sont impliqués par le biais des PG dans la modulation de la réponse immune et de la reconnaissance de la gestation.

2.3. Les acides gras :

2.3.1. Données générales :

Les acides gras (AG) n'existent pratiquement pas à l'état libre dans les cellules et les tissus des corps gras, mais combinés sous forme d'esters. Ce sont des acides organiques à longue chaîne, généralement à nombre pair d'atomes de carbone (14 à 30 atomes) possédant une seule fonction carboxylique et une chaîne carbonée (queue) conférant à la plupart des lipides

leurs propriétés d'insolubilité dans l'eau et leur consistance grasseuse et huileuse (**Manuel Leon.Camacho et al, 2004 ; Farah N.Talpur et al, 2006 ; R.H.Glew et al, 2006 ; Ivis T.Forrester-Anderson et al, 2006**).

Ces acides gras, généralement non ramifiés, diffèrent entre eux par la longueur de leur chaîne, la présence, le nombre et la position de leurs doubles liaisons. On observe une prédominance très remarquable des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal. La double liaison, lorsqu'elle existe, est plus généralement de configuration *cis* (**M.F.Balta et al, 2006 ; Wendy,L et al, 2006 ; Abolfazl Fadavi et al, 2006 ; Martial Ledoux et al, 2005**).

La plupart des organismes vivants sont capables de synthétiser des AG mono-insaturés par désaturation des AG saturés correspondants *cis* (**Hansteen.B et al, 1980**). .

Les acides gras polyinsaturés sont intéressants sur le plan nutritionnel. Certains d'entre eux jouent un rôle vital dans la cellule. D'où leur dénomination d'acide gras essentiels (AGE), il s'agit des acides linoléiques (série n-6) et α -linoléique (série n-3) et de leurs dérivés supérieurs. Ces AGE ne sont pas synthétisés mammifères. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation. L'acide linoléique est le précurseur des thromboxanes

Une des caractéristiques importante du point de vue chimique et nutritionnel est la longueur de chaîne des acides gras constitutifs des triacylglycérols (chaînes courtes, moyennes ou longues). Lorsqu'il n'y a pas de double liaison entre les atomes de carbone constitutifs de la chaîne, l'acide gras est dit "saturé"; dans le cas contraire, il est dit "insaturé".

Un exemple d'acide gras saturé est donné par l'acide stéarique (C18:0), et un exemple d'acide gras insaturé est l'acide oléique (C18:1). Quand plusieurs paires d'atomes de carbone ne sont pas saturés, l'acide gras est dit "poly-insaturé", comme l'acide linoléique (C18:2), ou l'acide linoléique (C18:3) .

Par ailleurs, la présence d'une double liaison dans un acide gras entraîne une propriété particulière, qui tient à ce que les deux atomes d'hydrogène adjacents à la double liaison puissent être:

- soit du même côté de la double liaison: isomère "*cis*".
- soit de part et d'autre de la double liaison: isomère "*trans*".

2.3.2 Nomenclature et structure

Les acides gras des plantes, des animaux et des micro-organismes sont généralement composés d'un nombre pair d'atomes de carbone, formant des chaînes linéaires terminées à une extrémité par un groupe carboxylique (COOH). La longueur des chaînes varie de 2 à 80 atomes de carbone bien que les acides gras les plus communs comptent de 12 à 22 unités de carbone (C₁₂ à C₂₂). Ces chaînes sont dites saturées si elles ne présentent aucune liaison double; mono insaturées et polyinsaturées, si elles présentent respectivement une ou plusieurs liaisons doubles (Tableau 2.1). Celles-ci sont généralement de configuration cis (c, Z) et disposées selon le type d'acide gras. Il est possible de représenter un acide gras, comme par exemple l'acide linoléique (nom trivial), de la façon suivante:



L'acide linoléique peut aussi s'écrire C18:2n-6. Le chiffre 18 représente le nombre total d'atomes de carbone retrouvé dans la chaîne, le chiffre 2 détermine le nombre de doubles liaisons et le chiffre 6 situe le carbone suivant lequel se retrouve la première liaison double, depuis le groupe méthyle (CH₃) terminal.

Une autre façon de situer la première liaison double fait appel à la terminaison carboxylique et elle permet d'écrire l'acide linoléique des façons suivantes : C18:2 (9, 12), 9c12c C18:2, cis-9, cis-12 C18:2 ou C18:2, 9c, 12c. Les liaisons doubles apparaissent ici en ordre croissant de grandeur, selon leur position, en relation avec le groupe carboxylique terminal. De plus, des informations supplémentaires concernent la configuration des liaisons. Enfin, le nom systématique de l'acide linoléique peut se lire ainsi: acide 9c12c octadécadiénoïque.

Les acides gras polyinsaturés (polyéniques) montrent un motif -C=C-C-C=C- dans lequel la séquence des doubles liaisons de configuration cis est interrompue par un groupe méthylène (CH₂). C'est le cas des acides linoléique (C18:2n-6) et α -linoléique (C18:3n-3). Les acides gras dérivés des ces précurseurs sont eux aussi des acides gras polyinsaturés.

2.3.2.1 Les acides gras saturés

Les acides gras saturés les plus abondants du règne végétal et animal sont des composés linéaires formés de 14, 16 et 18 atomes de carbone. L'acide palmitique (C16:0) est le plus fréquemment rencontré et il se retrouve dans les huiles de poisson (10-30%), le lait et les graisses animales (jusqu'à 30%) et dans presque toutes les huiles végétales (5-50%). L'acide

stéarique suit de près et se retrouve dans le suif (5-40%) et dans les gras solides d'origine végétale (30-45%) .

Le groupe des acides gras saturés compte aussi des chaînes paires et impaires de 2 à 36 atomes de carbone. Les chaînes impaires sont pour la plupart synthétisées par les micro-organismes et à l'occasion, dans le tissu animal (Christie, 1989). Les chaînes courtes et moyennes (C₄-C₁₄) se retrouvent principalement dans le gras du lait et dans quelques huiles végétales. Les longues chaînes (C₁₈-C₃₆) chaînes sont faiblement représentées dans le monde végétal quoique bien présentes chez certaines espèces. La structure des acides gras saturés est la suivante : **CH₃(CH₂)_nCOOH**

2.3.2.2 Les acides gras monoinsaturés

Les acides gras monoénoïques sont des chaînes linéaires de 10 à 30 carbones, en nombre pair, qui contiennent une seule liaison double, La structure de ces acides gras est la suivante :

CH₃(CH₂)_nCH=CH(CH₂)_mCOOH. Les acides gras monoinsaturés les plus importants sont : les acides palmitoléique (C₁₆:1n-7), oléique (C₁₈:1n-9) et érucique (C₂₂:1). Généralement, ces acides gras n-7 ou n-9 ont une double liaison de configuration cis.

2.3.2.3 Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) les plus importants ont une structure de 16 à 22 atomes de carbone, interrompue de 2 à 6 liaisons doubles de configuration cis. Leur structure correspond à celle-ci : **CH₃(CH₂)_m(CH=CHCH₂)_x(CH₂)_nC00H.**

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) les plus importants du monde végétal sont des C₁₈ alors que les C₁₆, C₂₀ et C₂₂ sont présents dans les huiles de poisson et les lipides des animaux [Gunstone, 1962]. Deux groupes principaux sont représentés: les n-6 et les n-3. L'acide linoléique (acide cis-9, cis-12-octadécadiénoïque) est le plus commun des acides gras polyinsaturés (AGPI). Il s'agit d'un acide gras essentiel qui sert de précurseur lors de la fabrication des chaînes n-6 de 18 à 22 atomes de carbones. L'acide α-linolénique (acide cis-9, cis-12, cis-15 octadécatriénoïque) est la structure terminale des acides gras polyinsaturés (AGPI) issue de la biosynthèse des acides gras chez les plantes supérieures.

L'acide C₁₈:3n-3 est un acide gras essentiel et sa structure permet, chez les animaux qui l'absorbent par le biais d'aliments, la synthèse des précurseurs des acides gras du groupe n-3.

Contrairement aux acides gras monoinsaturés ou saturés, les AGPI sont susceptibles de s'oxyder. Chez le porc, les AGPI de source alimentaire ont un effet marqué sur la composition

en gras corporel de l'animal alors que les sources d'acides gras insaturés et monoinsaturés ont un effet faible.

2.3.2.4 Les acides gras essentiels

Les acides gras essentiels sont requis dans l'alimentation des animaux parce qu'ils ne peuvent pas être synthétisés de novo à partir des précurseurs endogènes et parce qu'ils sont requis pour le maintien du développement et de la reproduction. Les animaux ne possèdent pas les enzymes ($\Delta 12$ et $\Delta 15$) requises à l'introduction des liaisons doubles retrouvées entre la terminaison méthylque et la liaison double $\Delta 9$ des acides gras. Ces enzymes sont présentes chez les plantes et c'est pourquoi la plupart des acides gras essentiels retrouvés dans l'alimentation des animaux sont d'origine végétale. Il en existe deux familles : les n-6 et les n-3. L'acide linoléique (C18:2n-6) et l'acide α -linoléique (C18:3n-3) sont reconnus comme étant essentiels dans le régime alimentaire de la plupart des espèces animales.

Les longues chaînes polyéniques sont constituées de 20 ou 22 atomes de carbones et comptent plus de 2 liaisons doubles. Les longues chaînes polyéniques sont fabriquées à partir des acides gras essentiels de 18 carbones, selon une séquence de désaturation et d'élongation. Les métabolites ainsi obtenus sont, entre autres, le C20:4n-6, l'acide eicosapentaénoïque (C20:5n-3) et l'acide docosaénoïque (C22:6n-3). En plus de catalyser la formation de longues chaînes polyéniques n-3 et n-6 à partir des C18:3n-3 et C18:2n-6 alimentaires, les désaturases sont responsables de la synthèse des longues chaînes polyéniques (n-9) à partir de l'acide oléique (C18:1n-9) endogène et/ou alimentaire. Les substrats privilégiés de la $\Delta 6$ désaturase sont : C18:3n-3 > C18:2n-6 > C18:1n-9. De plus, la désaturation ($\Delta 6$) de C18:1n-9 est complètement inhibée par la présence des acides C18:3n-3 et C18:2n-6 (**Innis, 1991**). Il semble en fait que l'affinité de l'enzyme pour le substrat soit étroitement liée au nombre de doubles liaisons présentées par la longue chaîne d'acide gras polyénique.

Les acides gras polyinsaturés de type C₂₀ donnent naissance aux eicosanoïdes. Ces métabolites physiologiquement et pharmacologiquement actifs sont connus sous le nom de AGPI, LT, tromboxanes (TX) et lipoxines (LX) (**Mitchell, 1990; Mayes, 2000**). Ils sont formés rapidement à la suite de stimuli et agissent à très faibles doses en tant qu'autocofacteurs, exerçant une influence profonde sur les réactions de types cellulaires (**Chapkin, 1992**).

L'augmentation de la consommation des AGPI de type n-3, plus particulièrement les acides

C20:5n-3 et C22:6n-3, est reconnue pour avoir plusieurs effets bénéfiques sur des aspects importants de la santé des animaux et des humains (**Leskanich & Noble, 1999**). Les acides gras essentiels stimulent la croissance, la santé de la peau, le maintien de la pousse des poils et des performances de reproduction, la régulation du métabolisme du cholestérol, l'activité lipotrope ainsi que d'autres effets physiologiques et pharmacologiques (**Sardesai, 1992**).

2.3.2.5 Les acides gras conjugués

Les acides gras conjugués polyéniques sont des isomères géométriques et positionnels des AGPI. Les plus communs sont des tétraènes ($\Delta 9, 11, 13, 15$) dérivés de l'acide α -linoléique, des diènes et des triènes ($\Delta 9, 11, 13$ et $\Delta 8, 10, 12$) dérivés de l'acide linoléique. Les polyènes conjugués renferment le motif $-C=C-C=C$ dans lesquels les doubles liaisons de configuration cis ou trans sont séparées par une seule liaison simple. L'avènement d'une structure conjuguée n'est pas fréquente parmi les AGPI. Les acides linoléiques conjugués (**CLA**) reçoivent actuellement beaucoup d'attention pour leurs différentes propriétés biologiques et plus particulièrement pour leurs rôles anti cancérigène et antiathérogène (**Banni & Martin, 1998**).

2.3.3 Sources alimentaires

Les sources d'acides gras alimentaires sont variées. Elles sont d'origines végétales, animales et bactériémies. La ration des truies doit contenir une quantité suffisante d'acides gras et d'acides gras essentiels afin de permettre aux animaux de répondre à l'ensemble de leur besoins physiologiques. La liste des lipides alimentaires qui suit se veut non exhaustive et elle correspond aux quatre traitements lipidiques ajoutés à la ration des truies Lors de la phase expérimentale décrite au chapitre 3.

2.3.4. Analyse des acides gras :

L'identification des AG est couramment réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après leur transformation préalable en esters méthyliques des acides gras (EMAG) de façon à accroître leur volatilité (**Kayoks.S et al, 1994**). Cette technique permet de séparer les EMAG en fonction de leur nombre d'atomes de carbone mais aussi en fonction du nombre et de la position des doubles liaisons, ainsi que d'éventuels groupes fonctionnels (**Beretz.A et al, 1982**).

Les esters méthyliques des acides gras (EMAG) sont préparés par plusieurs méthodes décrites dans la littérature, on peut citer deux méthodes.

- **Estérification des acides gras** par le méthanol en présence d'un catalyseur acide, le trifluorure de bore (BF₃) selon la méthode recommandée par "International of pure and Applied chemistry (IPAC) (Kaul. T.N et al, 1985 ; Parmar.N.S et al, 1984). Cette estérification à lieu sur les acides gras libres, par conséquent, il est nécessaire d'effectuer une saponification préalable par un hydroxyde alcalin (hydroxyde de potassium en milieu hydroalcoolique).

Cette méthode est valable uniquement si l'huile ne comporte pas d'AG particuliers, tels que des acides gras polyéthyléniques conjugués ou époxydiques (Varma.S.V , 1986).

Les esters méthyliques des acides gras (EMAG) sont préparés suivant ce protocole :

- **Transestérification** par action du méthylate de sodium en solution méthanolique (Hansteen.B, 1983). Cette technique n'est valable que si l'indice d'acide d'huile n'est pas trop élevé (teneur en acides gras libres inférieure ou égale à 3%).

Les identifications se font par comparaison des temps de rétention (TR) de produits étalons ou par calcul des longueurs de chaînes équivalentes (LCE). Cette méthode permet de caractériser les AG par une valeur numérique que l'on peut chercher dans les tables de données citées dans la littérature (Nishizoka.Y, 1986). Mathématiquement, la longueur de chaîne équivalente (LCE) est définie par la formule suivante :

$$LCE(X) = (m) + (n - m) \cdot \frac{\text{LogTR}(X) - \text{LogTR}(M)}{\text{LogTR}(N) - \text{LogTR}(M)}$$

Où M est l'acide gras saturé à m atomes de carbone ; N est l'acide gras saturé à n atomes de carbone ; n>m ; X est l'acide gras recherché.

L'analyse par chromatographie phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques des acides gras (EMAG) est effectuée sur une colonne de type "Méga 10" capillaire nature de phase sa susceptible de séparer les isomères de position des acides gras insaturés. L'identification des esters méthyliques des acides gras(EMAG) est réalisée en trois étapes. Tout d'abord nous injectons les esters méthyliques des acides gras (EMAG) étalons puis nous calculons les valeurs des longueurs de chaînes équivalentes (LCE) et en fin nous faisons une analyse chromatographique phase gazeuse couplée à un détecteur de masse pour enlever toute ambiguïté.

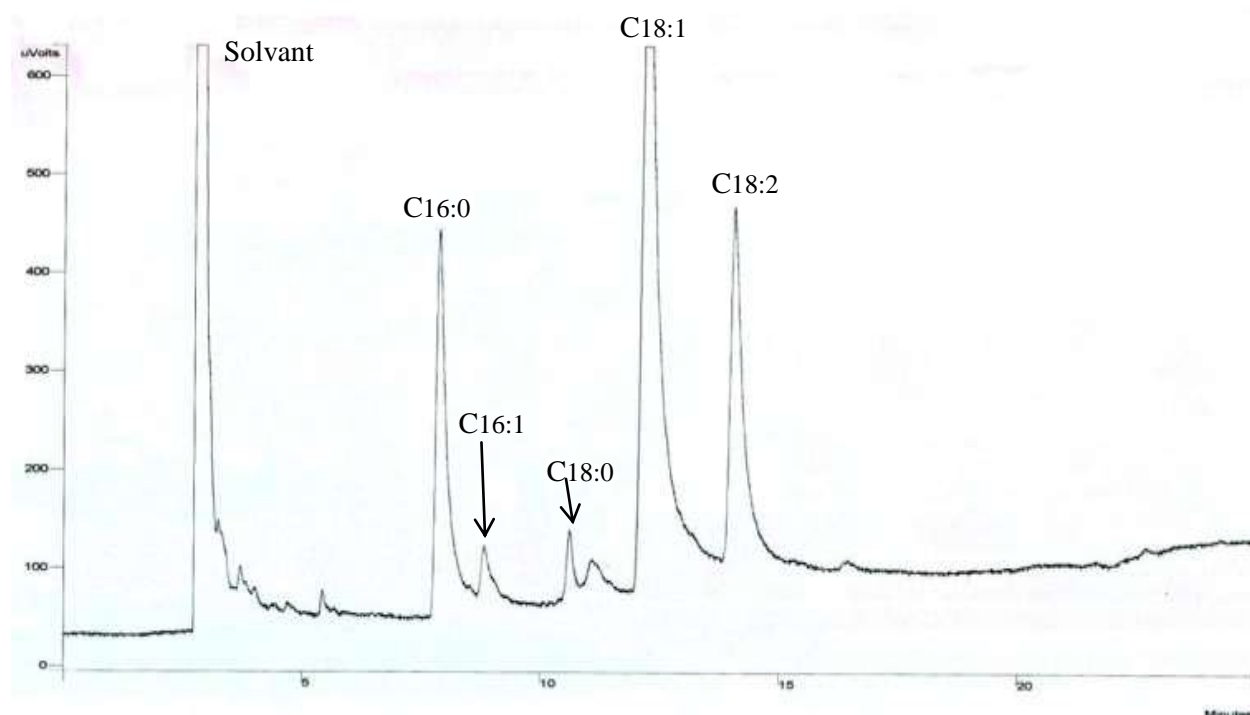


Figure 2.3 : Chromatogramme des EMAG de l'huile de *Pistacia lentiscus* noir

Tableau 2.1 : Composition en acides gras des huiles étudiées

Acides gras	<i>Pistachier.L</i> (Noir) (%)	<i>Pistachier.L</i> (Rouge) (%)	<i>Quercus</i> (<i>ilex</i>) (%)	<i>Quercus</i> (<i>suber</i>) (%)
C16 :0	19,50	16,30	16,50	17,00
C16 :1	2,10	1,00	—	—
C18 :0	01,70	0,70	—	—
C18 :1	55,30	53,50	65,00	63,80
C18 :2	21,40	28,50	17,60	17,80
C18 :3	—	—	0,90	0,90
C20 :1	—	—	—	0,50
ΣAGS	21,20	17,00	16,50	17,00
ΣAGI	78,80	83,00	83,50	83,00
$\frac{\Sigma$AGI ΣAGS	3,72	4,88	5,06	4,88

AGS : acides gras saturés ; AGI : acides gras insaturés

A partir des chromatogrammes des EMAG des huiles (figure 2.3), nous avons établi le tableau 2.1. Sept acides gras ont été identifiés dans les huiles des fruits étudiés. Les proportions individuelles de chaque acide gras dans les huiles sont aussi mentionnées dans le tableau 2.1. Les acides gras saturés dans les huiles sont les acides : palmitique et stéarique qui représentent une proportion totale 21,20% dans les huiles des fruits du *Pistachier* et 17 % dans les huiles des fruits de *Quercus*. L'acide palmitique est le composé majoritaire des acides gras saturés, leurs pourcentages varient de 16,30 % à 19,50 % dans les huiles des fruits de *Pistachier* et entre 16,5 à 17% dans les huiles de fruits de quercus. L'acide stéarique

est aussi détecté dans les huiles des fruits de *Pistachier* seulement mais avec des proportions plus faibles ne dépassant pas les 1,70%. Concernant les acides gras insaturés, les acides oléique et linoléique sont détectés dans tous les échantillons d'huiles. Les acides gras insaturés représentent un pourcentage total de 78,80 % dans l'huile du fruit noir de *Pistachier lentisque*, et plus de 83 % dans les trois autres huiles. Ils sont représentés essentiellement par l'acide oléique (C18 :1) de [53,50 - 65,00 %] et l'acide linoléique (C18 :2) à [17,60 - 28,50 %] et cela pour les quatre types d'échantillons. L'acide linoléique est détecté uniquement dans l'huile de fruits de quercus avec une proportion très faible qui ne dépasse pas 0,9%. De même l'acide palmitoléique est repéré seulement dans les deux huiles de fruits de *Pistachier* avec une quantité relative de l'ordre 2,10.

Notre étude sur la composition en acide gras de l'huile de quercus montre des valeurs identiques en acide oléique que ceux de l'huile d'olive car les acides gras monoinsaturés comme l'acide oléique ont des impacts remarquables comme un élément nutritionnel et des effets stables contre l'oxydation des huiles.

Les profils chromatographiques des EMAG confirment une similitude entre les huiles de *Quercus* et le *Pistachier* et les autres huiles végétales alimentaires comme les huiles : d'olive, tournesol, arachide, coton et colza et avocat.

Les rapports ($\Sigma\text{AGI} / \Sigma\text{AGS}$) sont pratiquement proches et élevés pour les quatre huiles. On note 3,72 et 4,88 pour les huiles des fruits noirs et rouges de *Pistachier lentisque* respectivement, et 5,0 pour les huiles des fruits des deux variétés du *Quercus*. Ces rapports donnent aux huiles une bonne prévention contre l'oxydation

L'analyse des huiles réalisée par la chromatographie en phase gazeuse confirme les résultats obtenus par la détermination des caractéristiques chimiques des huiles calculées par des méthodes chimiques simples, ce qui prouve l'importance de la détermination de ces caractéristiques des huiles dans l'étude préliminaire des matières grasses.

On se basant sur la présente étude, les fruits de *Pistachier lentisque* et du *Quercus* sont des bonnes sources d'huile. L'analyse qualitative et quantitative des EMAG des huiles étudiées montrent l'existence les mêmes acides gras mais avec des proportions différentes et des quantités élevées d'acides gras insaturés. Une meilleure connaissance des propriétés chimiques des huiles étudiées permet de trouver une application industrielle à ces huiles. Les résultats de la composition chimique des huiles incitent à proposer ces huiles comme huile alimentaires locale afin de minimiser l'importation des huiles de l'extérieur.

CHAPITRE 3

Etude des structures des triacylglycérols

ETUDE DES STRUCTURES DES TRIACYLGLYCEROLS

3.1. Introduction :

Les triacylglycérols (TAG), appelés aussi « graisses neutres » sont les constituants les plus abondants d'une huile végétale ce sont des esters du glycérol avec trois molécules d'acides gras. Selon l'identité des trois acides gras qui estérifient le glycérol, on obtient différents types de TAG :

- Les triacylglycérols simples, ou les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par des acides gras identiques.
- Les triacylglycérols mixtes, ou les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par deux ou trois acides gras différents.

Les multiples combinaisons avec les molécules de glycérol font que les corps gras sont des mélanges très complexes de composés. La manière dont les acides gras sont associés pour former les diverses molécules de triacylglycérols joue un grand rôle quant aux propriétés physiques, à la réactivité chimique et aux comportements physiologiques des corps gras.

La détermination de la structure glycéridique d'un corps gras, en prenant en compte la nature et les proportions de chacun des isomères, nécessite l'identification et la quantification des différents types de glycérides présents. L'isolement de ces derniers les uns des autres permet de préciser la nature et la proportion de chacun des acides gras occupent chacune des trois positions du glycérol et d'en déduire quels isomères sont présents en quelle est la proportion de chacun d'entre eux.

Afin d'obtenir le maximum de renseignement sur la nature des triacylglycérols (TAG) dans les huiles de *Pistacia lentiscus* et du *quercus*, nous étudierons successivement :

- La nature et les proportions des acides gras pris en compte pour l'identification des triacylglycérols (TAG).
- La nature et les proportions des acides gras en position Sn-2 du glycérol.
- La nature et les proportions des acides gras des triacylglycérols (TAG) différents entre eux par la nature des trois acides gras présents.

La combinaison de ces trois types de résultats expérimentaux nous conduira à une composition en triacylglycérols (TAG), où ne seront pas distinguées les positions Sn-1 et Sn-3.

La non équivalence des trois positions du glycérol entraîne l'existence d'isomères de position (lorsque les trois fonctions alcool ne sont pas acylées de la même façon) et d'isomères optiques (lorsque les deux fonctions alcool primaire sont acylées de façon différentes, le carbone médian du glycérol devenant asymétrique) (A.Lemhadri et al, 2006).

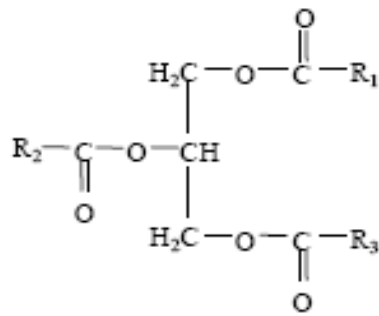
Une numérotation unifiée des trois positions du glycérol est nécessaire afin de distinguer sans ambiguïté les isomères de position des isomères optique. Cette numérotation stéréospécifique (Sn) indique que dans la représentation de Fischer de la molécule de glycérol, dans laquelle la fonction alcool secondaire est placée à gauche de la chaîne carbonée, le carbone supérieur est le numéro 1, le carbone médian le numéro 2 et le carbone inférieur le carbone le numéro 3.

Le numéro de combinaisons ternaires des divers acides gras ainsi identifiés est assez important. Si on désigne par n le nombre total d'acide gras, on peut avoir au maximum :

➤ si on considère l'ensemble des triacylglycérols (TAG) et de leurs isomères de position et optiques (distinction des positions 1 et 3 du glycérol, N_1 triacylglycérols (TAG), $N_1 = n^3$.

➤ si l'on inclut les isomères de position, mais sans tenir compte des énantiomères (non différenciation des positions 1 et 3), N_2 triacylglycérols (TAG), avec $N_2 = \frac{n^3+n^2}{2}$.

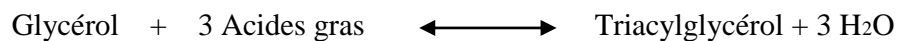
➤ N_3 triacylglycérols (TAG) différents entre eux uniquement par la nature des acides gras avec $N_2 = \frac{n^3+3n^2+2n}{6}$.



Triacylglycérols

Il existent plusieurs types de triacylglycérols: tri-saturés (SSS), monoinsaturés (SIS), diinsaturés (SII), et triinsaturés (III).

La plupart des lipides simples sont des triacylglycérols qui résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol avec trois molécules d'acides gras.



Leur composition en triacylglycérol (figure3.1) suit généralement un modèle dans lequel les acides gras au centre (ou en position-2) de la molécule de glycérol sont insaturés, avec de l'acide linoléique étant plus favorisé que les acides oléique ou linoléiques.

La plupart des acides gras de l'huile de table sont présents sous forme de triacylglycérols (triglycérides). Les triacylglycérides principaux de l'huile d'olive sont POO (18,4 %), SOO (5,1 %), POL (5,9 %), OOO (43,5 %), OOL (6,8 %) (P: acide palmitique; O: acide oléique; S: acide stéarique; L: acide linoléique) .

3.2. Méthodes d'analyse des triacylglycerols :

Il n'existe pas actuellement une méthode parfaite pour déterminer la composition glycéridique exacte d'une matière grasse, mais on peut la faire en combinant plusieurs méthodes d'analyse. La majorité des méthodes utilisées pour identifier les TAG sont des techniques chromatographiques.

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire dans ce cas la séparation se fait en fonction du nombre total d'atome de carbone (**Kamei.H et al, 1996**).

L'inconvénient de cette méthode est que les TAG de même condensation en carbone ayant des nombres d'insaturation différents ont le même temps de rétention. En plus, l'opération de l'analyse demande une température très élevée dans le four d'environ 350 °C.

- La chromatographie sur couche mince (CCM) de silice imprégnée d'une solution de nitrate d'argent : le fractionnement se fait en fonction du degré d'insaturation des différents TAG (**F.D.Gunstone, 1962**), des TAG ayant le même nombre d'insaturation mais des condensations en carbone différentes, ont le même facteur de rétention R.

- La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) colonne en phase inverse de type Rp18 : la séparation a lieu en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'insaturation (**Lio.M et al, 1985 ; Costantino.L et al 1992**).

- Les analyses stéréospécifiques : l'analyse stéréospécifique des triacylglycerols consiste à déterminer la distribution des différents acides gras sur les trois positions du glycérol. Si l'estérification des positions 1 et 3 se fait par des acides gras différents, les TAG résultants sont asymétriques et optiquement actifs. Cependant l'activité optique des ces stéréoisomères est trop faible pour être détectée. Des méthodes, autres que physiques, de détermination de la configuration des TAG ont été ainsi mise au point.

- La détermination des acides gras estérifiant la position 2 du glycérol, a été réalisée pour la première fois en 1965 par Bruckerhoff (**Hertoz.M.G.L, 1996**), en effectuant une digestion enzymatique des triacylglycerols par la lipase pancréatique de porc qui est un glycérol esterhydrolase spécifique de la position 2. Il existe une autre méthode déterminant les acides gras estérifiant les fonctions alcools primaires du glycérol. Il s'agit de la réaction de Grignard utilisant le bromure d'éthyle magnésium, réactif sans spécificité de chaîne, ni régiosélectivité (**Fernandez.Band.B.S et al, 1986**). Ces deux méthodes ne donnent que la répartition des acides gras sur les positions 2 et 1,3 du glycérol.

Néanmoins, la comparaison des résultats obtenus par hydrolyse enzymatique et hydrolyse chimique permet de mettre en évidence une éventuelle spécificité de chaîne de la lipase vis-à-vis d'un ou plusieurs acides gras (**YOUSFLM , 2005 ; COMES Frédérique, 1989**).

La méthode de Brockerhoff est aussi adoptée pour déterminer les acides gras en positions Sn-1, Sn-2 et Sn-3 sur la figure 3.1. Les 1,2 et 2,3 diacylglycérols (DAG) obtenus

après action du bromure d'éthylmagnésium sur les TAG et séparation par CCM sont transformés en 1- et 3-phosphatidylphénols. Ceux-ci subissent alors une digestion enzymatique par la phospholipase A₂ de venin de serpent, qui n'hydrolyse que les 3-phosphatidylphénols.

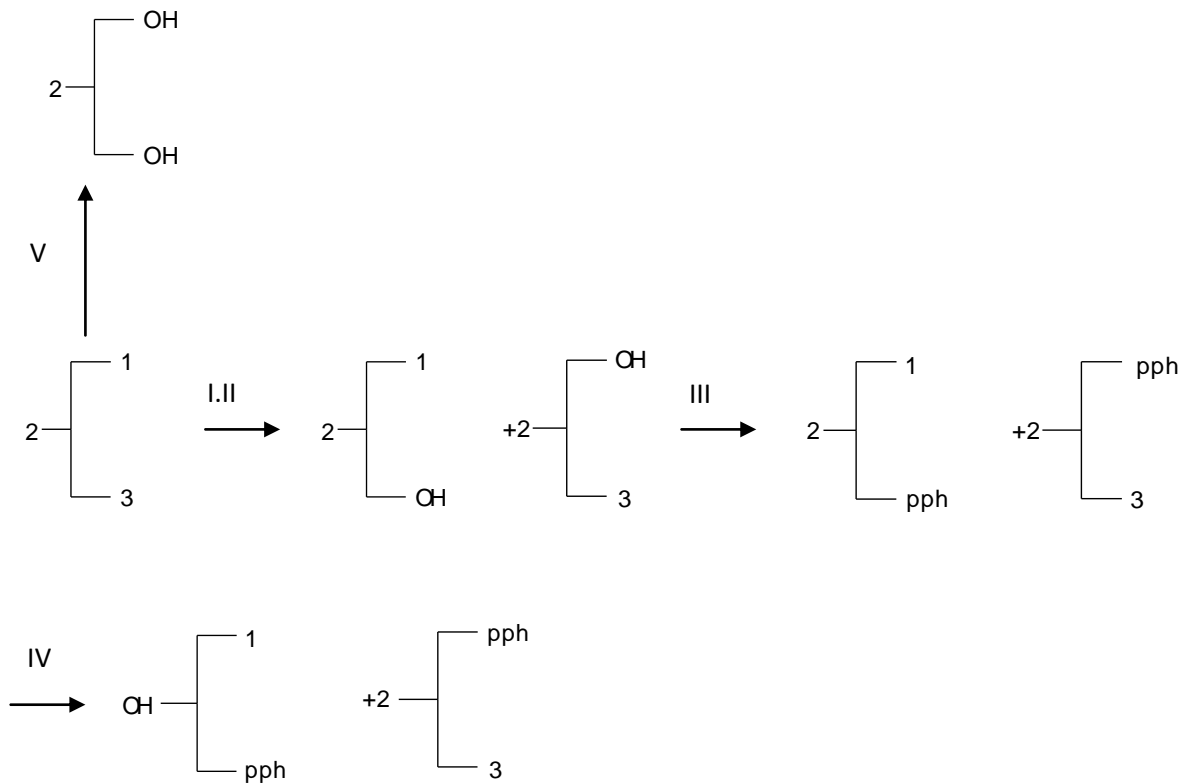


Figure 3.1 : Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff

L'ensemble de ces méthodes appliquées à un grand nombre de corps gras d'origine diverse (graisses animales, huiles végétales, laits) ont permis d'énoncer des règles générales de distribution des acides gras au sein TAG naturels (Gschwendt.M et al, 1983).

Ainsi, dans les TAG végétaux, les AG saturés estérifient préférentiellement les positions 1 et 3 du glycérol. La position 2 est occupée principalement par les acides gras

mono-ou poly-insaturés. Les acides gras particuliers se retrouvent majoritairement en position 3 figure 3.2.

La distribution des acides gras des TAG des graisses animales diffère des graisses végétales. La position 1 est ainsi occupée par des acides gras saturés. Les acides gras courts et insaturés estérifient la position 2. Enfin la position 3 est occupée par les acides gras longs.

L'étude de la distribution stéréospécifique des acides gras dans les TAG est intéressante à plusieurs points de vue. La plus grande importance accordée à la détermination des acides gras en position 2 est due à un intérêt historique. Son analyse a été la première à être développée. Cette analyse est très importante puisque, lors de la digestion chez les mammifères, les 2-monoacylglycérols, ainsi que les acides gras libres (AGL) correspondants sont absorbés par les muqueuses intestinales après hydrolyse préférentielle des TAG sur les positions Sn-1 et Sn-3 par la lipase pancréatique du porc (**D'mello, I.P.F, 1997**).

3.3. Les acides gras des triacylglycérols

3.3.1. Acides gras totaux des TAG

Les TAG sont isolés de l'huile brute par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice par élution du benzène selon la norme IUPAC 2231 (**Landolfi.Mower.R.L et al, 1984**).

Après une estérification en milieu basique, les EMAG correspondants ont été analysés par CPG. Dans les tableaux 1.3, et 2.3, nous rapportons les proportions des EMAG des TAG. D'après les données de ces tableaux, nous n'observons que très peu de variation de composition entre les acides gras des triacylglycérols et les acides gras totaux de l'huile brute.

Tableau 3.1 : Proportions des EMAG des triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits noir et rouge du *Pistacia lentiscus*

AG	Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> noir		Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> rouge	
	Huile (%)	TAG (%)	Huile (%)	TAG (%)
C16 :0	16,53	19,62	13,35	14,50
C16 :1	2,19	—	1,80	—
C18:0	3,62	1,81	3,83	3,90
C18:1	61,70	55,51	44,42	45,90
C18:2	9,89	21,82	33,70	35,70
C18:3	6,07	1,24	2,90	—

Tableau 3.2 : Proportions des EMAG des triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits du *Quercus ilex* et *suber*.

AG	Fruits du <i>quercus.ilex</i>		Fruits du <i>quercus.suber</i>	
	Huile (%)	TAG (%)	Huile (%)	TAG (%)
C16 :0	12,66	12,40	12,88	14,12
C16 :1	2,23	2,27	2,66	1,55
C18:0	—	—	—	—
C18:1	66,44	67,97	64,07	68,81
C18:2	17,00	15,88	18,05	15,52
C18:3	1,67	1,48	1,41	—

Pour la quantification des triacylglycérols, nous nous sommes intéressés qu'aux acides gras majoritaires, les acides oléiques, linoléiques, palmitiques, stéariques et linoléiques dont les proportions sont supérieures à 1%.

3.3.2. Digestion des lipides alimentaires

Les principaux lipides de l'alimentation humaine ou animale sont constitués essentiellement de triacylglycérols (triglycérides), de phospholipides et de stérols. La digestion de ces lipides est sous la dépendance des enzymes pancréatiques et des sels biliaires.

3.3.2.1. Les enzymes :

Les enzymes qui hydrolysent les lipides sont les lipases et les phospholipases. Leur activité se déroule dans l'intestin grêle.

- L'action complète de la triglycéride lipase (pancréatique) conduit à la libération de 2 acides gras et du 2-monoacylglycérol. Seuls les esters des fonctions alcool primaire du triglycéride sont hydrolysés.

- Les **phospholipases** qui hydrolysent les phospholipides sont au nombre de 4 : A1, A2, C et D. Les phospholipases **A1 et A2 (B)** libèrent respectivement les acides gras qui estérifient les fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol. Les composés privés de ces acides gras sont appelés des lysophospholipides. La phospholipase **C** hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate. Enfin la phospholipase **D** libère l'alcool qui spécifie le phospholipide.

Ces enzymes hydrolytiques agissent uniquement à l'interface eau-lipide. Aussi elles se fixent à la surface des grosses gouttelettes de graisses. Les premiers produits de l'action des lipases et phospholipases sont les acides gras et les lysophospholipides. Ils servent de puissants détergents qui accélèrent le processus réduisant les graisses en fines gouttelettes. L'action des sels biliaires complète la mise en émulsion et la formation de micelles des triglycérides.

3.3.2.2. Acides gras en Sn-2 et Sn-3 pour hydrolyse enzymatique.

Il y a hydrolyse préférentielle des positions 1 et 3 du glycérol par la lipase pancréatique de porc, qui est un glycérol esterhydrolase. Cette spécificité n'est pas absolue, la position 2 pouvant être également hydrolysée mais avec une vitesse beaucoup plus faible.

Afin de diminuer les réactions secondaires, telles que la migration de groupes acyles de la position 2 vers les positions 1 et 3, la durée de la réaction doit être courte (5 à 10 min). D'après Luddy et al. (**Baumann, J. Wurn, G. V et al, 1980**), un taux d'hydrolyse de l'ordre de 50% est préférable. Il faut également nous placer dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. Pour cela, nous ajoutons au milieu réactionnel du chlorure de

calcium CaCl_2 , les ions Ca^{++} étant cofacteur de cette enzyme, ainsi que du chlorure de sodium, l'acide cholique jouant le rôle d'émulsifiant. Cette réaction s'effectue en milieu tamponné de phosphate à $\text{pH} = 8$, et à une température de 37°C (température optimale de lipase).

Les divers produits obtenus par cette hydrolyse sont les monoacylglycérols (MAG), les diacylglycérols (DAG), les acides gras libres (AGL) et les triacylglycérols résiduels (TAG).

Après fractionnement des différentes classes par CCM ou colonne ouverte (Cavallini, L.Bindoli et al, 1987 ; Naim, M.Gestetner, B et al, 1976), celles-ci subissent une estérification afin d'obtenir les EMAG correspondants qui sont ensuite analysés par CPG. La composition en acides gras de la position 2 du glycérol est directement donnée par la composition en acides gras des triacylglycérols.

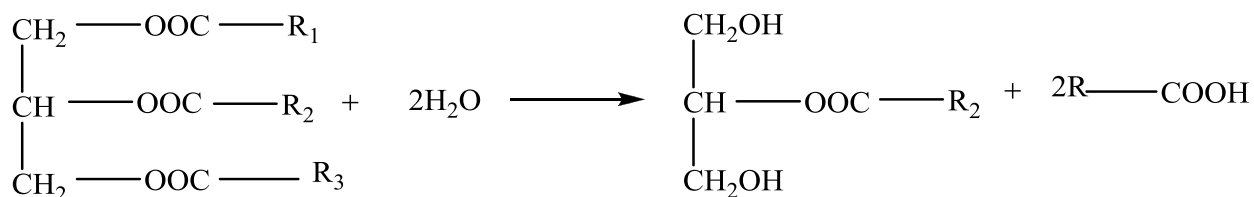
Le calcul de la composition en acides gras des Sn-1 et Sn-3 du glycérol est donné par la relation suivante (Mower.R.L et al, 1984):

$$[Sn - 1,3] = \frac{3 [TAG]\% - [Sn - 2]\%}{2}$$

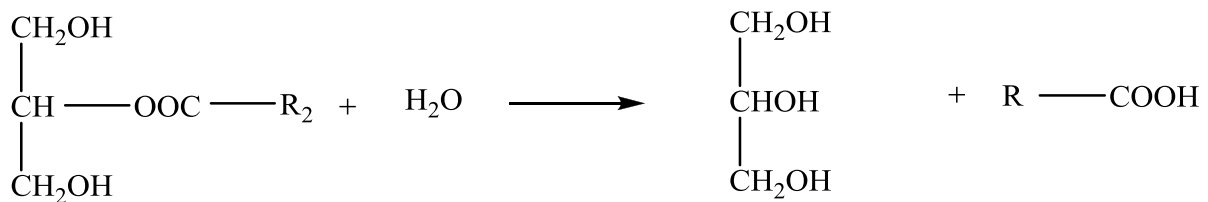
3.3.3. Hydrolyse des triglycérides

L'utilisation des triglycérides comme source d'énergie débute par une hydrolyse par les lipases qui libèrent le glycérol et les acides gras. Elle se fait en deux étapes :

1. La première activité hydrolytique, catalysée par le triglycéride lipase, libère un 2-monoacylglycérol et 2 acides gras. Elle est régulée par des hormones comme l'adrénaline, la noradrénaline, le glucagon et l'hormone corticotrope. On obtient :



2. La deuxième activité lipase, intracellulaire et indépendante des hormones, libère le dernier acide gras et le glycérol.



3.3.4. Isolement des monoacylglycérols en position 2 par CCM.

Les produits de l'hydrolyse sont solubilisés dans 500 μ l de chloroforme, puis ils subissent un fractionnement des différentes classes par chromatographie sur couche mince de gel de silice (CCM) ou colonne ouverte (Younes.M et al, 1981). L'élution est réalisée par un système de solvant constitué par hexane, diethyl éther, acide formique : 5/5/0,1, V/V/V. Deux migrations successives sont nécessaires. Les monoglycérides en position 2 sont visualisées par une lampe U.V à 254 nm. Après désorption des monoglycérides, ils sont récupérés dans une solution de 50 ml de chloroforme/méthanol c'est-à-dire 45ml /5ml sous agitation pendant deux (02) heures. Le solvant est filtré et évaporé sous pression réduite. Les extraits obtenus subissent une estérification afin d'obtenir les EMAG correspondants. Les EMAG des monoacylglycérols sont préparées de la même manière que ceux des acides gras totaux qui sont ensuite analysés par CPG dans les mêmes conditions.

Tableau 3.3 : Composition des principaux acides gras de l'huile des fruits noir et rouge de *Pistacia lentiscus* en position Sn-2 des triacylglycérols

AG	Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> noir		Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> rouge	
	TAG totaux	Position 2	TAG totaux	Position 2
C16 :0	19,62	8,61	14,50	16,14
C16 :1	—	—	—	—
C18:0	1,81	—	3,90	—
C18:1	55,51	61,55	45,90	47,40
C18:2	21,82	29,84	35,70	36,46
C18:3	1,24	—	—	—

Tableau 3.4 : Composition des principaux acides gras de l'huile des fruits du quercus ilex et suber en position Sn-2 des triacylglycérols

AG	Fruits du <i>Quercus.ilex</i>		Fruits du <i>Quercus.suber</i>	
	TAG totaux	Position 2	TAG totaux	Position 2
C16 :0	14,12	6,75	12,40	4,58
C16 :1	1,55	—	2,27	—
C18:0	—	—	—	—
C18:1	68,81	71,67	67,97	68,31
C18:2	15,52	21,58	15,88	27,11
C18:3	—	—	1,48	—

La digestion enzymatique des triacylglycérols (TAG) des huiles des fruits de *Pistacia lentiscus* et le *Quercus* par la lipase pancréatique de porc nous montre que les acides gras oléique et linoléique représentent respectivement environ de 62 % et 30 % des acides gras en position 2. L'acide stéarique occupe une position en très faible proportion (<1%) et l'acide palmitique dans une proportion de d'environ de 9%. En revanche, La position Sn-2 est très largement occupée par les acides gras insaturés C18 : 1 et C18 : 2 (oléique-linoléique) avec un taux de 91,39% des acides gras totaux du triglycéride de l'huile.

L'ensemble de ces résultats confirment bien les règles de distributions stéréospécifiques des acides gras sur la molécule de glycérol. En effet, les acides gras insaturés occupent préférentiellement la position Sn-2 du glycérol, fait qui avait déjà été énoncé par plusieurs auteurs (Hansteen.B, 1983 ; Naim, M.Gestetner et al,1976 ; Thompson.M et al, 1976; Takechi. M et al, 1985).

3.3.5. Détermination des triacylglycérols (TAG) à partir des acides gras en position Sn-2

Si l'on considère que les acides gras estérifient la molécule de glycérol en suivant une loi de distribution de position des acides gras dans les triacylglycérols établie par plusieurs auteurs (Thompson.M et al, 1976; Morton. A, 1968; Qideau.S et al, 1996; Mazza.G et al, 1993), il nous est alors possible, en utilisant les résultats de la digestion de la lipase pancréatique des triacylglycérols de quantifier les isomères de position des différents triacylglycérols.

Soit ABC, un triacylglycérol (TAG) mixte six isomères différents de positions existent (figure 3.1)

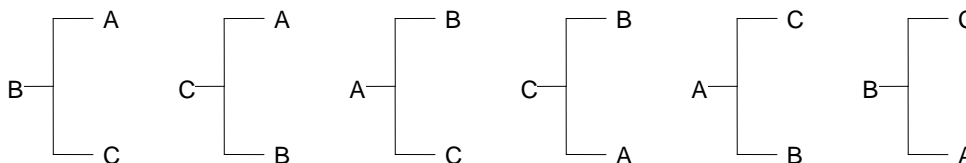


Figure 3.2 : Différentes isomères de position d'un TAG ABC

On a déjà vu que la digestion des triacylglycérols par la lipase pancréatique donne uniquement les pourcentages des acides gras en Sn-2 et en Sn-1,3. Les positions Sn-1 et Sn-3 ne sont pas différenciées. Donc seuls trois types de triacylglycérols peuvent être quantifiés. Ils seront notés A(BC), B(AC), C(AB). Les acides gras entre parenthèses estérifient les positions Sn-1 et Sn-3.

Pour déterminer la composition des triacylglycérols, nous avons adopté la méthode de Coleman (Thompson.M et al, 1976; Vemffa.L et al, 2001). Si x est le pourcentage d'un acide gras dans le triacylglycérol et y le pourcentage de cet acide gras en position 2 dans le triacylglycérol, alors le quotient $\frac{3x-y}{2}$ représente le pourcentage de l'acide

gras en position [1+3]. De la même manière, on peut calculer le pourcentage de tous les acides gras des huiles des fruits noir et rouge *Pistacia lentiscus* et des fruits ilex et suber du *Quercus* dans les trois positions 2 et 1+3. Les tableaux 2, 3, 4 et 5 regroupent ces valeurs (voir l'annexe).

Tableau 3.5 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits noir de *Pistacia lentiscus*.

	%	TAG	%	TAG	%	Totale
PPP	0,542					0,542
PPS	0,060	PSP	0,078			0,138
PPO	5,017	POP	1,135			6,152
PPL	2,268	PLP	0,384			2,652
PPLn	0,040	PLnP	0,041			0,081
PLnLn	0,003					0,003
PSLn	0,004	PLnS	0,004			0,008
OPS	0,419	PSO	0,54	POS	0,122	1,081
LPS	0,203	PSL	0,244	PLS	0,041	0,488
SSP	0,006					0,006
OSS	0,045					0,045
LSS	0,022					0,022
OPO	8,115	POO	10,488			18,603
LPO	6,69	POL	4,735	PLO	3,556	14,981
LPL	1,335	PLL	1,606			2,941
LPLn	1,139	PLLn	0,028	PLnL	0,166	1,333
LnPO	0,287	POLn	0,084	PLnO	0,371	0,742
SOO	0,875	OSO	0,876			1,751
SOL	0,424	LSO	0,722	OLS	0,297	1,443
SLL	0,144	LSL	0,144			0,288
LSLn	0,015	LLnS	0,015			0,03
OSLn	0,062					0,062
OLLn	0,204	LOLn	0,291	LLnO	0,287	0,782
OLO	5,753	LOO	13,974			19,727
LnOO	0,600	OLnO	0,601			1,201
LLO	4,737	LOL	2,790			7,527
LnLL	0,099	LLnL	0,098			0,197
OOO	16,96					16,96
LLL	0,946					0,946
LLnLn	0,010					0,010
OLnLn	0,021					0,021
Autres						0,197

Tableau 3.6 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits rouge de *Pistacia lentiscus*

	%	TAG	%	TAG	%	Totale
PPP	0,30					0,30
PPS	0,13	PSP	0,13			0,26
PPO	1,89	POP	1,00			2,89
PPL	1,46	PLP	0,78			2,24
OPS	0,38	PSO	0,80	POS	0,43	1,61
LPS	0,29	PSL	0,62	PLS	0,34	1,25
PSS	0,06					0,06
OSS	0,16					0,16
LSS	0,13					0,13
OPO	2,92	POO	6,22			9,14
OPL	4,54	POL	4,82	PLO	4,86	14,22
LPL	1,76	PLL	3,77			5,53
OOS	1,25	OSO	1,25			2,50
LOS	0,96	LSO	1,94	OLS	0,98	3,88
LLS	0,75	LSL	0,75			1,50
OLO	7,56	LOO	14,99			22,55
LLO	11,722	LOL	5,82			17,542
OOO	9,66					9,66
LLL	4,55					4,55
Autres						0,028

Tableau 3.7: Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits du *Quercus ilex*.

	%	TAG	%	TAG	%	Totale
PPP	0,12					0,12
PPPo	0,05	PPoP	0,05			0,1
PPO	2,33	POP	0,5			2,83
PPL	0,8	PLP	0,08			0,88
PPLn	0,03	PLnP	0,03			0,06
PLnLn	0,009					0,009
PPoLn	0,01	PLnPo	0,01			0,02
OPPo	0,76	PPoO	0,97	POPo	0,2	1,93
LPPo	0,3	PPoL	0,33	PLPo	0,03	0,66
PPoPo	0,02					0,02
OPoPo	0,032					0,032
LPoPo	0,13					0,13
OPO	7,55	POO	9,65			17,20
LPO	4,14	POL	0,3	PLO	1,46	5,9
LPL	0,45	PLL	0,5			0,95
LPLn	0,20	PLLn	0,02	PLnL	0,22	0,44
OPLn	0,49	POLn	0,14	PLnO	0,62	1,12
OOPo	0,315	OPoO	0,315			0,63
LOPo	1,25	LPoO	1,73	OLPo	0,48	3,46
LLPo	0,19	LPoL	0,19			0,38
LPoLn	0,08	LLnPo	0,08			0,16
OPoLn	0,21	OLnPo	0,21			0,42
OLO	4,75	LOO	17,21			21,96
OOLn	2,06	OLnO	2,05			4,11
LLO	2,60	LOL	1,88			4,48
LLLn	0,12	LLnL	0,12			0,24
OOO	31,40					31,40
LLL	0,28					0,28
Autres						0,079

Tableau 3.8 : Composition biochimique en triglycérides de l'huile des fruits du *Quercus.suber*.

	%	TAG	%	TAG	%	Totale
PPP	0,21					0,21
PPPo	0,03	PPoP	0,03			0,06
PPO	3,08	POP	0,81			3,89
PPL	0,83	PLP	0,15			0,98
OPPo	0,30	PPoO	0,407	POPo	0,11	0,817
LPPo	0,09	PPoL	0,11	PLPo	0,02	0,22
PPoPo	0,003					0,003
OPoPo	0,04					0,04
LPoPo	0,01					0,01
OPO	8,60	POO	11,66			20,26
LPO	4,18	POL	0,316	PLO	2,16	6,656
LPL	0,48	PLL	0,49			0,97
OOPo	1,12	OPoO	1,12			2,24
LOPo	0,33	LPoO	0,55	OLPo	0,21	1,09
LLPo	0,63	LPoL	0,06			0,69
OLO	6,03	LOO	15,83			21,86
LLO	1,928	LOL	1,82			3,748
OOO	32,54					32,54
LLL	3,36					3,36
Autres						0,356

La méthode détaillée de calcul des pourcentages relatifs des triacylglycérols est donnée dans l'annexe. Dans les tableaux 3.5, 3.6, 3.7 et 3.8, nous regroupons les divers genres de triacylglycérols (TAG). D'après les résultats obtenus des huiles des fruits noirs et rouges de *Pistacia lentiscus*, on note la prédominance des triglycérides suivants : **LLO, PLO, OOO, POO et LOO**, par contre pour les huiles des fruits du *Quercus.ilex* et *suber*, nous retrouvons systématiquement de façon majoritaire les triglycérides : **POO, LLO, LOO, et OOO**. On remarque que nos huiles sont riches en triglycérides formés par la combinaison des acides gras oléique, linoléique et palmitique.

L'analyse stéréospécifique réalisée par la méthode de Brockerhoff et dont les résultats sont présentés dans les tableaux 3.4, 3.5, 3.6 et 3.7 montrent que les acides gras saturés estérifient majoritairement les positions extrêmes, tandis que l'acide palmitique accusant une légère préférence pour la position Sn-1 alors que l'acide oléique estérifie plutôt la position Sn-3. L'acide linoléique occupe en majorité la position Sn-2. Le reste se répartit de façon sensiblement égale sur les positions extrêmes alors que l'acide oléique se distribue plus équitablement entre les trois positions et privilégie la position Sn-2.

CHAPITRE 4

Etude des lipides

ETUDE DES LIPIDES

4.1. Extraction des lipides polaires :

Les lipides polaires sont extraits selon la méthode de Folch (Folch *et al.* - 1957). Cette technique repose sur le principe d'extraction à froid des lipides par un mélange de solvants méthanol/chloroforme (1/2, v/v). Les lipides totaux ont été extraits à partir de la matière végétale par macération pendant 24 heures avec un mélange méthanol/chloroforme (1/2, v/v) (G.R.List *et al*, 1999 ; J.A.Sinngleton *et al*, 1999). L'extrait obtenu contient des substances non lipidiques, cette quantité extraite est solubilisée dans le chloroforme pour séparer cette partie non lipidique, cette solution chloroformique est lavée par une solution aqueuse de chlorure de sodium NaCl à 0,75 % (p/v) à 0,2 volume ensuite filtrée puis séchée par le sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Les teneurs en lipides totaux des huiles extraites de Pistachier lentisque varient de 8,47 % pour les fruits rouges à 29,90 % pour les fruits noirs. En ce que concernant les fruits du quercus les teneurs sont respectivement de 9,89 % pour le quercus ilex et 10,53 % pour le quercus suber.

L'addition d'une solution aqueuse favorise l'obtention d'un système biphasique. Les extractions sont réalisées 3 fois. Un mélange de solvants est utilisé afin d'extraire la totalité des lipides, des lipides les plus polaires au moins polaires.

Pour tous les échantillons (secs et humides), 6,66 volumes de méthanol, solvant polaire sont ajoutés au système pour une homogénéisation pendant 30 min. Puis, 13,33 volumes de chloroforme, solvant apolaire, sont ajoutés et le mélange est mis sous agitation pendant 30 min également. A ce stade, les lipides sont majoritairement passés en solution. Par filtration sur verre fritté, les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvant sont éliminés. Chaque perméat est versé dans une ampoule à décanter et dans laquelle est ajoutée 0,2 volume d'eau salée (0,9% Na Cl ; p/v). Les ampoules à décanter sont ensuite placées à + 4 °C à l'abri de la lumière pendant une nuit.

La phase organique (phase inférieure) contient les lipides neutres (LN), les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL), les lipides très ionisés et les autres composés solubles non lipidiques (protéines, sucres, sels...). A l'interface se trouvent majoritairement des protéines.

La phase organique est récupérée dans un ballon taré puis évaporée à l'évaporateur rotatif (Rotavapor). Après évaporation totale du solvant, les lipides sont repris dans un certain

volume de chloroforme en fonction de la masse obtenue pour les conserver. Ils sont ensuite stockés à l'abri de la lumière à - 80°C.

4..2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide :

Les lipides totaux sont fractionnés en différentes classes en fonction de leur polarité par chromatographie solide/liquide sur colonne ouverte. Cette méthode est basée sur la différence de degré d'adsorption de composés lipidiques sur des phases mobiles et fixes. Dans le cas présent, les composés lipidiques vont réagir différemment en fonction de la polarité du solvant d'éluion. Cette technique est une extraction en phase solide, appelée également *Solide Phase Extraction* (SPE) (Amalia A.Carelli et al, 1997 ; Libeth Ingvarlsen et al, 1994 ; Yuen May Chao et al, 2004 ; Mohamed fawzy Ramadan et al, 2003).

Dans une colonne (diamètre interne : 8-10 mm ; longueur : 20 cm) contenant de la laine de verre est introduite de la silice activée. La quantité de silice introduite est calculée de façon à ce que le rapport silice / extrait lipidique soit de 30/1. Le gel de silice est introduit dans la colonne à l'aide de chloroforme. Ce gel est ensuite drainé avec une faible quantité de chloroforme afin de le rincer et de stabiliser la colonne. Le solvant récupéré lors de cette étape est jeté. L'extrait lipidique est ensuite introduit dans la colonne en utilisant le chloroforme comme éluant. Différents éluants sont ensuite introduits dans la colonne en générant ainsi un gradient de polarité négatif (du plus polaire au moins polaire). Les fractions correspondant à l'éluion de ces solvants sont ensuite récupérées et quantifiées par évaporation du solvant. Les fractions sont ensuite conservées dans un volume connu de chloroforme et stockées à basse température.

Les valeurs des teneurs de ces différentes classes des lipides sont illustrées dans le tableau 4.1. À traves ces résultats, on remarque que les teneurs varient de 93,17 % des fruits rouge de *pistacia lentiscus* à 96,96 % des fruits noir de *pistacia lentiscus* pour les lipides neutres par rapport aux lipides totaux des fruits de *pistacia lentiscus* et les lipides totaux des fruits du *quercus*, les glycolipides sont en faibles teneurs dans les lipides totaux étudiées de 01,04 % dans les fruits du *quercus ilex* jusqu'à 05,59 % des fruits rouge de *pistacia lentiscus*,

Tableau 4.1 : Teneur des différentes classes des lipides polaires

Teneur (%)	<i>Pistacia lentiscus</i> noir	<i>Pistacia lentiscus</i> rouge	<i>Quercus</i> <i>ilex</i>	<i>Quercus</i> <i>suber</i>
lipides neutres (LN)	96,96	93,17	96,15	95,71
Glycolipides (GL)	02,37	05,59	01,04	01,34
Phospholipides (PL)	02,16	02,68	0,16	0,39

D'après les valeurs des teneurs des phospholipides de 0,16 % pour les fruits du *quercus ilex* à 02,68 % des fruits rouge *pistacia lentiscus*, à la lumière de ces valeurs on peut déduire que les lipides totaux des fruits de *pistacia lentiscus* et les fruits du *quercus* sont pauvres en phospholipides.

4.3. Etude des acides gras des lipides polaires :

Définition des lipides polaires: Lipides contenant un ou plusieurs radicaux phosphate, en particulier ceux dérivant du glycérol (phosphoglycérides , glycérophospholipides) ou de la sphingosine (sphingolipides). Ce sont des lipides polaires qui sont d'une grande importance pour la structure et les fonctions de la membrane cellulaire.

La fraction minoritaire dans les huiles végétales représente les lipides polaires, ces derniers contiennent les phospholipides et glycolipides.

4.4. Les phospholipides :

Les phospholipides (ou les lipides complexes) possèdent deux familles :

1. les glycérophospholipides
2. les sphingolipides

Ces deux familles diffèrent à la fois par leurs constituants et par le mode de liaison des acides gras sur les autres molécules. Malgré ces différences constitutives importantes, l'ensemble des molécules se comporte de manière similaire en se positionnant dans l'espace avec une partie hydrophile (tête polaire) et une partie hydrophobe (queue) constituée en grande partie par les chaînes hydrocarbonées d'acides gras.

4.5..Préparation des esters méthyliques des acides gras des lipides polaires:

La préparation des esters méthyliques des acides gras (EMAG) des différentes classes des lipides polaires : lipides neutres, glycolipides et phospholipides ainsi que l'analyse par chromatographie phase gazeuse est réalisée de la même manière. D'après les résultats obtenus, on remarque que toutes les EMAG des fractions des lipides contiennent les acides gras ordinaires rencontrés dans les huiles végétales mais avec des proportions variables.

Les chromatogrammes obtenus par analyse par CPG des esters méthyliques des fractions des lipides neutres des fruits noir et rouge du *pistacia lentiscus* et des fruits du *quercus ilex* et *suber*.

Les lipides neutres des fruits de *pistacia lentiscus* noir et rouge sont constitués essentiellement des acides gras : C16 saturé et mono-saturé (C16 :0, C16 :1) et C18 saturé et mono et poly-saturé. Les principaux acides gras sont : acide oléique (C18 :1), acide palmitique (C16 :0), acide linoléique (C18 :2), acide palmétoleique (C16 :1), acide stéarique (C18 :0) et l'acide linoléique (C18 :3) figure 4.1. Mais les fruits du quercus ilex et suber renferment particulièrement les acides gras : acide oléique (C18 :1), acide palmitique (C16 :0), acide linoléique (C18 :2), acide stéarique (C18 :0) et l'acide linoléique (C18 :3).

Les acides gras des esters méthyliques des glycolipides sont analysés dans les mêmes conditions que ceux des lipides neutres. Les chromatogrammes des EMAG des glycolipides des fruits noir et rouge de *pistacia lentiscus* figure 4.2, on observe la présence les mêmes acides gras détectés dans l'analyse des lipides neutres des fruits noir et rouge du *pistacia lentiscus* avec les mêmes proportions à peu près et l'apparition des acides gras saturés courte et longue chaines C14 :0 et C20 :0 et acide gras insaturé C20 :1 qui sont absentes dans les lipides neutres. Pour les glycolipides des fruits du quercus ilex et suber, ce sont particulièrement les mêmes acides gras qui sont détectés dans les chromatogrammes des lipides neutres des fruits du quercus avec des compositions légèrement variables.

La composition des phospholipides en acides gras des fruits de *pistacia lentiscus* (noir et rouge) et des fruits du quercus est déterminée dans des chromatogrammes.

En plus des acides gras qui se trouvent dans les deux fractions : lipides neutres, glycolipides, on remarque aussi la présence des acides gras saturés à courtes chaines C10 :0 C12 :0 C14 :0 et des acides gras insaturés à longues chaîne C20 :1. La composition en acides gras des lipides

totaux et les trois classes des lipides polaires des huiles étudiées « *pistacia lentiscus* et du *quercus* » est donnée dans les tableaux : 4.2 et 4.3

Tous ces résultats sont regroupés dans les tableaux ci-dessous. Les compositions des acides gras ordinaires : palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléinique se distinguent de celle des fractions lipides neutres et glycolipides seulement par l'abondance relative des différents acides.

Dans tous les extraits la teneur en acide palmitique augmente, alors que les parties des acides oléique et linoléique diminuent.

Les phospholipides des huiles de « *pistacia lentiscus* et du *quercus* » contiennent plus d'acides gras saturés par contre les glycolipides renferment essentiellement d'acides gras insaturés comme oléique et linoléique.

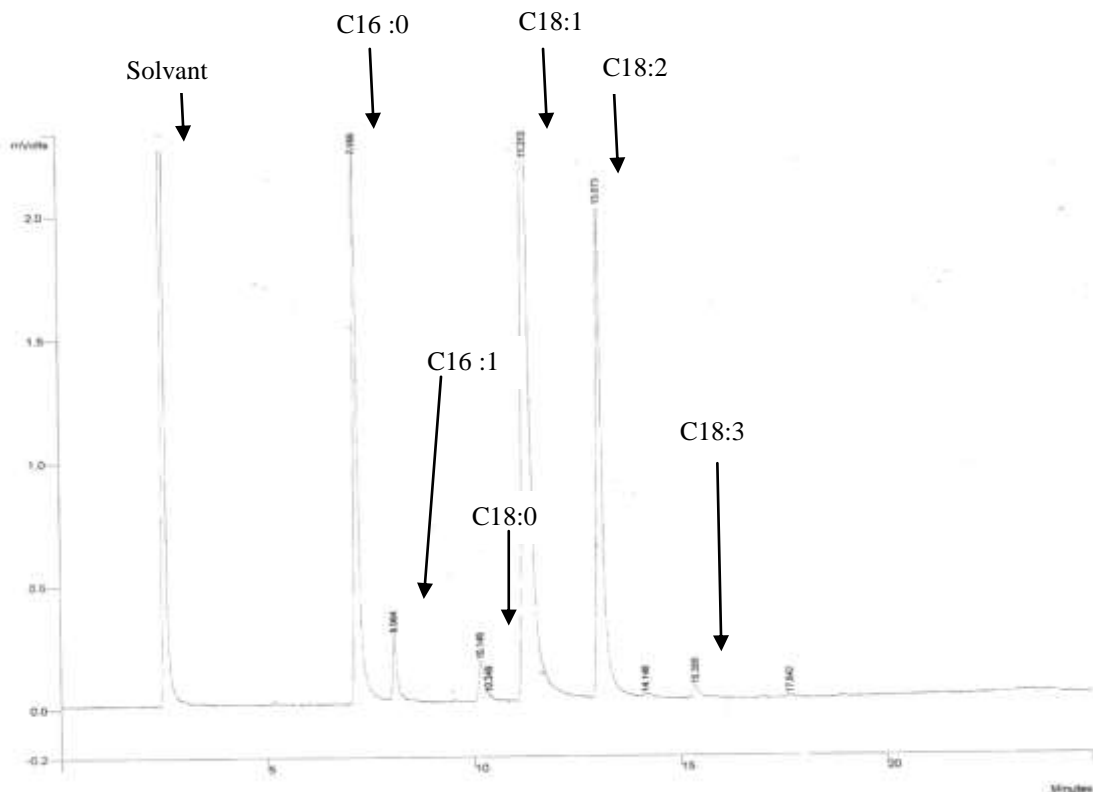


Figure 4.1 : Chromatogramme des lipides neutres des fruits de *Pistacia lentiscus* noir

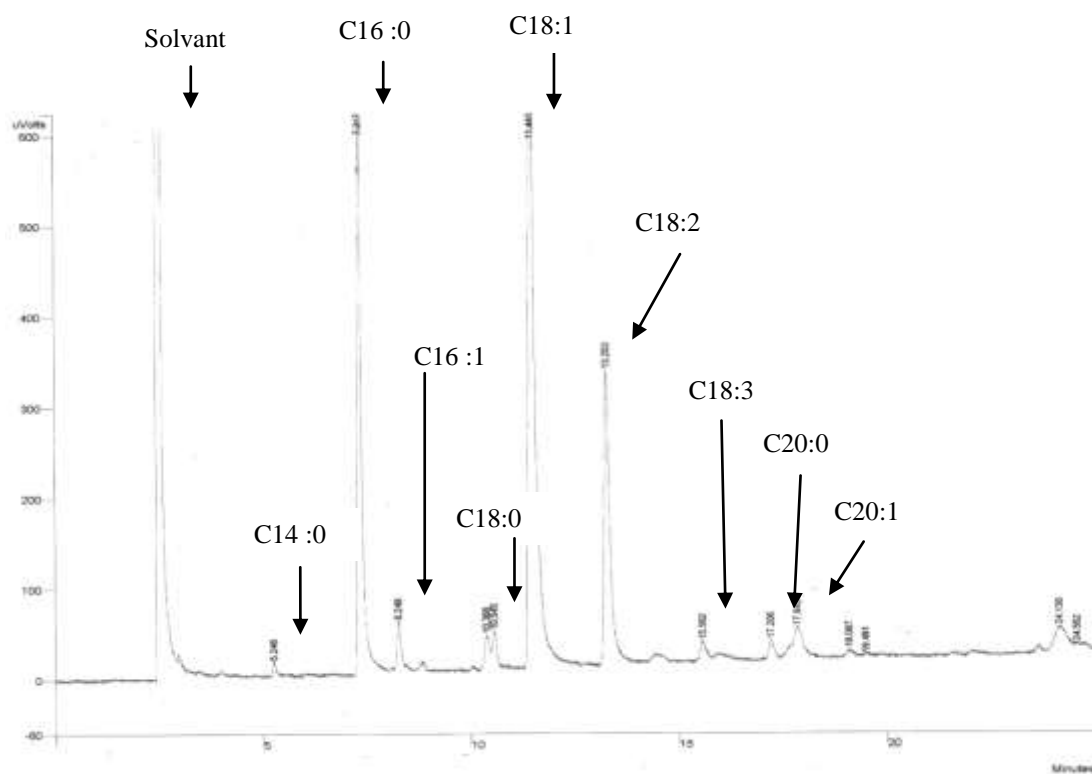


Figure 4.2 : Chromatogramme des glycolipides des fruits de *Pistacia lentiscus* noir

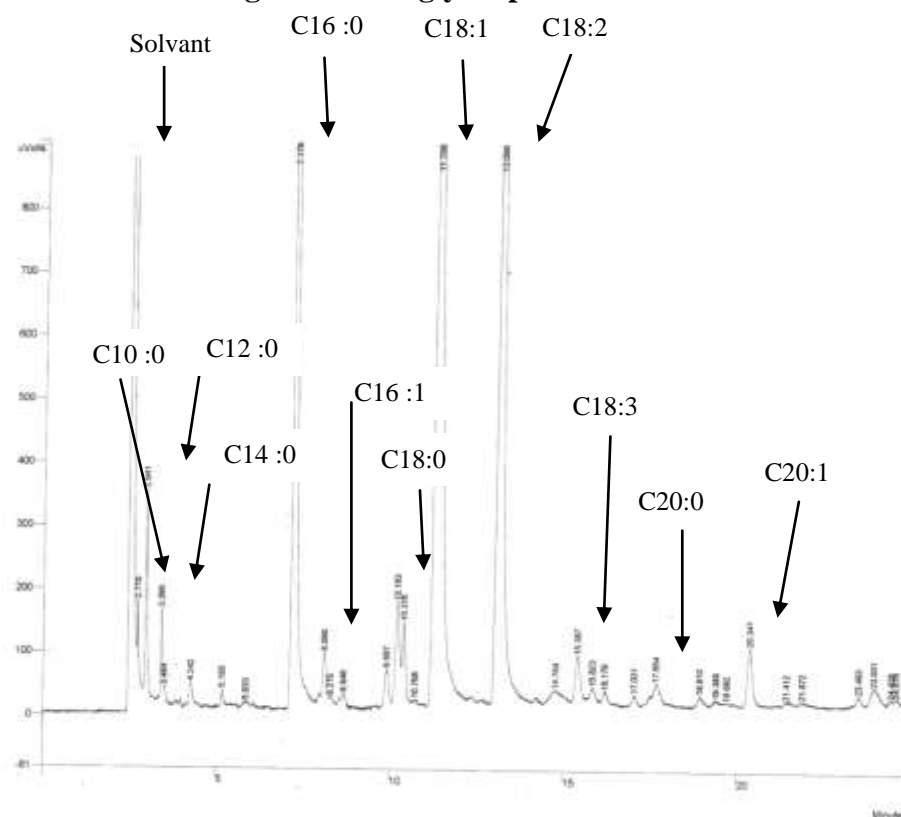


Figure 4.3 : Chromatogramme des phospholipides des fruits de *Pistacia lentiscus* noir

Tableau 4.2 : Composition en acides gras des différentes classes des lipides des fruits noir et rouge de *Pistacia lentiscus*.

AG	Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> noir				Fruits <i>Pistacia lentiscus</i> rouge			
	LT	LN	GL	PL	LT	LN	GL	PL
C10 :0	-	-	-	0,26	-	-	-	-
C12 :0	-	-	-	01,53	-	-	-	01,62
C14 :0	-	-	0,30	0,95	-	-	1,08	01,00
C16 :0	18,94	19,23	23,59	20,53	14,65	13,82	27,95	21,82
C16 :1	2,07	2,12	1,88	1,14	1,35	1,56	2,2	-
C18:0	1,59	2,01	2,99	3,43	3,34	3,37	5,49	3,43
C18:1	52,37	53,32	43,60	35,37	47,19	46,13	33,79	32,89
C18:2	18,56	22,50	16,86	27,63	32,05	32,73	19,09	34,64
C18:3	0,87	0,54	1,13	01,28	0,70	0,84	1,88	1,69
C20:0	-	-	1,06	0,73	-	-	1,28	-
C20:1	5,60	-	3,86	01,41	-	-	4,23	02,00
NID	-	0,28	4,73	5,74	0,72	1,55	3,01	0,91
Totale	100	100	100	100	100	100	100	100
ΣAGS	20,53	21,24	27,94	27,43	17,99	17,19	35,8	27,87
ΣAGI	79,47	78,48	67,33	66,83	81,29	81,26	61,19	71,22
$\frac{\Sigma AGI}{\Sigma AGS}$	3,87	3,69	2,41	2,44	4,52	4,73	1,71	2,62

LT : lipides totaux, LN : lipides neutres, GL : glycolipides, PL : phospholipides

Tableau 4.3 : Composition en acides gras des différentes classes des lipides des fruits du *Quercus ilex* et *suber* :

AG	Fruits du <i>Quercus.ilex</i>				Fruits du <i>Quercus.suber</i>			
	LT	LN	GL	PL	LT	LN	GL	PL
C10 :0	-	-		2,76	-	-	-	02,94
C12 :0	-	-		02,35	-	-	-	02,47
C14 :0	-	-		0,80	-	-	-	-
C16 :0	13,07	12,58	23,65	22,45	14,74	14,27	22,53	19,64
C16 :1	-	-	-	-	-	-		-
C18:0	01,79	2,51	4,33	5,36	03,00	3,036	04,30	2,34
C18:1	63,97	66,33	43,86	38,10	65,84	65,38	43,64	25,69
C18:2	18,07	16,87	26,10	22,84	15,04	15,31	28,75	41,28
C18:3	1,68	1,71	01,43	0,77	01,38	1,26	0,78	2,86
C20:1	-	-	-	04,09	-	-	-	2,78
NID	1,42	-	0,63	0,48	-	0,744	-	-
Totale	100	100	100	100	100	100	100	100
ΣAGS	14,86	15,09	27,98	33,72	17,74	17,306	26,83	27,39
ΣAGI	83,72	84,91	71,39	65,8	82,26	81,95	73,17	72,61
$\frac{\Sigma AGI}{\Sigma AGS}$	5,63	5,63	2,55	1,95	4,64	4,73	2,73	2,65

CHAPITRE 5

**Activité antioxydante des huiles
et
Analyse des tocophérols**

ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES ET ANALYSE DES TOCOPHEROLS

5.1. Activité antioxydante :

5.1.1. Mesure de l'activité antioxydante :

Les études épidémiologiques montrent un lien étroit entre la consommation des fruits et légumes et la réduction du risque de maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires causées par le stress oxydatif (**Shahid, F, 1997; Biglari, F et al, 2008; Jvanmardi, J et al, 2003; Chaovanalikit et al, 2004**).

L'intérêt des antioxydants est sans cesse croissant du fait de leur grande capacité à réprimer les radicaux libres (**Silva, E et al, 2007**). Le premier congrès sur les méthodes antioxydantes tenu à Orlando, aux Etats-Unis (2004) a permis la validation de méthodes dites standards pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans les aliments, les plantes, les produits pharmaceutiques, nutraceutiques, et les suppléments diététiques (**Sanchez-Morena, C, 2002**).

On distingue d'une part, dans les systèmes biologiques des sources d'antioxydants : les enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et la catalase) (**Huang, D et al, 2005**), les macromolécules telles que l'albumine, la ceruloplasmine, la ferrutine et d'autres protéines, les petites molécules (acide ascorbique, glutathion, acide urique, tocophérol, caroténoïdes, polyphénols, et des hormones (cestrogène, angiotensine, mélatinine (**Niki, E et al, 2000**), les cofacteurs des enzymes antioxydants (Se, Coenzyme Q(10), les inhibiteurs des enzymes oxydatives (aspirine, ibuprofène, cyclooxygénase), les chélateurs des métaux (EDTA) (**Huang, D et al, 2005**) ; d'autre part, des sources de radicaux libres et d'oxydants : O_2° , $RO(O)^\circ$, HO° (**Williams, E. M, 2000**) , 1O_2 , NO° , $ONOO^\circ$, $HOCl$, $LO(O)^\circ$.

De par leurs caractéristiques physiques et chimiques les antioxydants peuvent réagir de différentes manières avec les espèces réactives de l'oxygène à la base de nombreux dommages notamment une rupture de la fluidité membranaire (dénaturation des protéines, peroxydation lipidique, oxydation de l'ADN, altération des fonctions des plaquettes sanguines (**Kinsella, J.E et al, 2005**).

Malgré ces dommages, un composé tel que le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle principal dans de nombreux processus physiologiques vitaux (la vasodilatation et la neurotransmission) (**Edeas, M, 2005**).

Du fait de la multiplicité des réactions et des mécanismes caractéristiques autant que les différentes phases de localisation souvent impliquées, il serait risqué d'exploiter une méthode pour rendre compte de l'effet de toutes les sources de radicaux libres et tous les antioxydants vu la complexité dans la composition des substrats (aliments et échantillons biologiques).

5.1.1.1. Problématique de la détermination de l'activité antioxydante :

Le problème est lié à un manque de méthodes standardisées et de références pour mesurer la capacité antioxydante des aliments et produits biologiques. Il ne semble y avoir aucun consensus d'opinion, probablement du fait que le domaine des antioxydants est complexe Frankel et Meyer (**Frankel, E.N et al 2000**). ont relevé le risque lié à l'exploitation d'un même type de méthode pour évaluer l'activité antioxydante dans les systèmes biologiques et dans les aliments, du fait de la multiplicité des réactions et des mécanismes caractéristiques autant que des différentes phases de localisation souvent impliquées. Il n'ya donc pas une méthode universelle simple de mesure et de quantification exacte de l'activité antioxydante.

5.1.1.2. Définition :

Selon le « Webster's third New International Dictionary » (**Merriam-Webster, 2002**), un antioxydant est une substance qui s'oppose à l'oxydation ou empêche des réactions favorisées par l'oxygène ou des peroxydes. Plusieurs de ces substances sont employées en préventif dans divers produits notamment dans les corps gras, les produits alimentaires et les savons pour retarder la rancidité oxydative et dans les produits pétroliers pour retarder la formation des gommages et autres modifications indésirables et dans le caoutchouc pour retarder le vieillissement. En médecine et en biochimie, les antioxydants sont des enzymes ou d'autres substances organiques telles que la vitamine E ou bêta-carotène qui sont capables d'éliminer les effets préjudiciables de l'oxydation chez les tissus animaux (**Huang, D et al, 2005**). Dans l'industrie chimique, les antioxydants constituent des composés qui retardent l'autoxydation d'un produit chimique tel le caoutchouc et le plastique. Les antioxydants efficaces sont des extracteurs radicaux qui décomposent des réactions en chaînes des radicaux. Des phénols et des amines sont employés souvent comme antioxydants dans ces industries. En science alimentaire, un antioxydant est une substance contenue dans des aliments qui diminue considérablement les effets adverses des espèces réactives (espèce réactives de l'oxygène et de l'azote) sur les fonctions physiologiques normales de l'homme. Halliwell définit les antioxydants biologiques comme étant des molécules

qui à très faibles doses comparées aux molécules qu'ils sont supposés protéger, peuvent prévenir ou réduire l'extension de la destruction par oxydation (**Halliwell, B et al, 1990**).

5.1.1.3. Méthode de détermination de l'activité antioxydante :

Les essais sont classés suivant les mécanismes réactionnels. On distingue : les mécanismes de transfert de protons, d'électrons et ceux qui ne suivent aucun des deux (02) mécanismes. Les essais basés sur le mécanisme de transfert d'électron tel que : Phénols totaux par Folin Ciocalteu, DPPH seront exploités dans notre étude.

5.2. Les systèmes de protection contre le stress oxydant (*les antioxydants*)

5.2..1.Définition

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Diallo, 2005**).

5.2.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Un antioxydant est dit primaire ou vrai, quand il réagit avec des radicaux lipidiques et les transforme en produits plus stables, interrompant ainsi la chaîne de propagation oxydative. Ce type d'antioxydant constitue la catégorie principale et la plus décrite dans la littérature. Les principaux antioxydants primaires sont de nature phénolique.

Il est secondaire ou préventif, qui diminue la vitesse d'initiation par autres mécanismes, par exemple en chélatant les métaux, en piégeant l'oxygène ou en absorbant les radiations UV. Par ailleurs, il existe des substances qui peuvent agir en synergie avec les antioxydants que nous venons de définir. Ceux-ci, sont appelés antioxydants synergistes et possèdent des mécanismes d'action qui leur sont propres (**Gordon M.H, 1990**).

5.2.3 Principaux antioxydants

5.2.3.1 Les antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (*Pincemail, 2002*).

5.2.3.2./Les antioxydants exogènes

a) Antioxydants synthétiques

Cette famille de substances antioxydants est relativement limitée, puisqu'elle correspond à des corps étrangers au milieu biologique (humain comme animal), donc biochimiquement suspects. C'est la raison pour laquelle ces molécules ont fait l'objet de nombreuses publications, dont les données toxicologiques sont parfois contradictoires (*Barlow S.M, 1990*).

Les principaux antioxydants synthétiques autorisés dans l'industrie alimentaire sont :

- Le Butylhydroxytoluène ou B.H.T. (E 321)
- Le Butylhydroxyanisole ou B.H.A. (E 320)
- L'acide isoascorbique (ou erthorbique) (E 315)

b) Antioxydants naturels

La recherche d'antioxydants naturels se fait en deux étapes : la première consiste à trouver dans une plante une activité antioxydant et la seconde à identifier les composants antioxydants responsables de cette activité.

***Les caroténoïdes :** sont capables d'inactiver des radicaux libres. D'après *Burton et Ingold* (1984), le caroténoïde est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes (*Milane Hadi, 2004*).

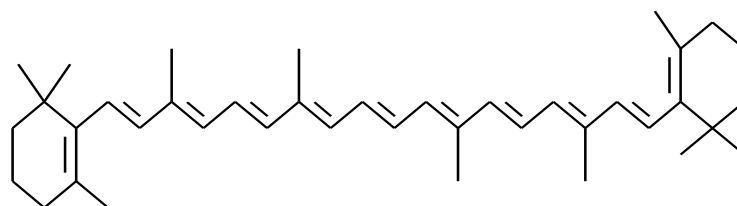


Figure 5.1 : Structure des caroténoïdes

***La vitamine E ou l' α -tocophérol :** cette vitamine réagit avec les radicaux oxygénés lipidique en empêchant leur propagation (*Liebler et al, 1986*). Également est un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux.

***La vitamine C ou l'acide L-ascorbique :** cette vitamine joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E, il peut capter à la fois les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Lii S et al, 1988).

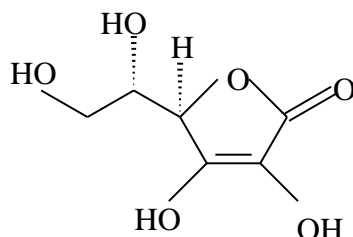


Figure 5.2 : Structure de l'acide ascorbique

***Les composés phénoliques :** forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Mohammedi Z, 2006). La principale classe représente les flavonoïdes qui peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant par capture directe des ROS.

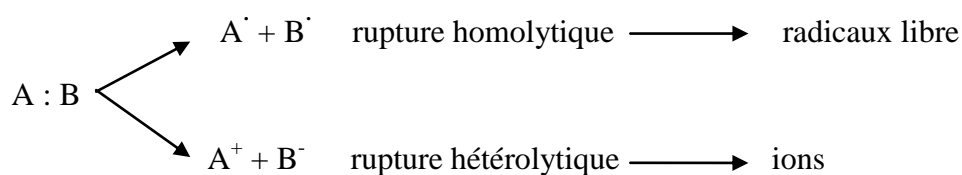
5.2.4. Les flavonoïdes comme antioxydants

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant (Peterson, 1998 ; Di Carlo, 1999 ; Cotelle N, 2001) , à titre d'exemple :par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ROS.

5.2.5. Les radicaux libres

5.2.5.1. Définition

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, des espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant : (Bonnefont-rousselot et al, 2003).



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (*Bonnefont-rousselot et al, 2003*).

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant électron ou en prenant un à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (*Kolechlin-Ramonatxo, 2006*).

5.2.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (ex : hydroperoxydes ROOH et peroxyde d'hydrogène H₂O₂) (*Wall A, 2000*). **Tableau 5.1** .

Tableau 5.1 : Quelques espèces réactives de l'oxygène

ROS (Reactive Oxygen Species)	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Radical hydroperoxyde	HOO^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^{\cdot}

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité est très variable selon la nature du radical oxydant (*Favier A, 2003*).



5.2.5.3 Mécanisme d'action des radicaux libres

On assimile trop souvent et de façon caricaturale les radicaux libres à des agresseurs à l'origine de nombreuses détériorations.

- Les radicaux libres entrent en contact avec les phospholipides membranaires.
- La membrane se fragilise et se désintègre.
- Le contenu de la cellule se répand dans le milieu extracellulaire.
- La cellule perd sa forme et sa fonction initiale.

- La cellule meurt, ce qui fragilise le tissu entier. Et lorsqu'elle ne meurt pas, les pores formés dans la membrane plasmique favorisent l'entrée de substances toxiques, responsables de son dysfonctionnement (*Laurence, 2002*).

5.3. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologique (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (*Favier A, 2003*) :

5.3.1. Protéines et acides aminés

L'oxydation des protéines aboutit à la fragmentation et formation de liaisons croisées (donne naissance à des composés carbonylés : R-CHO, R-CO-R, R-CO-CO-R)

L'oxydation des enzymes provoque la perturbation du métabolisme.

5.3.2. Lipides

Les membranes (plasmique ou intracellulaires) et les lipoprotéines contiennent des phospholipides riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) susceptibles de subir une peroxydation ce qui induit la formation de nombreux dérivés.

5.3.3. Acides nucléiques

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des être vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (*Favier A, 2003*). Les ROS produits par les mitochondries causent des dégâts sur l'ADN mitochondrial (mutations ponctuelles) c'est-à-dire des perturbations dans le fonctionnement de la mitochondrie (*Myara J, 2002*).

En effet, cette modification de l'ADN induit des mutations souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ces sont les premières étapes de la carcinogénèse (*Favier A, 2003, Cadet J. et al, 2002*).

5.3.4. Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (*Javanovic et al*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet) comme le superoxyde, le radical peroxy, le radical alkoxy et le OH^\bullet par transfert d'hydrogène.

Le radical flavonoxy (Fl-O \cdot) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (*McCord*, 1995).

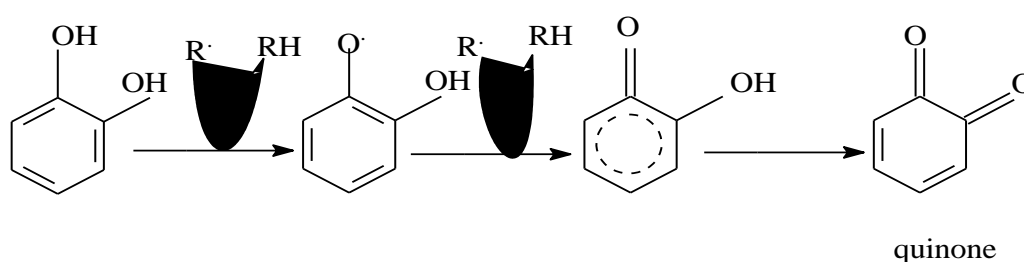


Figure 5.3 : Réaction des flavonoxy avec les EOR

5.3.5. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{+2}) et du cuivre (Cu^{n+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle.

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (*Morris*, 1995 ; *Brown*, 1998).

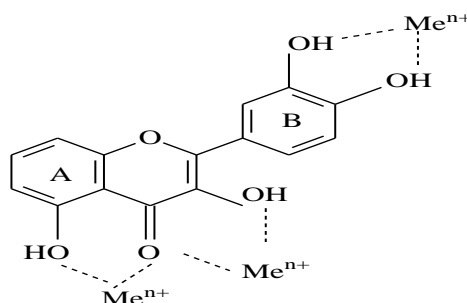


Figure 5.4: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques

5.3.6. Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables à l'inhibition de très nombreuses enzymes ; parmi les quelles les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant (gluthathione S-transférase, les lipoxgénases, la xanthine oxydase, et les nitrique oxydesynthases) et les enzymes digestives (comme la trypsine, l' α -amylase et la lipase) (*Sebastien Fiorucci, 2006*).

5.3.7. Evaluation de l'activité antioxydant

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plus part de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Alors, la mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels. Le premier mode, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. Par contre, le second relie la quantité des radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

5.3.8. Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres

La capacité du produit à piéger les radicaux libres est donc à ralentir ou inhiber, aussi bien les phases d'initiation que de propagation. Parmi les méthodes d'évaluation du pouvoir anti radicalaire, sont qui emploient azo-composant pour produire des radicaux stables sans l'intervention d'un produit de dégradation. En effet, elles mesurent directement la réactivité d'un composé donneur de H \cdot comparativement à celle d'un antioxydant de référence, D'autres méthodes sont également utilisées, comme la méthode utilisant le radical stable DPPH \cdot (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle. De plus, il y a d'autres techniques spectroscopiques qui utilisent les dérivées oxygénées pour évaluer le statut antioxydant des extraits ou des composés purs comme le balayage des radicaux nitoxydes, hydroxyles, pyroxyles et su peroxydes.

5.4. Analyse des tocophérols

5.4.1. Introduction :

Les tocophérols sont généralement des constituants mineurs des corps gras végétaux. Ils existent principalement sous forme monomère (**Dreyer,David et al,(1967)**). Ces composés sont classés dans le groupe des vitamines liposolubles (vitamine E de fertilité). Bien que leurs structures peu différentes, et leurs effets sont très variables.

En effet, la forme α -tocophérol présente l'activité vitaminique la plus importante, tandis que l'isomère γ -tocophérol est plus efficace comme antioxydant. L' isomère γ économise l'oxygène de la respiration cellulaire, protège les substances oxydables. De plus, il intervient dans le métabolisme des graisses en empêchant la dégradation des acides gras (**Dreyer,David et al,1967 ; Meier.W et al, 1962**).

La recherche médicale a démontré les effets bénéfiques de la vitamine E, entre autre dans le retard de l'évolution de l'infection par le virus HIV en SIDA clinique et dans la réduction des symptômes qui y sont associés. Des études cliniques sont requises pour illustrer les effets bénéfiques potentiels de ces nutriments dans la prolongation de la période asymptomatique de l'infection par le virus en HIV en combinaison avec un traitement par un médicament antiviral chez les patients souffrants du SIDA (**Star.A.E et al, 1971**).

5.4.2. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographe sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (**Li Piewu et al, 1999**).

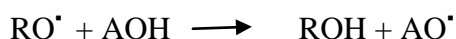
En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée avec l'oxydation dans les nourritures et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde (O_2^{\cdot}), le balayage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le balayage d'acide hypochloreux (HOCl) (**Sanchez. Morenos et al, 2002**), le balayage du radical d'hydroxyle

(OH \cdot), ou le balayage du radical de peroxyde (ROO \cdot). Parmi ces méthodes, nous citons ceux qui emploient l'azo-composant pour produire des radicaux de peroxydes, tels que la méthode de PIEGE (paramètre total d'antioxydant de radical piégeage) (**Brasseur.L et al, 1995**), la méthode ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao G.H al, 1993**), la méthode d'ABTS (le balayage du radical cation 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (**Duthie G.G et al, 1991**), le balayage du radical stable 1,1-Diphényl-2-Picryl – Hydrazyl (la méthode DPPH) (**Molyneux P, (2004)**), la méthode de DMPD (le balayage du radicale cation N, N' –p-di-méthylque-phénylénédiamine) (**Li C et al, 1994**), ou la méthode photochemiluminescence (PLC) (**Magin D.V et al, 2002**).

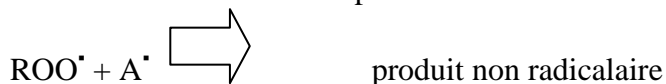
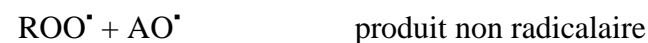
Actuellement, une des méthodes analytiques les plus communes pour déterminer l'oxydation des lipides est l'analyse de TBA (**Jay, Maurice et al, 1975**). qui mesure un complexe thiobarbiturique-malonaldéhyde (TBA-MA) avec un maximum d'absorbance à 593 nm. La méthode TBA a certaines limitations dans des systèmes de nourriture. Le TBA réagit non spécifiquement avec des composés tels que les sucres, l'acide ascorbique, et les produits non enzymatiques de brunissement souvent présents en nourritures.

5.4.3. Les tocophérols :

Les tocophérols permettent de piéger les radicaux libres



Réactions minoritaires :



Les tocophérols sont présents dans les huiles végétales en quantité non négligeable, sous leurs différentes formes isomériques α , β , γ , δ les formes α et γ étant les plus fréquentes (α - tocophérols 26-27 mg / 100 g d'huile de colza (**Dolde D. et al., 1999**)). Les tocophérols sont des dérivés du 8-méthylchroman-6-ol, possédant une chaîne latérale de 3 unités terpènes saturées. Lorsque ces chaînes sont insaturées, il s'agit de tocotriénols.

Les tocophérols et certains dérivés possèdent des propriétés antioxydantes, c'est à dire la capacité à céder des atomes d'hydrogène à des radicaux libres afin de les stabiliser. A forte concentration (> à 4%) les tocophérols deviennent oxydants. En revanche, à des concentrations plus basses, ils contribuent à augmenter la stabilité vis-à-vis de l'oxydation, particulièrement pour des huiles à haute teneur en acide oléique.

Les tocophérols sont des antioxydants classés comme antioxydants de rupture de chaîne, c'est à-dire qu'ils agissent au niveau de l'étape de propagation et de terminaison. Le fait de supplémenter, par exemple l'huile de tournesol riche en α -tocophérol n'a pas d'intérêt pour la stabilité oxydative, car sa concentration est déjà proche de l'optimum. L' α -tocophérol est le plus vite oxydé et le δ -tocophérol le plus lentement. Outre l'inhibition de l'auto-oxydation des acides gras poly-insaturés, les tocophérols permettent d'orienter les produits de l'autooxydation (**Léger C. L., 1992**).

Les tocophérols et tocotriénols peuvent être classés parmi les antioxydants primaires (**Machlin L. J., 1980**). Ces molécules sont constituées d'un noyau chromane plus ou moins méthylé et d'une chaîne polyisoprénique plus ou moins saturée (figure 5.2). Les tocophérols ont une double action bénéfique, comme vitamine (Vitamine E) et comme antioxygène (**Burton G. W. et al. 1986**). On a dénombré quatre formes de tocophérols, α , β , γ , δ qui diffèrent seulement par le nombre et la position de groupes méthyles sur le noyau aromatique. Cette différence structurale conduit toutefois à des pouvoirs antioxydants différents. Le δ -tocophérol a souvent été trouvé comme le plus efficace : ($\delta > \gamma > \beta > \alpha$), mais leur activité relative dépend de la température et de la nature du substrat (**Wendy B. W. et al., 1996**). Un ordre différent a parfois été obtenu $\alpha > \beta = \gamma \gg \delta$ (**Porter N. A., 1986**).

Les tocophérols sont solubles dans les lipides, ils sont présents dans les huiles végétales qu'ils protègent du rancissement. Les sources naturelles de tocophérols sont donc les huiles alimentaires, le germe de blé, le soja. Le Tableau 5.3 montre la teneur des tocophérols dans d'autres huiles de table.

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possèdent un noyau chromane portant une chaîne latérale tri iso propénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols (**Ramakanth.S et al, 2006 ; Jiyeon Chun et al, 2006**). La substitution du noyau aromatique par des groupes méthyles conduit aux huit combinaisons naturelles données dans la figure 5.5.

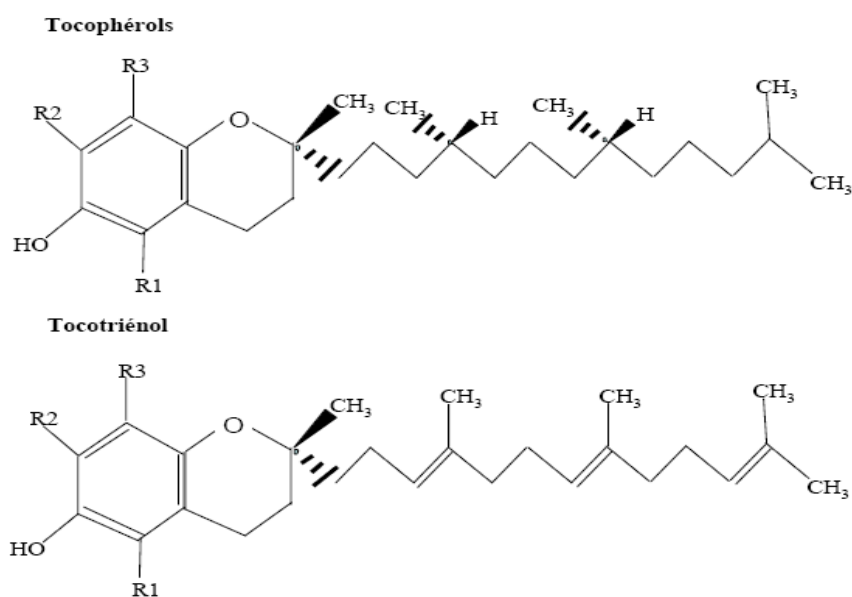


Figure 5.5 : Structure moléculaire des tocophérols et tocotriénols (Wendy B. W. *et al.*, 1996)

Tableau 5.2 : Les quatre formes des tocophérols selon la position des groupements méthyle sur le noyau 6-OH chromane

	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Tableau 5.3 : Teneurs en Tocophérol de quelques huiles végétales (mg / kg) (Harwood, J.L et al 2000).

Huiles	α -Tocophérol	β -Tocophérol	γ -Tocophérol	δ -Tocophérol	Total
Colza	100-400	0-150	180-780	–	400-2700
Noix de coco	0-8	0-11	0-15	0-44	0-50
Coton	130-690	0-37	140-740	0-30	380-1500
Mais	20-600	0-370	60-2500	0-250	300-3810
Palme	2-190	0-240	0-500	2-350	90-1500
Soja	10-360	0-50	90-2400	–	560-3400
Tournesol	400-1000	0-60	0-60	–	400-1600
Olive	63-227	0-2	5-15	–	68-244

5.4.4. Dosage quantitatif des tocophérols individuels

Le dosage des tocophérols individuels peut être réalisé par deux techniques d'analyse : soit par CPG (Star.A.E et al, 1971 ; Li Piewu et al, 1999), soit par HPLC (Reichling, J et al, 1979 ; Mues, Ruediger et al, 1979). Dans notre analyse, nous avons choisi cette dernière technique car elle donne de meilleurs résultats. Nous avons utilisé une colonne apolaire à phase inverse Rp 18 et un mélange méthanol /acétonitrile (70 :30 V/V) comme éluant de débit 1ml/mn. La détection est faite par fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et celle de l'émission de 330 nm. L'identification des différents tocophérols présents dans nos huiles est faite par la co-injection des tocophérols étalons (standards) d'isomères α, β, γ et δ . Un étalonnage externe nous a permis de calculer la quantité de chaque tocophérol individuel contenu dans nos échantillons.

A partir des chromatogrammes de nos huiles figure 5.6 et ceux des tocophérols individuels étalons figure 5.7, nous a permis d'aboutir aux résultats qui sont portés dans le tableau 5.4.

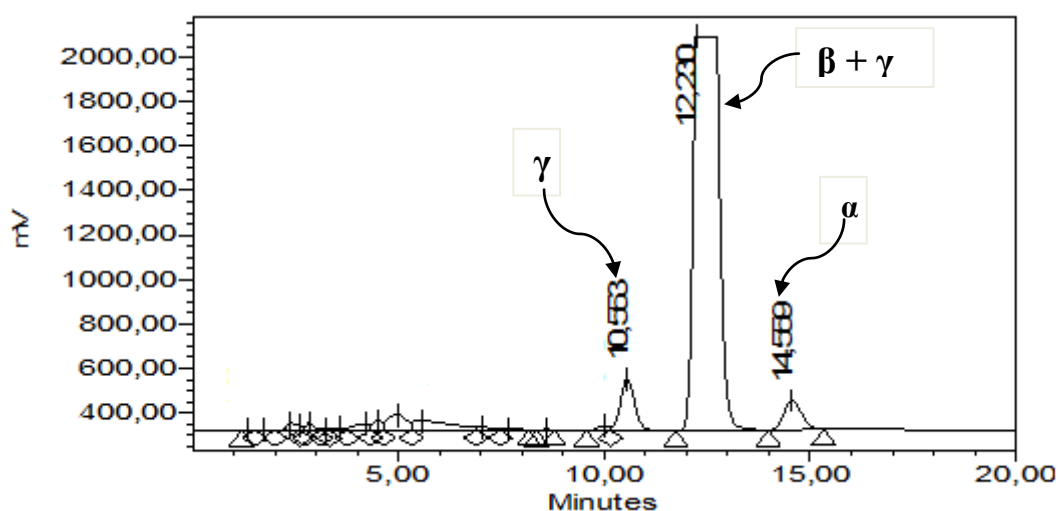


Figure 5.6: Chromatogrammes HPLC des tocophérols de l'huile étudiée

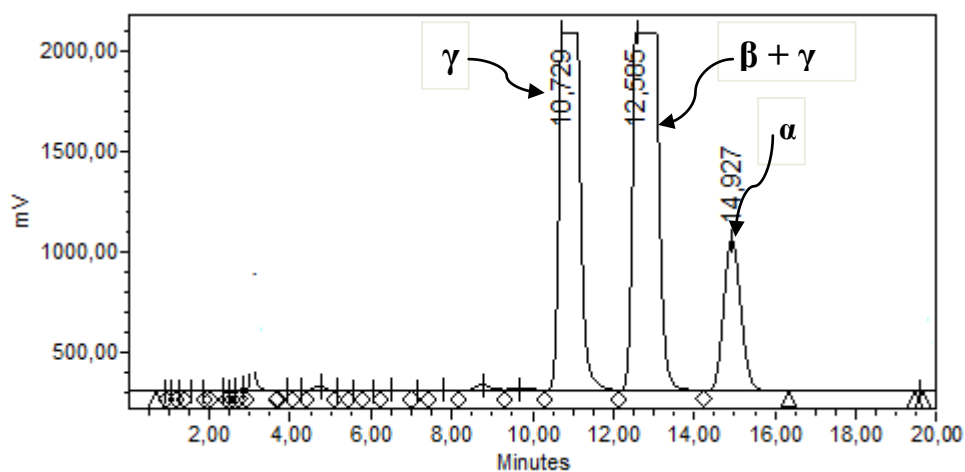


Figure 5.7: Chromatogrammes HPLC des tocophérols individuels standards

Tableau 5.4 : Teneurs en Tocophérol des huiles étudiées (mg / kg).

Huiles	α -Tocophérols	($\beta + \gamma$)-Tocophérols	δ -Tocophérols	Total
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	135	16	1,4	152,4
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	355	157	73	585
<i>Quercus.ilex</i>	25,7	315	17,9	358,6
<i>Quercus.suber</i>	122	448	0,0778	570

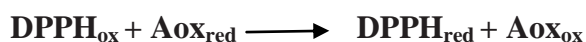
Les résultats d'analyse des tocophérols des huiles étudiées font apparaître une très forte prédominance de l'isomère α -Tocophérol dans l'huile du fruit noir de *Pistacia lentiscus* avec une teneur de 135 mg/kg. Pour les deux huiles des fruits de *Quercus*, on remarque que les deux isomères ($\beta + \gamma$)-Tocophérol sont les plus dominants. L'isomère δ -Tocophérol ne représente que des petites quantités 1,4 et 17,9 mg/Kg dans les huiles des fruits noirs de Pistachier lentisque et le *Quercus ilex* respectivement, alors qu'il existe sous forme d'une très faible quantité dans l'huile des fruits de *Quercus suber*. Les teneurs en tocophérols totaux déterminés par CLHP de nos huiles sont respectivement 152,4, 358,6 et 570 mg/kg dans les huiles de *Pistacia lentiscus* et *Quercus.ilex* et *Quercus.suber*.

Si on compare la quantité en tocophérols totaux de nos huiles à d'autres huiles végétales alimentaires, on peut classer les huiles des fruits de *Quercus* parmi les huiles végétales riches en tocophérols. Comme on a déjà vu dans le chapitre II que la teneur en huile dans les fruits du *Quercus* est faible (de l'ordre 9%) et comme l'analyse des tocophérols de ces huiles montre que ces dernières sont riches en tocophérols, donc on peut utiliser ces huiles à des fins thérapeutiques ou cosmétiques et comme des antioxydants

La richesse de nos huiles en composés tocophéroliques et l'utilisation des huiles étudiées en médecine traditionnelle, nous on incité d'évaluer le pouvoir antiradicalaire de ces huiles. Pour cela nous avons testé le pouvoir antiradicalaire de nos huiles vis-à-vis du radical en utilisant le radical DPPH.

5.4.5. Le test au DPPH.

Le DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil) est un radical de couleur violet intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radiaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH.



De nombreuses méthodes sont développées permettant d'évaluer les capacités antioxydantes de composés naturels ou bien issus de la synthèse chimique. L'une d'entre elle, couramment utilisée, fait appel à l'utilisation d'un radical libre stable, le (1,1-Diphényl-2-Picryl Hydrazyl) (DPPH).

La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux (figure 5.8). D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de

la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à une longueur d'onde de 517 nm.

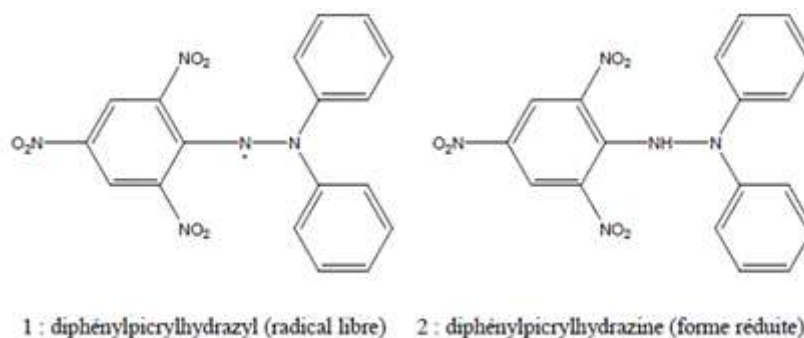


Figure 5.8 : Structure chimique du radical libre 1,1-Diphényl-2-Picryl -Hydrazyl et de sa forme réduite (Molyneux.P, 2004).

5.4.5.1. Principe du test.

Le principe est l'addition du radical libre stable DPPH[•] ou 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle à une solution éthanolique contenant un composé antioxydant et qui peut céder un atome hydrogène et entraîne un changement de la coloration violette, l'apparition de la forme réduite de DPPH nous donne une couleur jaune (Dong-Sun Lee et al, 2001).

5.4.5.2. Préparation de la solution DPPH.

Le DPPH[•] ou 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (C₁₈H₁₂N₅O₆; Mw : 394,33g/mole) est solubilisé dans l'éthanol absolu pour en avoir une solution de concentration de 125 µM.

5.4.5.3. Préparation des extrais lipidiques

Les extrais lipidiques ont été préparés par dissolution des quantités bien connues d'huiles dans l'éthanol à raison de 20 mg/ml. Ces solutions dites solutions mères subiront ensuite des dilutions de la solution mère pour en avoir des solutions filles de différentes concentrations.

5.4.5.4. Essai au DPPH

Dans des tubes à essai, on introduit 1ml des extrais lipidiques des solutions filles, on ajoute 1ml de la solution DPPH. Les tubes sont placés à l'obscurité à la température ambiante pendant

30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm par un spectrophotomètre contre un blanc.

Les figures suivantes représentent la variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait lipidique figure : 5.9, 5.10 et 5.11 de même pour les figures : 5.12 et 5.13 qui représentent les courbes des antioxydants standards comme le BHT et la vitamine E. Ces figures montrent une diminution progressive de l'absorbance jusqu'à une concentration élevée où la réduction du DPPH devient plus ou moins stable ou varie très peu en s'éloignant de cette concentration.

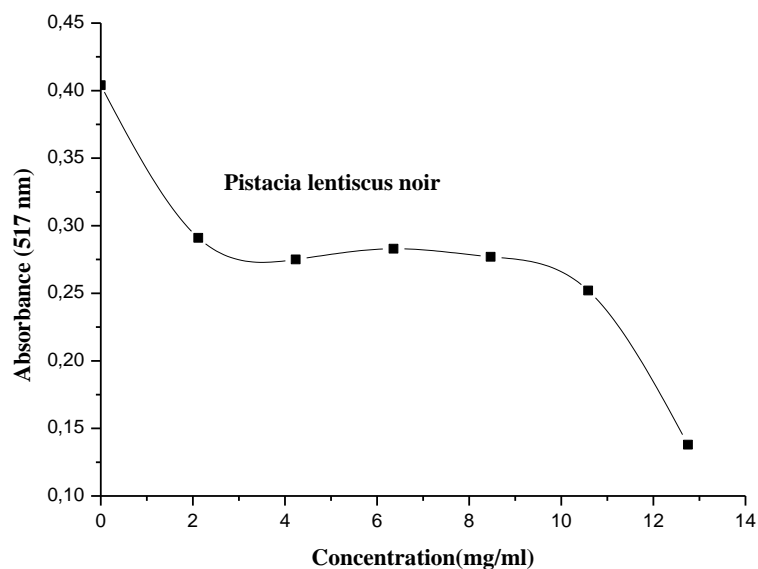


Figure 5.9 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit de *Pistacia lentiscus* noir.

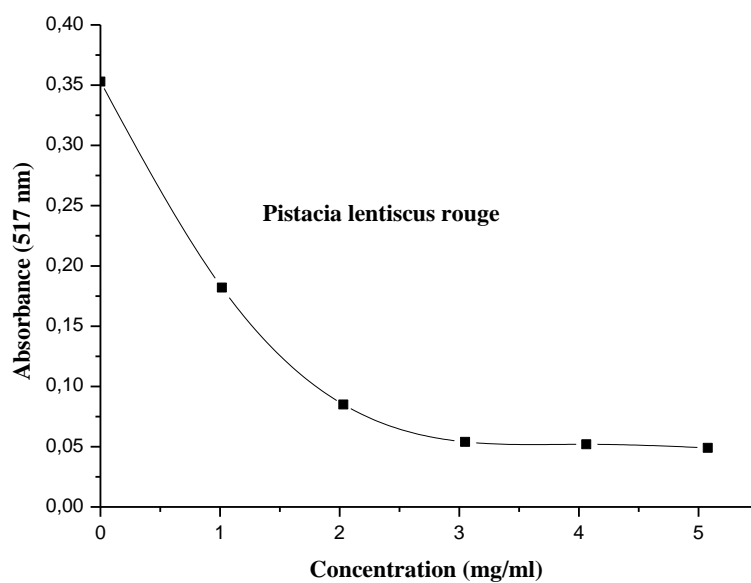


Figure 5.10 : variation de l'absorbance en fonction de concentration du fruit de *Pistacia lentiscus* rouge.

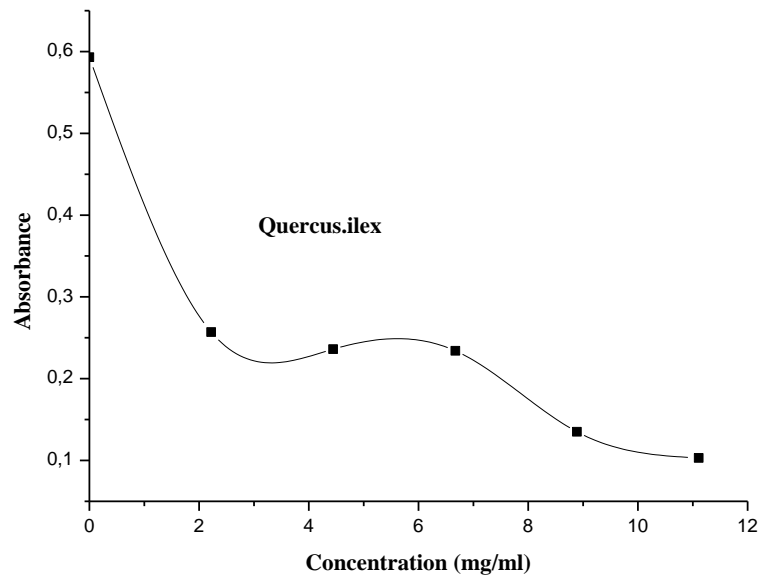


Figure 5.11 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit du *Quercus.ilex*.

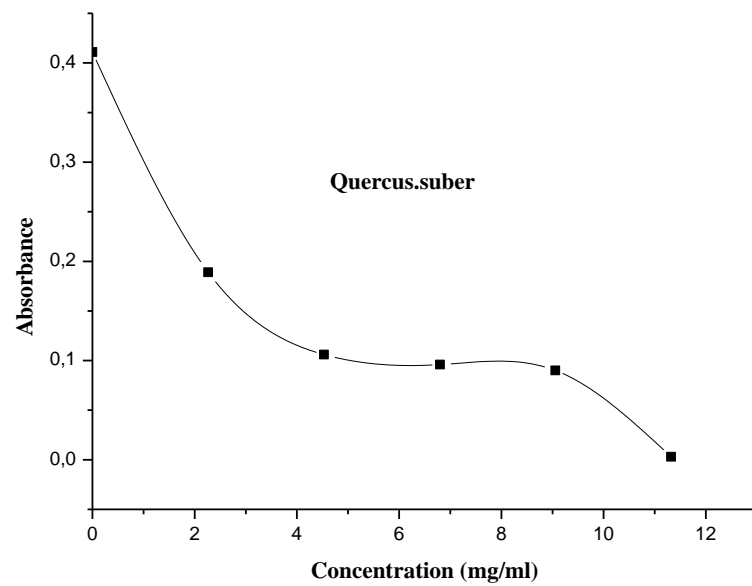


Figure 5.12: variation de l'absorbance en fonction de la concentration du fruit du *Quercus.suber*.

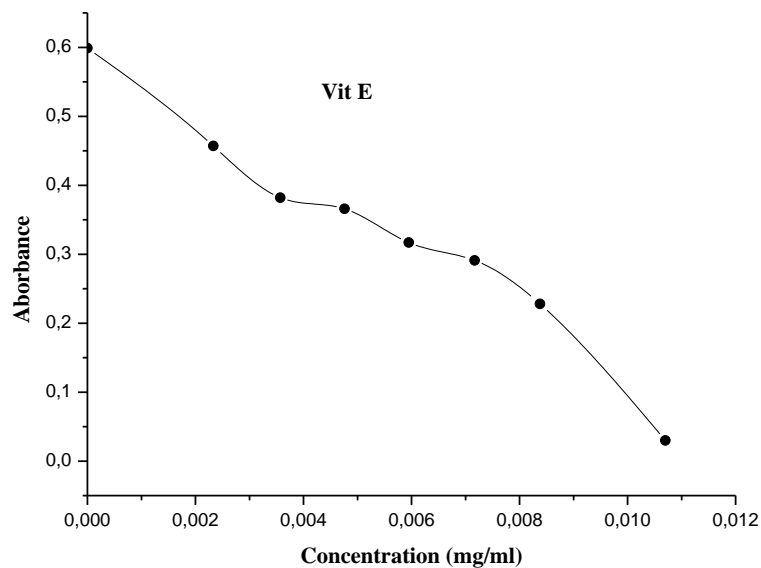


Figure 5.13.: variation de l'absorbance en fonction de la concentration du Vitamine E

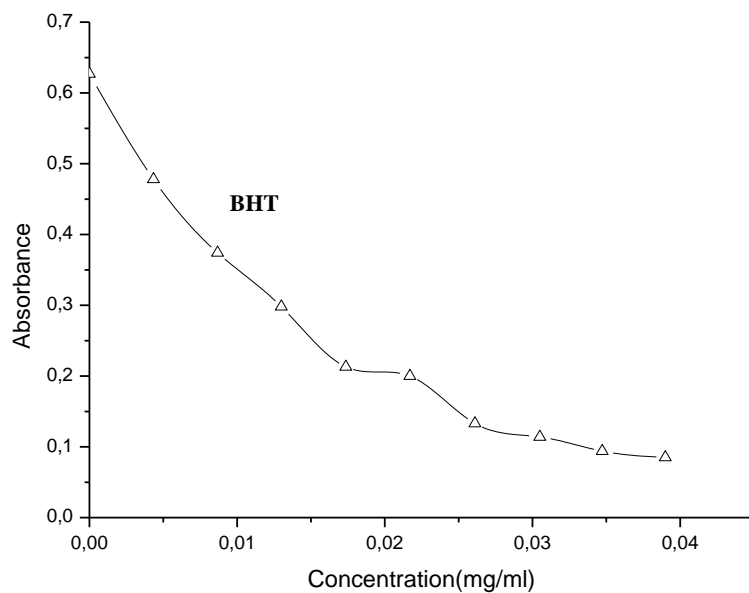


Figure 5.14 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration de BHT

Le pouvoir antiradicalire des extraits lipidiques ou composés antioxydants purs est exprimé par le paramètre EC_{50} , qui est défini comme la concentration nécessaire de l'antioxydant pour inhiber la moitié de la quantité des radicaux libres.

La valeur du paramètre EC_{50} pour chaque extrait lipidique a été calculée à partir des

courbes qui représentent la variation de en fonction de la concentration l'absorbance de nos extraits dans un solvant éthanolique en (mg/ml), donc on détermine la valeur de l'absorbance à un taux d'inhibition de 50% puis par projection de ce point sur l'axe des abscisses on lu la valeur de EC₅₀. Egalement nous avons testé la vitamine E et BHT (des antioxydants commerciaux pris comme antioxydants).

Un autre paramètre exprime la puissance antiradicalaire noté " ARP" a été calculé à partir du premier paramètre égale à $1/EC_{50}$ plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro plus la puissance antioxydant augmente.

Les valeurs de EC₅₀ et la puissance anti-radicalaire de nos huiles sont regroupées dans le tableau5.5.

Tableau 5.5 : EC₅₀ et puissance anti-radicalaire ou anti-oxydante (ARP) des extraits lipidiques et les standards

	EC ₅₀ (mg/ml)	ARP (ml/mg)
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	11,68	0,085
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	1,077	0,93
<i>Quercus.ilex</i>	1,82	0,55
<i>Quercus.suber</i>	2,003	0,5
Vit E	0,0067	149,25
BHT	0.0123	81,3

P.N : *Pistacia lentiscus noir*, PR : *Pistacia lentiscus rouge*, QA : *Quercus.ilex*,
QM : *Quercus.suber*,

On rappelle que l'activité antiradicalaire des extraits est exprimée en EC₅₀, ce paramètre a été introduit par Brand Williams et ces collaborateurs et il a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leur résultats, il défini la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

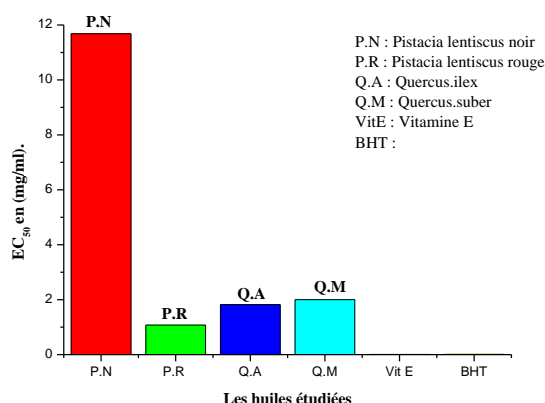


Figure 5.15 : EC₅₀ des extrais lipidiques et les standards

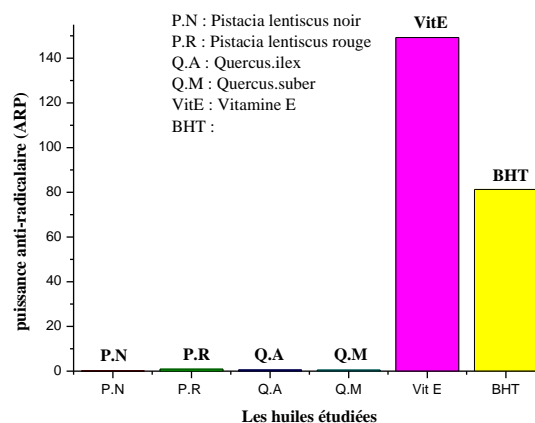


Figure 5.16 : ARP des extrais lipidiques et les standards

Selon les résultats obtenus, nous pouvons classer la puissance anti-radicalaire de nos extraits lipidiques et composés antioxydants de référence suivant l'ordre décroissant:

Vit E > BHT > *Pistacia lentiscus rouge* > *Quercus.ilex* > *Quercus.suber* > *Pistacia lentiscus noir*.

Les figures 5.16 ; 5.17, 5.18 et 5.19 représentent les valeurs de l'indice EC₅₀ des tocophérols totaux des extraits, on remarque que les isomères α et δ montrent une mauvaise corrélation avec EC₅₀ par contre la somme des isomères (β+γ) présentent une meilleure

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50% aussi bien que la puissance anti-radicalaire ARP égal à 1/ EC₅₀ (Leitão et al, 2002). Les résultats sont exprimés en activité antioxydante.

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol.

L'activité anti-oxydante A.Aox est calculée à partir de la relation suivante :

$$A. Aox = \frac{1}{EC_{50}} \cdot T = ARP \cdot T$$

A.Aox : Activité anti-oxydante ; T : teneur en tocophérols des extraits.

Tableau 5.6 : Activité anti-oxydante de l'isomère α -Tocophérols.

	EC ₅₀ (mg/ml)	ARP (ml/mg)	A.Aox
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	11,68	0,085	11,475
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	1,077	0,93	330,15
<i>Quercus.ilex</i>	1,82	0,55	14,135
<i>Quercus.suber</i>	2,003	0,5	61

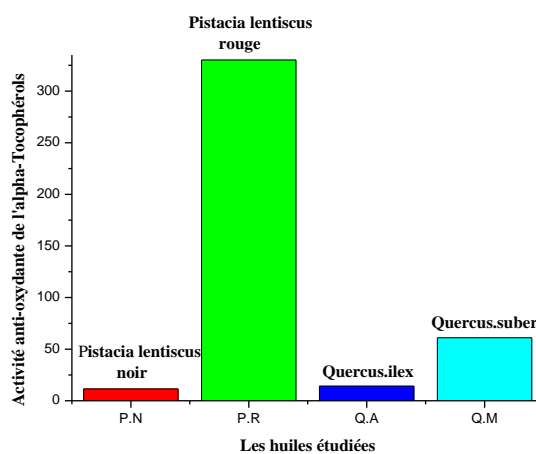


Figure 5.17 : Activité anti-oxydante de l'isomère α -Tocophérols des huiles

Tableau 5.7 : Activité anti-oxydante des isomères ($\beta + \gamma$)-Tocophérols.

	EC ₅₀ (mg/ml)	ARP (ml/mg)	A.Aox
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	11,68	0,085	1,36
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	1,077	0,93	146,01
<i>Quercus.ilex</i>	1,82	0,55	173,25
<i>Quercus.suber</i>	2,003	0,5	224

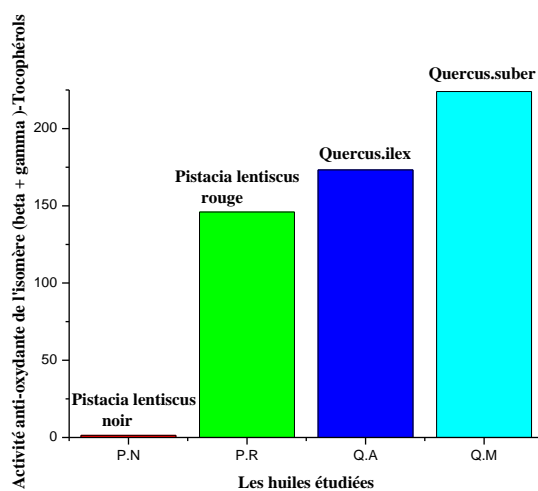


Figure 5.18 : Activité anti-oxydante des isomères ($\beta + \gamma$)-Tocophérols des huiles

Tableau 5.8 : Activité anti-oxydante de l'isomères δ -Tocophérols des huiles étudiées.

	EC ₅₀ (mg/ml)	ARP (ml/mg)	A.Aox
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	11,68	0,085	0,119
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	1,077	0,93	67,89
<i>Quercus.ilex</i>	1,82	0,55	9,845
<i>Quercus.suber</i>	2,003	0,5	0,0389

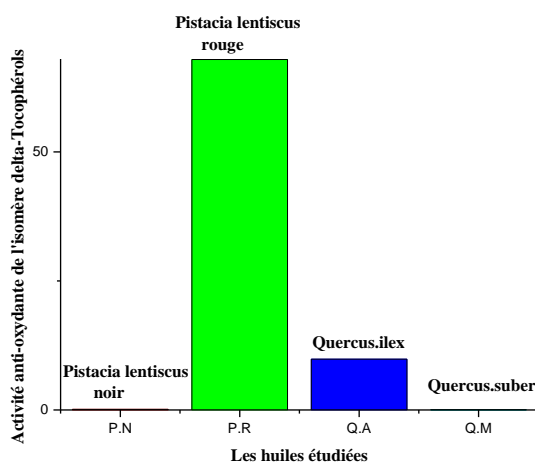


Figure 5.19 : Activité anti-oxydante de l'isomères δ -Tocophérols des huiles étudiées.

L'activité anti-oxydante de nos extraits est exprimée en EC₅₀ (tableau 5.8). Ce paramètre est déterminé graphiquement dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité anti-oxydante en pourcentage. La valeur de chaque EC₅₀ exprime la concentration de l'extrait lipidique exigée pour réduire le DPPH en solution de 50%.

5.4.6. Quantification des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une notion sur la teneur en composés phénoliques totaux dans les huiles. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adoptée de Singleton et Ross (1965) (Giner.Chafez.B.I, 1996) avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

5.4.6.1. Dosage des phénols totaux

Tout le contenu phénolique de chaque extrait a été déterminé par la méthode citée précédemment en utilisant l'acide gallique comme phénol standard. Cette méthode mesure le potentiel d'oxydo-réduction des composés phénoliques où la réaction est basée sur la réduction d'acide phosphotungstomolybdique incolore qui est réduit par l'oxydation des phénols en oxyde bleu de tungstène et molybdène, ce qui entraîne une couleur bleu détectable par le spectrophotomètre en UV-Visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

5.4.6.1.1. Courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage était obtenue par des solutions d'acide gallique de concentration massique différentes. On introduit dans un tube à essai, 100µl de chaque solution de l'acide gallique suivi de l'addition de 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée) et 2ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) puis ces solutions sont incubées immédiatement à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante pour que la réaction accomplisse. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc par un spectrophotomètre de type Shimadzu 160. Les valeurs de la densité optique des solutions ainsi préparées en fonction de la concentration de chaque solution de l'acide gallique, nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

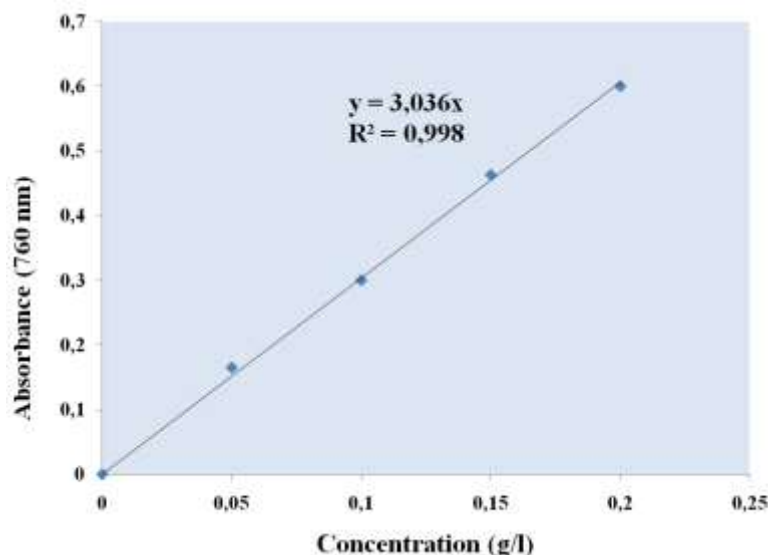


Figure 5.20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le dosage quantitatif des phénols totaux des extraits lipidiques a été réalisé en adoptant la même façon utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Les teneurs en composés phénoliques totaux de chaque huile de fruits ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage. La quantité en phénols totaux a été exprimée en (mg/g) et en équivalent de l'acide gallique. Les résultats obtenus pour ce test sont représentés dans le tableau 5.9.

Tableau 5.9 : Quantité en phénols totaux dans les huiles

Huiles	Quantité en phénols totaux (mg/Kg)
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	3000
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	7400
<i>Quercus.ilex</i>	2000
<i>Quercus.suber</i>	1700

5.4.6.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la quantité des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adoptée de Lamaison et Carnat (1991) (Quetier.Delen.C et al, 2000), dans ce test les flavonoïdes sont été quantifiés par un dosage direct à l'aide d'une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Cette solution forme un complexe très stable avec les groupement hydroxydes (OH) des phénols. Ce complexe de couleur jaune absorbe dans le visible à une longueur d'onde 430 nm. Dans cette méthode la rutine a été utilisée comme flavonoïde standard.

5.4.6.2.1. Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de concentration 0,2 g/l de la rutine dans l'éthanol, nous avons préparé des solutions filles de différentes concentration. A une quantité de 1ml de chaque solution de rutine ainsi préparée on ajoute 1ml de la solution aqueuse de chlorure d'aluminium de 5%, après incubation à l'obscurité et à la température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance du mélange a été mesurée à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc en utilisant toujours le même spectrophotomètre UV-Visible. On trace la courbe d'étalonnage de la rutine qui représente la variation de l'absorbance du mélange des solutions déjà préparées en fonction des concentrations des solutions filles. La quantité des flavonoïdes dans les huiles étudiées a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine est exprimée en mg/g et en équivalent de la rutine.

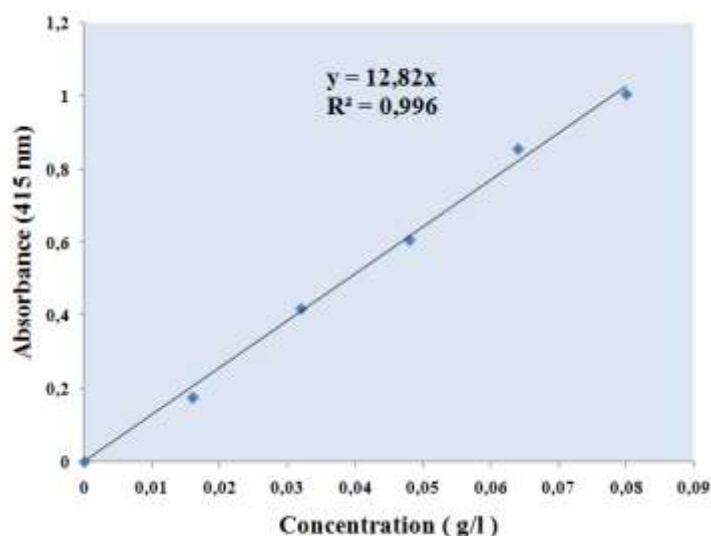


Figure5.21 : Courbe d'étalonnage de rutine

Les valeurs des teneurs en flavonoïdes dans les différents extraits étudiés sont regroupées dans le tableau 5.10.

Tableau 5.10 : Quantité des flavonoïdes dans les huiles étudiées.

Huiles	Quantité en flavonoïdes (mg/Kg)	% en flavonoïdes
<i>Pistacia lentiscus noir</i>	2800	93,33
<i>Pistacia lentiscus rouge</i>	3000	40,54
<i>Quercus.ilex</i>	443	22,15
<i>Quercus.suber</i>	1100	64,70

D'après les résultats obtenus dans les tableaux 5.9 et 5.10 nous constatons que les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes sont très peu variables d'un extrait à un autre. Pour les teneurs en polyphénols totaux, les valeurs varient de 1700 mg /Kg dans l'huile des fruits du *Quercus suber* à 7400 mg/Kg dans l'huile des fruits *Pistacia lentiscus* rouge. Concernant les teneurs en flavonoïdes, on remarque que les valeurs sont comprises entre 443 mg/Kg dans l'extrait des fruits du *Quercus.ilex* et 3000 mg/Kg dans l'extrait des fruits *Pistacia lentiscus* rouge.

Dans l'extrait des fruits *Pistacia lentiscus noir*, nous observons que la teneur en flavonoïdes est très proche à celle des phénols totaux, ce qui indique que presque tous les phénols existants dans l'extrait d'huile possèdent des structures flavonoïques, mais dans les fruits du *quercus suber* la quantité des flavonoïdes dépasse 50 %. Par contre dans les extraits des fruits de *Pistacia lentiscus* rouge et *Quercus.ilex*, on remarque que la majorité des phénols présents ne sont pas des flavonoïdes. Ces résultats montrent bien la pauvreté des extraits des fruits de Pistachier lentisque rouge et du quercus ilex en flavonoïdes par rapport à l'huile extraites des fruits noirs de Pistachier lentisque.

Il faut noter que les quantités des tocophérols totaux dans les huiles étudiées et qui sont déterminées par CLHP sont toujours inférieures à celles calculées par spectrophotométrie visible (méthode de Singleton et Ross). On remarque que les pourcentages des tocophérols totaux dans les huiles varient de 5.08% dans l'huile des fruits noirs de Pistachier lentisque à 33.53% dans l'huile de Quercus Suber. Ces résultats montrent que les huiles étudiées ne renferment pas seulement les tocophérols, mais elles contiennent aussi d'autres composés phénoliques de structures différentes que celles des tocophérols comme les acides phénoliques (hydroxybénzoïques et hydroxycinnamiques) et des composés de structures flavonoïdiques qui sont déjà confirmés qualitativement et quantitativement par le test de Lamaison et Carnat. Ce

résultat est très intéressant car on vient de découvrir des huiles contenant des composés phénoliques autres que les tocophérols, propriété actuellement caractéristique que pour l'huile d'olive. Comme les composés phénoliques sont doués par des propriétés biologiques certaines, donc nos huiles étudiées peuvent-être utilisées à des applications thérapeutiques.

Tableau 5.11: Activité anti-oxydante. des tocophérols, phénols totaux et les flavonoïdes des huiles étudiées.

	A.Aox des tocophérols totaux	A.Aox des phénols totaux	A.Aox des flavonoïdes
<i>Pistacia.L. noir</i>	12,954	255	238
<i>Pistacia.L. rouge</i>	544,05	6882	2790
<i>Quercus.illex</i>	197,23	1100	243
<i>Quercus.suber</i>	285	850	550

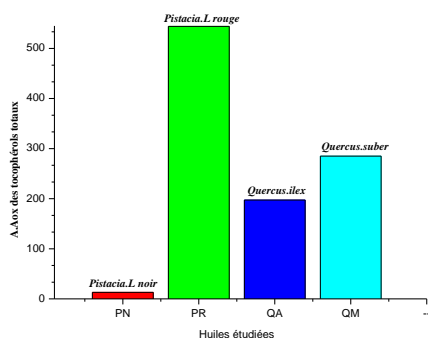


Figure 5.22: Activité anti-oxydante des tocophérols totaux

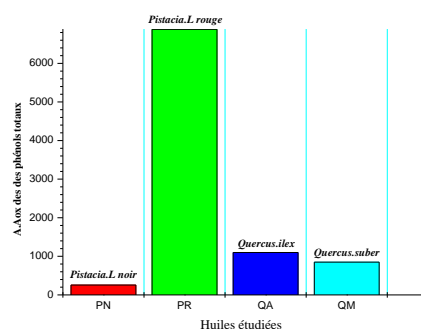


Figure 5.23.: Activité anti-oxydante des phénols totaux

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Ce travail est une contribution à l'étude de la composition chimique des constituants des huiles extraites des fruits de *pistacia lentiscus* noir et rouge et du *quercus ilex* et *suber*, nous avons établi les principales caractéristiques chimiques des huiles des fruits de deux arbres de différentes espèces : « le *pistacia lentiscus* et le *quercus* » et approfondi la connaissance de quelques constituants chimiques de leurs fruits . Pour cela nous avons étudié la composition en acides gras, la fraction saponifiable (glycéridique) et la fraction insaponifiable des huiles extraites des fruits

Nous avons déterminé les principales caractéristiques physico-chimiques des huiles extraites des fruits de *pistacia lentiscus* et du *quercus*. Les valeurs de ces indices sont proches de celles des huiles végétales alimentaires.

La fraction saponifiable de des huiles étudiées renferme les acides gras ordinaires rencontrés dans le pouvoir végétal. Les huiles sont riches en acides gras insaturés. Les teneurs représentés par les acides oléique C18:1 et linoléique C18:2, sont 79,47 % dans les fruits noirs de *pistacia lentiscus*, 81,29 % dans les fruits rouge de *pistacia lentiscus*, 82,26% dans les fruits du *quercus suber* et 83,72 % dans les fruits du *quercus ilex* . Ces teneurs en acide insaturés montrent l'importance de ces huiles de point de vue alimentaire.

La présence de l'acide linoléique et en faible quantité : 01,38 % pour les fruits rouges de *pistacia lentiscus* et les fruits du *quercus suber* et 1,68 % pour les fruits noirs de *pistacia lentiscus* et les fruits du *quercus ilex*. Ces huiles contiennent aussi des quantités importantes d'acides gras saturés qui varient de 17,99 % dans les fruits rouges à 20,53 % dans les fruits noirs de *pistacia lentiscus* et varient de 14,86 % dans les fruits du *quercus* à 17,74 % dans les fruits du *quercus suber*.

L'hydrolyse enzymatique des triacylglycérols, par lipase pancréatique de porc, nous montre que l'acide oléique contribue avec 47,40 % dans la composition des triglycéride des fruits rouge et à une teneur de 61,55 % dans les fruits noir de *Pistacia lentiscus* et de 68,31 % dans les fruits du *quercus ilex* et de 71,67 % dans les fruits du *quercus suber*, par contre la contribution de l'acide linoléique contribue dans l'estérification de la position Sn-2 avec

29,84 dans les huiles des fruits noir et 36,46 % dans les huiles des fruits rouge de *Pistacia lentiscus*. Pour les huiles du *quercus* l'acides lionoléique occupe la position -2 des

triglycérides avec une proportion de 21,58 % dans les huiles des fruits du *quercus suber* et 27,11% dans les huiles des fruits du *quercus ilex*.

L'utilisation de la méthode d'hydrolyse enzymatique par la lipase pancréatique du porc et les méthodes chromatographiques nous ont permis d'établir les structures des triacylglycérols des huiles de *pistacia lentiscus* et du *quercus*. Les triglycérides qui sont retrouvés dans les lipides des fruits noir et rouge de *pistacia lentiscus* et les *quercus ilex* et *suber* résultent de la combinaison des acides gras palmitique, oléique et linoléique LLO, PLO, OOO, POO et LOO.

Les résultats d'analyse des tocophérols des huiles des fruits montrent que les teneurs varient de 152,4 à 585 mg / kg pour *pistacia* et de 358,6 à 570 mg / kg pour le *quercus*. On peut conclure que ces huiles sont riches en tocophérols, ce qui leur confère un pouvoir de longue conservation et une aptitude vitaminique assurée.

L'analyse qualitative et quantitative des acides gras des lipides neutres, glycolipides et phospholipides a été réalisée pour la détermination de la composition des lipides totaux étudiés. Les trois (03) classes des huiles des fruits noir et rouge *pistacia lentiscus* et les fruits *quercus ilex* et *suber* renferment les mêmes acides habituels mais avec des proportions variables.

D'après les résultats trouvés nous pouvons conclure que les huiles étudiées ont une valeur nutritionnelle importante puisqu'elles renferment des acides gras essentiels comme et l'acide oléique et l'acide linoléique, de même ces huiles possèdent des activités antioxydantes certaines par leurs teneur en composés phénoliques y compris les tocophérols et les tocotriénols, ce qui montre que ces huiles peuvent être de bonnes sources d'antioxydants naturels.

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure connaissance de la composition chimique des extraits lipidiques des fruits noir et rouge de *pistacia lentiscus* et les fruits des *quercus ilex* et *suber*, de même à la connaissance des ressources de la végétation en Algérie et leurs teneurs en substances d'intérêt biologique et particulièrement les composés phénoliques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

- Abolfazl F, Mohsen B, Mohammad H.A. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 676-680.
 - Amalia A.C, Maria.I.V. (1997).Brededan and guillermo H.Crapiste, quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *JAOCS*. 74, 511-514.
 - Arms K, Camp P.S. (1993). *Biologie Générale*. Édition Études Vivantes.
 - Arthurson G , Jonson C.E.(1975). Prostaglandines. *J Appl Physiol*. 38,1153–1160.
 - Balta M.F,Arilgaç T.Y,Aşkin M.A, Kuçuk M,Balta F, Özrenk K. (2006).Determination of fatty acid compositions, oil contents and some quality traits of hazelnut genetic resources grown in eastern Anatolia of turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*.19, 681-686.
 - Barbier M. (1980). *Encyclopedia Universalis Pigments et Pigmentations* V.13, 66.
 - Beretz A, Cazenave I.P, Anton R.(1982).Agents actions. 12, 382-387.
 - Biglari F, AIKarkhi A.F.M., and Easa.A.M (2008).Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactyl era*) fruits from Iran.*Food Chemistry*. 107, 1636-1641.
 - Bonnefont R.D,Thérond, P., Delattre, J.(2003).Radicaux libres et antioxydants.In : *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires*. Médecine- sciences. Flammarion (Ed). Paris. 59-81.
 - Brasseur L. P, Thérond , Legrand. A. (1995). Pouvoir antioxydant total du plasma. *Act Pharm Biol Clin*. 8 : 239-224.
 - Burton G. W, INGOLD K. U. (1986) .Vitamin E: application of the principales of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *ACC Chem*. 19, 194-201.
 - Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat A.G, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat J.L, Sauvaigo S.(2002). Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrat specificity of DNA repair glycosylases. *Biol.Chem*, 383,933-43.
- Cao G.H., H.M., Alessio, Cutel R.G. (1993).Oxygen radical absorbency capacity assay for antioxydants. *Free Radic.Biol. Med*. 14,303-311.
- Carlo D, Mascolo G .N, Izzo A.A, Capasso F.(1999). Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review.Lif Sci*. 65, 337-353.

- Chaovanalikit A, Wrolstad R.E.(2004).Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science* . 69,73-83
- Chapkin R.S. (1992). Reappraisal of the essential fatty acids. 429-436 in *Fatty acids in foods and their health implications* (Dekker, M. ed.), Ck Chow ed. New-York, NY,
- Christie W.W. (1989).Gas chromatography and lipids: a practical guide. The Oily Press, Ayr.307, 1014
- Chrysoula C, Tassoua , Nychas G. J. E. (1995).Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia Zentiscus* var. *chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model, food system,international biodeterioration & biodegradation, 411-420.
- Comes F. (1989). Etude comparative des lipides de graines de quelques rosaceae prunoidées et rosoidées, Thèse doctorat, France.
- Cottelle, N.(2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 569-590.
- D'mello I.P.F.(1997). Hand Book of plant and Fungal Toxicants, C.R.C Boca Raton, New York, 99.
- Diallo A. (2005). .Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* willd. (MYRTRACEAE). Thèse de Doctorat.Université, Mali,
- Dolde D, Vlahakis, Hazebroek J. (1999). Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 76, 349-35.
- Dreyer D.L, Bertelli, D.J.(1967) , *Tetrahedron*, 23-12, 4607-12.
- Duthie G.G., Gonzalez B.M., Morrice P.C, Arthur J.R. (1991). Free rad. res. comms, 15, 35-40.
- Edeas M, (2005). La 3ème conference ingrédients solaires et vieillissement cutané, in société française des antioxydants. Vol.9, Paris.
- Farah N.T, Bhanger M.I, Khuhawar M.Y.(2006), Comparison of fatty acids and cholesterol content in the of Pakistani cow breeds, *Journal of Food Composition and Analysis.* 19, 698-703.
- Favier A. (2003)., Le stress oxydant Intérêt conceptuel et experimental dant la comprehension des mécanismes des maladies et potential thérapeutique, l'actualité chimique. 108 -114.
- Fernandez B.B.S,Gotia M.T.Monters M. ,Allan.A.L. (1986).Boletin De La Sociedad Quimica Del Peru.72,19-31.
- Fimin J.I, Wilson, K.E, Rossen. L, Johuston.A.W.B. (1962). Flavonoids activation of nodulation

genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plant. *Nature*. 234-754.

- Frankel E.N, Meyer, A.S, (2000).The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science and the Food Agricultural*, 80,1925-1941.
- Giner Chafez.B.I. (1996).Condensed tannins in tropical forages, Thèse Ph.D, Cornell University. Ithoua.Ny.USA.
- Glew R.H, Herbein H.J, Ma I, Obadofin O, Wark W. VanderJagi D.J.A.(2006). The trans fatty acid and conjugated linoleic acid content of Fulani butter oil in Nigeria, *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 704-710
- Gordon M.H. (1990).The mechanic of antioxydant action in vitro. Food antioxidants. Hudson B.J.F. (ed.), Elsevier, *Amsterdam*.1-18.
- Gschwendt, M., et al. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 117(2): 444-447.
- Gunstone F.D. (1962). The distribution of fatty acids in natura glycerides of vegetables Origin, 1214-1223.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C.(1990).Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Method in Enzymology*.186,1-85.
- Hamanure Y, Hayashiya K, Naito K.I. Matsuura. K , Nishida.J. (1962) *Nature*. 194.754.
- Hansteen.B, Lebesm Z.(1980).Unters Forsch, *Journal of Cell Science*. 43, 367-377.
- Harwood J.L, Quinn, P.J.(2000).Recent advances in the biochemistry of plant lipids, portand press, London,(eds.).433.
- Hertoz M.G.L.(1996).Proceeding of the nutrition society. V.55. 385.
- Hope W.C,Welton.A.F,Nagy.C.F, Coffrey J.W.(1981). *Fed. Proc*. 40.44-88.
- Huang D.O.B, Prior R.L.(2005).The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*.53, 1841-1856.
- Huang, D.O.B, Prior R.L.(2005).The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 53. 1841-1856.
- Ivis T,Forrester A, James M.C.N, Robin W, Mark W. (2006). Fatty acid content of pasture-reared fryer rabbit meat. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 715-719.
- Javanovic S.V, Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.J.(1994).Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116, 4846-4851.

- Jay M, Gonnet, J.F.(1975).Wollenwelber eckhard voirin B. *phytochemistry* 14. 1605-12.
- Jiyeon C, Junsoo L, Lin Y, Jacob E, Ronald R.E. (2006).Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United states diet, *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 196-204
- Jvanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco, J.M. (2003).Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry*.83, 547-550.
- Kamei H,Kojima T.Koide T,Hasegawa M,Umeda T,Teraba K, Hashimots Y.(1996).Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 11,4-247.
- Kaul T.N,Middeton E.(1985).Orga.PL. *J.Med.Virol*. 1571-79.
- Kayoks S.Shuishi M,Michis F,Sachiks E. (1994).Naohide.K.Carcinogenesis.V.15.N°11. 2669.
- Kinsella J.E, Frankel E, Grman B, Kanner,J .(1993).Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*.47, 85-89.
- Kivc B.AK*, Akay S. (2005). Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia,and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry, *Fitoterapia*. 76, 62–66.
- Kolechlin R.C.(2006).Oxygène, stress oxydant et supplementations anti-oxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et métabolisme*. 20,165-177.
- Laurence L.S.(2002).Les radicaux libres.
- Leger C.L.(1992). Vitamine E tocophérols et composés apparentés: Propriétés antioxygène et rôle biologique source alimentaires.CNERNA-CNRS Commission Nutrition Membrane. Polytechnica.1-157.
- Leitão, viregac (2002). Quick- preparative separation of naturel Naphtoperanone with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. *Z.Natur foresch* . 57,1051-1055.
- Lejeune B, Vernat B, Regeat F. Gardelle D. Foucher D. pournat. A. (1984). Parfums Cosmétiques Arômes. V56,6568.
- Lemhadri A, Hajji L,Michel J.B, Eddouks M. (2006). Cholesterol and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 106, 321-326.
- Li C, Oldham C.D, May S.W.N.(1994).N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative

reductant for peptidylglycine –amidating mono-oxygenase catalysis, *Biochem. J.* 300, 31-36.

- Li P, Anu H, Jar S, Teijo Y, Heikki V.(1999). TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed metal by video scanning technology , *Chemistry an Nutrition*, 10, 123-187.
- Libeth I, Soren M , Hilmer S.(1994).Analysis of individual Phospholipids by High-Performance Capillary Electrophoresis, *JAOCS*, 71, 183-188.
- Liebler D.C., Kling D.S. Reed D.J.(1986). Antioixidant protection of phospholipids bilayers by a tocopherol.*J. Biol. Chem.* 51, 1214-1219.
- Lii S, Graig E.A. (1988).The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet*, 63,1-677.
- Lio M.M, Matsumoto.A, Takoki Y.N. (1985). Fugumoto, M.Agric. *Biol Chem*, 49, 2173.
- List G.R, Orthoefer F, Taylor N, Nelsen T, Abidi S.L. (1999).Characterization of Phospholipids from Glyphosate-Tolerant Soybeans, *JAOCS*. 76, 57-60.
- Luigia L*,Anna S, Giuseppe V*,(2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.1–5.
- Machlin L.G.(1980). Vitamin E. A comprehensive treatise, Marcel Dekker, New-York.
- Magin D.V.G, lewin I.N, Popov D.I, Zmailov Y , Vladimirov Y.A.(2002). Photochemiluminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems, *Mathematic modeling*. 46, 419.
- Manuel L.C, Isabel V.A, Isabel.M.V.A.(2004).(Quercus spp.) Fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study, *JAOCS*. 81, 447-453.
- Martial L, Jean M.C, Mariannick d, Yvette S, Jean L.S, Laurent L.(2005). Fatty acid composition of french butters,With special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 409-425.
- Mayes P. A. (2000).Metabolism of uunsaturated fatty acids and eicosanoids. 250-258 in *Harper's Biochemistry*.25" ed. Appleton & Lange, Connecticut, USA.Miles,
- Mazza G,Mmatti E.(1993). "Anthocyanits in fruits vegetables and grains" C.Press.Boca.Raton 362.
- McCord J.M.(1995). Superoxide radical: controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 202,112-117.
- Meier W, Fuerst A.(1962),*Helvetica Chimica Acta*.45 232-9
- Merriam W. (2002). Antioxidant in webster's third new international dictionary, unabridged.

- Milane H.(2004).La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et application thérapeutique.20-22 (thèse de doctorat).
- Mitchell M. D. (1990). Pathways of arachidonic acid metabolism.1-3 in Eicosanoids in Reproduction, (Mitchell, MD. ed.). CRC Press, hc., Boston, USA.
- Mohamed F.R. Jörg-Thomas M. (2003).Phospholipid composition of niger (*Guizotia abyssinica* cass.) seed oil, *Lebensin-Wiss.U.Technol* 36, 273-276.
- Mohammedi. Z, Etude de pouvoire antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelque plantes de la région de Tlemcen 2005-2006.p28 (thèse de magistère).
- Molyneux P.(2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity. *Songklanakarin J. Sci.Technol.* 26, 211-219.
- Molyneux.P.(2004). The use of the stable free radical Diphenyl Picryl Hydrazyl for estimating antioxydant activity. *Song blanak arin J.Sci.Technol*, 26, 211-219.
- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R.(1995).Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 27, 109-122.
- Morton. A.D.I. Fd. (1968).*Technol.* 3, 269-675.
- Mues, Ruediger, Timmermann, Barbara N, Ohno, Nobuo, Mabry, Tom J. (1979). *Phytochemistry.* 18, 1379-83.
- Myara. J, vieillissement et stress oxydant, radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène, cours de biochimie, 2002, pp 1-22.
- Niki, E. and Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is behind measured by which method.*IUBMB Life*, 50, 323-329.
- Nishizoka.Y. (1986), *Science.* 233, 305-312.
- Parmar.N.S.et Hennings. G. (1984) .*Agents. Actions.* 15, 143-145.
- Perterson,J.;Dwyer,J,(1998). Flavonids :dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr.* 18, 1995-2018.
- Peters.N.K. Frost, J.W et Long.S.R.(1986). *Science.* 223, 978-980.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O.(2002). Mécanismes physiologiques de la

défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 ,233-239.

- Porter N. A. (1986).Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *ACC. Chem.* 19,262
- Predrag L, Hui S, Uri C, Hassan A, Arieih B.(2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease, *Journal of Ethnopharmacology* .100 , 198–204.
- Quetier.Delen.C et AL.(2000). Phenolic Compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Enmapharmacology*. 72, 35-42.
- Ramakanth.S. Jonnala, Nurhan T. Dunford, Kenton E. Dashiell, Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars.(2006). *Journal of Food Composition and Analysis*.19, 600-605.
- Sanchez-Morena, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science Technology International*, 8, 121-137.
- Sebastien F.(2005). Activités biologiques de composés de la famille des flavonides : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculai. p25.
- Shahid, F.(1997). Natural antioxidant chemistry health effects, and applications. *AOCS Press*: Urbana.
- Silva, E, M., souza, J,N,s,Rogez, H., Rees, J,F, and Larondelle, Y.(2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
- Singleton J.A, Ruan M, Sanford J.H, Haney C.A , Stikeleather L.F.(1999).Separation and characterization of peanut phospholipid molecular species using high-performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry. *JAOCS*. 76, 149-56.
- Smith, D.A et Banks, S.W.(1986). Plant Flavonoids in Biology and Medecine Biochemical , Pharmacological and structure Activity Relationships, Cody, V. Middleton. E, Harborne. J.B (Eds) Liss.A.R. New York .113-124.
- Varma.S.V.(1986). Plant Flavonoids in Biology and Medecine Biochemical Pharmacological and structure activity relationships, Cody, V. Middleton.E, Harborne.I.B (Eds), Liss.A.R.New York. 343-358.
- Wall. J.(2000).Antioxidant in prevention of reperfusion damage of dasclar Endothelium, *Review*,

Volume 1, *Pharmacology*. 103-125.

- Wendy Brand-William.(1996). Activités antioxydante et antiradicalaire de composés phénoliques et d'extraits végétaux en systèmes modèles et en cuisson-extrusion. Thèse de Docteur en Sciences, Spécialité Science Alimentaires, E.N.S.I.A, Massy, 112
- Wendy L. Applequist, Bharathi A, Brian T. Schaneberg, Yan-Hong W, Ikhlas A. Khan.(2006).Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in a common (shared) garden, *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 606-611
- Williams, E. M. and Ieffrey, A.M.(2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and Chemistry induced Regulatory *Toxicology and Pharmacology*.32, 283-292.
- Yousfi. M.(2005). Caractérisation des molécules lipidiques et phénoliques de Pistacia atlantica, Thèse doctorat, Université de Blida, Algérie.
- Yuen M C, Siow C. B, Ah Ngan M, Cheng H.C. (2004). Phospholipids from Palm- Pressed Fiber, *JAOCS*. 81, 471-475.
- Zaat, S.A.J, Wijffelman, C.A, Spaink, H.P.(1987). Van Brussel, A.A.N. Okker. R.J.H et Lungtenburg, B.J.J. *Bacteriol*, 169-198.

ANNEXES

Annexes

Tableau 01 : Nomenclature des acides gras (Adapté de Cbristie, 1989).

Nom systématique	Nom trivial	Abréviation
Acides gras saturé		
Dodécanoïque	Laurique	C12 :0
Tetradécanoïque	Myristique	C14 :0
Hexadécanoïque	Palmitique	C16 :0
Octadécanoïque	Stéarique	C18 :0
<i>Acides gras monoinsaturés</i>		
9 ¹ -Hexadécénoïque	Palmitoléique	C16:1n-7
9-Octadécénoïque	Oléique	C18:1n-9
<i>Acides gras polyinsaturés</i>		
9,12-Octadécadiénoïque	Linoléique	C18 :2n-6
9,12,15-Octadécatriénoïque	α -Linoléique	C18 :3n-3
6,9,12-Octadécatriénoïque	γ -Linoléique	C18 :3n-6
8,11,14-Eicosatriénoïque	Dihomo- γ -linoléique	C20 :3n-6
5,8,11,14-Eicosatétraénoïque	Arachidonique	C20:4n-6
5,8,11,14,17-Eicosapentaénoïque	Eicosapentaénoïque	C20:5n-3
4,7,10,13,16,19-Docosahexaénoïque	Docosahexaénoïque	C22:6n-3

Calcul des taux des différents triacylgcérols.

Tableau 02 : Taux des différents acides gras de l'huile de pistachier lentisque noir dans les positions 2 et 1+3 d'un triacylgcérol,

Acide gras	P	Po	S	O	L	Ln
x	19,62	—	1,81	55,51	21,82	1,24
$3x$	58,86	—	5,43	166,53	65,46	3,72
y	8,61	—	—	61,55	29,84	—
$\frac{(3x - y)}{2}$	25,12	—	2,71	52,49	17,81	1,86

P : palmitique ; S : stéarique ; O : oléique ; L : linoléique ; Ln : linoléique.

Tableau 03 : Taux des différents acides gras de l'huile de pistachier lentisque rouge dans les positions 2 et 1+3 d'un triacylgcérol,

AG	P	Po	S	O	L	Ln
x	14,50	—	3,90	45,90	35,70	—
$3x$	43,50	—	11,70	137,70	107,1	—
y	16,14	—	—	47,40	36,46	—
$\frac{(3x - y)}{2}$	13,68	—	5,85	45,15	35,32	—

Tableau 04 : Taux des différents acides gras de l'huile du quercus.ilex dans les positions 2 et 1+3 d'un triacylglycérol,

AG	P	Po	S	O	L	Ln
<i>x</i>	12,40	2,27	—	67,97	15,88	1,48
3<i>x</i>	37,2	6,81	—	203,91	47,64	4,44
<i>y</i>	4,58	—	—	68,31	27,11	—
$\frac{(3x - y)}{2}$	16,31	3,40	—	67,8	10,26	2,22

Tableau 05 : Taux des différents acides gras de l'huile du quercus.suber dans les positions 2 et 1+3 d'un triacylglycérol,

Acide gras	P	Po	S	O	L	Ln
<i>x</i>	14,12	1,55	—	68,81	15,52	—
3<i>x</i>	42,36	4,65	—	206,43	46,56	—
<i>y</i>	6,75	—	—	71,67	21,58	—
$\frac{(3x - y)}{2}$	17,80	2,33	—	67,38	12,49	—

Calcul de la composition des triglycerides :

Méthode de Coleman : Exemple de l'acide oléique (C18 :1) occupe la position 2

Position 2	%	DAG	%	TAG	%
MAG					
-O-	61,55	OP	15,46	OPP	3,883
				OPS	0,419
				OPO	8,115
				OPL	2,753
				OPLn	0,287
		OS	1,67	OSP	0,419
				OSS	0,045
				OSO	0,876
				OSL	0,297
				OSLn	0,031
		OO	32,31	OOP	8,116
				OOS	0,875
				OOO	16,96
				OOL	5,754
				OOLn	0,600
		OL	10,96	OLP	2,753
				OLS	0,297
				OLO	5,753
				OLL	1,95
				OLLn	0,204
OLn	1,145	OLnP	0,287		
		OLnS	0,031		
		OLnO	0,601		
		OLnL	0,204		
		OLnLn	0,021		

Exemple de l'acide Linoléique (C18 :2) occupe la position 2

Position 2	%	DAG	%	TAG	%
MAG	29,84	LP	7,50	LPP	1,884
				LPS	0,203
				LPO	3,937
				LPL	1,335
				LPLn	1,139
		LS	0,81	LSP	0,203
				LSS	0,022
				LSO	0,425
				LSL	0,144
				LSLn	0,015
		LO	15,6 6	LOP	3,93
				LOS	0,424
				LOO	8,220
				LOL	2,790
				LOLn	0,291
		LL	5,31	LLP	1,334
				LLS	0,144
				LLO	2,787
				LLL	0,946
				LLLn	0,099
LLn	0,55	LLnP	0,138		
		LLnS	0,015		
		LLnO	0,287		
		LLnL	0,098		
		LLnLn	0,010		
-L-					

Exemple de l'acide palmitique (C16 :0) occupe la position 2

Position 2 MAG	%	DAG	%	TAG	%
-P-	8,61	PP	2,16	PPP	0,542
				PPS	0,060
				PPO	1,134
				PPL	0,384
				PPLn	0,040
		PS	0,23	PSP	0,078
				PSS	0,006
				PSO	0,121
				PSL	0,041
				PSLn	0,004
		PO	4,52	POP	1,135
				POS	0,122
				POO	2,372
				POL	0,805
				POLn	0,084
		PL	1,53	PLP	0,384
				PLS	0,041
				PLO	0,803
				PLL	0,272
				PLLn	0,028
PLn	0,16	PLnP	0,041		
		PLnS	0,004		
		PLnO	0,084		
		PLnL	0,028		
		PLnLn	0,003		

4.3. Etude des acides gras des lipides polaires :

Définition : Lipides contenant un ou plusieurs radicaux phosphate, en particulier ceux dérivant du glycérol (phosphoglycérides , glycérophospholipides) ou de la sphingosine (sphingolipides). Ce sont des lipides polaires qui sont d'une grande importance pour la structure et les fonctions de la membrane cellulaire.

La fraction minoritaire dans les huiles végétales représente les lipides polaires, ces derniers contiennent les phospholipides et glycolipides.

4.3.1. Les phospholipides :

Les phospholipides (ou les lipides complexes) possèdent deux familles :

1. les glycérophospholipides
2. les sphingolipides

Ces deux familles diffèrent à la fois par leurs constituants et par le mode de liaison des acides gras sur les autres molécules. Malgré ces différences constitutives importantes, l'ensemble des molécules se comporte de manière similaire en se positionnant dans l'espace avec une partie hydrophile (tête polaire) et une partie hydrophobe (queue) constituée en grande partie par les chaînes hydrocarbonées d'acides gras.

4.3.1.1. Les glycérophospholipides :

Les glycérophospholipides sont constitués :

- de glycérol
- d'acides gras
- d'acide phosphorique

et dans certains cas

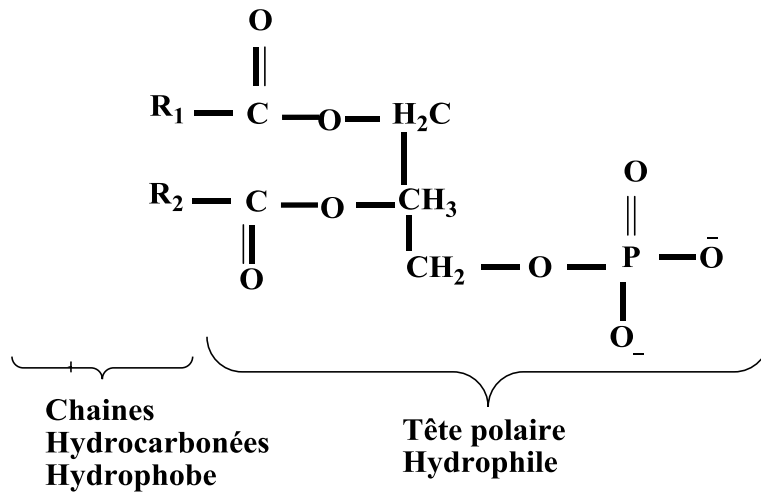
- d'un alcool supplémentaire lié par une liaison ester phosphorique à l'acide phosphorique

Lorsque les acides gras sont reliés au glycérol par des liaisons esters, on obtient les acides phosphatidiques et leurs dérivés.

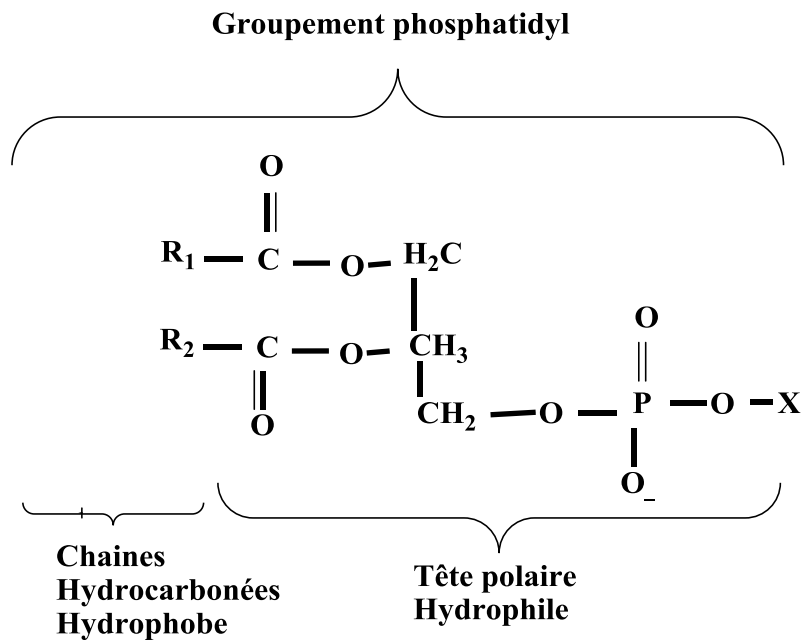
Lorsque ceratins acides gras sont reliés au glycérol par le biais d'une liaison de type vinyl éther, on obtient des plasmalogènes.

A.) Les glycérophospholipides :

a) Structure générale des acides phosphatidiques :



b) Structure générale des dérivés d'acides phosphatidiques :



R : Chaînes hydrocarbonées des acides gras

X : Alcool estérifié sur l'acide phosphorique

Schéma des dérivés d'acides phosphatidiques

1) Structure des phosphatidylcholines ou Lécithines :

X = Choline

Remarque :

dans de nombreux cas, l'acide gras en position 1 est insaturé et l'acide gras en position 2 est saturé.

2) Structure des phosphatidyléthanolamines ou Céphalines:

X = Ethanolamine

3) Structure des phosphatidylsérines:

X = Sérine

4) Structure des phosphatidylinositides:

X = Inositol

5) Structure des phosphatidylglycérols :

X = Glycérol

6) Structure des diphosphatidylglycérols ou cardiolipides:

X = phosphatidyl glycérol

c) Structure générale des plasmalogènes:

R : Chaînes hydrocarbonées des acides gras

X : Résidu éthanolamine ou choline

• **Structure de Plasmalogène à éthanolamine**

5.3.1.2..Les sphingolipides :

Les sphingolipides sont constitués :

- de sphingosine
- d'un acide gras

et dans certains cas

- d'un substituant qui peut être de la choline ou un groupement de nature glucidique

L'originalité des sphingolipides réside dans le mode liaison de l'acide gras avec la sphingosine. Les deux molécules étant associées par le biais d'une liaison amide créée entre le groupement carboxyle de l'acide gras et un groupement amino de la sphingosine.

- a) **Structure de la sphingosine**
- b) **Structure générale d'un céramide**
- c) **Structure générale d'une sphingomyéline**
- d) **Glycolipide neutre simple ou cérébroside**
- e) **Glycolipide neutre complexe**
- f) **Glycolipide acide ou ganglioside**

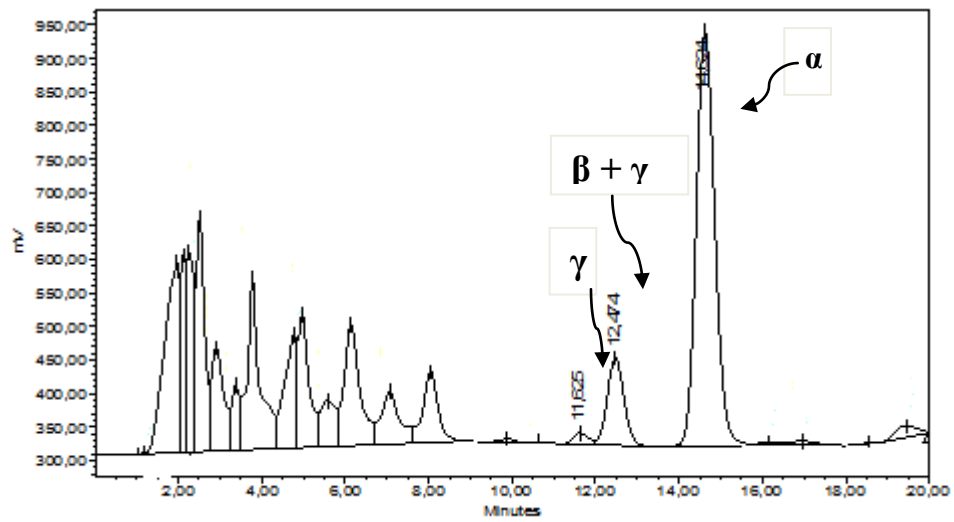


Figure 1: Chromatogrammes HPLC des tocophérols de l'huile du fruit de *Pistacia lentiscus* noir

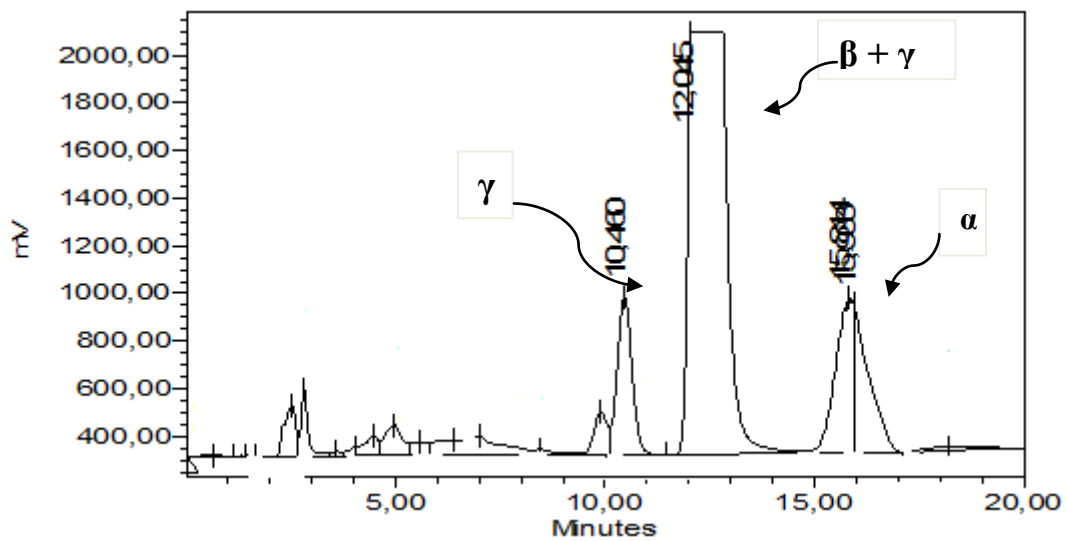


Figure 2: Chromatogrammes HPLC des tocophérols de l'huile du fruit du *Quercus ilex*

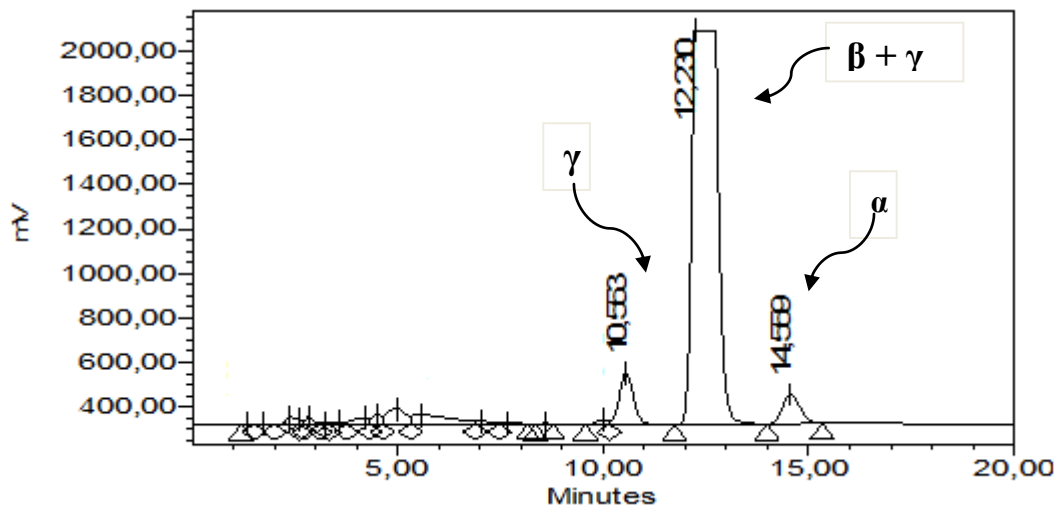


Figure 3: Chromatogrammes HPLC des tocophérols de l'huile du fruit du *Quercus suber*

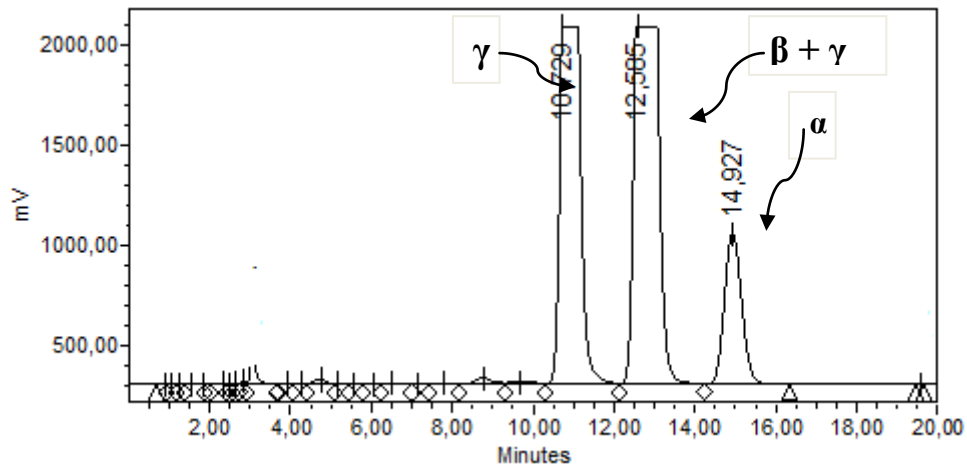


Figure 4: Chromatogrammes HPLC des tocophérols individuels standards