



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

FACULTE DES MATHEMATIQUES ET SCIENCES DE LA MATIERE

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Domaine: Sciences de la Matière

Filière: Chimie

Spécialité: Analyses physico-chimiques et réactivité des espèces
moléculaires

Par: DJOUADI Assia

Thème

**Étude de l'effet de température sur les teneurs en omégas-3 et -6
dans les graisses alimentaires et l'huile d'olive par la
voltammétrie impulsionnelle différentielle**

Soutenue publiquement le: 11 Décembre 2016

Devant le jury composé de:

M. SAIDI Mokhtar	Pr.	Université d'Ouargla	Président
M. DENDOUGUI Hocine	Pr.	Université d'Ouargla	Examineur
M ^m . BOUBEKRI Chérifa	MC/A	Université d'El-Oued	Examinatrice
M. LANEZ Touhami	Pr.	Université d'El-Oued	Rapporteur
M. OUAHRANI M ^{ed} Ridha	Pr.	Université d'El-Oued	Invité

*« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter,
on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit,
mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*

Ellen Mac Arthur (2002), Du vent dans les rêves.

Je dédie cette thèse,

*à tous ceux et toutes celles
qui m'ont accompagné et soutenu
durant ces années de recherche*

Remerciements

Au nom d'ALLAH, le tout Miséricordieux et le très Miséricordieux

« Et ma réussite ne dépend que d'ALLAH. En lui je place ma confiance, et vers lui que je reviens repentant ». (Hood ,88)

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage de réaliser ce modeste travail. Dieu merci pour pouvoir achever ce travail.

La thèse a représenté pour moi une période de vie à la fois intense et enrichissante, et ce en grande partie grâce aux personnes que j'ai côtoyé, qui m'ont soutenue et écoutée.

Ce manuscrit est l'aboutissement d'un travail réalisé au sein du laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes de l'université d'El Oued, sous la direction de Monsieur le professeur LANEZ Touhami, directeur de ce laboratoire de recherche VTRS, je tiens en premier lieu à le remercier, tout particulièrement, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant l'encadrement de mon travail doctoral. Sa pleine disponibilité malgré les obligations et préoccupations administratives, son aide permanente sans relâche, ses précieux conseils, sa gentillesse et ses connaissances scientifiques, ont fortement contribué à ma formation et m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral, tout au long de ces années. Merci pour tout le temps qu'il m'a consacré. Je lui dois beaucoup. Cela a été un privilège pour moi, de travailler sous sa direction. Un grand merci pour la confiance qu'il m'a accordé et qu'il me témoigne toujours.

Je souhaite également remercier les membres du jury, Messieurs SAIDI Mokhtar, DENDOUGUI Hocine, OUAHRANI Mohammed Ridha et madame BOUBEKRI Chérifa pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour avoir accepté de juger ces travaux de thèse. Leur intérêt pour ces travaux, leurs analyses critiques et la discussion qui a eu lieu lors de la soutenance de thèse ont permis d'établir des échanges très constructifs avec eux.

Que monsieur NANI Sadok, Ingénieur de laboratoire, reçoit mes sincères remerciements pour sa contribution et son aide à dans la réalisation des analyses CPG, ainsi que pour sa disponibilité et sa gentillesse. Sans cette aide, une grande partie de cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée.

J'exprime ma profonde reconnaissance à monsieur TLIBA Ali, Ingénieur de laboratoire, pour l'aide technique et ses dévouements qu'ils m'ont apportée me permettant de réaliser mon travail dans les meilleures conditions, ainsi que à sa gentillesse.

J'adresse mes très sincères remerciements aux laborantines du laboratoire pédagogique qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci les filles pour votre bonne humeur, votre gentillesse, vos encouragements, et les bons moments passés ensemble, ainsi que pour votre agréable compagnie.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à Monsieur MESBAHI Adel pour son aide, conseils et l'expérience humaine qu'ils m'ont permis d'apprendre l'utilisation de CPG, sans oublier bien évidemment tous ceux qui m'ont aidé au niveau de toutes les démarches administratives.

Mes remerciement s'adressent également à l'équipe de Ferme Dhaouia de m'avoir apporté les échantillons d'olive.

Je reste également redevable aux chercheurs du laboratoire de physique, pour l'aide qu'ils m'ont apportée au chauffage des échantillons d'huile.

À vous mes collègues doctorants auxquels je souhaite une très bonne continuation et bon courage pour la fin de vos recherches.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans avoir remercié ma famille, dont le soutien permanent y est pour beaucoup dans l'achèvement de ce travail. Un très grand merci à mes chers parents pour tout ce qu'ils m'apportent et notamment pour m'avoir toujours encouragée, m'avoir épaulée sans fléchir durant cette thèse et s'être inquiété du bon déroulement de mes études. Merci pour m'avoir soutenue dans les périodes difficiles de la rédaction du manuscrit. Je tiens à adresser un énorme merci à mon père pour son compagnie lors de voyage. J'exprime mes vifs remerciements à ma sœur Maryam pour son aide dans le domaine d'informatique.

Merci à toute ma famille pour leur soutien et leur amour qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en chimie organique et de devenir la personne que je suis.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes amies, elles sont nombreuses. Chacune a contribué à sa manière à la réalisation de ce travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. *Merci à vous tous!*

Je sais que toutes ces lignes ne sont pas suffisantes pour exprimer ma profonde reconnaissance à vous et je vous dis « *Grand bien vous fasse* ».

Assia

Résumé:

Ce travail est une contribution à une meilleure connaissance de l'effet de la température sur la teneur en ω -3 et ω -6 des lipides alimentaires. Différentes expériences de chauffage ont été réalisées pour tester cet effet. En effet, des échantillons d'huile ont été chauffés, à une température de 175 °C, 275 °C, 350 °C et 450 °C durant quinze minutes. Les techniques utilisées pour qualifier et quantifier ces teneurs en acides gras sont celle de la chromatographie et aussi d'électrochimie. L'acidité et leurs contenus en diènes conjugués ont été également investiguée. Quatre variétés d'olive ont été étudiées. L'extraction des lipides a été effectuée par solvant organique avec l'assistance d'ultrasons et autre à l'aide d'un pressage mécanique, et les extraits lipidiques ont été également testés et comparés, à son tour, entre eux afin de les valoriser.

L'analyse de la chromatographie gazeuse montre que les extraits des deux méthodes d'extraction utilisées présentent une grande similarité avec certaines différences.

Les résultats chromatographiques de l'oxydation des extraits ainsi que l'interprétation de l'évolution d'acidité et des diènes conjugués ont montré que les températures 350 °C et 450 °C ont un effet significatif sur la teneur en ω -3 et ω -6. Le pourcentage de diminution d' ω -3 le plus élevé a été associée principalement à la variété SIG et celle de NEB, suivi du LAR et du MAN. La diminution la plus basse d' ω -6 était associée au NEB, suivi par SIG, LAR et MAN.

La saponification suivi par une double extraction liquide-liquide de l'huile à base ω -3 ou ω -6 nous a permis de détecter électrochimiquement (CV, SWV et DPV) sa teneur en ω -3 ou ω -6. La superposition de leurs réponses électrochimiques a empêché l'étude de l'évolution de leurs teneurs dans l'huile d'olive.

Mots clés: Lipides; acides gras polyinsaturés; chauffage; chromatographie; méthode électrochimique.

المخلص:

يساهم هذا العمل في فهم أفضل لتأثير درجة الحرارة على محتوى الأحماض الدهنية للـ ω -3 و ω -6 للدهون الغذائية، حيث أجريت العديد من التجارب لاختبار هذا التأثير. في الواقع، لقد تم تسخين عينات الزيت عند درجات الحرارة 150 °C ، 250 °C ، 350 °C ، 450 °C لمدة 15 دقيقة. التقنيات المستعملة لتحديد وتكميم هذه الأحماض الدهنية هي التقنية الـ كروماتوغرافية والكهروكيميائية. وكذلك تم معاينة الحموضة ومحتوى الألسانات الثنائية المترافقة. الدراسة أجريت على أربع أنواع من الزيتون، حيث قمنا باستخلاص الدهون بالمذيب العضوي بمساعدة الأمواج فوق الصوتية وأيضاً بواسطة الضغط الميكانيكي. والمستخلصات الدهنية بدورها اختبرت وقورنت فيما بينها من أجل تثمينها.

أظهرت تحاليل كروماتوغرافيا الطور الغازي أن مستخلصات الطريقتين المستعملتين متشابهة بشكل كبير مع بعض التباينات. كما أوضحت النتائج الكروماتوغرافية لأكسدة المستخلصات وكذلك تفسير تطور الحموضة ومحتوى الألسانات الثنائية المترافقة أن درجتي الحرارة 350 و 450 °C لديها تأثير كبير على محتوى الأحماض الدهنية للـ ω -3 و ω -6. حيث ارتبطت نسبة أعلى انخفاض لمحتوى ω -3 بالنوع SIG و NEB متبوعة بالنوعين LAR و MAN. بينما ارتبط أدنى انخفاض في مستوى ω -6 بالنوع NEB متبوعاً بـ SIG ، LAR و MAN.

سمحت لنا عملية التصين المتبوعة باستخلاصين سائل-سائل لزيطي الـ ω -3 أو ω -6 بتحديد محتوى كهر وكيميائياً (CV, SWV, DPV). تطابق إشارتيهما كهروكيميائياً منع دراسة تطور محتوى هذه الأحماض في زيت الزيتون.

الكلمات المفتاحية: الدهون ، الأحماض الدهنية عديدة اللاشباع، تسخين، الكروماتوغرافيا، الطريقة الكهروكيميائية.

Abstract:

This work is a contribution to a better understanding of the temperature effect on the ω -3 and ω -6 content in dietary lipids. Different heating experiments were performed to examining this effect. Indeed, oil samples were heated at a temperature of 175 °C, 275 °C, 350 °C and 450 °C for fifteen minutes. The techniques used to qualify and quantify these fatty acid contents are that of the chromatography along with electrochemistry. The acidity and conjugated diene contents were also investigated. Four olive varieties were studied. Lipid extraction was performed by organic solvent assisted by ultrasound and other by means of mechanical pressing, and lipid extracts were also tested and compared to valorize it.

The analysis of the gas chromatography shows that the extracts of the two extraction methods used have a great similarity with certain differences.

The chromatographic results of the extracts oxidation and the interpretation of the acidity and conjugated dienes evolution have shown that the temperatures 350 °C and 450 °C have a significant effect on ω -3 and ω -6 content. The percentage of the highest decrease of ω -3 was associated primarily with the SIG and NEB variety, followed by LAR and MAN. The lowest decrease of ω -6 was associated with the NEB, followed by SIG, LAR and MAN.

Saponification followed by a double liquid-liquid extraction of the oil-based in ω -3 or ω -6 allowed to detect electrochemically (CV, SWV and DPV) its content of ω -3 and -6. The superposition of their electrochemical responses prevented the study of the evolution of their contents in olive oil.

Keywords: Lipid; polyunsaturated fatty acids; heating; chromatography; electrochemical method.

Table des matières

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Lipides alimentaires	
I. Lipides alimentaires	8
I.1. Généralités	8
I.2. Définition	8
I.3. Origine	9
I.3.1. Corps gras d'origine végétale	10
I.3.1.1. Graisses concrètes	10
I.3.1.2. Huiles fluides	10
I.3.2. Corps gras d'origine animale	11
I.3.2.1. Corps gras provenant de la chair animale	12
I.3.2.2. Corps gras provenant de la matière grasse laitière	12
I.3.3. Corps gras mixtes	15
I.3.3.1. Margarines et matières grasses composées et à teneur lipidique réduite	15
I.4. Utilisation des lipides : d'assaisonnement ou de cuisson	18
I.5. Classification des lipides	20
I.5.1. Lipides simples	20
I.5.2. Lipides complexes	20
I.6. Nature et source des principaux lipides	21
I.6.1. Acides gras	21
I.6.1.1. Définition	21
I.6.1.2. Acides gras à chaîne linéaire	22
I.6.2. Acylglycérols	27
I.6.3. Phospholipides	28
I.6.4. Glycolipides	29
I.6.5. Cholestérol et phytostérols	29
I.6.6. Vitamines liposolubles	30
I.6.6.1. Vitamine E	31
I.7. Productions végétales	32
I.7.1. Huile d'olive	33
Chapitre II : Dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés	
II. Dégradation des lipides	36
II.1. Oxydation des lipides	36
II.1.1. Définition	36

II.1.2. Mécanisme réactionnel	37
II.1.3. Facteurs affectant l'oxydation des lipides	38
II.1.4. Différentes voies d'oxydation	41
II.1.4.1. Auto-oxydation	42
II.1.4.2. Thermo-oxydation	43
II.1.5. Produits d'oxydation	49
II.1.6. Méthodes d'évaluation de la dégradation lipidiques	54
II.1.6.1. Mesure de l'oxydation des lipides	54

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes	
III. Matériels et méthodes	66
III.1. Matériels	66
III.1.1. Matériels de laboratoire	66
III.1.2. Matériel végétal	66
III.1.2.1. Echantillonnage et description	66
III.1.2.2. Préparation et conditionnement de la matière première	67
III.2. Analyse biochimique	67
III.2.1. Teneur en eau	67
III.2.2. Détermination de la teneur en lipides totaux	68
III.2.2.1. Extraction par solvant organique	69
III.2.2.2. Extraction par pressage mécanique	72
III.2.3. Détermination de la composition en acides gras	73
III.2.3.1. Analyse chromatographique	73
III.2.3.2. Analyse électrochimique	77
III.2.3.2. A. Techniques expérimentales utilisées	78
III.3. Traitement thermique des échantillons	91
III.3.1. Contrôles de l'oxydation des corps gras insaturés	91
III.3.1.1. Analyse de la spectrophotométrie ultraviolette	91
III.3.1.2. Indice de l'acidité	93
III.4. Étude statistique	94
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV. Résultats et discussion	96
IV.1. Caractérisation biochimique	96
IV.1.1. Teneurs en eau	96
IV.1.2. Fraction lipidique	97
IV.1.2.1. Extraction des AGPIs d'oméga-3 et-6	97
IV.1.2.2. Composition en acides gras	97

IV.1.2.2.A. Fractions lipidiques obtenues par ESAU	98
IV.1.2.2.B. Fractions lipidiques obtenues par EPM	100
IV.1.2.3. Comparaison entre les deux méthodes	103
IV.2. Étude de l'influence de température sur la fraction lipidique	108
IV.2.1. Caractérisation chimique	108
IV.2.2. Évolution de l'oxydation des acides gras	109
IV.2.2.1. Niveau d'oxydation des lipides	110
IV.2.2.2. Cinétique d'oxydation des lipides	113
IV.3. Analyse électrochimique	120
IV.3.1. Caractérisation électrochimique d'acide gras d' ω -3 et ω -6	120
IV.3.1.1. Voltammétrie différentielle pour l'acide gras d' ω -3 et ω -6	120
IV.3.1.2. Voltammétrie cyclique	122
IV.3.2. Détermination simultanée d'acides gras d' ω -3 et d' ω -6.....	122
Conclusion générale et perspectives.....	126
Références bibliographiques	130
Annexe	146

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AGPI	acides gras polyinsaturé
EPA	Acide éicosapentaénoïque
DHA	Acide docosahexaénoïque
AGPI n-3	Acides gras polyinsaturé d'oméga-3
AGPI n-6	Acides gras polyinsaturé d'oméga-6
AGMI	Acides gras mono-insaturés
AGS	Acides gras saturés
MG	Matières grasses
AG	Acide gras
LDL	Low Density Lipoprotein
HDL	High Density Lipoprotein
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
TG	Triglycérides
TA	Tissu adipeux
pH	Potentiel d'hydrogène
UV	Ultra Violet
MDA	Dialdéhyde malonique
4-HHE	4-hydroxy-2-hexénal
4-HNE	4- hydroxy-2-nonénal
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
RMN	Résonance magnétique nucléaire
IR	Infra rouge

PV	Peroxyde value
LAR	La rougette
MAN	Manzanilla
NEB	Neb djmal
SIG	Sigoise
ESAU	Extraction par solvant assisté par ultrasons
EPM	Extraction par pressage mécanique
BD	Bligh et Dyer
EMAGs	Esters méthyliques d'acides gras
AGL	Acide gras libre
Ox	Oxydant
Red	Réducteur
CV	Cyclic Voltammetry
SWV	Square wave voltammetry
DPV	Differential pulse voltammetry
ANOVA	Analysis of variance
ECS	Electrode au calomel saturée

Liste des symboles

Symbole	Désignation
ω -3 ou n-3	Acides gras de la familles oméga-3
ω -6 ou n-6	Acides gras de la familles oméga-6
ω -6 / ω -3	Rapport Oméga-6/Oméga-3
g	gramme
μ g	micro gramme
mg	milli gramme
kg	kilo gramme
LOO•	radical peroxyde
RO ₂ •	radical peroxyde
RO•	Radical alcoxyde
R•	Radical alkyle
O ₂	Oxygène moléculaire
HO•	Radical hydroxyle
ROOH	Hydropéroxydes
°C	Degrés Celsius
a _w	Activité de l'eau
pK	Constante d'équilibre
³ O ₂	Oxygène triplet
nm	nanomètre
v	Volume
W	Watt
min	minute
MPa	Méga Pascal
rpm	Rotation par minute

p	poids
mL	milli Litre
μ L	micro Litre
I	Intensité
E	Potentiel
$E_{p/2}$	Potentiel de demi-vague
E_{pa}	Potentiel de pic anodique
E_{pc}	Potentiel de pic cathodique
i_{pa}	Densité du Courant de pic anodique
i_{pc}	Densité du Courant de pic cathodique
ms	micro-seconde
L	Litre
mV	milli volt
s	seconde
M	Molaire

Liste des figures

Figure I.1. Structures de différents types d'acides gras	22
Figure I.2. Acide oléique (acide 9-octadécénoïque)	24
Figure I.3. Acide linoléique (acide 9,12- octadécadiénoïque).	25
Figure I.4. Acide arachidonique (acide 5,8,11,14- eicosatétraénoïque).	26
Figure I.5. Acide linoléique.....	26
Figure I.6. EPA (acide 5,8,11,14,17- eicosapentaénoïque).....	27
Figure I.7. DHA (acide 4,7,10,13,16,19- docosahexaénoïque).....	27
Figure I.8. Structure générale d'un triacylglycérol (R_1, R_2 et R_3 sont les chaînes d'acides gras).....	28
Figure I.9. Sphingomyéline (R est la chaîne carbonée d'un acide gras de 20 à 24 carbones).	28
Figure I.10. Glucosylcéramide (R= chaîne de l'acide gras).	29
Figure I.11. Cholestérol.	30
Figure I.12. β -sitostérol.	30
Figure I.13. Tocophérols.	31
Figure I.14. Tocotriénols.....	32
Figure II.1. Etapes élémentaires de l'auto-oxydation de lipides.....	37
Figure II.2. Auto-oxydation de l'acide oléique : produits primaires formés.....	50
Figure II.3. Auto-oxydation de l'acide linoléique : produits primaires formés.	51
Figure II.4. Voies de peroxydation des acides gras polyinsaturés.	52
Figure II.5. Courbe cinétique de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés	53
Figure II.6. Réarrangement pour former les diènes conjugués.....	59
Figure II.7. Etapes de réaction chimiques dans le dosage de produits d'oxydation conjuguables (COP).60	
Figure II.8. Réactions possibles entre le réactif ρ -anisidine et malonaldéhyde.	61
Figure III.1. Quatre variétés d'olive à étudier. A : MAN, B : NAB, C : LAR, D : SIG.	67
Figure III.2. Représentation schématique des mécanismes d'extraction par solvant organique proposés.	70
Figure III.3. Schéma du montage de pressage et d'extraction utilisé.	72
Figure III.4. Différentes étapes et méthodes d'extraction de l'huile.	74
Figure III.5. Préparation et analyse des esters méthyliques d'acides gras.....	76
Figure III.6. Évolution du potentiel en fonction du temps en voltammétrie cyclique.	79
Figure III.7. Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus irréversible d'oxydoréduction	79
Figure III.8. Voltammogrammes cycliques pour des systèmes : réversible rapide (A), quasi réversible semi rapide (B) réversible lent (C) totalement irréversible (D).	81
Figure III.9. Forme d'onde de l'onde carrée montrant l'amplitude, la hauteur du pas, la période de l'onde carrée, temps de retard, et les temps de mesure de courant 1 et 2.....	82

Figure III.10. Voltammogramme à onde carrée	82
Figure III.11. Programme du potentiel pour la voltammétrie impulsionnelle différentielle.	84
Figure III.12. Dispositif expérimental électrochimique voltampérométrique	87
Figure III.13. Cellule à trois électrodes.....	87
Figure III.14. Différentes étapes de séparation de l'insaponifiable de l'huile et d'extraction des acides gras.....	90
Figure III.15. Dosage des acides gras libres.....	93
Figure IV.1. Proportions d'acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport des extraits lipidiques de différentes variétés d'olive.	103
Figure IV.2. Variabilité de la composition en acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport dans les deux extraits lipidiques de chaque variété NEB et SIG.	105
Figure IV.3. Variabilité de la composition en acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport dans les deux extraits lipidiques de chaque variété LAR et MAN.....	106
Figure IV.4. Variation des niveaux d'acidité de l'huile d'olive de quatre variétés extraite par deux méthodes d'extraction différentes	107
Figure IV.5. Évolution de l'acidité (%) des huiles d'olive au cours du traitement thermique.	108
Figure IV.6. Évolution des valeurs de diènes conjugués des échantillons d'huile d'olive au cours du traitement thermique.	111
Figure IV.7. Spectre d'absorption UV de quatre échantillons de l'huile d'olive.....	112
Figure IV.8. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport des lipides totaux de différents échantillons d'olive au cours du traitement thermique pour les différentes températures. .	119
Figure IV.9. Voltammogrammes à onde carrée de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C ₆ H ₆ -CH ₃ à 0.1 M de H ₂ SO ₄	121
Figure IV.10. Voltammogrammes impulsionnelle différentielle de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C ₆ H ₆ -CH ₃ à 0.1 M de H ₂ SO ₄	121
Figure IV.11. Voltammogrammes cycliques de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C ₆ H ₆ -CH ₃ à 0.1 M de H ₂ SO ₄	122
Figure IV.12. Voltammogrammes pour un mélange de l'huile d'oméga-3 et-6 avant la saponification sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C ₆ H ₆ -CH ₃ à 0.1 M de H ₂ SO ₄ pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : CV et courbe (2) : SWV.....	123
Figure IV.13. Voltammogrammes pour un mélange de l'huile d'oméga-3 et-6 après la saponification sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C ₆ H ₆ -CH ₃ à 0.1 M de H ₂ SO ₄ pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : CV et courbe (2) : SWV.....	123

Figure IV.14. Courbe d'étalonnage de la teneur en oméga -6 pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : DPV et courbe (2) : SWV. 124

Figure IV.15. Courbe d'étalonnage de la teneur totale en oméga -3 pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : DPV et courbe (2) : SWV. 124

Liste des tableaux

Tableau I.1. Composition en acides gras de l'huile d'olive.....	34
Tableau II.1. Principaux produits de décomposition des hydroperoxydes du linoléate.	47
Tableau II.2. Principaux produits de décomposition des hydroperoxydes du linoléate.	48
Tableau III.1. Description des olives échantillonnées.....	66
Tableau IV.1. Teneur en eau des variétés d'olive	96
Tableau IV.2. Compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidiques d'olive extraites par ESAU.....	99
Tableau IV.3. Compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidique d'olive extraites par EPM	101
Tableau IV.4. Évolution des concentrations en produits primaires de l'oxydation des lipides, diènes conjugués, de différents échantillons des huiles d'olive préchauffés à différentes températures étudiées. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$) ; ($n=3$).....	110
Tableau IV.5. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport ω -6/ ω -3 des lipides totaux de différents échantillons LAR et MAN préchauffés à différentes températures. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$) ; ($n=3$).....	115
Tableau IV.6. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport ω -6/ ω -3 des lipides totaux de différents échantillons NEB et SIG préchauffés à différentes températures. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$) ; ($n=3$).....	117

Introduction générale

Introduction générale

Les lipides alimentaires, encore appelés matière grasses, corps gras, huiles ou graisses, représentent l'une des trois grandes classes de macronutriments de notre alimentation, avec les glucides et les protéines [1]. Ils sont présents dans toutes les matières animales premières (viande, poisson, lait, œuf) et végétales (grains, graines, fruits et légumes).

Du point de vue nutritionnel, les lipides ont été longtemps considérés surtout pour leur fort apport énergétique. Ils ont cependant vu ces dernières années leur statut modifié au vu des nombreux rôles qu'ils peuvent avoir dans la construction et le métabolisme cellulaire et comme précurseurs de nombreux composés actifs. Pour prévenir les principales pathologies liées aux habitudes alimentaires (maladies cardiovasculaires, diabète, obésité, cancers), la part recommandée des lipides dans l'apport énergétique chez l'adulte est de 35 à 40% (AFSSA, 2010). Cette fourchette permet d'assurer la couverture des besoins en certains acides gras polyinsaturés (AGPI) qui doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation, principalement par les huiles d'origine végétale (tournesol, soja, colza et maïs), mais également les poissons, car l'organisme humain ne peut pas les synthétiser alors qu'ils sont indispensables à son bon fonctionnement [1,2]. Les lipides alimentaires sont en effet une source de nutriments essentiels tels que les vitamines liposolubles A, D, E et K [1]. Ils jouent également le rôle de transporteur vis-à-vis ces vitamines liposolubles (A, D, E, K).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) indispensables pour la croissance et les fonctions physiologiques qui doivent être fournis par les aliments appartiennent à deux familles biochimiques, définies par la position des doubles liaisons dans les molécules ; ce sont les familles d'oméga-3 et -6, il s'agit respectivement de l'acide α -linoléique et linoléique. Il est très important de signaler que les acides gras de ces deux familles ne sont pas interconvertibles, il faut donc l'apport alimentaire des deux. Par contre, à partir de ces deux acides gras l'organisme est capable d'effectuer la synthèse d'autres acides gras polyinsaturés [2].

L'importance de la consommation des acides gras ω -3 et ω -6 réside dans un rapport adéquat. Des études récentes ont montré que le rapport optimal ω -6/ ω -3 dans un régime alimentaire doit varier entre 1:1 et 4:1. Malheureusement, à l'heure actuelle, il y a une augmentation de la consommation d'acides ω -6 en comparaison aux acides

d' ω -3 [3], cet excès d'oméga-6 empêche l'utilisation optimale de l'oméga-3 par l'organisme. En effet, les omégas-3 et les omégas-6 entrent en compétition au niveau des enzymes responsables du métabolisme des acides gras polyinsaturés. Ainsi, un excès d'apport en acide linoléique (n-6) est susceptible de compromettre la production d'acide éicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA) à partir de l'acide linoléique [4].

Des quantités excessives d'acides gras polyinsaturés oméga-6 (AGPI) et un rapport très élevé en ω -6/ ω -3, promeuvent la pathogenèse de nombreuses maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer et les maladies inflammatoires et auto-immunes, alors que des niveaux accrus d'AGPI oméga-3 (un faible rapport ω -6/ ω -3) exercent des effets suppressifs [5].

Bien qu'une consommation excessive de matières grasses soit à éviter, les recommandations nutritionnelles dans le domaine des matières grasses visent à accroître la consommation de produits riches en acides gras polyinsaturés au détriment des produits plus saturés pour leurs effets nutritionnels bénéfiques et plus particulièrement en ce qui concerne la nécessité d'apports équilibrés en acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-6 et oméga-3.

Or, il est bien connu que la sensibilité des huiles et des graisses à l'oxydation sont liés à leur niveau d'insaturation, tout en dépendant encore de beaucoup d'autres facteurs. Les aliments contenant une quantité d'acides gras fortement insaturés sont donc peut-être particulièrement fragiles.

L'oxydation des graisses est une des principales réactions responsables de la dégradation des aliments. C'est un problème qui touche principalement les lipides alimentaires. Elle suscite une odeur et un goût de rance conduisant à une altération des propriétés technologiques et organoleptiques du produit (couleur, odeur, texture...). Mais l'oxydation n'est pas seulement un problème sensoriel. Outre la perte de valeur nutritionnelle des aliments par l'oxydation des acides gras insaturés qui sont les plus susceptibles, les matières grasses oxydées entraînent aussi des risques pour la santé du consommateur suite à la formation des radicaux libres qui favorisent le développement de certaines maladies telle que l'artériosclérose [6], et des produits secondaires volatils de l'oxydation. Parmi ce groupe d'acides gras insaturés se trouvent les molécules bioactives de la famille des n-3 et n-6, qui sont des acides gras

polyinsaturés. L'ampleur de ce problème a poussé les chercheurs à élucider les mécanismes de l'oxydation afin de mieux appréhender ce problème.

Parmi les facteurs influençant l'oxydation des graisses, la température a été rapportée comme un agent intéressant, peut entraîner la dégradation thermique des aliments. Il s'agit de phénomènes très complexes, agissant principalement sur les acides gras insaturés même si le cholestérol et d'autres composés insaponifiable peuvent aussi s'oxyder. En effet, la thermo-oxydation des lipides entraîne l'apparition de composés secondaire polymérisés très dangereux pouvant engendrer plusieurs pathologies [7]. Il est donc apparu important de déterminer l'ampleur des dégradations subies par les lipides lors de traitement par température. Plusieurs méthodes ont été appliquées dans le cadre de ces études.

Dans les huiles et la matière grasses, les AGPIs se trouvant sous formes libres sont oxydés plus rapidement que ceux sous forme liées, tel que: les triglycérides, lorsqu'ils sont exposés séparément à certains variables affectant la stabilité oxydative des lipides. Par ailleurs, il a été rapporté que les AGPIs n-3 sont plus vulnérables à l'oxydation que les AGPIs n-6. Cette susceptibilité est dépendante de leur degré d'insaturation et des autres différents composés contenus dans les aliments.

Les AGPIs sont assez répandus dans les produits alimentaires incluant les produits végétaux. L'huile d'olive constitue un des principaux aliments fournissant les AGPIs. En effet, l'acide oléique (AGMI) et l'acide linoléique (AGPI n-6) sont les principaux composants d'acide gras d'huile d'olive. De nombreuses recherches sur la valorisation des sources d'oméga-3 et-6 ont été entreprises par les chercheurs [3,8].

Les résultats actuellement disponibles sur l'oxydation des acides gras sous l'effet de la température ont été obtenus à partir des plusieurs types de lipides alimentaires. Cependant, la quantification des acides gras des huiles extraits de fruits d'olivier d'origine d'El-Oued (sud-est algérien) et de leurs stabilités oxydatives face à la température n'ont pas fait l'objet de recherches. Ainsi, les méthodes les plus couramment utilisées et les plus appropriées à ce jour pour quantifier les acides gras, sont les méthodes chromatographiques qui se révèlent les méthodes de choix, malgré quelles présentent un certain nombre d'inconvénients tel que la consommation du temps. D'autres techniques permettant d'analyser les acides gras et de comprendre le

phénomène de dégradation lié à l'oxydation ont fait l'objet de notre étude, c'est la voltammétrie impulsionnelle qui a été développées dans notre recherche.

C'est pour cette raison que cette étude prend toute son importance, en ce sens qu'elle est consacrée à la valorisation des olives locales. Cette valorisation consiste à quantifier les acides gras polyinsaturés d'oméga-3 et -6 et encore d'évaluer leurs stabilités à l'oxydation thermique afin de mettre en évidence leurs importances sur le plan nutritionnel et pharmaceutique. De ces objectifs, le plan de la thèse sera comme suit:

Le manuscrit est subdivisé en deux parties: la première partie, intitulé « **Synthèse bibliographique** », subdivisé en deux chapitres, portant sur la problématique de la recherche et résume les connaissances actuelles sur les huiles et les graisses alimentaires, de même que les méthodes d'oxydation, et plus particulièrement la thermo-oxydation, afin de comprendre le rôle de la température sur l'insaturation des acides gras. Le chapitre I de cette partie intitulé, « **Lipides alimentaires** », résume la classification systématique des lipides, avec une vue d'ensemble des classes de lipides les plus utilisées dans l'industrie agroalimentaire et surtout qui renferme les acides gras polyinsaturé d'oméga-3 et-6. Quant au deuxième chapitre, intitulé « **Dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés** », elle met en évidence les différentes manières de dégradation des acides gras polyinsaturé observés au niveau des aliments et les facteurs intervenant dans leur déroulement. Elle décrit également les réactions impliquées dans ces phénomènes de détérioration ainsi que les différents produits formés. Les méthodes d'analyse des acides gras et les tests de contrôle de l'oxydation des corps gras insaturés ont aussi été présentés. Suite à la synthèse bibliographique, les hypothèses, buts et objectifs de recherche sont posés.

Les différents matériels et méthodes sont présentés dans le chapitre III , qui a pour titre « **Matériels et méthodes** ». Ce chapitre porte sur l'étude de la composition en acides gras insaturés des différents échantillons de corps gras, de même leurs stabilités à l'oxydation sous l'effet de la température. Après extraction, les échantillons frais et préchauffé ont été analysés en utilisant des techniques chromatographiques et électrochimiques. L'analyse des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés sous l'effet de la température a été investiguée par la méthode spectrophotométrique. Le quatrième chapitre, « **Résultats et discussion** », rassemble tous les résultats obtenus et leurs discussions qui ont donné lieu à la rédaction de

publications. Ces deux derniers chapitres constituent la deuxième partie de cette thèse, qui est la **partie expérimentale**.

En **conclusion générale et perspectives**, nous énumérons les résultats obtenus à travers cette étude et les principales perspectives envisagées à la poursuite des recherches dans ce domaine.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Lipides alimentaires

I. Lipides alimentaires :

I.1. Généralités :

Les matières grasses sont souvent caractérisées par leur teneur élevée en lipides et sont le représentant exclusif des graisses dites visibles, par opposition aux graisses cachées [9]. Souvent décriées, les matières grasses (MG) sont essentielles à la vie, et leur bon usage est avant tout une question d'équilibre et de choix. Elles doivent représenter 30 à 35% de nos apports alimentaires, et leurs bénéfices sont apportés en partie par le choix judicieux que nous devons faire en les sélectionnant. En effet, une consommation lipidique trop riche en acides gras saturés nuit à la santé, tandis que les bénéfices des acides gras polyinsaturés, en particulier des omégas 3, et mono-insaturés ont été largement démontrés. Le raccourci qui consiste à condamner les matières grasses de l'alimentation au profit d'un mieux-être est une grave erreur. Les matières grasses sont indispensables au bon fonctionnement de notre organisme, seul le choix de leur origine garantit leurs qualités [10].

I.2. Définition :

Le terme « lipides » pris dans son sens actuel recouvre des substances appelées communément corps gras, huiles, graisses, cires, et bien d'autres composants cellulaires plus cachés qui ont tous en commun leur hydrophobie, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme ou le benzène [11-13]. Les lipides répondant à cette définition furent également définis comme des substances naturelles, fossiles ou actuelles, ayant une chaîne carbonée, linéaire ou cyclique, d'au moins dix atomes de carbone. Il est certain que les lipides ne peuvent être définis uniquement comme des substances naturelles ayant un haut degré de solubilité dans les solvants organiques. Nous savons aujourd'hui que certains lipides à part entière sont bien connus pour être partiellement hydrosolubles (gangliosides, phosphoinositides...) tandis que d'autres composés chimiques uniquement constitués d'acides aminés s'avèrent solubles dans le chloroforme [11].

Les corps gras peuvent se présenter sous deux formes:

- ✓ les huiles liquides ;
- ✓ les graisses solides.

On différencie les huiles des autres graisses par leur point de fusion. Les huiles sont des corps gras liquides à la température de 15 °C, tandis que les graisses sont plus ou moins solides à cette température (on dit aussi concrètes). Peut être désignée sous le nom de « graisse » suivie de l'indication de la matière animale ou végétale d'où la graisse est extraite toute matière comestible et solide à la température de 15 °C, vendue à l'état pur.

Le terme graisse, sans autre qualificatif, est réservé à la graisse de porc ou saindoux, toutes les autres graisses devant être désignées en complétant le mot graisse par un qualificatif: « végétale » si elle provient de fruits ou graines, « animale » si elle provient des animaux, « comestible » ou « alimentaire » s'il s'agit d'un mélange [14].

Les lipides, qui sont les macronutriments les plus énergétiques (1 g fournit 9 kcal) [10], sont présents dans les aliments sous deux formes [9,10,15]:

❖ **Graisses visibles**, sont à la fois celles qui sont ajoutées aux mets ou individualisées dans un aliment et celles que l'on peut séparer et donc mesurer aisément, telles que les huiles, le beurre et les margarines ; ils sont utilisées pour l'assaisonnement ou la cuisson [12].

❖ **Graisses cachées ou invisibles** qui correspondent à la matière grasse naturellement présente dans les aliments (viandes grasses, poissons gras...) et à la matière grasse ajoutée dans les préparations artisanales ou industrielles (viennoiseries, biscuits...) [10]. Une des causes essentielles de l'excès d'apport en lipides est la consommation trop importante de graisse cachée dans les plats industriels ou artisanaux prêts à consommer, dans certaines viandes et dans des fromages gras riches en acides gras saturés. D'autres produits alimentaires ont une forte teneur lipidique, et donc calorique, comme les: chips ; frites ; cacahuète, noix de cajou... ; pâtisseries, biscuits, gâteaux, viennoiseries ; chocolat [16].

Les acides gras qui constituent ces lipides peuvent être saturés (acides gras saturés, AGS), mono-insaturés (acides gras mono-insaturés, AGMI) ou polyinsaturés (acides gras polyinsaturés, AGPI) [10].

I.3. Origine :

Les corps gras, par définition riches en lipides, sont classés à la fois selon leur origine (animale, végétale, ou mixte) et selon leur consistance [17]. Dans l'alimentation, on distingue classiquement les corps gras d'origine animale et ceux d'origine végétale,

mais un certain nombre de margarines et assimilés peuvent être mixtes. Dans chaque catégorie, on distingue aussi les émulsions qui sont un mélange eau/huile – et les huiles ainsi que les graisses concrètes qui ne contiennent pas d'eau [9].

I.3.1. Corps gras d'origine végétale :

Ce sont des corps gras issus de pulpes de fruits ou des graines d'oléagineux [17]. Elles comprennent les huiles (fluides et graisses concrètes) et les émulsions (margarines et matières grasses composées) [9,14]. Les huiles ainsi que les graisses concrètes contiennent 100% de lipides. Ce sont pour les huiles des matières grasses fluides car leur point de fusion est bas, ce qui témoigne d'une prédominance d'acides gras insaturés, tandis que les graisses concrètes ont un point de fusion élevé et sont donc solides à température ambiante, ce qui témoigne d'une teneur élevée en acides gras saturés. Le point de fusion est d'autant plus bas que la teneur en acides gras insaturés est élevée et que le nombre de doubles liaisons est grand. À l'inverse, il est d'autant plus élevé que le nombre de liaisons saturées est élevé [9].

I.3.1.1. Graisses concrètes :

Les graisses dites concrètes ne deviennent fluides qu'à une température élevée parce que leur teneur en AGS est considérable (92% pour l'huile de coprah, 81% pour l'huile de palmiste et 52% pour l'huile de palme) avec une prédominance d'acide palmitique et stéarique. Les huiles de palme et de palmiste proviennent respectivement de la pulpe et de la noix du palmier à huile, tandis que l'huile de coprah provient de la noix de coco [9,15]. Les graisses concrètes « pauvres » en acides gras insaturés sont très stables au chauffage et à l'oxydation. C'est un des intérêts de leur usage. En outre, l'huile de palme a permis de réduire le recours aux matières grasses végétales partiellement hydrogénées et donc à la consommation d'acides gras trans qui en sont issus [9].

I.3.1.2. Huiles fluides :

Leur composition en acides gras estimée par un profil en acides gras par chromatographie en phase gazeuse permet de les caractériser très précisément. Fluides, elles sont toutes pauvres en acides gras saturés, la plus riche étant l'huile d'olive avec 15%, ce qui précisément la rend moins fluide [9].

On peut distinguer les huiles selon les AG qui les composent : AGPIS (acide linoléique), tels que les huiles de tournesol, maïs, soja, pépin de raisin, argan, carthame; AGMIS tels que olive, arachide, colza, sésame ; acide α -linoléique tels que colza, noix, germe de blé, soja et lin. Les huiles sont aussi une source de vitamine E, d'autant plus élevée que la teneur en acides gras polyinsaturés est grande, ce qui leur fait jouer un rôle antioxydant vis-à-vis des doubles liaisons, proportionnelle à leur teneur en AGPIS, et leur conférant un rôle antioxydant. Les proportions de tocophérols et de tocotriénols (huit isomères) sont différentes selon les huiles [9,15].

Les huiles contiennent, lorsqu'elles sont vierges, un insaponifiable important, c'est-à-dire une partie ne pouvant pas générer de savons (acides gras + base) et donc ne contenant pas de lipides mais comportant une multitude de molécules extrêmement diverses : polyphénols, phytostérols, caroténoïdes, terpènes, hydroxytyrosol... Les huiles d'olive, d'argan, de noix vierges en sont particulièrement riches. Cet insaponifiable confère aux huiles des propriétés particulièrement intéressantes en termes de santé, de protection cardiovasculaire et peut-être vis-à-vis des cancers. Ceci a été largement étudié pour l'huile d'olive et l'huile d'argan [9].

Le bon usage des huiles consiste à privilégier les huiles riches en acide α -linoléique, telles que les huiles de colza et de noix pour l'assaisonnement, d'autant qu'elles sont plus sensibles à la cuisson (bien qu'aujourd'hui leur chauffage en friture plate soit autorisé), et de choisir des huiles riches en acides gras mono-insaturés telles que l'olive pour la friture plate, l'arachide pour la friture profonde. La cuisson répétée à haute température peut altérer la composition des huiles peu robustes : perte de la vitamine E, altération des AGPIS, apparition de composés nouveaux tels que les AG oxydés et les polymères cycliques. Les huiles de palme, d'arachide et d'olive sont les plus résistantes à la chaleur [9,15].

I.3.2. Corps gras d'origine animale :

Ils sont solides à température ambiante parce qu'elles sont riches en AGS (lard et saindoux, gras de bœuf, suif du mouton, beurre). Leur teneur en lipides est variable, aux alentours de 70 à 95% [15]. Ils se classent en [14]:

- origine maritime: graisses et huiles de mammifères marins (baleine, cachalot) et de poissons (sardines, hareng...);

- origine terrestre: graisses de mouton, de bœuf (suif), de cheval, de porc (saindoux), d'oie ;
- corps gras élaborés: le beurre .

La caractéristique commune des graisses animales est leur grande richesse en acides gras saturés. Il en résulte une grande stabilité au cours de la friture. Ces graisses riches en acides gras saturés favorisent l'élévation du taux de cholestérol. Toutes ces graisses sont dures à 20 °C du fait de leur haute teneur en acides gras saturés. Les « huiles » d'animaux marins, liquides à température ambiante, ne sont pas consommées telles quelles. Elles sont riches en vitamines D (210 µg pour 100 g) [14].

I.3.2.1. Corps gras provenant de la chair animale :

Les corps gras provenant de la chair animale, saindoux, suif, gras de bœuf, graisse de cheval, graisse de canard et d'oie (voire graisse de phoque ou de baleine autrefois pour les Esquimaux) sont issus de la graisse sous-cutanée (ou sous la peau), ou de la graisse périmusculaire des animaux terrestres ou marins.

C'est la nature des lipides et donc des acides gras qui est importante à considérer. Le suif, la graisse de bœuf, de cheval, le saindoux sont riches en acides gras saturés (49%) alors que les graisses de canard, d'oie sont riches en AGMIs (54%), et que la graisse de poisson est riche en AGPIs- oméga- 3. Ils sont issus de tissus adipeux, de graisses sous cutanée, ou d'organes. Ces corps gras sont riches en cholestérol. Ils supportent bien le chauffage [9,15,17].

I.3.2.2. Corps gras provenant de la matière grasse laitière :

Il s'agit de la crème fraîche et du beurre. La matière grasse laitière contient 60% d'acides gras saturés, 35% d'acides gras mono-insaturés, 5% d'acides gras polyinsaturés avec un rapport oméga 6/oméga 3 de 2,4 très favorable même si les valeurs absolues sont modestes.

Au total, la graisse laitière comprend plus de 400 acides gras différents, dont l'acide butyrique caractéristique de la graisse laitière, les acides myristique, laurique, palmitique et stéarique (saturés), mais aussi oléique (mono-insaturé), linoléique et alpha-linolénique (essentiels), trans-vaccénique et ruménique (CLA). La composition en acides gras dépend en faible partie de l'alimentation animale et de la saison [9].

- **Beurre :**

Il s'agit aussi d'une émulsion, qui d'un point de vue réglementaire contient au moins 82% de lipides, la phase non grasse étant constituée d'eau et de très peu de lactose, de protéines, vitamines A et D. La teneur maximale en eau autorisée étant de 16%. Le beurre est obtenu après barattage de la crème du lait, suivi d'une maturation, d'un refroidissement [9,14]. La crème est obtenue par centrifugation du lait. On obtiendra d'un côté la crème et de l'autre un lait écrémé. Il y a ensuite une fermentation acide de la crème, sous l'action de microorganismes. Le barattage sépare la matière grasse du liquide dans lequel elle se trouve en émulsion. Le liquide restant est le babeurre. Les globules de matière grasse sont lavés. Ils sont ensuite malaxés pour obtenir une homogénéisation du beurre et chasser l'eau en excès. Le beurre est enfin conditionné.

Il existe différentes qualités de beurre, selon les lieux et les processus de fabrication [14]:

- beurre fermier: fait à la ferme, avec des crèmes crues, il s'altère rapidement;
- beurre laitier: fabriqué en usine, sa conservation est meilleure;
- le beurre extra fin doit être fabriqué au plus tard 72 heures après la collecte du lait ou de la crème;
- beurre pasteurisé: la crème est d'abord pasteurisée à 95 °C; il est fabriqué dans des usines agréées par le ministère de l'Agriculture dont le contrôle est permanent;
- beurre demi-sel: il contient plus de 0,5 g de chlorure de sodium/100 g et moins de 2 g ;
- beurre salé: il contient ≤ 2 g de chlorure de sodium/100 g;
- le beurre tendre reste tendre à la sortie du réfrigérateur. Ce n'est pas un beurre allégé. Sa composition est la même qu'un beurre ordinaire ;
- le beurre concentré est dépourvu de sa partie eau ; il est surtout utilisé en collectivité;
- les beurres allégés et les spécialités laitières à tartiner sont préparés en ajoutant des émulsifiants et de l'eau aux corps gras;
- les « beurres allégés » apportent de 41% à 62% de matières grasses d'origine laitière.
- les spécialités laitières à tartiner apportent de 20% à 41% de matières grasses d'origine laitière.

Les triglycérides du beurre contiennent des acides gras saturés à chaînes longues dont surtout l'acide palmitique (20 à 30%) et l'acide stéarique (10%); des acides gras à chaînes courtes, de 4 à 10 carbones (10%) dont un tiers d'acide butyrique, une quantité restreinte d'acides gras essentiels (acides linoléique, 1,5% ; linoléinique, 0,5% ; arachidonique, 0,4%) [14].

Bien sûr, le beurre est une source de cholestérol alimentaire (environ 250mg/100g) mais aussi de vitamine A (1mg/100 g), dont c'est la source majoritaire, et de vitamine D en petite quantité. Son point de fusion est de 35 °C ce qui lui confère un fondant idéal en bouche. Son usage cru et fondu ne pose pas de problème. Lorsqu'il est chauffé et donc cuit, des oxystérols apparaissent [9].

Sa digestibilité, lorsqu'il est sous forme d'émulsion, est particulièrement bonne. C'est la raison pour laquelle il doit être consommé cru ou ajouté en fin de cuisson. En effet, au cours d'un chauffage prolongé, d'une part l'émulsion est détruite, ce qui diminue la digestibilité et d'autre part il apparaît des peroxydases et de l'acroléine qui sont irritants.

Les beurres peuvent être légalement colorés par les colorants suivants : curcumine, lactoflavine, cochenille, indigotine, chlorophylles, caramel, carbomedicinalis vegetalis, caroténoïdes, xantophylles, rouge de betterave, anthocyanes et uniquement par ceux-ci [14].

- **Crème fraîche :**

C'est une matière grasse dérivée du lait de vache. Elle est obtenue après écrémage du lait entier. Sa teneur en lipides est naturellement de 33% dont 20 g d'acides gras saturés, 9 g d'acides gras mono-insaturés, 1g d'acides gras polyinsaturés pour 100 g. Elle renferme une part non négligeable de vitamine A (304µg pour 100g). Il existe de la crème épaisse et de la crème liquide appelée fleurette. La consistance n'a rien à voir avec le taux de matières grasses. C'est la maturation par ferments lactiques qui entraîne un épaississement de la crème et une acidification. Une crème liquide et douce est une crème qui n'a pas mûri [9,14].

On décline aujourd'hui des crèmes fraîches allégées à 15%,12%, 10% voire 8% [9] et à 5% de matières grasses [14]. L'arôme dépend en partie de la phase grasse et des protéines même présentes en petite quantité : l'allégement le diminue. La crème fraîche contient en outre un peu de lactose, de protéines, de calcium et de vitamines D [9].

I.3.3. Corps gras mixtes :

Ce sont des huiles végétales hydrogénées comme la margarine, par exemple, mais aussi certaines huiles de poisson ou shortening issus de mélange pour des fritures profondes dans l'agro-alimentaire. Les corps gras durs sont en fait riches en acides gras saturés, soit par leur composition naturelle, soit par hydrogénation. À l'inverse, les corps gras fluides à température ambiante sont riches en acides gras insaturés.

I.3.3.1. Margarines et matières grasses composées et à teneur lipidique réduite :

- **Histoire :**

La margarine est une invention (1869 expo universelle de Paris) destinée à remplacer le beurre ordinaire pour la marine et les classes sociales peu aisées. Ce produit devait avoir un prix de revient modique et être capable de se conserver, sans contracter ni goût acide ni odeur forte, plus longtemps que le beurre. Son nom issu du grec « margaritas » signifiant « perle ». Quelques années plus tard, un brevet est déposé et la commercialisation à grande échelle de la margarine commence [14,17,18].

Les premières margarines étaient composées d'une émulsion de graisses animales et marines, d'eau ou de lait. Ces graisses ont ensuite été remplacées par des graisses de palme, de coprah et de palmiste. En 1920, on découvrit l'hydrogénation, moyen de solidifier les huiles. À l'heure actuelle, on peut utiliser les huiles de tournesol, de soja, de maïs, de colza, de pépins de raisin et d'olive [14].

- **Définition :**

Elles sont à 99% d'origine végétale, mais il faut savoir que la législation définit comme Margarine « Toutes les substances alimentaires autres que le beurre, quelles que soient leur origine, leur provenance et leur composition, qui présentent l'aspect du beurre et sont préparées pour le même usage que ce dernier produit, ne peuvent être désignées que sous le nom de margarine, ou de « pâte à tartiner » [14,17].

Les margarines sont des corps gras alimentaires se présentant sous la forme d'une émulsion du type eau dans l'huile ou les graisses animales ou végétales, mais le lait remplace souvent l'eau [14,17,18].

- **Composition :**

Elles comportent:

* une partie grasse (82%) qui comprend selon les cas : des huiles végétales fluides hydrogénées partiellement, des graisses végétales telles quelles ou hydrogénées, des huiles et graisses animales et marines en général hydrogénées; il n'est pas rare de trouver trois, voire plus, de corps gras mélangés en proportion judicieuse dans les phases grasses des margarines ; pour les margarines dont la dénomination comprend le nom de l'huile particulière comme « margarine au tournesol », on retrouve majoritairement, mais non exclusivement, l'huile citée ;

* une partie aqueuse qui est de l'eau et ou du lait: 16% ;

* éventuellement du sucre pour mieux dorer les aliments à cuire; un révélateur obligatoire (fécule ou amidon) qui permet de différencier facilement la margarine du beurre [14];

* Elle contient également de nombreux additifs, en quantité variable selon les produits : un peu de sel, des arômes et d'émulsifiants de synthèse, ainsi que des conservateurs (sorbate de potassium, acide citrique), des acides naturels pour la saveur, des colorants naturels (carotènes); et des antioxydants [14,17,18].

* on peut également ajouter des vitamines A et E (l'adjonction de vitamine A est obligatoire dans les margarines à teneur garantie en acides gras essentiels et dans les margarines allégées et interdites dans les margarines traditionnelles). L'ensemble des additifs ne dépasse pas 2% [14].

- **Différentes margarines :**

Tout comme le beurre, les margarines se déclinent en différentes teneurs en matières grasses, et dénominations. On y trouve les margarines qui classiquement ne contiennent pas de beurre ou de matière grasse animale (moins de 10% d'acide butyrique) et ont une teneur en lipides de 82%. Ce type de produit disparaît, car la plupart sont à teneur lipidique réduite. Beaucoup sont mixtes, c'est-à-dire des matières grasses composées avec des matières grasses d'origine végétale et animale.

Il faut savoir que, pour fabriquer un corps gras « solide » (en barquette) à partir d'huiles (fluides), plusieurs techniques existent. Elles consistent toutes à augmenter le pourcentage d'acides gras saturés aux alentours de 25 à 30% pour élever le point de

fusion afin de rendre le produit solide à température ambiante, condition nécessaire à leurs usages culinaires [9].

Margarines courantes dures :

Elles sont plus particulièrement destinées à la cuisson et à la pâtisserie (ménagère ou industrielle). Les graisses employées sont souvent les graisses de palme, de coprah, de palmiste en mélange. Elles sont riches en acides gras saturés et sont de ce fait dures à la sortie du réfrigérateur. Elles se présentent sous emballage papier ingraissable [14].

Margarines tartinables :

Elles sont toujours moelleuses et conditionnées dans des barquettes en plastique. Elles se consomment crues ou cuites mais pas en friture et tirent leurs propriétés des différentes huiles employées. D'une façon générale, elles sont composées de mélanges variables d'huiles: huiles concrètes (palme, coprah, palmiste), huile de tournesol, de maïs, de colza, d'olive, de pépins de raisin. La présence d'huiles concrètes ou l'hydrogénation partielle des huiles suffit à les transformer en matières grasses solides.

Margarines riches en oméga 3 :

L'huile utilisée est l'huile de colza, en mélange avec une autre huile (tournesol) et des huiles concrètes (palme, palmiste, coprah) pour la texture [14].

Les margarines présentées en barquette obtenues à partir d'huiles dont le pourcentage d'AGPIs a été augmenté par diverses techniques sont nutritionnellement plus intéressantes. Certaines d'entre elles sont enrichies en AG n-3 (oméga 3) dans le cadre d'une allégation santé [15]. Des teneurs en acides gras oméga 3 intéressantes, leur conférant un rapport oméga 6/oméga 3 bas. Le chauffage, en friture plate, des margarines riches en oméga 3 n'entraîne pas de dégradation importante de ces acides gras.

Margarines enrichies en phytostérols :

Les phytostérols sont des composés présents en faibles quantités dans les huiles végétales, les fruits, les légumes, les noix et les graines. Leur structure chimique est proche de celle du cholestérol. L'ajout de certains composés, et notamment de phytostérols, est proposé dans certaines margarines afin de contribuer à faire baisser le cholestérol (effet hypocholestérolémiant): Ils bloquent l'absorption du cholestérol dans

l'intestin grêle, cholestérol qui est ensuite éliminé avec les phytostérols par voie digestive. Pour un apport maximum de 3 g/jour (limite de précaution), dans le cadre d'un régime adapté, les phytostérols entraînent une réduction du taux de LDL cholestérol sans modifier le HDL. Mais en termes de risque cardiovasculaire les études sont contradictoires : la dose supra-nutritionnelle en phytostérols pourrait augmenter le risque car l'alimentation apporte quant à elle 300 mg de phytostérols.

Margarines allégées :

Elles sont composées des mêmes graisses que les autres et contiennent de 41 à 62% de matières grasses. Moins ces margarines sont riches en graisses, plus elles sont riches en eau [14]. Quand elles contiennent de 20 à 41% de matières grasses, elles sont appelées pâtes à tartiner à teneur en lipides réduite.

Margarines liquides :

Il existe des margarines liquides pour la cuisson qui ne provoquent pas d'éclaboussures : Exemple de composition pour 100 g :

- Lipides: 74 g
- Acides gras saturés : 8 g
- Acides gras monoinsaturés : 44 g
- Acides gras polyinsaturés : 22 g
- Dont oméga 6 : 14,5 g
- Oméga 3 : 6,3 g
- Rapport oméga 6/oméga 3 : 2,3
- Acide gras trans /1 g

Acides gras trans :

Les acides gras trans des margarines sont le résultat du traitement par hydrogénation des huiles végétales fluides ce qui les transforme en margarine. En termes de risque cardiovasculaire, ces acides gras trans se comportent dans l'organisme comme des acides gras saturés. Mais les industriels ont su résoudre ce problème en effectuant une hydrogénation sélective et partielle de telle sorte que la quantité d'acides gras trans ne dépasse pas 1 g pour 100 g de produit.

I.4.Utilisation des lipides : d'assaisonnement ou de cuisson

Température critique des corps gras [14]:

- beurre: 130 °C ;
- margarine dure: 140 °C ;
- huile combinée: 180 °C ;
- huile de tournesol et de maïs: 180 °C ;
- huile d'olive et d'arachide: 210 °C ;
- huile concrète: 220 °C.

Usage :

- cru et fondu: margarines tartinables, beurre ou crème fraîche;
- assaisonnement: toutes les huiles et les mélanges d'huile, en préférant les huiles riches en oméga 3 que l'on ne peut pas chauffer ;
- cuissons: toutes les margarines (ne pas trop les chauffer) et les huiles (certaines margarines allégées ne peuvent être chauffées car elles contiennent trop d'eau) riches en acides gras saturés, ou matières grasses concrètes (huile de palme par exemple), peuvent contenir jusqu'à 10% de beurre, ou être d'origine totalement végétale, ou encore enrichies en vitamines A, E, et D, naturellement présentes dans les corps gras.
- fritures plates : huiles pauvres en oméga 3 (toutes, sauf huiles de colza, de soja et de noix);
- fritures profondes: huile d'olive ou d'arachide.

On peut utiliser aussi les graisses de palme ou la végétaline. La législation actuelle réserve à l'assaisonnement les huiles contenant plus de 2% d'acide linoléique ou d'oméga 6 (huiles de noix, de soja, de colza).

Les huiles pour friture et assaisonnement et contenant le plus d'acides gras polyinsaturés (huile de tournesol par exemple) doivent être utilisées en respectant une température inférieure à 180 °C et un nombre de bains limités à 8 [14].

L'étiquetage des huiles et matières grasses destinées exclusivement à la cuisson ou à la friture comporte la mention « réservé à la friture » ou « réservé à la cuisson ».

Lorsque les huiles peuvent être utilisées pour la friture profonde, l'étiquetage précise les conditions d'utilisation à respecter [14].

I.5. Classification des lipides :

Les lipides représentent un groupe hétérogène de structures très variées [12]. Ils sont constitués d'acides gras à chaîne carbonée plus ou moins longue dont l'estérification des fonctions alcool permet de synthétiser des lipides de composition variée : le glycérol est à la base des glycérides, la sphingosine des sphingolipides, le cholestérol des stéroïdes, etc [13]. Depuis les origines de la chimie organique, plusieurs tentatives ont été proposées afin d'aboutir à une classification unifiée et claire des diverses entités lipidiques, basée sur des paramètres physiques, chimiques. Plus tard, la complexité des molécules lipidiques sans cesse décrites conduira les auteurs à une plus grande unification de la classification. Pour tout cela, les auteurs ont adopté une classification distribuée en deux groupes [11,12]: les lipides simples ou homolipides : acides gras, esters d'acides gras et de glycérol (triglycérides), esters d'acides gras et de stérol (cholestérol) et les lipides complexes ou hétérolipides : phospholipides, glycolipides. Dans les aliments, les lipides sont présents essentiellement sous forme de triglycérides (90 à 95%). Le reste (5 à 10%) est représenté par les phospholipides et le cholestérol.

I.5.1. Lipides simples :

Par définition, les lipides simples ne sont formés que d'un ou deux constituants différents appartenant à la classe des lipides, dans le deuxième cas l'un d'entre eux peut appartenir à la classe des glucides ou à celle des acides aminés. Ils peuvent en plus porter un groupe chimique tel qu'un phosphate ou un sulfate. Ce sont des lipides généralement non polaires et neutres, sauf pour les acides gras libres. Ainsi, les lipides simples peuvent être scindés en deux groupes sur la base du nombre de constituants :

1. Lipides simples à un composé : Hydrocarbures, Acides gras, Dérivés d'acides gras, Alcools gras, Aldéhydes gras, Cétones grasses, Amino-alcools, lipides phénoliques et lipides simples prénylés.

2. Lipides simples à deux composés : Acylglycérols, Alkylglycérols, Aminolipides, Céramides, Cires, Cyanolipides, Esters et alkyléthers de stérols, Acyl-CoA, Glycolipides simples.

I.5.2. Lipides complexes :

Ils sont constitués d'au moins trois entités chimiques différentes (lipides simples et groupes polaires). De plus, ces lipides peuvent porter un groupe chimique tel qu'un

phosphate ou un sulfate, mais ceux-ci ne sont pas considérés comme discriminants dans cette classification. Parmi ces lipides, beaucoup sont glycosylés (les glycolipides), ils contiennent donc une partie glucidique plus ou moins complexe liée à l'un des autres composants lipidiques. Ils sont tous plus polaires que les lipides simples [11].

Les lipides complexes peuvent être scindés en trois groupes sur la base de leur structure [11]:

1- Phospholipides.

2- Aminolipides complexes.

3- Glycolipides complexes.

I.6. Nature et source des principaux lipides :

I.6.1. Acides gras :

I.6.1.1. Définition :

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques (R-COOH) constitués d'une chaîne hydrocarbonée, se présentent sous diverses formes moléculaires et caractérisée par :

- Monocarboxylique ;
- Nombre variable d'atome de carbone (de 2 à 36), le plus souvent en nombre pair ;
- Chaîne saturée (aucune double liaison) ou insaturée (de 1 à 6 doubles liaisons), qui sont le plus souvent de configuration *cis* (c'est-à-dire avec les 2 groupements méthylène (-CH₂-) du même côté de la liaison, par opposition aux doubles liaisons de configuration *trans*, pour lesquelles les groupements -CH₂- sont de côtés opposés) ;
- Chaîne linéaire, non ramifiée et non substituée, mais éventuellement et plus rarement,, la présence de groupements tels que des méthyles (-CH₃, acides gras ramifiés), des hydroxyles(-OH) ou des cyclopropanes.

Le terme d'acide gras ici, englobe les chaîne monoacides, saturées et insaturées, mais également plusieurs groupes de composés similaires avec des chaînes carbonées plus ou moins complexes et avec un ou plusieurs groupes fonctionnels supplémentaires. Mais parmi toutes les formes décrites dans le monde végétal, animal ou microbien , une vingtaine de forme seulement ont pris de l'importance en nutrition humaine et sont

communément rencontrés dans l'alimentation. Ils se trouvent principalement combinés dans d'autres lipides simples ou complexes mais sont parfois libres ou estérifiés par les alcools méthylique ou éthylique (arômes). La figure II.1 illustre les différentes structures des AG [1,11].

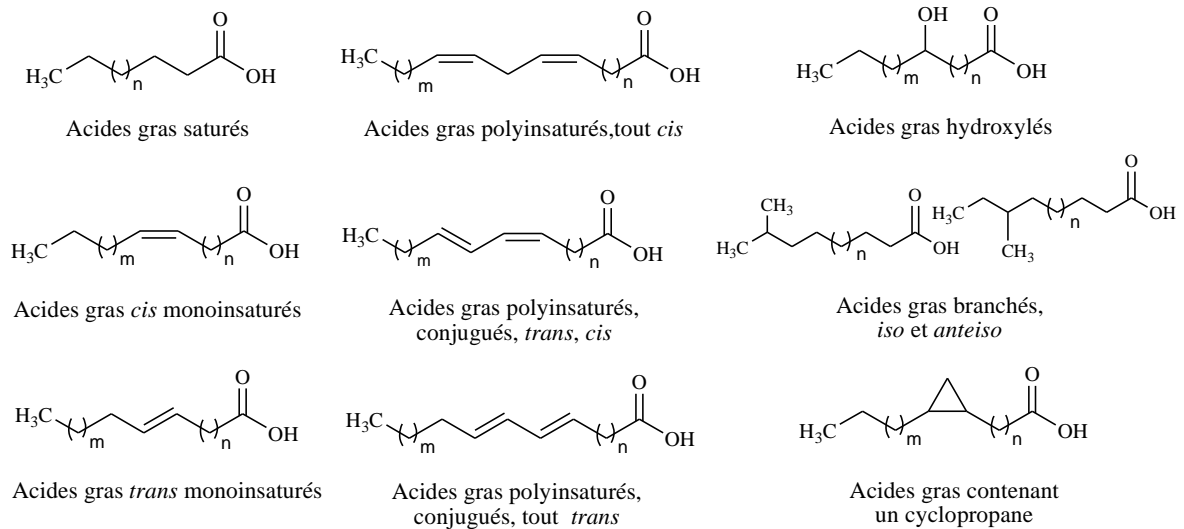


Figure 1.1. Structures de différents types d'acides gras [1].

I.6.1.2. Acides gras à chaîne linéaire :

Parmi les formes classiques à chaîne carbonée linéaire, on peut distinguer les acides gras saturés et les acides gras insaturés. Les premiers peuvent être scindés en catégories selon la longueur de leur chaîne, les derniers selon le nombre, la position et la configuration de leurs doubles liaisons.

I.6.1.2.1. Acides gras saturés :

Comme tous les acides gras naturels, les acides gras saturés ont presque toujours un nombre pair de carbone et ont pour formule générale : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{COOH}$, « n » étant le plus souvent compris entre 2 et 22 ; ils sont le plus souvent représentés par une notation telle que 18:0 pour l'acide gras saturé à 18 carbones (acide stéarique). Leurs propriétés physiques et physiologiques varient suivant la longueur de la chaîne carbonée. C'est ainsi que jusqu'à moins de 6 carbones, ces acides organiques, dits acides à chaîne courte, sont plus solubles dans l'eau et n'ont pas le même comportement nutritionnel que les autres puisqu'ils sont rapidement absorbés et peuvent même réguler les mouvements d'eau et de sodium dans l'intestin. Les acides gras ayant de 6 à 12 carbones sont appelés acides gras à chaîne moyenne car ils ont des propriétés

physiologiques particulières. Leur absorption et leur catabolisme sont plus rapides par rapport aux acides gras chaîne plus longue (de 14 à 24 carbones).

À côté des acides gras saturés à chaîne linéaire, des espèces à chaîne branchée sont également présents dans les lipides de certains types d'aliment. Ils n'ont aucun rôle énergétique, mais ont une certaine importance physiologique [11,19].

I.6.1.2.2. Acides gras insaturés :

Pour décrire ces acides gras en plus de leurs noms vernaculaires, il est indispensable de donner le nombre d'atome de carbone de la chaîne, le nombre, la configuration et la position des doubles liaisons. Il s'agit des noms systématiques des acides gras, recommandés par le système IUPAC. Dans le domaine nutritionnel, et comme l'allongement métabolique de la chaîne des acides gras s'effectue à partir de la fonction carboxyle, la nomenclature proposée par R.T. Holman en 1964, et actuellement la plus utilisée, compte les doubles liaisons à partir du groupe méthyle terminal. L'ordre donc n'étant pas modifié et ceci détermine la famille métabolique, notée par n-x (n étant le nombre total de carbones dans la chaîne, x étant la position de la première double liaison, côté méthyle). La position des autres doubles liaisons est déduite en ajoutant 3 à la précédente. Trois familles principales seront ainsi différenciées, les familles des acides gras n-9,n-6 et n-3, la première double liaison se trouvant respectivement au 9^e, 6^e ou 3^e carbone en commençant par le groupe méthyle. Aussi, les auteurs anglophones emploient la notation ω -x (oméga-x), représentant le carbone terminal à l'opposé du carboxyle, au lieu de n-x. Elle est la mieux connue des consommateurs. Cette nomenclature s'applique couramment pour les acides gras polyinsaturés à longue chaînes, comme par exemples les (ω -3) ou les (ω -6).

Les trois familles les plus importantes d'acides gras ont pour précurseurs l'acide oléique (18:1 ω -9), l'acide linoléique (18:2 ω -6) et l'acide linoléique (18:3 ω -3). À partir de ces trois composés, les autres acides gras les plus courants seront formés chez les animaux principalement par une suite d'allongements et de désaturations [1,19].

Une grande variété d'acides gras insaturés existe, formant ainsi des chaînes alcéniques (avec une ou plusieurs doubles liaisons) ou alcyniques (avec une ou plusieurs triples liaisons).

I.6.1.2.2.A. Acides gras à chaîne alcénique :

Les acides gras insaturés à chaîne alcénique peuvent être classés en acides gras mono-insaturés (monoènes) et polyinsaturés (polyènes).

- **Monoènes :**

Les acides gras mono-insaturés sont présents dans toutes les huiles végétales, le type le plus représenté étant l'acide oléique (Figure I.2), présent dans l'huile d'olive et les graisses animales (beurre et graisses diverses). Les formes les plus fréquentes ont un nombre pair de carbones, l'unique double liaison pouvant se trouver dans des positions diverses. De plus, cette double liaison peut se présenter sous formes d'une liaison Z (isomère cis) ou E (isomère trans).

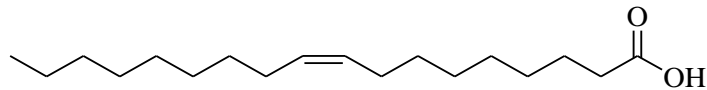


Figure I.2. Acide oléique (acide 9-octadécénoïque)

- **Polyènes :**

Les acides gras poly-insaturés offrent une grande variété de structures, ils ont de 2 à 9 doubles liaisons qui peuvent présenter plusieurs distributions le long de la chaîne carbonée. Cinq possibilités d'importance quantitative variable sont possibles :

- Les doubles liaisons sont séparées par un seul groupe méthylène : polyènes isoléniques ;
- Certaines doubles liaisons sont rapprochées (non séparées par un groupe méthylène) : polyènes conjugués ;
- Certaines doubles liaisons sont séparées par plusieurs groupes méthylène : polyènes irréguliers ;
- Certaines doubles liaisons ont une distribution allénique (deux sur un même carbone) : polyènes alléniques ;
- Trois doubles liaisons peuvent être consécutives (distribution cumulénique) : polyènes cumuléniques.

Polyènes isoléniques :

La distribution des doubles liaisons est la suivante : $-C - C = C - C - C = C - C -$

Les polyènes isoléniques les plus importants peuvent être scindés en trois séries d'acides gras métaboliquement non convertibles chez les animaux et ayant en commun du côté du méthyle terminal la structure suivante : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH} = \text{R}$, avec $x=1$ pour la série n-3, $x=4$ pour la série n-6, $x=7$ pour la série n-9 [11].

Acides gras d'oméga-9 :

Le plus important de ces acides gras n-9 est l'acide oléique (18:1 n-9), découvert en 1823 dans des graisses animales. Il est surtout abondant dans l'huile d'olive (60 à 70% du total) et trouvé majoritairement dans les glycérides. D'autres acides gras de cette famille sont présents dans l'alimentation mais leur faible concentration leur enlève toute signification nutritionnelle.

D'autres monoènes, présent dans les graisses animales, graisses de poisson et de mammifères marins, de même que dans certaines plantes, sont à signaler soit par la spécificité de leur distribution, soit par leur intérêt économique ou physiologique tels que : l'acide myristoléique (14:1 n-5), l'acide physétérique (14:1 n-9), l'acide palmitoléique (16:1 n-7), l'acide vaccénique (18:1 n-7), l'acide pétrosélinique (18:1 n-12) et l'acide gadoléique (20:1 n-11).

Acides gras d'oméga-6 :

L'acide linoléique (18:2 n-6), isolé dès 1844 de l'huile de lin, est sans conteste le représentant majeur des acides gras n-6. Il est très commun dans les graisses animales et constitue une part importante des huiles végétales. Les sources de cet acide gras essentiel pour l'homme, comme pour les autres animaux, sont tous les végétaux (feuilles, tiges, fruits), ou par leurs sous-produits (huiles). Il est le précurseur de toute la série n-6 formée par une suite de désaturations et d'élongations successives aussi bien chez l'homme que chez quelques végétaux.

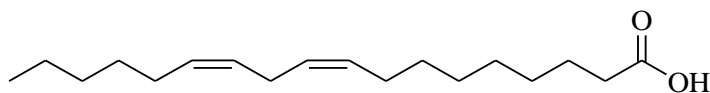


Figure I.3. Acide linoléique (acide 9,12- octadécadiénoïque).

- L'acide γ -linoléique (18:3 n-6) est le premier intermédiaire formé à partir de l'acide linoléique. Découvert dans les graines d'*Oenothera* (onagre), il est extrait actuellement de plusieurs familles végétales, dont les Boraginacés (Bourrache), Onagracés, Saxifragacés (Cassis) et de nombreuses propriétés thérapeutiques lui sont attribuées.

- L'acide dihomo- γ -linoléique (20:3 n-6) , dérivé naturel du précédent par élongation, n'est fourni dans l'alimentation humaine que par le lait maternel (maximum 0.01g/100g). Cet acide gras peut se transformer en eicosanoïdes de la série 1 qui contribuent à la protection des artères et du cœur, stimulent l'immunité et ont des effets anti-inflammatoires.
- L'acide arachidonique (20:4 n-6), dérivé du précédent par désaturation, est le plus important de cette série, puisqu'il est un constituant majeur des phospholipides membranaires chez les animaux. De plus, il est le principal précurseur d'une foule de molécules bioactives à activité de type hormonal, les eicosanoïdes.

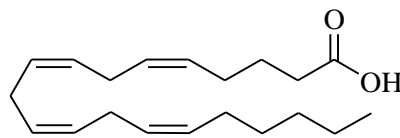


Figure I.4. Acide arachidonique (acide 5,8,11,14- eicosatétraénoïque).

Peu représenté chez les végétaux, sauf chez des microalgues et quelques champignons, il est abondant dans les tissus animaux. Cet acide gras est essentiel pour les animaux carnivores comme les félinés (chat, lion) qui ne peuvent le synthétiser à partir de l'acide linoléique.

Acides gras d'oméga-3 :

L'acide α -linoléique (18:3 n-3) (Figure I.5), découvert en 1887 dans l'huile de chanvre, est le membre type de cette série. Il est le précurseur de tous les représentants de la série n-3 formés par une succession complexe d'insaturation, d'élongation et d'oxydation. Comme caractéristique de la majorité des plantes, cet acide gras doit être obligatoirement trouvé par la majorité des animaux dans les productions végétales (feuilles, fruits, huiles).

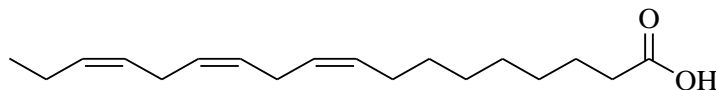


Figure I.5. Acide linoléique.

- L'acide stéaridonique (18:4 n-3) est produit par désaturation du 18:3 n-3 et se trouve principalement dans les graines de certaines plantes mais aussi dans l'huile de poisson.

- Signalons surtout l'acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3 ou EPA) et l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3 ou DHA), présents dans les algues unicellulaires marines, les huiles de poisson et les tissus nerveux.

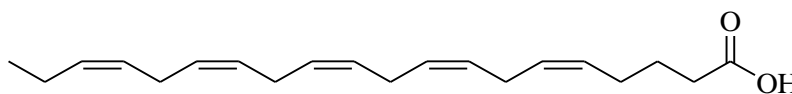


Figure I.6. EPA (acide 5,8,11,14,17- eicosapentaénoïque).

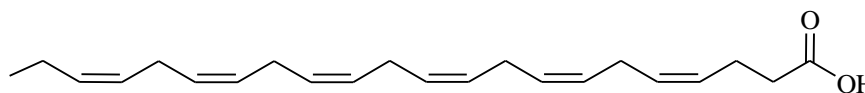


Figure I.7. DHA (acide 4,7,10,13,16,19- docosahexaénoïque).

Les huiles de poisson sont uniques par la présence d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans leurs molécules de triacylglycérol, comme le EPA et le DHA. Ils sont également présents dans les tissus des poissons sous forme de phospholipides membranaires. La raréfaction de la ressource halieutique et les contaminations des poissons par de nombreuses substances toxiques ont conduit à envisager une production de masse de ces acides gras à partir de plantes transgéniques, de micro-algues et même de bactéries marines [11,19].

I.6.1.2.2.B. Acides gras à chaîne alcynique :

Ces acides gras, appelés aussi acides éthynoïques, contiennent une ou plusieurs triples liaisons combinées ou non avec une ou plusieurs doubles liaisons. Peu d'espèces sont rencontrées dans la nature.

I.6.2. Acylglycérols :

Ces lipides majeurs dans l'alimentation sont chimiquement des triesters de glycérol, c'est pour cela qu'on les a aussi appelés triglycérides [19]. Les triglycérides sont composés d'une molécule de glycérol estérifiée par trois molécules d'acides gras (semblables ou différents). La structure des acides gras (AG) qui composent ces triglycérides peut être très variable. Ils peuvent différer par la longueur de la chaîne définie par le nombre d'atomes de carbone (AG à chaîne courte : < 8 atomes de carbone, à chaîne moyenne : < 12 atomes de carbone et à chaîne longue : > 12 atomes de carbone). Ils diffèrent également par leur degré d'insaturation. Cette dernière est définie par le nombre de doubles liaisons présentes dans la chaîne carbonée. On distingue les acides gras saturés (AGS), qui ne comportent pas de double liaison, les

acides gras mono-insaturés (AGMI), qui comportent une double liaison, et les acides gras polyinsaturés (AGPI), qui comportent deux ou plus de deux doubles liaisons [12]. Les triglycérides (TG) sont les molécules de réserve énergétique du tissu adipeux (TA). Leur synthèse se fait majoritairement dans le TA et un peu dans le foie (Figure I.8) [13].

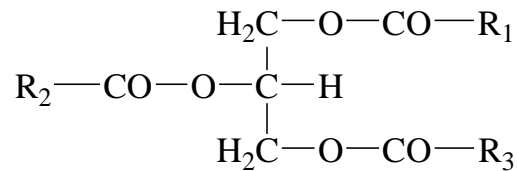


Figure I.8. Structure générale d'un triacylglycérol (R_1, R_2 et R_3 sont les chaînes d'acides gras).

I.6.3. Phospholipides :

Les phospholipides sont des lipides membranaires qui ont la particularité d'être amphiphiles. Ils possèdent un pôle hydrophile avec l'acide phosphorique qui a une forte polarité pour l'eau et un pôle hydrophobe [13,16]. Les phospholipides se trouvent dans les aliments sous forme de glycérophospholipides, qui sont des diglycérides dont le 3^e radical hydroxyle est estérifié par l'acide phosphorique, ou de sphingosylphospholipides, le plus abondant est la sphingomyéline où le glycérol est remplacé par la sphingosine qui possède une chaîne grasse très longue (Figure I.9) [13,19]. Partie intégrante des portions de viande, de laitage et d'œufs consommés par l'homme, ils sont constitutifs des membranes cellulaires, mais sont également présents sous forme de réserves dans le lait et le jaune d'œuf. Les végétaux contiennent également des phospholipides mais leur faible teneur dans les aliments (0.2% au maximum) réduit énormément leur intérêt nutritionnel, sauf sous forme de produits de supplémentation préparés à partir de quelques graines. Leur intérêt réside aussi bien du point de vue de leur contenu en acides gras que de leur composante non lipidique (tête polaire) [19].

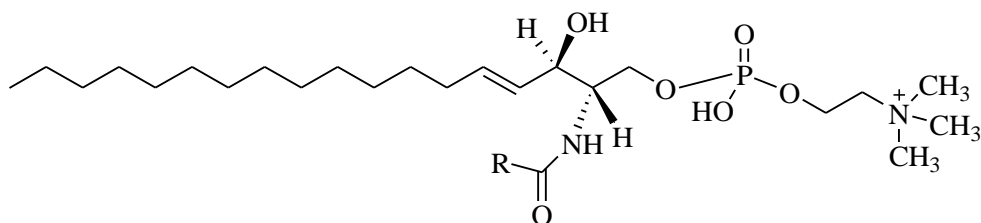


Figure I.9. Sphingomyéline (R est la chaîne carbonée d'un acide gras de 20 à 24 carbones).

I.6.4. Glycolipides :

Les glycolipides sont issus du remplacement d'un groupe phosphate par un sucre (glucose ou galactose) pour les cérébrosides et par des oligosaccharides complexes (l'acide N-acétylneuramine) pour les gangliosides. Situés à la face externe des membranes cellulaires, les glycolipides ont en partie une fonction de récepteur [14]. Les aliments d'origine animale contiennent une foule de glycolipides ayant une tête polaire plus ou moins diversifiée (globosides, glycolipides sulfatés ou phosphorés), les plus complexes étant les gangliosides. Chez les végétaux, la variété est moindre et représentée par des mono- et des oligohexosylcéramides contenant un ou plusieurs sucres (glucose, galactose, mannose, inositol), nombre d'entre eux sont phosphorylés.

Bien que de nombreux types de glycolipides existent dans les cellules animales et végétales, seul, le glucosylcéramide (Figure I.10), appartenant au groupe des glycosphingolipides et parmi les plus représentés, a fait l'objet de recherches nutritionnelles. Ce glycolipides, a une partie hydrophobe représentée par un céramide, comme dans la molécule de sphingomyéline, liée à une partie hydrophile représentée par un sucre , le glucose [19].

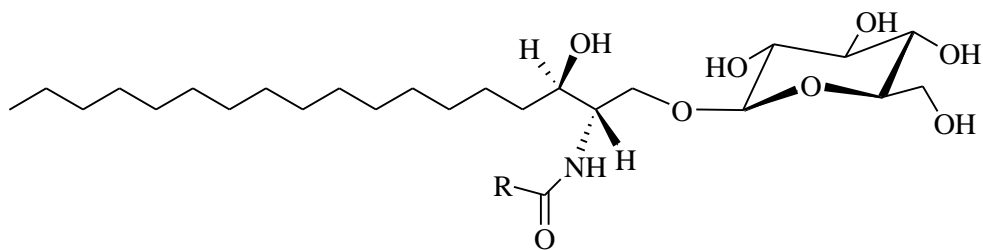


Figure I.10. Glucosylcéramide (R= chaîne de l'acide gras).

I.6.5. Cholestérol et phytostérols :

Le cholestérol (Figure I.11) et les phytostérols (stérols végétaux) appartiennent au grand groupe des stéroïdes. Ils dérivent métaboliquement du squalène , terpène commun aux règnes animal et végétal, et possèdent tous un noyau à quatre cycles, le noyau stérane (cyclopentanoperhydrophénanthrène).

Le cholestérol est le stérol majeur chez les animaux où il participe tel quel à l'édification des membranes cellulaires en leur assurant une certaine rigidité. Il est présent sous une forme estérifiée par un acide gras, l'ester de cholestérol, dans la plupart

des tissus et, notamment, dans le cerveau. Il est d'origine alimentaire et endogène par une synthèse principalement hépatique. À part quelques exceptions, le cholestérol est absent chez les plantes [13,19].

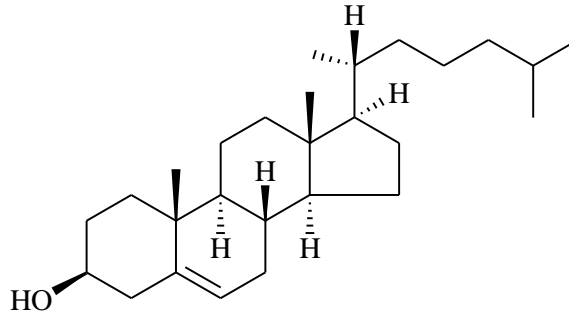


Figure I.11. Cholestérol.

Les phytostérols sont les stérols des végétaux, équivalents au cholestérol chez les animaux. Ils peuvent être divisés en deux groupes, les vrais phytostérols ou « Δ^5 -stérols » avec une double liaison en position 5 sur le noyau stérol, et les stanols ou « 5α -stérols » avec un noyau stérol entièrement saturé [19].

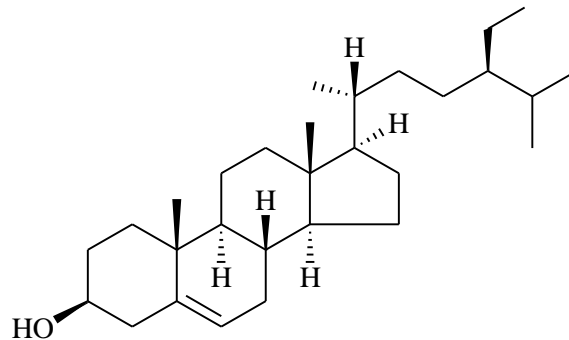


Figure I.12. β -sitostérol.

Parmi plus de 40 formes différentes de phytostérols, le plus important est le β -sitostérol (Figure I.12). Il est présent dans les membranes des cellules végétales mais on le trouve également dans de nombreuses huiles (maïs, germe de blé).

I.6.6. Vitamines liposolubles :

Les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, K) forment un groupe hétérogène de substances que l'on considère comme des lipides à part entière. Elles ont toutes été découvertes au cours du XX^e siècle comme des facteurs nutritionnels à l'origine de maladies carencielles. Certaines d'entre elles doivent provenir impérativement de l'alimentation, d'autres peuvent être biosynthétisées par l'homme après ingestion de

précurseurs ou par photoréaction cutanée. Leurs fonctions sont très variées et leur supplémentation s'avère progressivement très utile pour des actions thérapeutiques majeures, dont certaines d'entre elles restent encore à confirmer [19].

Les corps gras renferment les vitamines liposolubles A, D et E. La vitamine K est présente en faible quantité dans le beurre (< 50 µg pour 100 g). La vitamine A est plutôt concentrée dans les corps gras d'origine animale (beurre et huiles de poisson), la vitamine D dans les huiles de poisson, la vitamine E dans les huiles riches en polyinsaturés.

La vitamine E possède des propriétés oxydantes. Elle agit en particulier au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Les vitamines étant sensibles à la lumière, mieux vaut stocker ces huiles à l'abri de la lumière [14].

I.6.6.1. Vitamine E :

La vitamine E est un terme générique qui englobe au moins huit molécules de structures voisines (tocochromanols) qui peuvent être distribuées en deux groupes : quatre tocophérols, vitamine E à chaîne latérale saturée (Figure I.13), et quatre tocotriénols, vitamine E à chaîne latérale insaturée (Figure I.14). Tous ces composés sont spécifiques du monde végétal, source alimentaire essentielle pour l'homme.

Les tocophérols (Figure I.13) ont une chaîne phytyle (3 unités isoprénoïdes) entièrement saturée. Ils sont représentés par quatre formes (vitamères) différenciées par le nombre et la position des méthylation sur le noyau phénolique : l' α -, le β -, le γ - et le δ -tocophérol [19].

L' α -tocophérol est la forme la plus connue qui sert souvent à définir chimiquement et physiologiquement la « vitamine E ».

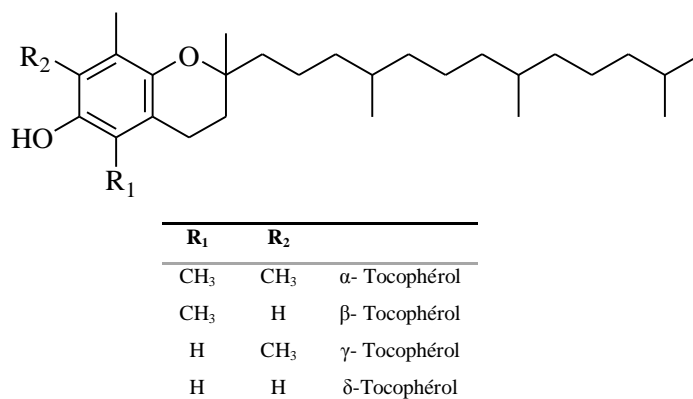
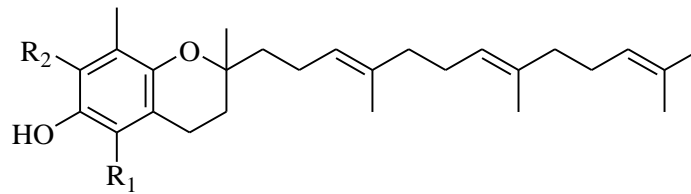


Figure I.13. Tocophérols.

Les tocotriénols (Figure I.14) ont une chaîne phytyle avec trois doubles liaisons. Comme pour les tocophérols, ils sont représentés par quatre formes différenciées par le nombre et la position des méthylations sur le noyau phénolique : l' α -, le β -, le γ - et le δ -tocotriénol.



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

Figure I.14. Tocotriénols.

Tous les composés formant le complexe de la vitamine E sont à des degrés divers de puissants antioxydants auprès des lipides cellulaires et circulants [19].

I.7. Productions végétales :

De nombreux végétaux, dont certains sont cultivés depuis la plus haute antiquité, ont été tout d'abord utilisés par l'homme pour couvrir principalement ses besoins énergétiques. Certains peuvent accessoirement être aussi utilisés depuis une période très récente pour l'obtention de lipides raréfiés tels que stérols, caroténoïdes ou vitamines.

Plus de 2000 plantes oléagineuses ont été répertoriées sur la planète, mais pas plus de treize font l'objet de productions à grande échelle et donc de commerce international, fournissant plus de 90% de la production mondiale d'huiles [19].

La production en 2009/2010 des principales huiles s'élève au total à environ 144 millions de tonnes et peut être classée en trois groupes. Le premier groupe est celui des sources végétales dépassant 10 millions de tonnes, le second rassemble celles comprises entre 2 et 5 millions de tonnes et le dernier regroupe les sources végétales inférieures à un million de tonnes mais présentant un intérêt alimentaire certain.

Le premier groupe des quatre huiles majeures (palme, soja, colza et tournesol) représente ainsi environ plus de 83% du total, les huit autres sources oléagineuses

constituant le reste (17%), 16% pour le deuxième groupe (coton, palmiste, arachide, olive, coprah, maïs) et environ 1 % pour le troisième (sésame, lin).

Les huiles végétales sont souvent classées en deux groupes en fonction de leur origine : les huiles de pulpe (palme, olive) et les huiles de graines (toutes les autres sources végétales).

I.7.1. Huile d'olive :

L'huile d'olive est le modèle le plus connu d'une production végétale, à la fois source de mythes sacrés, de lumière et de nourriture. Venue d'Asie mineure, elle accompagne typiquement les civilisations grecques, phéniciennes et romaines dans leurs expansions, que ce soit dans la culture de l'olivier, l'extraction de l'huile, sa conservation et son utilisation .

- ❖ **Origine** : cette huile est extraite principalement de la pulpe du fruit de l'olivier (*Olea europea*, Oleaceae). Cet arbre, caractéristique du pourtour méditerranéen, est connu depuis plus de 3000 ans en Europe mais doit son expansion à l'empire romain.
- ❖ **Composition** : l'olive contient environ 30% de son poids d'une huile caractérisée par une teneur élevée en acide oléique (de 53 à 80%) mais très basse en acide stéarique (18:0) (Tableau I.1). Trois espèces moléculaires de triacylglycérols dominant : OOO :39%, OOP : 21% et OLO :10%.

Les teneurs en tocophérols et tocotriénols sont faibles (<0.1 g/kg). La teneur en stérols est également très faible (0.1 g/kg en moyenne), le β -sitostérol étant l'espèce majeure.

Sa composition en acides gras et sa richesse en antioxydants (dérivés du tyrosol) lui confèrent une grande stabilité thermique, ce qui permet son emploi alimentaire même avec chauffage [19].

Tableau I.1. Composition en acides gras de l'huile d'olive.

Acide gras	% en poids
16:0	8-21
16:1	1-4
18:0	1-6
18:1	53-80
18:2	2-24
18:3	1-2
20:0	< 0.5
20:1	< 0.5
22:0	< 1

Chapitre II :

Dégradation oxydative des acides
gras polyinsaturés

II. Dégradation des lipides :

Depuis la nuit des temps, l'homme consomme une vingtaine d'acides gras naturels, d'origine végétale et animale. Certains d'entre eux sont fragiles : l'exposition à l'air, à la lumière et à la chaleur peut les dénaturer [20]. C'est le cas des acides gras insaturés et tout spécialement les plus insaturés d'entre eux, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne d'oméga-6 et plus encore d'oméga-3 puisque ils sont facilement altérés par des réactions désignées sous le nom de peroxydation. Ce phénomène a lieu aussi bien *in vitro* (dans les aliments lors du stockage ou dans la chair après abattage) qu'*in vivo*. Généralement, sur des huiles ou des graisses, on parle généralement de rancissement (réactions purement chimiques) [21].

II.1. Oxydation des lipides :

En science des aliments, lorsque l'on parle de la réaction de l'oxygène moléculaire avec des lipides, on parle d'« oxydation ». Plus formellement, cependant, il s'agit d'une réaction d'addition d'une molécule d'oxygène qui aboutit à la formation de radicaux peroxyde (LOO•). C'est la raison pour laquelle on utilise plutôt le terme de peroxydation des lipides insaturés [1].

La peroxydation des lipides est l'une des premières mécanismes de dégradation de la qualité des aliments ; elle peut se manifester par la détérioration de la flaveur, de la texture, de la valeur nutritionnelle associée à la production de composés toxiques potentiellement nuisibles pour le fonctionnement de l'organisme, mais également de la couleur. La peroxydation des lipides concerne principalement les acides gras polyinsaturés. En effet, ceux-ci sont, de par leur structure, facilement dégradables par des processus oxydants non enzymatiques. Plus l'acide gras est riche en doubles liaisons, plus il est peroxydable. En identifiant le seuil caractéristique de ce phénomène, la peroxydation des acides gras, lorsque son intensité est modérée, a un effet bénéfique sur la flaveur des aliments, sans danger particulier pour la santé humaine. Toutefois, lorsque son intensité augmente, elle devient une des causes majeures de la détérioration de la qualité des produits [22].

II.1.1. Définition :

L'oxydation des lipides est une réaction radicalaire se décomposant en trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison, qui vont conduire à la formation de plusieurs produits finaux, volatils (alcanes, cétones, aldéhydes, alcools, esters, etc.)

et non volatils. La nature et les proportions relatives de ces différents composés volatils dépendent de plusieurs facteurs, dont la nature des acides gras peroxydés, le type d'oxydation et les conditions de milieu (température, pH, présence de fer, etc.) [22].

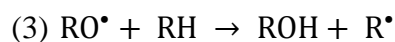
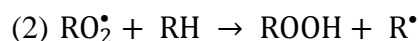
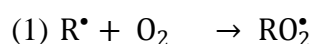
II.1.2. Mécanisme réactionnel :

Le déroulement de l'oxydation des lipides est très compliqué à cause de la multitude des réactions mises en jeu. Elle s'effectue par plusieurs étapes avec la formation d'espèces radicalaires intermédiaires, comme suit :

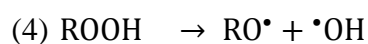
L'oxydation des lipides, en présence d'oxygène, s'ensuit une réaction radicalaire en chaîne qui comporte trois phases différentes: initiation, propagation et terminaison. L'initiation est la phase de déclenchement où se forme un premier radical libre. En présence d'amorceurs (radicaux hydroxyles, alcoxyles, peroxyles, l'oxygène singulet ou le peroxylnitrite), les lipides insaturés (LH) perdent un radical d'hydrogène H^\bullet particulièrement labiles, c'est-à-dire ceux situés sur des atomes de carbone placés entre deux doubles liaisons pour former des radicaux allyles centrés sur le carbone (L^\bullet) [1,23,24]. Cette réaction peut être produite par une dissociation thermique, par des catalyseurs métalliques ou par des radiations ionisantes avec ou sans intervention de substances photosensibilisatrices [25].

Initiation : formation de radicaux peroxy RO_2^\bullet , alcoyle RO^\bullet ou alkyle R^\bullet

Propagation de la chaîne



Scission en radicaux



Terminaison de la chaîne

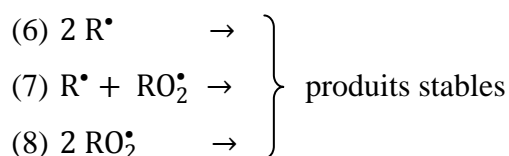


Figure II.1. Etapes élémentaires de l'auto-oxydation de lipides.

Le radical libre formé se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène moléculaire O_2 pour donner un radical peroxyde, $LOO\bullet$. Ce dernier peut à son tour arracher un radical $H\bullet$ d'une autre molécule d'acide gras adjacente ($L'H$), créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) ; la combinaison du radical peroxyde avec le radical d'hydrogène conduit à la formation d'un radical libre et d'un hydro-péroxyde lipidique ($LOOH$) qui peut se décomposer pour former des radicaux alcoxydes ($LO\bullet$), hydroxydes ($HO\bullet$) et radicaux peroxydes [23,24]. Ces étapes entraînent une prolifération qui peut catalyser la réaction d'oxydation par étapes de propagation et, par conséquent, la réaction devient autocatalytique [23].

Finalement les radicaux libres dans le milieu réagissent entre eux et forment des produits non radicalaires, c'est la terminaison. Ce sont donc des radicaux, qui sont responsables du déclenchement de l'auto-oxydation [1]. Globalement, ce processus conduit à des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des acides, des esters, des peracides, des peroxydes, mais aussi à des produits de polymérisation [26].

II.1.3. Facteurs affectant l'oxydation des lipides :

L'oxydation des lipides est une réaction lente particulièrement à basse température. Les facteurs, à partir de lesquels la stabilité d'un corps gras n'est plus garantie, dépendent de la composition en acides gras, de leur concentration, de la présence de pro- ou d'antioxydants, de la pression partielle de l'oxygène et ainsi que sa forme, de la surface en contact avec l'air, les composés mineurs tels que des métaux, des pigments, des phospholipides, des acides gras libres, mono- et diacylglycérols, des composés oxydé thermiquement et l'apport d'énergie (lumière ou chaleur) [1, 27], et des conditions dans lesquelles l'aliment contenant des corps gras est entreposé (température, lumière, teneur en eau) et des enzymes [28- 30].

✿ Influence de la température et de la concentration en oxygène :

Une grande interaction existe entre la température et la concentration d'oxygène. Ainsi il est assez difficile d'évaluer individuellement l'effet de ces facteurs. La solubilité de l'oxygène est très élevée à température ambiante ou à basse température [29]. Pendant la phase de propagation, l'oxygène réagit rapidement avec les radicaux alkyl $R\bullet$ pour générer les hydro-péroxydes $ROOH$ [31]. La cinétique de formation du $ROOH$ est largement élevée par rapport à leur

décomposition. Par contre, lorsque la température augmente, la solubilité de l'oxygène diminue considérablement [29], et d'après Khayat et al. [32], l'oxydation des lipides est d'autant plus rapide que la température est importante. Il existe donc un antagonisme entre ces deux paramètres. La réaction d'initiation devient plus importante et la concentration des radicaux libres $R\bullet$ augmente. Ceci entraîne la formation des polymères, une réaction faisant intervenir les radicaux alkyl $R\bullet$ et les radicaux alkoxy $RO\bullet$ [31].

Aux températures (de l'ordre de 70 °C), il y a dénaturation des protéines, notamment de la myoglobine qui relargue le fer et le rend directement disponible pour initier l'oxydation ou favoriser la décomposition des hydroperoxydes, notamment en présence d'agents réducteurs [32]. De plus il se produit une désorganisation des structures cellulaires qui favorisent les contacts entre substrats de l'oxydation et agents prooxydants. Ainsi, les opérations de cuisson sont bien connues pour avoir un effet prooxydant marqué. Au contraire, la congélation est un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits [33], car les vitesses d'oxydations des lipides et des pigments hémiques sont notablement réduites à faibles températures. Lors du stockage à l'état congelé, il est nécessaire d'atteindre des températures de - 40 °C pour arrêter complètement l'oxydation car à une température de - 15 °C la formation de peroxydes reste possible [34].

✱ Catalyseurs métalliques :

Les catalyseurs métalliques sont des groupes de métaux lourds possédant deux ou plusieurs états de valence et des potentiels d'oxydoréduction entre eux comme le Cobalt, Cuivre, Fer, Manganèse, Nickel. Généralement, ils augmentent le taux d'oxydation des lipides dans les aliments et diminuent le temps nécessaire d'induction de l'oxydation, c'est-à-dire le temps durant lequel l'oxydation apparaît [35]. Ils peuvent affecter la réaction d'initiation, de propagation et de terminaison aussi bien que le taux de décomposition des hydroperoxydes. L'initiation de l'oxydation lipidique par les métaux peut se faire par transfert d'électron ou par formation de complexe de transition ou de complexes avec le peroxyde d'hydrogène qui catalysent l'auto-oxydation et la décomposition des hydroperoxydes par des réactions de type redox [25].

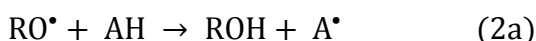
✿ Antioxydants :

En présence d'oxygène, l'oxydation des lipides insaturés ne peut pas être empêchée. De plus, c'est une réaction irréversible, cependant elle peut être inhibée. Les antioxydants sont des réducteurs qui ralentissent et inhibent l'oxydation des lipides. Ils peuvent agir sur différentes étapes de l'auto-oxydation et de l'oxydation. Les antioxydants réagissent généralement sur les radicaux libres produits pendant l'initiation et la propagation et les rendent moins actifs. L'action préventive bloque l'étape d'initiation en complexant les catalyseurs et en réagissant avec l'oxygène ou en déviant de l'aliment les effets de la lumière ou des rayonnements [35].

Les antioxydants AH entrent en compétition avec les substrats RH lors de la propagation comme donneurs d'hydrogène pour les radicaux libres ROO- présents dans le milieu et forment des Hydroperoxydes (1a).



Les radicaux libres A• générés sont à faible réactivité, ces radicaux libres plus stables arrêtent la propagation [35]. Dans son mode d'action l'α-tocophérol réagit avec les radicaux alkoxyl et inhibe la décomposition des hydroperoxydes ce qui diminue la formation des aldéhydes (2a).



La performance des antioxydants dépend du milieu, de leur concentration et du temps d'oxydation. En effet, ils peuvent agir également comme des pro-oxydants sous certaines conditions [36].

✿ Influence de pH :

Le pH influe sur le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes [33]. Premièrement, pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des protons (H⁺), le potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand des espèces pro-oxydantes (ions des métaux de transition) ou antioxydantes (acide ascorbique par exemple) solubles en phase aqueuse sont présentes. Le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques, et donc leur réactivité vis à vis

des molécules oxydables sont élevés. Dans le cas du tissu musculaire, un pH faible favorise la dénaturation des protéines héminiques et la libération du fer qui est un agent prooxydant. Le pH modifie également les interactions entre les constituants du fait d'attractions et de répulsions électrostatiques liées à la charge des molécules à un pH donné en fonctions de leur pK. Ainsi, les interactions entre les cations métalliques et les protéines sont favorisées quand le pH est supérieur à leur point isoélectrique, ce qui est susceptible de favoriser l'oxydation si les protéines sont directement en contact avec les lipides.

✿ Influence de l'eau :

L'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. Par définition, l' a_w est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit sur la pression partielle de vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température. L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvatation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique. Par solvatation, l'eau permet la mobilisation des substances pro-oxydantes ou antioxydantes. Elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation. En général, en présence de métaux de transition solubles, une a_w voisine de 0,3 (comprise entre 0,2 et 0,4) correspond aux vitesses d'auto-oxydation les plus faibles. Ces valeurs correspondent à la formation d'une couche monomoléculaire d'eau autour des constituants. Une a_w comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes. Une très faible activité de l'eau est également favorable à l'oxydation [37]. Par contre, les réactions initiées par des activités enzymatiques sont généralement fortement ralenties quand l'activité de l'eau est inférieure à 0,7-0,8.

II.1.4. Différentes voies d'oxydation :

L'oxydation des lipides est un phénomène par lequel l'oxygène atmosphérique réagit spontanément avec les acides gras insaturés des lipides. La stabilité oxydative des lipides dépend de leur composition et de l'environnement auquel ils sont exposés, de la concentration de trois facteurs, le substrat, les catalyseurs de l'oxydation et des antioxydants. Au niveau des aliments, ils existent des substances naturelles ou antioxydants qui contrôlent l'oxydation ainsi que des substances la favorisant ou pro-oxydant. L'équilibre est cependant perturbé par les paramètres environnementaux qui vont favoriser l'oxydation ou l'empêcher. L'oxydation lipidique peut résulter de

plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs. Dans les aliments, on distingue deux principaux mécanismes : l'auto-oxydation et la photo-oxydation.

II.1.4.1. Auto-oxydation :

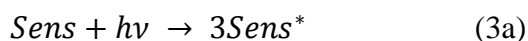
L'auto-oxydation des lipides est surtout due à l'oxygène triplet et aux réactions en chaîne décrites dans la figure II.1. Néanmoins, l'oxygène singulet peut jouer le rôle de fournisseur d'hydroperoxydes qui, par décomposition, fournissent les radicaux peroxydes, qui sont précisément à l'origine de la réaction en chaîne d'auto-oxydation, à l'étape d'initiation.

II.1.4.1.A. Auto-oxydation (Auto-oxydation par l'oxygène triplet) :

L'oxygène moléculaire qui entre en jeu dans la réaction de peroxydation est l'oxygène triplet ($^3\text{O}_2$) qui possède deux électrons non-appariés et a le caractère d'un diradical à l'état fondamental. Cet oxygène triplet ne peut pas agir directement sur un acide gras insaturé. Une première étape d'initiation, au cours de laquelle un radical d'hydrogène H^\bullet est enlevé par des radicaux libres présents dans le milieu est nécessaire. Le radical peroxyde formé dans la réaction (1) de la chaîne de radicaux (Figure II.1) est relativement peu réactif et, de ce fait, peut enlever d'une façon sélective le radical H^\bullet le plus faiblement lié d'une molécule d'acide gras. Pour cela, il se différencie du radical alcoyle (RO^\bullet) et du radical hydroxyle (HO^\bullet), qui sont très réactifs. La réaction (2) est rapide seulement si l'énergie nécessaire à l'abstraction de H^\bullet de la molécule d'acide gras est nettement inférieure à l'énergie libérée lors de la création des liaisons H-O dans les groupements hydroperoxydes en formation [1].

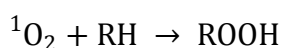
II.1.4.1.B. Photo-oxydation (Auto-oxydation par l'oxygène singulet):

La photo-oxydation est une voie de dégradation oxydative des lipides initiée par des substances photo-sensibilisatrices. Dans les aliments, les pigments ou certains additifs alimentaires tels que la chlorophylle, l'hémoprotéine, la riboflavine, la rose de bengale, l'érythrosine B et la phloxine peuvent initier la photo-oxydation en présence de la lumière [38]. Les substances photo-sensibilisatrices absorbent l'énergie lumineuse et passent dans un état singulet qui est suivi par un croisement intersystème pour donner une molécule excitée à l'état triplet (3a) [25].

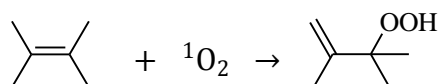


Les photos sensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes [38].

L'oxygène singulet à des origines multiples. Dans les aliments, il est souvent lié à la présence d'un photosensibilisateur (chlorophylle, flavine, composés hèmes, porphyrines et quelques colorants de synthèse) qui, passant dans un état triplet excité suite à l'absorption de photons, peut à son tour exciter l'oxygène et le faire passer de l'état fondamental triplet à l'état singulet, qui est énergétiquement plus élevé (4a), c'est le premier mécanisme [1, 25]:



L'oxygène singulet est beaucoup plus réactif que l'oxygène triplet. Au contraire de ce dernier, il peut s'additionner directement sur les doubles liaisons des acides gras insaturés pour donner des hydroperoxydes à travers une réaction de type « ène » [1]:



Dans un second mécanisme réactionnel, la molécule photosensible dans son état excité arrache un hydrogène de l'acide gras insaturé pour former un radical libre (5a) qui est capable de réagir avec la molécule d'oxygène dans son état fondamental [25].



La photo-oxydation est plus rapide que l'auto-oxydation, la cinétique de la réaction du linoléate avec l'oxygène sous son état singulet est approximativement 1500 fois plus rapide que l'oxygène sous son état triplet [39].

Dans les huiles végétales, la présence des molécules photosensibles favorise la photo-oxydation. Cependant ces dernières sont enlevées lors de l'opération de raffinage et de décoloration.

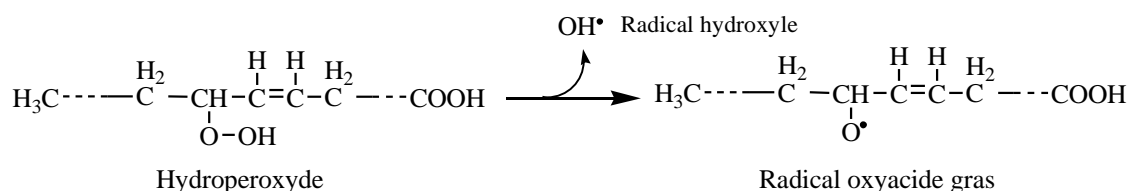
II.1.4.2. Thermo-oxydation :

À température élevée, les réactions d'oxydation vont s'accélérer et donner, comme les hydroperoxydes sont sensibles à la chaleur, des réactions secondaires plus variées, telles que des isomérisations, des polymérisations, des cyclisations, des hydrolyses. Les hydroperoxydes se décomposent facilement en une multitude de

composés, qui ne s'oxydent plus, à travers une série de réactions en chaîne. Ils se stabilisent souvent en formant des di, tri- et polymères de nature très complexe (que l'on peut observer dans les huiles de friture par exemple). Même dans les conditions normales d'entreposage des denrées alimentaires, les lipides insaturés s'oxydent et doivent donc être protégés de la lumière et si possible du contact avec l'air [1, 40].

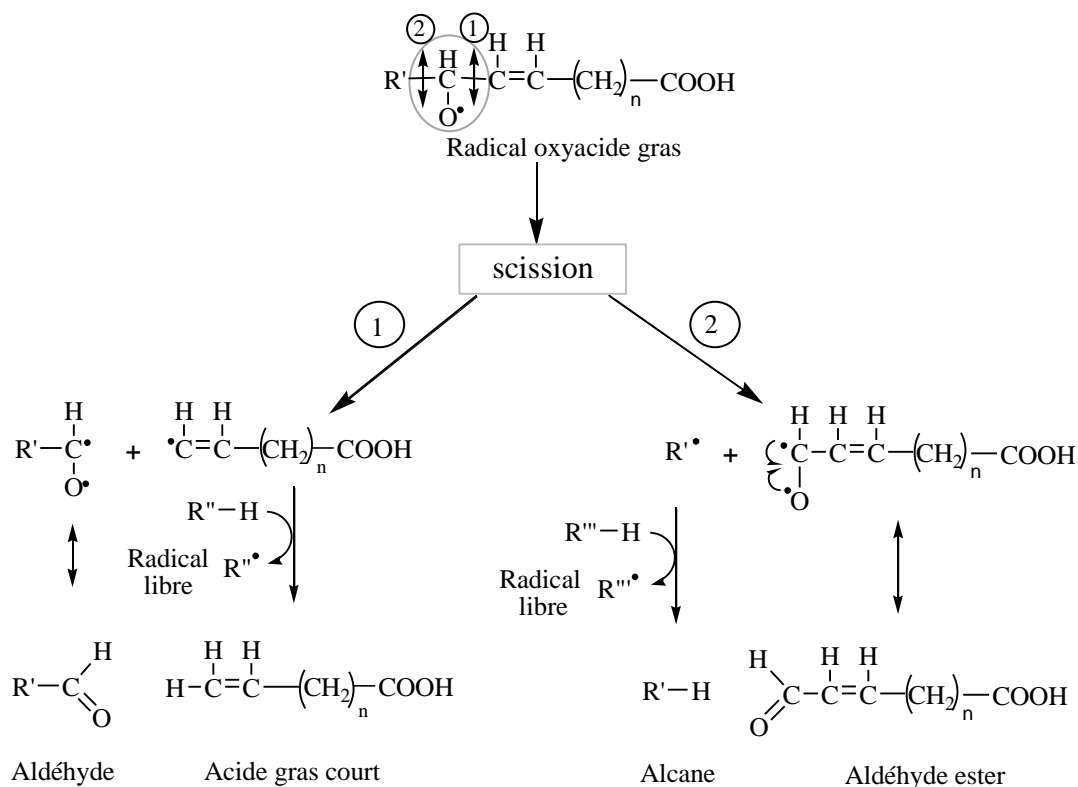
- **Réactions secondaires d'altération thermoxydative :**

La température élevée favorise la décomposition de l'hydroperoxyde d'acide gras en radicaux libres : La première étape de la décomposition des hydroperoxydes insaturés est le clivage homolytique de la liaison oxygène- oxygène pour générer des alkoxy et hydroxy radicalaires [26].

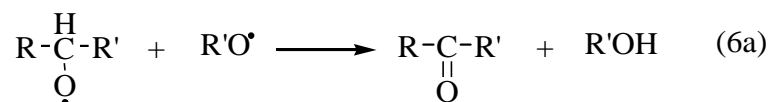


Le radical libre oxyacide gras est très instable, il donne naissance à des produits volatils et non volatils: Les radicaux alkoxy peuvent par la suite réagir suivant 4 réactions. Une décomposition de la liaison carbone- carbone produit des aldéhydes ou des aldéhydes esters. Par ailleurs, l'alkoxy peut capter un radical d'hydrogène d'une autre molécule et forme l'alcool et un radical libre. Les radicaux libres obtenus lors de ce stade propagent l'auto-oxydation [35,40].

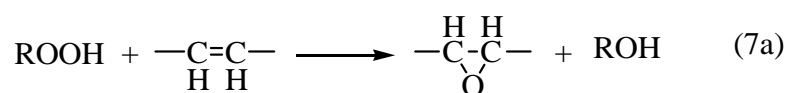
- **Formation de produits volatils :**



L'interaction de radicaux libres oxyacides gras avec d'autres radicaux libres conduit à des produits non radicalaires, caractérisant la terminaison (6a) :

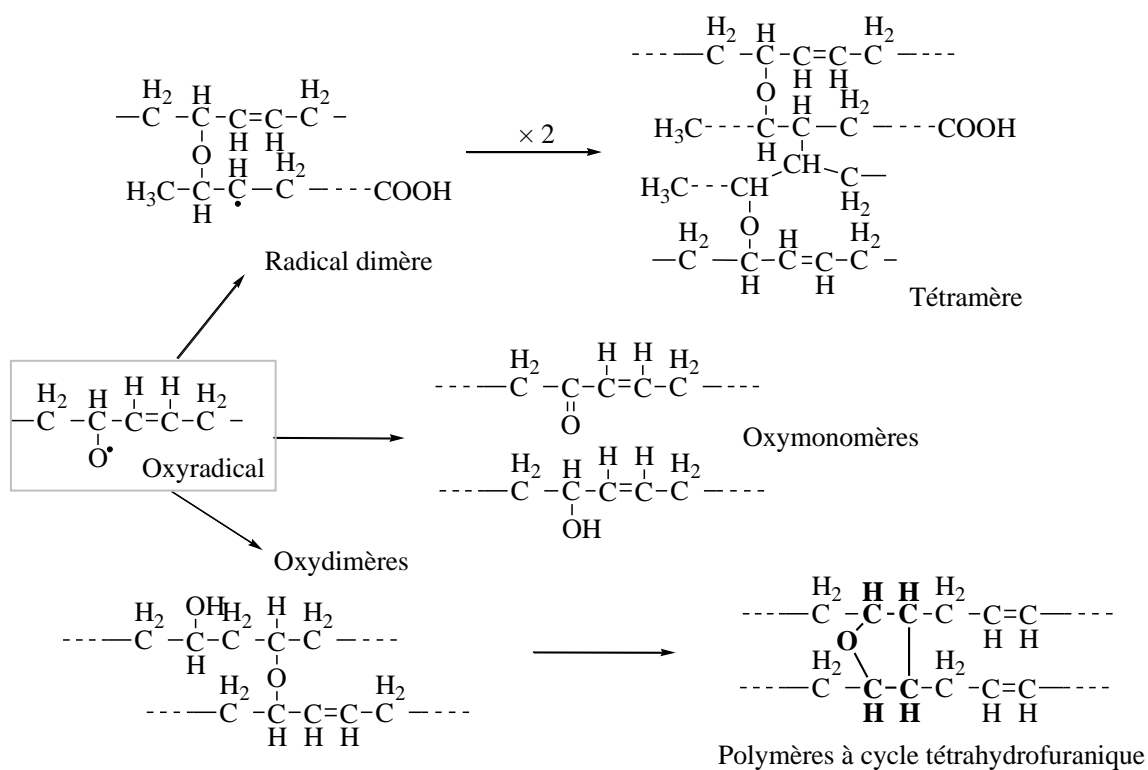


D'autres produits secondaires peuvent apparaître lors de l'auto-oxydation des lipides. L'hydroperoxyde ou son radical libre peut réagir avec une double liaison pour former un époxyde (7a) [40].



- **Réaction de formation de produits non volatils :**

De plus, une réaction de polymérisation est généralement rencontrée dans l'oxydation des lipides. Les polymères sont formés par association directe de l'alkoxy avec un radical libre ou encore par l'apparition de nouvelle liaison carbone-carbone par l'interaction des alkyls de type radicalaires. Les deux types de polymères formés peuvent contenir des structures cycliques [26, 40].



- **Décomposition des hydropéroxydes du linoléate :**

La décomposition thermique des hydropéroxydes du linoléate correspond à la scission de la liaison carbone-carbone et forme des aldéhydes et des aldéhydes esters [25, 41]. Les principaux produits de décomposition des hydropéroxydes du linoléate sont représentés dans le tableau II.1 suivant.

- **Décomposition des hydropéroxydes du linoléate :**

Les hydropéroxydes du linoléate se décomposent en un mélange de produits secondaires. L'instabilité de l'acide linoléique s'explique par la présence des groupements méthylène. Cette structure favorise la formation des dialdéhydes [25]. Les principaux composés de dégradation sont résumés dans le tableau II.2 suivant.

Tableau II.1. Principaux produits de décomposition des hydroperoxydes du linoléate.

Radical alkoxy	Clivage	Produits de décomposition
$\begin{array}{c} \text{I} \quad \text{II} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOMe} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \\ 13 \end{array}$	(I)	Pentane + Pentan-1-ol + 12-formyldodéca-9,11-diénoate de méthyle
	(II)	Hexanal+ Dodéca-9,11-diénoate de méthyle
$\begin{array}{c} \text{I} \quad \text{II} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\overset{\cdot}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOMe} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \\ 9 \end{array}$	(I)	Nona-1,3-diène + 8-formyloctanoate de méthyle
	(II)	Déca-2,4-diéнал + Octanoate de méthyle

II.1.5. Produits d'oxydation :

II.1.5.A. Produits primaires :

Les lipides sont composés d'acides gras qui, tels de la série d'acide oléique, linoléique ou α -linoléique, possèdent un ou plusieurs groupements allyles. Ces acides gras insaturés s'oxydent facilement pour former des hydroperoxydes, soit par auto-oxydation, en présence de radicaux et de l'oxygène triplet, soit par photo-oxydation dû à l'action de l'oxygène singulet, mais avec des vitesses différentes. Ainsi, l'énergie nécessaire à l'abstraction d'un radical H^\bullet se différencie selon les différents groupements qui peuvent apparaître dans les acides gras. Un radical peroxyde peut arracher un radical H^\bullet plus facilement d'un groupement méthylène dans un système 1,4-pentadiène que d'un groupement allyle isolé, car le radical formé à partir du 1,4-diène peut plus facilement se stabiliser par résonance. Ceci explique les différences observées dans les vitesses avec lesquelles les acides gras insaturés sont auto-oxydés. Il en découle également qu'à température ambiante seuls les acides gras polyinsaturés sont attaqués de façon sélective par les radicaux peroxydes.

Dans le cas de l'acide oléique, l'abstraction d'un H^\bullet des groupements méthylènes en position 8 et 11 (Figure II.2) peut conduire à la formation de quatre hydroperoxydes (entités (a) à (d) dans des proportions sensiblement égales), qui ont effectivement été identifiés comme des produits de l'auto-oxydation. La configuration des doubles liaisons dans les hydroperoxydes formés dépend de la température. A température ambiante, on obtient environ 33% de molécules avec une configuration *cis* et 67% avec une configuration *trans*, thermodynamiquement plus stable. En comparaison, l'action de l'oxygène singulet conduit uniquement à la formation des deux hydroperoxydes en position 9 et 10.

Dans le cas de l'acide linoléique (Figure II.3), les deux radicaux pentadiényles qui résultent de l'abstraction d'un radical H^\bullet du groupement méthylène en position 11, particulièrement réactif, donnent deux monohydroperoxydes ((a) et (b)) faisant partie d'un système diène conjugué. L'action de l'oxygène singulet sur ce même acide linoléique produit, par une réaction « ène » sur les atomes de carbone 9,10, 12 et 13, quatre hydroperoxydes [1].

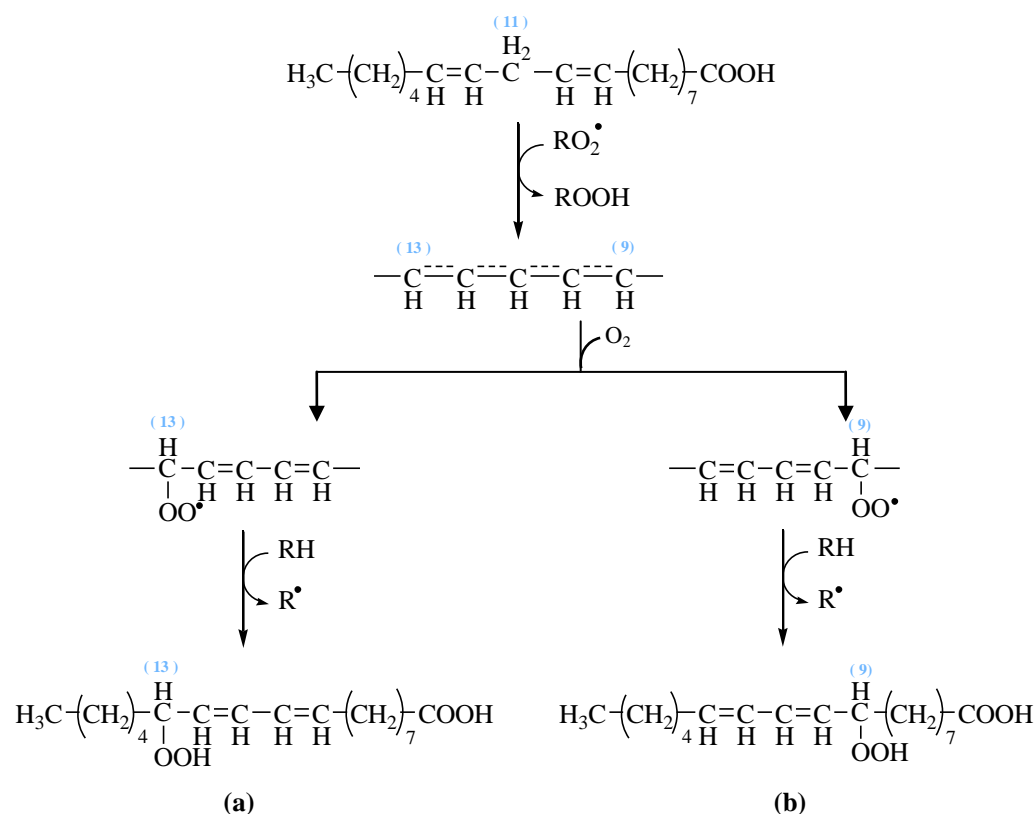


Figure II.3. Auto-oxydation de l'acide linoléique : produits primaires formés [1].

II.1.5.B. Produits secondaires :

Les hydroperoxydes formés dans la phase primaire de l'auto-oxydation n'ont ni odeur ni goût. La qualité organoléptique de l'aliment ne change qu'après sa dégradation chimique, particulièrement thermo-chimique, et la formation de composés secondaires, volatils et non volatils. Le changement qui intervient dans l'arôme de l'aliment est presque toujours jugé négativement. Par exemple, les goûts rance, poisseux, métallique, de carton ou le goût de vieux indéfinissable, sont attribués à de telles sortes de détériorations [1]. Les produits d'oxydation secondaires comprennent entre autres des aldéhydes, des cétones, des alcools, des hydrocarbures à courte chaîne, des acides organiques volatils et des composés époxy. La période pour la formation des produits secondaires varie selon le type d'huile. Ces composés sont formés immédiatement après la formation des hydroperoxydes dans les huiles de colza et d'olive; Cependant, les composés secondaires dans les huiles de carthame et de tournesol ne sont formés qu'après une certaine accumulation d'hydroperoxydes [23].

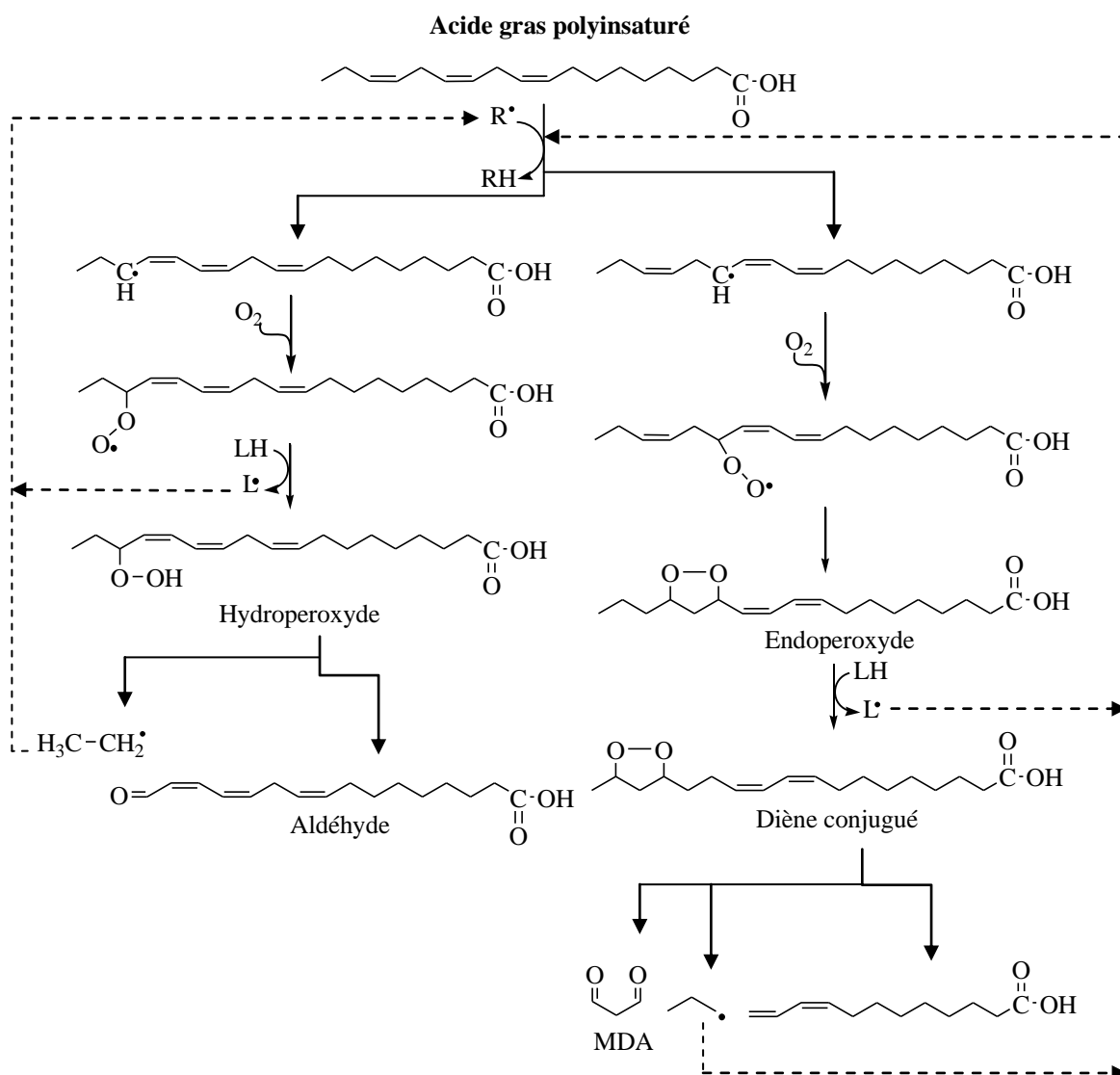


Figure II.4. Voies de peroxydation des acides gras polyinsaturés.

Peu d'études ont été spécifiquement consacrées à la formation des produits secondaires de l'oxydation des lipides considérés comme cyto ou génotoxiques tels que le MDA ou le 4-hydroxy-2-hexéanal (4-HHE), issu de l'oxydation des acides gras n-3 (Figure II.4), et le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE), issu de l'oxydation des acides gras n-6. Dans une étude *in vitro*, le devenir oxydatif d'huile de tournesol fraîche ou préalablement oxydée thermiquement a été évalué. Dans cette étude, ni le 4-HNE ni les autres aldéhydes oxygénés n'ont été détectés dans l'huile fraîche, contrairement à ce qui a été observé pour l'huile oxydée thermiquement. Des résultats similaires ont également été obtenus pour des hydroxycénals, dont le 4-HHE [42].

➤ **Produits secondaires volatils :**

La dégradation de la qualité la plus observée dans les produits alimentaires en haute teneur lipidique soumis à des hautes températures est effectivement l'apparition des mauvaises saveurs. Cette détérioration de saveur est principalement causée par la production de produits d'oxydation volatils des lipides, ce qui peut nuire aux caractéristiques organoléptiques, même dans de très faibles concentrations [43]. Ces composés sont des molécules d'arôme au pouvoir odorant intense qui peuvent influencer fortement l'odeur et le goût de l'aliment oxydé, même lorsqu'ils sont présents à l'état de traces. Ces composés sont principalement [1]:

- des composés carbonylés aromatiques,
- le dialdéhyde malonique (MDA),
- des alcanes et alcènes.

À température élevée, lors de friture plate (en surface) ou profonde (bain d'huile), ces produits volatils ne resteront pas dans l'aliment frit et ne seront pas ingérés avec lui. Ils sont responsables de l'odeur de friture [40].

➤ **Produits secondaires non volatils :**

La formation de produits non volatils est à surveiller car ils se retrouvent dans les aliments. Les molécules ainsi produites peuvent atteindre 500 espèces chimiques nouvelles. En général à l'état de traces, elles ne sont toxiques que lorsque leur concentration augmente.

Comme le montre la figure II.5, au début du processus d'oxydation des lipides, la vitesse de formation des hydroperoxydes dépasse leur vitesse de décomposition au cours du stade initial d'oxydation, ce qui s'inverse aux stades ultérieurs [23].

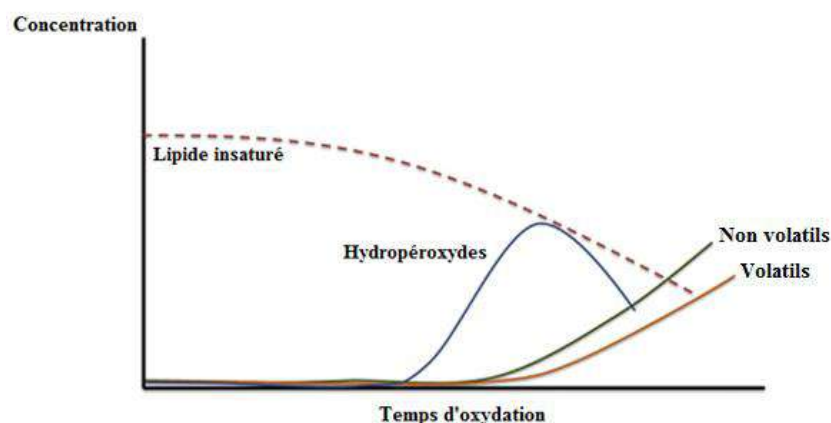


Figure II.5. Courbe cinétique de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés [23].

II.1.6. Méthodes d'évaluation de la dégradation lipidiques :

Afin de mieux évaluer et de comprendre les effets de certain traitement sur les produits à haut contenu lipidique, de nombreuses méthodes d'analyse sont couramment utilisées pour la mesure de l'oxydation des lipides dans les aliments. Bien que l'objectif de méthodes analytiques consiste à déterminer l'oxydation des produits, l'évaluation de la dégradation est souvent faite en surveillant les composés intermédiaires. L'évaluation de plusieurs produits d'oxydation et des stades de la voie oxydative permet un meilleur suivi, avec plus de détails pour une meilleure compréhension du processus de dégradation des lipides [23]. Comme, il n'existe aucune méthode uniforme et standard pour détecter toutes les modifications oxydatives dans tous les systèmes alimentaires [44], il est nécessaire de choisir une méthode appropriée et adéquate pour une application particulière. Les méthodes disponibles pour surveiller l'oxydation des lipides dans les aliments peuvent être classées en cinq groupes en fonction de ce qu'ils mesurent: l'absorption d'oxygène, la perte des substrats initiaux, la formation des radicaux libres, et la formation des produits d'oxydation primaires et secondaires [45]. Plusieurs tests physiques et chimiques, incluant des analyses instrumentales, ont été employés dans les laboratoires et l'industrie pour la mesure de divers paramètres de l'oxydation des lipides et d'évaluer le degré de dégradation. En outre, des tests sensoriels fournissent une évaluation subjective ou objective de détérioration oxydative, en fonction de certains détails. Certaines méthodes d'évaluation de la dégradation sont décrites ci-dessous.

II.1.6.1. Mesure de l'oxydation des lipides :

Lors des études de la cinétique d'oxydation des lipides, l'état d'avancement de la réaction peut être évalué par la mise en évidence de la disparition des substrats de l'oxydation. Afin de déterminer l'état d'oxydation d'un aliment il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides. Une grande variété de méthodes est disponible en fonction de l'information et de la précision recherchées et du substrat étudié [45].

II.1.6.1.A. Analyse des substrats d'oxydation :

L'étude de la consommation d'oxygène permet de suivre les phases d'initiation et de propagation de la réaction. Les méthodes de mesure sont manométriques (mesure de la pression partielle en oxygène), polarographique (mesure de la consommation d'oxygène), chromatographiques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du

poids consécutive à la fixation d'oxygène. Ce type d'analyse est employé pour déterminer les cinétiques d'oxydation des lipides en système modèle pour des tests d'oxydation accélérés ou dans le cas de conservation d'échantillons en emballage étanche. Mais il n'est pas utilisé pour déterminer les degrés d'oxydation d'un produit.

La cinétique de disparition de l'un ou plusieurs acides gras peut être étudiée. L'analyse des acides gras est réalisée après extraction des lipides, méthylation des acides gras et chromatographie en phase gazeuse. La difficulté consiste à extraire quantitativement la matière grasse et à minimiser les pertes au niveau des réactions de méthanolyse [46].

- **Prise du poids :**

La consommation d'oxygène durant le stade initial d'auto-oxydation aboutit à une augmentation du poids de la graisse ou de l'huile, ce qui reflète théoriquement son niveau d'oxydation. Le chauffage d'une huile et le test périodique de la prise de poids est l'une des plus anciennes méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative [47]. Cette méthode nécessite un équipement simple et indique directement l'absorption d'oxygène à travers le changement de masse. Dans ce cas, les échantillons de l'huile sont pesés et stockés dans un four à une température définie sans circulation d'air.

Pour éviter l'influence de la variation de masse par les composés volatiles, les échantillons peuvent être préchauffés dans une atmosphère inerte. Les échantillons sont ensuite retirés du four à des intervalles de temps différents, refroidis à température ambiante, et repesés; le gain de poids est alors enregistré. La période d'induction peut être obtenue en traçant le gain de poids en fonction du temps de stockage. Dans certains cas, le temps nécessaire pour atteindre une augmentation de poids de 0,5% est pris comme un indice de stabilité de l'huile [44, 47, 48].

En tant que méthode physique pour mesurer l'oxydation des lipides, la méthode de prise de poids présente plusieurs inconvénients tels que le chauffage discontinu de l'échantillon, ce qui peut donner lieu à des résultats non reproductibles, et nécessitant beaucoup de temps d'analyse et beaucoup d'effort humain. Néanmoins, cette méthode offre des avantages tels que le faible coût de l'instrumentation ainsi que la haute capacité et la grande vitesse de traitement des échantillons sans limitation [44].

- **Consommation d'oxygène dans l'espace de tête :**

En plus de la méthode de la prise de poids, la consommation de l'oxygène peut être mesurée directement en contrôlant la chute de la pression d'oxygène. En utilisant la

méthode de l'oxygène dans l'espace de tête, un échantillon d'huile est placé dans un récipient fermé contenant également une certaine quantité d'oxygène à des températures élevées, généralement autour de 100 °C. La réduction de la pression dans le récipient, ce qui est due à la consommation d'oxygène, est contrôlée en permanence et enregistrée automatiquement. La période d'induction en tant que un point de variation maximale du taux de consommation d'oxygène peut être calculée [49]. Un instrument commercial de cette méthode, connu sous le nom Oxidograph, est disponible. Dans le Oxidograph, le changement de pression dans le récipient de réaction est mesuré par voie électronique au moyen de transducteurs de pression [44, 50].

La méthode de l'oxygène dans l'espace de tête est simple et reproductible et peut être la meilleure méthode d'analyse pour évaluer la stabilité oxydative de graisses et d'huiles [51]. Cependant, son application dans la mesure de l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires autres que les graisses et les huiles est limitée, car l'oxydation des protéines absorbe également de l'oxygène [52].

- **Mesure du changement de réactif :**

L'oxydation des lipides peut également être évaluée en mesurant quantitativement la perte de substrats initiaux. Dans les aliments contenant des graisses ou des huiles, les acides gras insaturés sont les principaux réactifs dont la composition change de manière significative pendant l'oxydation. Les variations de la composition en acides gras fournissent une mesure indirecte de l'étendue de l'oxydation des lipides [52]. Dans cette méthode, les lipides sont extraits de l'aliment, si nécessaire, et ensuite convertis en dérivés appropriés pour l'analyse chromatographique [44]. Les esters méthyliques d'acide gras (EMAGs) sont les dérivés les plus utilisés pour la détermination de la composition en acides gras, généralement par chromatographie en phase gazeuse (CPG) [53]. De même, l'indice d'iode, ce qui reflète la perte d'insaturation, peut être également utilisé comme un indice de l'oxydation des lipides [54].

La mesure des variations de la composition en acides gras est utile pour l'identification de la classe de lipides et des acides gras qui sont impliqués dans des réactions d'oxydation [44]. Cependant, comme la distribution des acides gras insaturés varie dans des différents systèmes alimentaires, par exemple, les acides gras hautement insaturés étant situés principalement dans les phospholipides des aliments musculaires, la séparation des lipides en lipides neutres, glycolipides, phospholipides, et d'autres classes peut être nécessaire [44,52]. Par ailleurs, c'est un moyen insensible en terme de concentration d'évaluer la détérioration oxydative. À titre de comparaison par le calcul,

l'oxydation de 0,4% d'acides gras polyinsaturés à mono-hydroperoxydes représenterait un changement de 16 meq oxygène/kg d'huile dans l'indice de peroxyde, alors qu'un changement de moins de 1,0 méq oxygène/kg d'huile peut facilement être détectée par la mesure de l'indice de peroxyde [50]. En outre, l'application de cette méthode est limitée en raison de son incapacité à se servir d'indicateur de l'oxydation des autres lipides saturés [44]. Néanmoins, son utilité pour mesurer l'oxydation des huiles hautement insaturés ne peut pas être sous-estimée.

II.1.5.1.B. Mesure des produits primaires:

Les produits primaires de l'oxydation des lipides peuvent être analysés à l'aide de nombreuses techniques présentant des grandes différences au niveau de leur sensibilité, leur facilité d'utilisation, et la nature de la matrice. Si certaines techniques fonctionnent sur des systèmes « simples », comme des huiles, elles ne sont pas forcément adaptées à des systèmes plus complexes tels que le poisson et ses produits transformés.

Beaucoup de produits primaires formés lors de l'oxydation en chaîne du radical libre de lipides sont instables et difficiles à isoler et à identifier [55].

- **Dosage des hydroperoxyde :**

La mesure de la teneurs en hydroperoxydes formés est un indicateur des étapes initiales de la dégradation lipidiques. La voie la plus probable de décomposition des hydroperoxydes est le clivage homolytique de la liaison oxygène- oxygène, produisant des radicaux hydroxyles et alcoxyles [56]. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre la formation et la décomposition des peroxydes.

Plusieurs méthodes analytiques, à adapter en fonction du substrat étudié, sont disponibles pour déterminer la teneurs en hydroperoxydes et celles-ci peuvent être classées en celles qui déterminent la quantité totale d'hydroperoxydes et celles basées sur des techniques chromatographiques permettant de donner des informations détaillées sur la structure et la quantité des hydroperoxydes spécifiques présents dans un certain échantillon d'huile [57]. Ces méthodes chromatographiques comme la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à la détection par chimiluminescence [58,59] et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) [60] couplée à la spectrométrie de masse et des méthodes spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) [61] et infra rouge (IR) [62,63] permettent de caractériser les hydroperoxydes dans les huiles comestibles. Ces techniques sont reproductibles et

sensibles mais complexes et inadaptées à des analyses de routine. La spectroscopie en proche infrarouge appliquée directement sur des lipides est rapide, non destructive et les résultats sont bien corrélés avec les méthodes iodométriques et colorimétriques, mais l'appareillage reste coûteux [64].

La valeur de peroxyde (hydroperoxydes) (PV) est la mesure la plus courante de l'oxydation des lipides et représente la teneur en hydroperoxydes total dans un échantillon. L'indice de peroxyde représente la mesure des milliéquivalents d'oxygène d'hydroperoxydes par gramme d'huile. Un certain nombre de méthodes ont été développées pour déterminer la PV, dont le titrage iodométrique, la mesure spectrophotométrique de complexe d'ion ferrique, et la spectroscopie infrarouge, elles sont les plus fréquemment utilisées. La méthode iodométrique [65] est la plus largement utilisée pour la détermination de la qualité de l'huile comestible. Elle consiste à mesurer l'iode produit par l'oxydation de l'iodure de potassium par les peroxydes présents. L'iode formé est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium. Cependant, cette méthode normalisée nécessite une quantité de lipides assez importante. De plus, l'oxygène de l'air, la présence de lumière et l'absorption de l'iode par les acides gras insaturés interfèrent sur le dosage [38]. Les méthodes colorimétriques basées sur la mesure spectrophotométrique de complexe d'ion ferrique due à l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par les hydroperoxydes présents. La méthode au thiocyanate de fer est basée sur l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques en présence de peroxydes suivi d'une mesure spectrophotométrique du complexe formé entre les ions ferriques et le thiocyanate [45, 66]. La méthode au xylénol orange [67, 68] repose sur l'oxydation en milieu acide des ions ferreux en ions ferriques par les hydroperoxydes de l'échantillon. Le complexe coloré formé entre les ions ferriques et le xylénol orange possède un maximum d'absorption à 560-580 nm. Ces différentes techniques colorimétriques ont été mises au point sur des huiles purifiées [69,70] ou des liposomes [67]. Elles sont sensibles, rapides et nécessitent une plus faible quantité de lipides que la méthode iodométrique mais elles requièrent une extraction préalable des lipides. Or, l'extraction des lipides effectuée en présence d'oxygène, peut générer elle-même des hydroperoxydes et/ou induire la décomposition des hydroperoxydes présents. Une méthode modifiée du dosage des hydroperoxydes par le xylénol orange réalisée sur des extraits tissulaires de mammifères sans extraction des lipides préalable a été proposée, et elle a ensuite été appliquée à la chair de poulet [71] et à des végétaux [72].

Il est également possible de contrôler la quantité de hydroperoxydes formés au fil du temps, ce qui peut donner des détails sur l'étape de lipidoxydation, si le lipide est dans la partie de croissance ou de décroissance de la concentration en hydroperoxyde, figure II.5. L'augmentation de la valeur de peroxydes indique l'oxydation primaire et elle est vérifiée dans les huiles après leur traitement par la température, et cette augmentation semble être dépend du temps [73].

- **Détermination des diènes conjugués :**

L'auto-oxydation des acides linoléique et linoléique conduit seulement à la formation des produits conjugués [56]. Ces produits primaires de l'oxydation contenant des doubles liaisons conjuguées peuvent être quantifiés par la spectrométrie UV [74,75]. En effet, le radical du carbone résultant durant la séquence peroxydative des acides gras polyinsaturés est stabilisé par un réarrangement moléculaire pour former un diène conjugué, plus précisément, il passe de l'état malonique à l'état conjugué [76] comme le montre la figure II.6. Les diènes conjugués ont une forte absorbance environ à 234 nm, qui permet une évaluation rapide et quantification de l'état d'oxydation des lipides.

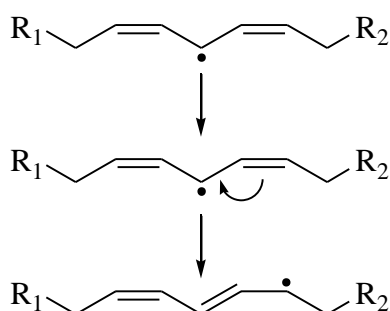


Figure II.6. Réarrangement pour former les diènes conjugués [23].

Les diènes et triènes conjugués, qui absorbent respectivement à 234 et 268 nm, sont directement liés à l'hydroperoxydes et sont souvent utilisés en plus ou à la place de l'indice de peroxyde PV [77]. Cette méthode est rapide, si les lipides du produit à analyser sont extraits, mais peu spécifique [78]. Elle convient bien pour le suivi des premiers stades de l'oxydation des lipides dans des systèmes simplifiés ou pour des systèmes biologiques. Cependant, les diènes conjugués ne peuvent pas être aussi sensible que les hydroperoxydes et leurs produits de décomposition, y compris les aldéhydes, les cétones et les acides à faible poids moléculaire, pour la détermination de la peroxydation des lipides [79].

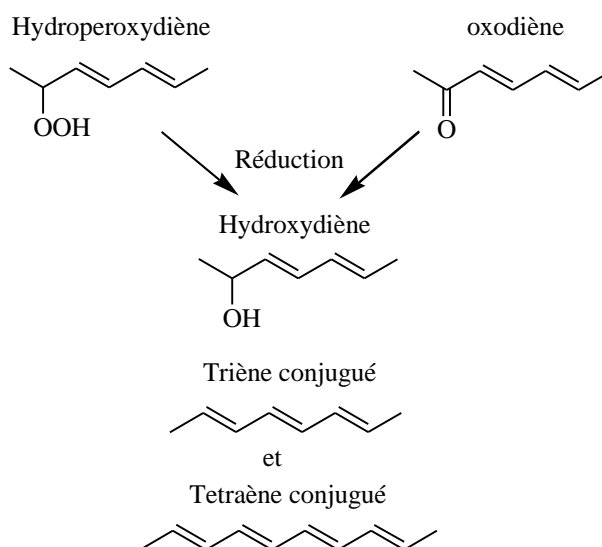


Figure II.7. Étapes de réaction chimiques dans les dosage de produits d'oxydation conjuguables (COP).

Des bonnes corrélations entre les diènes conjugués et l'indice de peroxyde ont été obtenues [80,81]. Cependant, cette méthode présente moins de spécificité et de sensibilité que la mesure PV [47,50]. En outre, le résultat peut être affecté par la présence de composés absorbant dans la même région, comme les caroténoïdes [44]. Pour éviter ces interférences, une méthode spectroscopique alternative de mesure des produits d'oxydation conjugués (COPs) a été proposée. Dans cette méthode, les hydroperoxydes et les produits de décomposition sont convertis en chromophores hautement conjugués par réduction et déshydratation ultérieure (Figure II.7). Les concentrations des triènes et tétraènes conjugués résultants sont déterminés à partir de leur absorption respectif à 268 nm et 301 nm et sont exprimés en valeurs de COP [44, 50].

II.1.5.1.C. Mesure des composés secondaires :

Les produits d'oxydation primaires (hydroperoxydes) sont instables et susceptibles de se décomposer. Un mélange complexe de produits d'oxydation secondaire volatils, non volatils, et polymérisés est formé par des réactions de décomposition, fournissant divers indices de l'oxydation des lipides [82].

Plusieurs méthodes spectrophotométriques sont disponibles pour la mesure de produits d'oxydation secondaires, elles sont toutes basées sur l'évaluation de l'intensité de la couleur résultante de la combinaison d'une famille de produits de dégradation secondaires avec un réactif spécifique et le choix de la méthode doit être considéré en fonction du modèle étudié [83].

- **Indice de ρ -Anisidine (ρ -AnV) :**

La méthode de l'indice ρ -anisidine (ρ -AnV) mesure la teneur en aldéhydes (principalement 2-alcénals et 2,4-alcadiénals) générés lors de la décomposition des hydroperoxydes dans les graisses et les huiles. Elle est basée sur la réaction de coloration de ρ -méthoxyaniline (anisidine) et les composés aldéhydiques. La réaction de réactif ρ -anisidine avec les aldéhydes dans des conditions acides conduit à des produits jaunâtres qui absorbent à 350 nm. Cette couleur est quantifiée et convertie en ρ -AnV et l'intensité de la couleur dépend de la teneur en aldéhydes ainsi que de leur structure. La méthode AOCS Cd 18-90 [65] a été normalisée pour l'analyse de la valeur d'anisidine.

Ce test est plus sensible aux aldéhydes insaturés que les aldéhydes saturés parce que les produits colorés à partir d'aldéhydes insaturés absorbent plus fortement à cette longueur d'onde [84]. Cependant, elle est bien corrélée avec la teneur totale en substances volatiles et représente un indicateur fiable de rancissement oxydatif des graisses, des huiles et des aliments contenant des lipides [85,86]. Une corrélation hautement significative entre ρ -AnV, les saveurs marquant et de PV a été décrite [87]. Néanmoins, certains auteurs ont indiqué que le ρ -AnV est comparable seulement avec le même type d'huile parce que le ρ -AnV initial varie selon les sources de l'huile [88]. Par exemple, les huiles avec des niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés peuvent avoir plus de ρ -AnV même si l'huile fraîche.

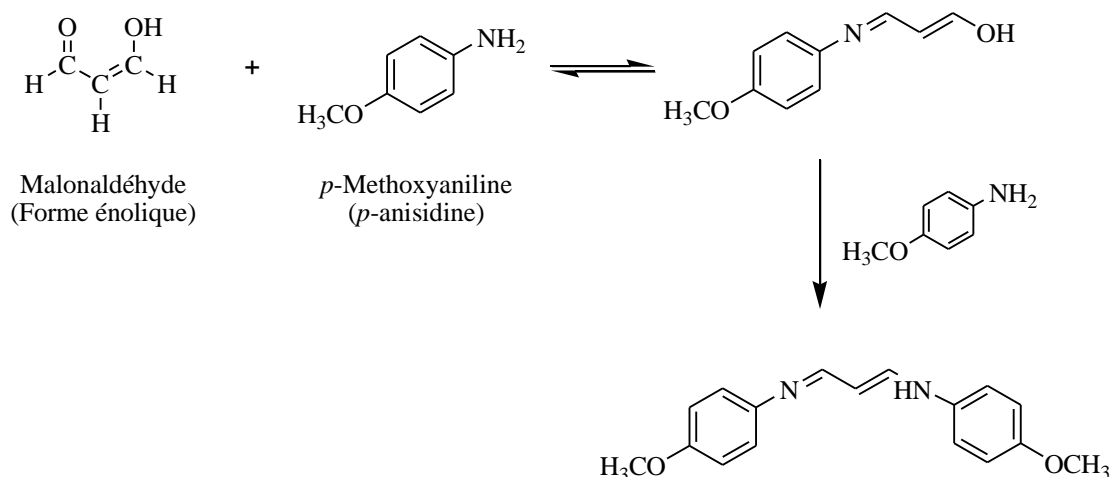


Figure II.8. Réactions possibles entre le réactif ρ -anisidine et malonaldéhyde.

- **Indice de TOTOX :**

L'indice de Totox est une mesure de l'oxydation totale, y compris les produits d'oxydation primaires et secondaires et il est calculé par $2\text{PV} + \rho\text{-AnV}$, fournissant à des informations sur l'état actuel de l'oxydation. Il est utilisé par l'industrie [77]. Au cours de

l'oxydation des lipides, on observe souvent que PV augmente d'abord, puis il diminue comme les hydroperoxydes se décomposent (Figure II.5). Le PV et ρ -AnV reflètent le niveau de l'oxydation en première et dernière étapes de la réaction d'oxydation, respectivement. L'indice Totox mesure les tous deux indices d'hydroperoxydes et leurs produits de dégradation, et fournit une meilleure estimation de la détérioration progressive de l'oxydation des graisses et des huiles [89].

- **Indice de stabilité de l'huile (OSI):**

Au cours de l'oxydation des lipides, des acides organiques volatils, principalement l'acide formique et l'acide acétique sont produits, en tant que des produits volatils d'oxydation secondaire, à des températures élevées, en même temps avec les hydroperoxydes [90,91]. En outre, les autres produits secondaires, y compris les alcools et les composés carbonylés, peuvent en plus être oxydés en acides carboxyliques [90]. La méthode de l'indice de stabilité de l'huile (OSI) permet de mesurer la formation d'acides volatils en surveillant la variation de la conductivité électrique lorsque le flux des huiles oxydées passent à travers l'eau [50]. L'indice d'OSI est défini comme le point de changement maximal de la vitesse d'oxydation, attribuée à l'augmentation de la conductivité par la formation d'acides organiques volatils au cours de l'oxydation des lipides [92]. Cependant, cette méthode nécessite un niveau un peu plus élevé d'oxydation ($PV > 100$) afin d'obtenir des résultats quantifiables que d'autres méthodes, dans lesquelles les hydroperoxydes sont les produits les plus importants formés et détectés [93]. Par conséquent, pour déterminer la stabilité de l'huile dans le laboratoire, en particulier les huiles qui sont stables dans des conditions normales, le procédé d'oxydation est accéléré en exposant des échantillons de l'huile à des températures élevées en présence d'un excès d'air ou d'oxygène [94,95].

Dans la méthode d'OSI, on utilise un flux d'air et une température élevée pour accélérer l'oxydation [93]. L'OSI est un développement automatisé de la méthode d'oxygène actif (AOM), parce que les deux méthodes emploient le principe de l'oxydation accélérée. Toutefois, le test OSI mesure les variations de la conductivité provoquée par les acides volatils ioniques, tandis que PV est déterminé dans l'AOM [44].

Deux pièces d'équipement sont disponibles dans le commerce, le Rancimat (Metrohm Ltd.) et l'instrument de stabilité oxydative (Omnion Inc.), sont utilisés pour déterminer la valeur OSI. Le Rancimat est une méthode automatisée rapide, qui

s'accorde bien avec l'AOM [93]. Dans le test Rancimat, un flux d'air est mis à barboter à travers l'huile chauffée, généralement à 100 °C ou au-dessus. Pour les huiles marines, des températures aussi basses que 80 °C sont souvent utilisées. Les composés volatils formés lors de l'oxydation accélérée sont recueillis dans de l'eau distillée, ce qui augmente la conductivité de l'eau.

La variation de la conductivité est tracée automatiquement et la période d'induction de l'huile ou le temps nécessaire pour atteindre un niveau fixe de conductivité est enregistré [90,96]. Le test Rancimat permet de surveiller le processus d'oxydation en continu. Comme rapporté par Farooq et al. [97], l'analyse par la méthode Rancimat est à quatre à cinq fois plus rapide que celle de l'OMA. Une excellente corrélation entre Rancimat et diènes conjugués a été trouvée [94]. Cependant, le principal inconvénient de cette méthode est que seuls huit échantillons peuvent être inclus dans chaque lot. Un autre appareil, l'instrument de stabilité oxydative, fonctionne sur le même principe que le Rancimat, et a la capacité d'analyser simultanément jusqu'à 24 échantillons [90].

Diverses modifications ont été proposées pour l'évaluation de l'oxydation des lipides par la méthode OSI. Il s'agit notamment de l'utilisation des énergies auxiliaires, tels que les micro-ondes pour réduire le temps d'analyse [94] et une combinaison de la méthode OSI avec la chromatographie afin d'obtenir des informations spécifiques sur les produits volatils. Les substances volatiles piégées lors de la mesure par le test Rancimat peuvent être analysées par la technique de l'espace de tête couplée à la chromatographie en phase gazeuse (HS-GC) avec FID et à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour la quantification individuelle des composés volatils, ainsi améliorant la spécificité de l'évaluation [98].

Partie expérimentale

Chapitre III :

Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes :

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS).

III.1. Matériels :

III.1.1. Matériels de laboratoire :

La liste de la verrerie, les solvants, les réactifs, l'appareillage et d'autres équipements sont mentionnés dans l'annexe (Annexe 6).

III.1.2. Matériel végétal :

Dans le cadre des intérêts du laboratoire de VTRS portant sur la valorisation des produits d'origine d'El Oued , nous avons choisis le fruit d'olivier comme matière première pour étudier l'impact de température et des méthodes d'extraction sur sa teneur en acides gras d'oméga-3 et -6.

III.1.2.1. Échantillonnage et description :

Quatre échantillons de fruits d'olivier représentant quatre variétés différentes d'olive ont été étudiés.

Toutes les variétés ont été obtenus après la récolte de fruits dans la région d'El-Oued, dans le sud-est de l'Algérie, au cours de la campagne agricole de 2013 (Novembre). Le tableau III.1 regroupe l'origine, et la codification des échantillons.

Tableau III.1. Description des olives échantillonnées.

Variété	Code	Origine
Rougette	LAR	El-Oued
Manzanilla	MAN	El-Oued
Neb djmal	NEB	El-Oued
Sigoise	SIG	El-Oued

La figure III.1 suivante représente les photos des fruits d'olivier à étudier :

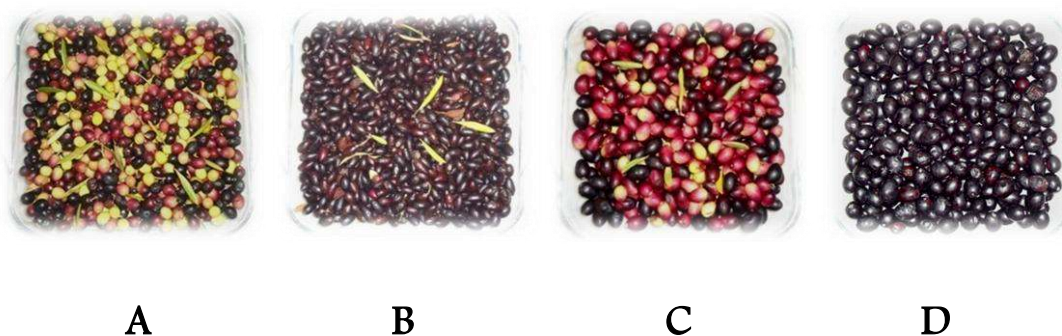


Figure III.1. Quatre variétés d'olive à étudier.

A : MAN, B : NAB, C : LAR, D : SIG

III.1.2.2. Préparation et conditionnement de la matière première :

Après la récolte, les échantillons du fruits de l'olivier ont été transportés au laboratoire dans des sacs en plastique pour les traitements. Les échantillons ont été ensuite nettoyés de leurs feuilles, lavés soigneusement pour enlever les corps étrangers indésirables du sol, dénoyautés manuellement puis conservés dans des boîtes en verre et ensuite conditionnés dans un réfrigérateur à 4 °C trois jours avant l'extraction jusqu'à ce que l'analyse a commencé. Immédiatement avant l'extraction par solvant, chaque échantillon a été haché dans un mixeur. Après procéder à l'extraction par solvant, le reste de pâtes (échantillons des fruits d'olive hachés) a été congelé dans des boîtes de verre à - 18 °C, pendant trois 3 mois (stocké), lorsqu'ils ont été procédé à l'extraction par pressage.

Les pâtes stockées (fruits d'olive hachés), qui ont été maintenues congelées dans des récipients hermétiques, ont été laissées à décongeler à température ambiante, avant l'extraction de l'huile par le pressage et les quatre huiles d'olive ont été extraites par le même système de traitement.

III.2. Analyse biochimique :

III.2.1. Teneur en eau :

Elle est déterminée en portant des échantillons frais (m_1) pesés préalablement dans une étuve à 80 °C jusqu'à poids constant. La matière sèche obtenue est pesée (m_2). La teneur en eau des échantillons est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (g/100g)} = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1}$$

III.2.2. Détermination de la teneur en lipides totaux :

D'une façon générale, la première étape d'analyse de lipides consiste souvent à extraire d'abord les lipides de la matrice. Plusieurs procédures d'extraction des lipides totaux, qui dépendent de la nature de la matrice alimentaire et du type de lipide à analyser, peuvent être utilisés. Les lipides neutres peuvent être extraits par des solvants non polaires, tels que l'éther de pétrole ou l'hexane. Un mélange de solvants polaires et non polaires permet d'extraire les lipides neutres et les lipides polaires (phospholipides), qui sont deux classes de lipides constituées d'acide gras. Deux méthodes d'extraction au solvant, les méthodes de Folch et de Bligh et Dyer, basées sur l'utilisation d'un mélange chloroforme-méthanol, sont toujours très utilisées aujourd'hui en laboratoire [1].

Folch et al. [99] ont été parmi les premiers qui ont reconnu et développé le système de phase méthanol/ chloroforme/ eau (la méthode dite "Folch"), qui, sous diverses modifications, continue à être considéré comme les moyens classiques et les plus fiables pour extraire les lipides quantitativement. Dans l'intérêt de l'économie, des méthodes moins exhaustives ont été développées. De loin le plus connu est la méthode de "Bligh et Dyer" [100], qui est devenue l'une des méthodes les plus recommandées pour extraire les lipides totaux de tissus biologiques frais, animaux et végétaux [101, 102]. Cette méthode est en fait reconnue comme une méthode de référence standard dans de nombreuses études pour la détermination des lipides des poissons marins [102-110] ainsi que pour d'autres types d'échantillons, comme du lait [111, 112].

Dans tous les cas, il est important de prendre certaines précautions afin de s'assurer que l'étape d'extraction n'altère pas la composition de l'extrait lipidique et que le rendement soit total, telle que manipulation sous azote, évaporation des solvants à une température inférieure à 40 °C, réduction du temps d'extraction et de stockage avant l'analyse, ce qui permettent de prévenir l'oxydation des acides gras polyinsaturés [1].

L'ultrason qui peut considérablement améliorer le transport de masse dans des divers procédés alimentaires a été utilisé pour favoriser l'homogénéisation, l'agitation et l'extraction [113,114]. Dans l'extraction liquide/solide, l'ultrason améliore principalement le transfert de masse par des forces de cavitation. L'effondrement des bulles explosives peut générer une pression localisée intensive provoquant la rupture des parois cellulaires et améliorant la libération des composants intracellulaires dans un solvant [115]. L'extraction assistée par ultrasons (EAU) [116-118] contourne certains

inconvenients des techniques d'extraction traditionnelles, tels que la perte et la dégradation des composants thermolabiles, en raison de ses températures de travail les plus basses. L'extraction assistée par ultrasons est moins coûteuse, grâce à la réduction significative du temps et de la température d'extraction, ainsi que les meilleurs rendements obtenus ou similaires dans la plupart du temps [114, 116, 119-122].

Idéalement, une technologie d'extraction des lipides doit présenter un niveau élevé de spécificité vis à vis des lipides, afin de minimiser la co-extraction des contaminants non-lipidiques, tels que les protéines et les glucides [123]. En outre, la technologie choisie doit être efficace (tant en termes de temps et d'énergie), non réactive avec les lipides, relativement pas chère, et sécuritaire [124]. Dans cette section, nous allons examiner l'utilisation de l'extraction par solvant organique pour la détermination routine des matières lipidiques à l'échelle du laboratoire. Nous allons également examiner l'extraction habituelle par pressage mécanique, une technologie verte utilisée dans l'industrie.

III.2.2.1. Extraction par solvant organique :

III.2.2.1.A. Principes de base :

Les principes de base de l'extraction par solvant organique de lipides sont ancrés sur le concept de base de la chimie du «like dissolving like ». En raison des interactions entre leurs longues chaînes hydrophobes d'acides gras, les lipides neutres participent par des faibles forces d'attractions de Van der Waals entre elles et forment des globules dans le cytoplasme [124,125]. Le mécanisme proposé pour l'extraction par solvant organique est représenté dans la figure III.2 et peut être divisé en cinq étapes.

Quand une cellule de végétaux est exposé à un solvant organique non polaire, tel que l'hexane ou le chloroforme, le solvant organique pénètre à travers la membrane cellulaire dans le cytoplasme (étape 1) et interagit avec les lipides neutres en utilisant des forces similaires de Van der Waals (étape 2) pour former un complexe solvant organique-lipides (étape 3). Ce complexe solvant organique-lipides, entraîné par un gradient de concentration, diffuse à travers de l'autre côté de la membrane cellulaire (étape 4) et le film de solvant organique statique entourant la cellule (étape 5) vers la plupart de solvant organique. Par conséquent, les lipides neutres sont extraits hors des cellules et restent dissouts dans le solvant organique non polaire. Un film statique de solvant organique est formé du fait de l'interaction entre le solvant organique et la paroi cellulaire. Ce film entoure la cellule de végétaux et reste non perturbé par aucun flux de solvant ou d'agitation.

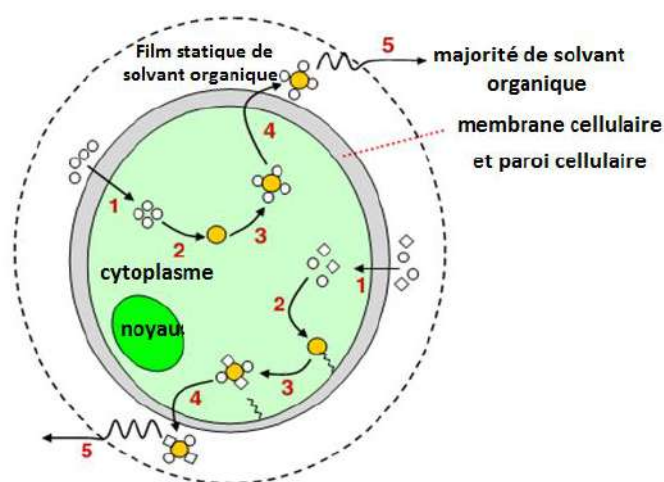


Figure III.2. Représentation schématique des mécanismes d'extraction par solvant organique proposés. Voie indiquée en haut de la cellule: le mécanisme de solvant organique non-polaire. Voie indiquée au bas de la cellule: le mécanisme de mélange de solvant organique non-polaire/ polaire. ● lipides, ○ solvant organique non polaire, ◇ solvant organique polaire [123].

Certains lipides neutres sont, cependant, trouvés dans le cytoplasme comme un complexe avec des lipides polaires. Ce complexe est fortement lié par des liaisons hydrogènes avec des protéines de la membrane cellulaire. Les interactions de Van der Waals formés entre le solvant organique non-polaire et les lipides neutres dans le complexe sont insuffisantes pour perturber ces associations lipide-protéine membranaires. D'autre part, un solvant organique polaire (tel que le méthanol ou l'isopropanol) est capable de perturber les associations lipide-protéine en formant des liaisons hydrogènes avec les lipides polaires dans le complexe [124,125]. Le mécanisme par lequel le mélange de solvant organique non polaire / polaire extrait les complexes lipidiques associés à la membrane est également proposé à moitié inférieure de la figure III.2 et peut être divisé en cinq étapes.

Le solvant organique (non-polaire et polaire) pénètre à travers la membrane cellulaire dans le cytoplasme (étape 1) et interagit avec le complexe de lipide (étape 2). Au cours de cette interaction, le solvant organique non polaire entoure le complexe de lipide et forme des associations de Van der Waals avec les lipides neutres dans le complexe, tandis que le solvant organique polaire entoure également le complexe de lipide et forme des liaisons hydrogènes avec les lipides polaires dans le complexe. Les liaisons hydrogènes sont suffisamment fortes pour déplacer les associations lipide-protéine liant le complexe lipidique avec la membrane cellulaire. Un complexe de

solvant organique-lipides est formé et se dissocie au loin de la membrane cellulaire (étape 3). Le complexe solvant organique-lipides ensuite diffuse à travers de l'autre côté de la membrane cellulaire (étape 4) et le film statique de solvant organique entourant la cellule (étape 5) vers la plupart de solvant organique. En tant que tel, l'addition d'un solvant organique polaire à un solvant organique non polaire facilite l'extraction de complexes de lipide neutre associé à la membrane. Cependant, le processus a également conduit inévitablement à la co-extraction des lipides polaires.

Dans la plupart des travaux pratiques de laboratoire, les deux solvants organiques, non polaire et polaire sont ajoutés aux cellules de tissus animaux et végétaux frais pour assurer l'extraction complète de tous lipides neutres, à la fois sous la forme de globules autoportants et sous la forme de complexes associées à la membrane [126].

III.2.2.1.B. Principe de travail:

L'extraction de lipide a été réalisée par un mélange de solvant organique selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) combinée à une extraction assistée par ultrasons [100,127]. Cette technique repose sur le principe d'une extraction à température modérée des lipides à partir de tissus frais par un mélange de solvant organique méthanol/chloroforme (1/2 ; v/v) afin d'extraire la totalité des lipides, des plus polaires au moins polaires, à l'aide d'un ultrason qui provoque la rupture des parois cellulaires.

La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure.

III.2.2.1.C. Protocole expérimental :

Les volumes initiaux de solvants ont été réalisés selon la méthode originale de Bligh et Dyer en utilisant le rapport suivant: Dans un ballon de 500 mL, 100 g d'échantillon a été homogénéisé avec 300 mL du mélange chloroforme: méthanol (1:2, v/v) (système monophasique). On procède ensuite à l'extraction à l'aide d'un ultrason, l'extraction a lieu à 60 °C dans un bain à ultrasons, dont la capacité ultrasonique est de 720W. Pour cela le ballon est adapté au réfrigérant à reflux, puis le mélange est soniqué pendant 30 min. Assurer que le niveau du mélange du ballon était inférieure à celui de la cuve de nettoyage. Après l'extraction, le mélange a été filtré sous vide sur Büchner muni d'un papier filtre puis le filtrat a été ré-homogénéisé avec

100 mL de chloroforme, et 100 mL d'eau distillée ou solution de sel faible est ajoutée. Le système bi-phasique final a été transvasé dans une ampoule et mis à décanter jusqu'à séparation en deux phases. : une phase surnageante contenant les composés non lipidiques et une phase organique qui contient la quasi-totalité des lipides. Pour une extraction quantitative des lipides, le reste de tissu est ré-homogénéisé avec du chloroforme et filtré à nouveau. Les fractions sont rassemblées et mises à décanter dans une ampoule. Après décantation, la phase inférieure, composée de l'huile et du chloroforme, est prélevée dans un ballon à fond rond. L'huile est obtenue après évaporation à sec du chloroforme sous pression réduite à 40 °C et le solvant résiduel a été éliminé à l'aide d'un courant d'azote. Ensuite la teneur en lipide est déterminée par gravimétrie après évaporation de la phase de chloroforme combinée à siccité. Tous les échantillons ont été conservés à l'abri de la lumière, dans un flacon en verre ambré à -18 °C jusqu'au moment de l'analyse.

III.2.2.2. Extraction par pressage mécanique :

L'extraction par pressage mécanique a été appliquée pour déterminer la composition d'huile n'ayant pas subi de dégradation thermique. Les pâtes des fruits d'olivier de chaque variété ont été préparées pour les traiter et donc l'huile d'olive a été obtenue en utilisant un système d'extraction mécanique à l'échelle du laboratoire.

III.2.2.2.A. Description du montage :

La presse préparée se compose d'un maître-plaque surmonté à deux plaques de pressage. Une des plaques fixée à l'aide des tiges sur le maître- plaque et l'autre sur le piston pour faire le pressage. Cet ensemble est placé dans un récipient pour recueillir l'extrait qui s'écoule. Une représentation schématique de montage de presse utilisé est présentée dans la figure III.3 suivante :

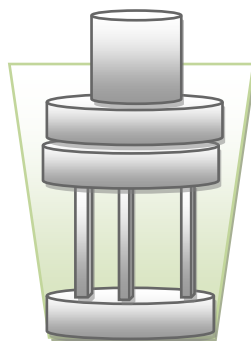


Figure III.3. Schéma du montage de pressage et d'extraction utilisé.

III.2.2.2.B. Protocole expérimental :

Chaque fois, une faible quantité de la matière à extraire est déposée au moyen d'une spatule au niveau de la plaque fixée, puis soumise à une pression de (0-20 MPa) après de remettre le piston sur la plaque en utilisant une presse hydraulique à commande manuelle jusqu'à ce que le liquide commence à s'écouler. Dès que le liquide s'arrête à s'écouler entre les plaques, vider l'air, retirer le piston et ensuite refaire l'expérience avec d'autre quantité d'échantillon à presser. Le liquide obtenu (huileux et aqueux) a été séparé par un procédé de décantation et on obtient de trois produits finaux: l'huile et les deux déchets (grignon et des eaux). Après la décantation, l'huile brute de pressage a été centrifugée à température ambiante. L'huile clarifiée est alors séparée des résidus et ensuite transférée dans des flacons en verre brun pour le stockage à -18 °C avant d'autres analyses.

III.2.3. Détermination de la composition en acides gras :

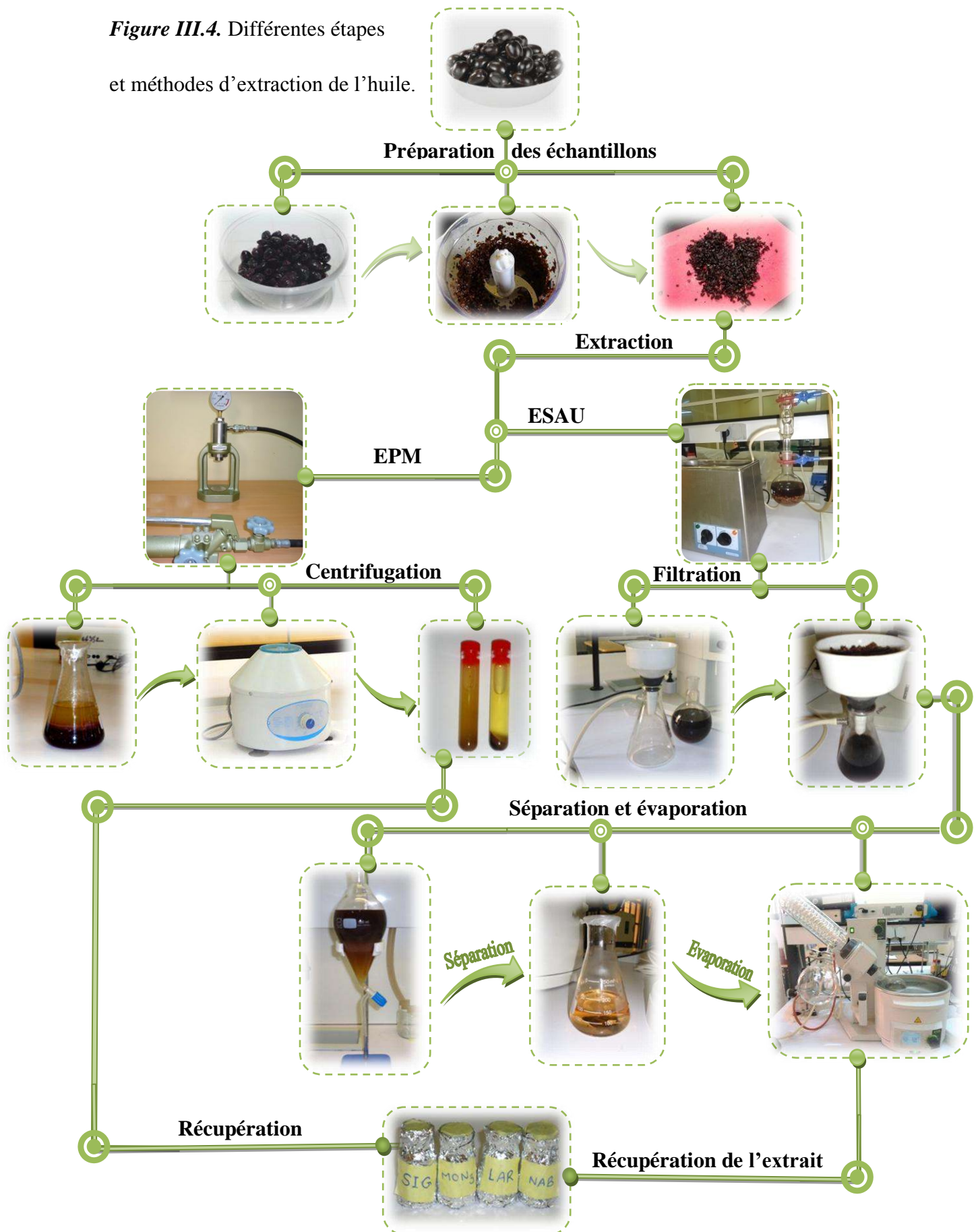
Plusieurs méthodes rapportées pour la caractérisation de la composition en acides gras de certains produits lipidique sont basées sur l'analyse de chromatographie, car elle permet de les séparer et les quantifier facilement [128-130]. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) se distingue parmi les autres méthodes d'analyse des acides gras, mais cette méthodologie implique une longue étape de dérivation et a besoin de temps pour l'analyse des acides gras [131, 132]. Par conséquent, la disponibilité des méthodes analytiques rapides et efficaces dans ce domaine spécifique est l'importance la plus haute pour les deux communautés scientifiques et industrielles. À l'occasion de ce travail, l'analyse électrochimique a été développée et envisagée comme une autre méthodes utilisées pour étudier les acides gras insaturés. Elle présente l'intérêt de ne pas nécessiter beaucoup de temps pour l'analyse.

III.2.3.1. Analyse chromatographique :

III.2.3.1.A. Principe :

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Un gaz vecteur, appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne, renfermant une phase stationnaire. Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase stationnaire et il est entraîné par la phase mobile. Les solutés, en fonction de leur nature, sont plus ou moins retenus et sortent de la colonne séparés au sein de la phase mobile. Un détecteur placé en sortie de colonne permet de détecter la présence d'un soluté au sein du gaz vecteur.

Figure III.4. Différentes étapes et méthodes d'extraction de l'huile.



Le temps de rétention caractérise qualitativement la substance concernée. L'amplitude ou l'aire des pics permet de déterminer la concentration des différents solutés dans le mélange initial. Cette méthode d'analyse a été mise en œuvre pour détecter les acides gras présents dans les extraits lipidiques sous forme d'esters méthyliques.

III.2.3.1.B. Méthylation des acide gras (Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)) :

Dans le cas des acides gras, l'injection en CPG de l'extrait lipidique est précédé d'une méthylation directe des AG, présents sous forme libre ou estérifié au glycol dans le mélange, afin de rendre peu volatils ces acides gras.

Selon [133], la méthylation des acides gras consiste en deux étapes principales: le prétraitement des échantillons suivie d'une transesterification.

B.1. Prétraitement catalysé par un acide (estérification) :

Cette étape consiste à estérifier les acides gras libre afin d'éviter la formation du savon qui peut inhiber la séparation d'ester méthylique et glycérol (formation d'émulsion) lors de l'utilisation d'un catalyseur alcali [133].

Le prétraitement de l'huile d'olive a été effectué avec un acide sulfurique à concentration 10% de l'huile comme catalyseur et un volume de méthanol de 50% de l'huile. Une quantité connue d'huile a été pesée dans un ballon à fond rond 100 mL. On y traite avec le méthanol (50%) et l'acide sulfurique concentré (10%). Le ballon équipé d'un barreau aimanté est adapté au réfrigérant à reflux et placé dans un bain à 70 °C puis on agite le mélange sous reflux à 800 rpm. Au terme de 120 min de la réaction, le mélange réactionnel a été laissé à décanter dans une ampoule à décanter de 60 mL jusqu'à séparation en deux couches. La couche inférieure qui contient les fractions de méthanol - eau - H₂SO₄ a été éliminée. La couche supérieure composée de l'huile d'olive ayant une teneur plus faible d'acides gras libres et des impuretés a été purifiée par lavage avec une solution chaude de bicarbonate de sodium (5% p/v), pour neutraliser l'excès de H₂SO₄ et de réduire l'acidité, puis elle a été laissée à reposer jusqu'à séparation complète des phases. Encore la phase inférieure a été drainée et la procédure a été répétée jusqu'à ce que la couche drainée devient basique. L'huile traitée est ensuite lavée avec de l'eau distillée et la procédure a été répétée jusqu'à ce que la valeur de pH de l'eau de lavage devient similaire à celle de l'eau distillée. L'huile traitée est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre (0,5-1 g), agitée rigoureusement pour

éliminer les traces d'eau et décantée dans un ballon à fond rond taré à travers d'un papier filtre, puis pesé pour l'étape suivante de transestérification.

B.2. Transestérification catalysée par une base :

La réaction de transestérification implique l'hydrolyse des triglycérides suivi d'une méthylation des acides gras résultants. Elle a été réalisée en utilisant le même équipement expérimental de l'étape de prétraitement et l'hydroxyde de potassium comme catalyseur. Le ballon a été initialement chargé avec de l'huile traitée (huile à faible teneur en AGL). Les pastilles d'hydroxyde de potassium (1.5% en poids de l'huile d'olive) ont été dissoutes dans un rapport de méthanol (30 p% de l'huile) puis le mélange a été introduit dans le ballon. La réaction a lieu à 70 °C, pendant 1 heure sous agitation constante à 800 tr/min. Après chauffage et agitation magnétique à l'aide d'un barreau aimanté, le mélange a été transvasé dans une ampoule à décanter et laissé reposer. La couche d'ester a été séparée par gravité et située dans la couche supérieure. Le glycérol, l'excès du méthanol et les produits indésirables sont dans la couche inférieure et ont été soutirés. La phase d'ester méthylique a été ensuite lavée avec de l'eau distillée pour l'élimination complète de l'excès du méthanol et les traces du catalyseur. L'étape de lavage a été répétée jusqu'à neutralité. Les EMAGs ont été séchés sur sulfate de sodium, filtrés et stockés à - 18 °C dans des flacons en verre jusqu'à l'analyse par CPG (Figure III.5). Une dilution des esters méthyliques dans l'hexane est faite pour une concentration adaptée à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

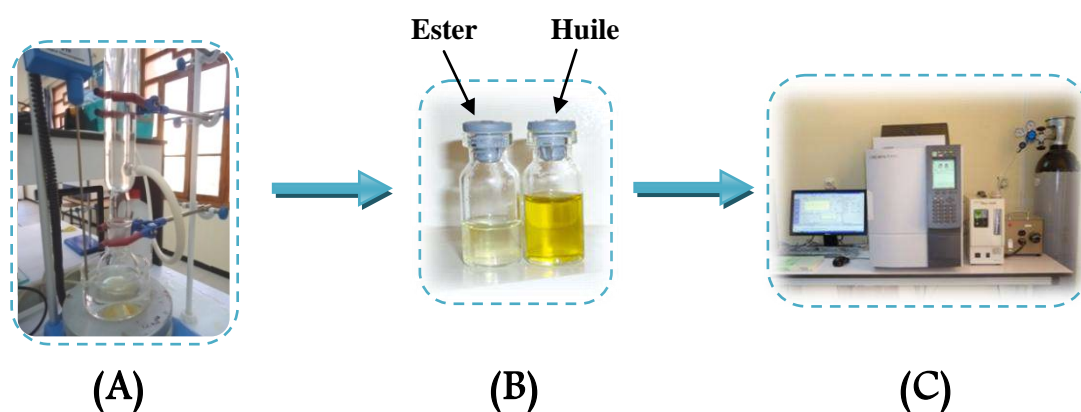


Figure III.5. Préparation et analyse des esters méthyliques d'acides gras.

(A): Estérification et transestérification. (B): Récupération d'ester. (C): Analyse par CPG

III.2.3.1.C. Analyse par Chromatographie en phase gazeuse :

Toutes les analyses quantitatives et qualitatives d'esters méthyliques ont été réalisées sur un chromatographe gazeux équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et ils ont été séparés sur une colonne capillaire DB-WAX (30 m de longueur, 0,32 mm de diamètre, dont l'épaisseur du film est de 0,25 μm) garnie de polyéthylène glycol. L'azote a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de colonne de 0.59 mL/min. La température de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 250 °C et 280 °C respectivement. La séparation des esters d'acides gras a été réalisée suivant un gradient de température comme suit : la température initiale de la colonne a été maintenue au départ à 50 °C pendant 1 min, puis celle-ci a été portée à 200 °C à raison de 25 °C min^{-1} . Enfin, elle a été augmentée à 230 °C avec un taux de 3 °C min^{-1} et maintenue durant 18 min à cette température. L'analyse a été en mode d'injection split avec un rapport de division de 1:50. Le volume d'injection a été de 1,0 μL , et chaque échantillon de l'huile a été analysé au moins en triplicat. L'identification des pics a été réalisée à l'aide d'un standard d'esters d'acides gras fournis par la société Restek (mélange de EMAG, 37 composés). Le logiciel GC Solution a permis l'intégration des chromatogrammes. La proportion de chaque acide gras a été exprimée en pourcentage, calculée, suivant la méthode ISO 5508 [134], en se référant l'aire de pic d'acide gras considéré à la somme des aires de tous les pics d'acides gras détectés, à l'exception de celle du solvant.

III.2.3.2. Analyse électrochimique :

Récemment, la technique décrite pour étudier les composés purs ou les extraits, c'est la technique électrochimique grâce à sa possibilité et sa rapidité de fournir des informations quantitatives et qualitatives sur les processus électrochimiques afin de comprendre leurs comportements [135,136]. De nombreuses méthodes électrochimiques sont couramment réalisées sur des extraits bruts, afin d'analyser leurs substances électro-actives sans prétraitement [137, 138]. Ces méthodes sont basées sur la propriété d'oxydoréduction d'un composé dans le milieu réactionnel. Cependant, les extraits lipidiques testés n'ont pas permis l'apparition de l'oxydation des acides gras insaturés à cause de leur richesse en antioxydants, tel que la vitamine E. Après plusieurs essais infructueuses d'optimiser les conditions expérimentales sans prétraiter l'extrait, nous avons trouvé que les échantillons lipidiques doivent faire l'objet d'une étape de l'élimination des antioxydants afin d'analyser électro- chimiquement leurs acides gras.

III.2.3.2.A. Techniques expérimentales utilisées :

La voltammétrie cyclique et la voltammétrie à onde carrée sont deux techniques électrochimiques les plus couramment utilisées et qui représentent également des méthodes de choix, notamment pour évaluer les espèces chimiques. Elles sont des techniques expérimentales permettant l'étude de système en régime de diffusion pure.

Le principe général de la voltammétrie est donc l'obtention d'une réponse (le courant) du système soumis à une perturbation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant une exploration par imposition et variation progressive du potentiel d'électrode (balayage de potentiel) [139].

La connaissance des caractéristiques fondamentales d'une réaction électrochimique se fait au moyen de la mesure des variations du courant en fonction du potentiel appliqué aux bornes d'une cellule d'électrolyse. Cette relation se traduit par l'obtention de figures appelées voltammogrammes. À partir des courbes obtenues, il est alors possible de déterminer la nature et la concentration des espèces Ox et Red, aussi d'évaluer les paramètres de cinétique électrochimique ...etc.

➤ Voltammétrie cyclique :

La voltammétrie cyclique est la technique la plus utilisée pour acquérir à des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques. Cela revient à sa capacité de fournir rapidement des informations considérables sur les processus redox, la cinétique de réactions de transfert d'électrons hétérogènes et sur les réactions chimiques couplées ou encore les procédés d'adsorption. La voltammétrie cyclique est souvent la première expérience réalisée dans l'étude électroanalytique. En particulier, elle offre une localisation rapide des potentiels redox des espèces électroactives, et une évaluation convenable de l'effet des milieux sur le processus d'oxydoréduction [140].

Principe :

La voltammétrie cyclique est une méthode électroanalytique basée sur des mesures dans des conditions de microélectrolyse dynamiques (hors équilibre). Les courbes obtenues (qui sont caractéristiques de la solution électrolytique) peuvent être utilisées pour déterminer la nature et la concentration des espèces oxydables ou réductibles présentes [139].

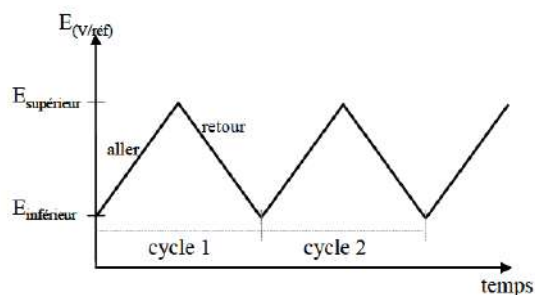


Figure III.6. Évolution du potentiel en fonction du temps en voltammétrie cyclique.

Lors de l'application du potentiel, les espèces électroactives présentes à la surface de l'électrode s'oxydent (ou se réduisent) et l'intensité anodique (ou cathodique) augmente jusqu'à un maximum. Les courbes I-E ont donc la forme de pics (Figure III.7). En effet, la concentration des espèces consommées à l'interface électrode/solution électrolytique diminue et dans les conditions de diffusion linéaire semi-infinie, le courant après le pic diminue. L'intensité du pic obtenu est proportionnelle à la concentration de l'espèce correspondante.

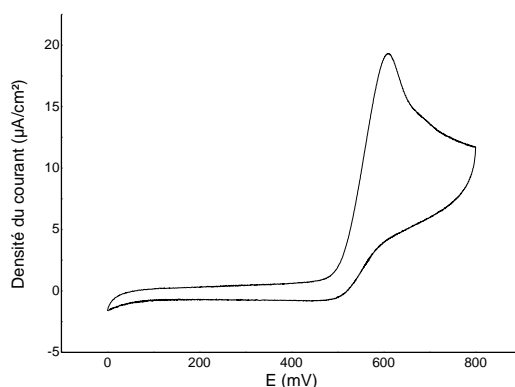


Figure III.7. Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus irréversible d'oxydoréduction.

L'interprétation des données:

Le voltammogramme cyclique est caractérisé par plusieurs paramètres importants. Quatre d'entre eux sont observables, les potentiels d'oxydations (E_{pa}) et de réductions (E_{pc}), ainsi que les intensités des courants des pics i_{pc} et i_{pa} de l'espèce étudiée, fournissent la base pour le diagnostic développé mis au point par Nicholson et Shain pour analyser la réponse cyclique voltammétrique [140].

L'étude des courbes intensité-potential enregistrées, appelées communément voltammogrammes cycliques, rend compte des caractéristiques du système étudié. Trois cas sont à considérer :

✚ Système réversible :

Un système est dit réversible ou Nernstien si le transfert de charge est rapide. La relation entre la concentration des espèces électroactives à la surface de l'électrode et la densité de courant du pic (i_{pa}) correspondante est montrée par l'équation de Randles-Sevcik, ce qui donne à 25 °C :

$$i_{pa} = (2.69 \times 10^5).S. n^{3/2}.D_{Ox}^{1/2}.C_{Ox}.v^{1/2}$$

S , surface de l'électrode en cm^2 , n , nombre total des électrons transférés, D , coefficient de diffusion en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$, C , concentration de l'espèce réagissante au sein de l'électrolyte en mol.cm^{-3} , v , vitesse de balayage en mV.s^{-1} .

✚ Système irréversible :

Pour un système totalement irréversible, le transfert électronique hétérogène est lent et donc l'équation de Nernst n'est plus applicable. La réaction inverse peut être négligée. L'expression de la densité de courant en fonction de la concentration d'espèce électroactive est donnée ici par la relation simplifiée de Butler-Volmer à 25 °C suivante :

$$i_p = (2.99 \times 10^5).S. \alpha^{1/2}.n^{3/2}.D^{1/2}.C.v^{1/2}$$

α , coefficient de transfert.

L'intensité i_p s'exprime en A.cm^{-2} si D est exprimé en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$; v en V.s^{-1} et la concentration C en mol.cm^{-3}

✚ Système quasi-réversible :

L'expression mathématique du courant du pic pour ce système a été développée par Matsuda et Ayabe, le courant de pic est donné par l'expression suivante :

$$i_p = (2.69 \times 10^5).S. n^{3/2}.D^{1/2}.C.K.v^{1/2}$$

Avec, K , constante de vitesse.

Les voltammogrammes cycliques caractéristiques de ces trois situations sont présentés sur la figure III.8 suivante :

Ces voltammogrammes ont pour caractéristique principale de dépendre de la vitesse de balayage de potentiel, laquelle peut être rendue très élevée. Par ailleurs, la réalisation de balayage aller et retour donne naissance à des voltammogrammes présentant un tracé différent au retour et à l'aller.

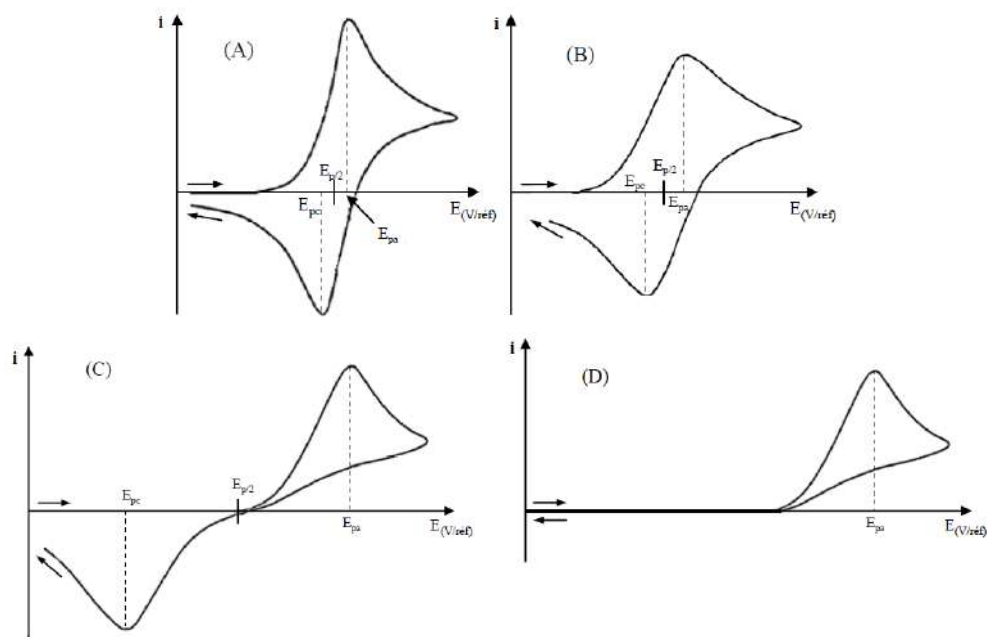


Figure III.8. Voltammogrammes cycliques pour des systèmes : réversible rapide (A), quasi réversible semi rapide (B) réversible lent (C) totalement irréversible (D).

➤ Voltammétrie à onde carrée :

L'application de SWV a été très répandue dans la dernière décennie, surtout en raison, de sa grande sensibilité aux réactions confinées à la surface des électrodes. La voltammétrie à ondes carrées est une technique électrochimique puissante qui peut être appliquée dans les deux mesures, électrocinétiques et analytique [141]. Elle est beaucoup plus sensible et peut fournir une meilleure résolution que la voltammétrie cyclique ou la voltammétrie impulsionnelle normale. Pour ces raisons, SWV peut être la méthode de choix pour les systèmes à faibles concentrations en substance électroactive ou à des signaux interférés [142,143].

Description et Principe :

La voltammétrie à onde carrée est une technique différentielle de large amplitude dans laquelle la forme d'onde est composée d'une onde carrée symétrique, superposée à

un potentiel de base en escalier, est appliquée à l'électrode de travail [140]. Le courant est échantillonné à deux reprises durant chaque cycle d'onde carrée, une fois à la fin de l'impulsion directe (à l'instant t_1) et une fois à la fin de l'impulsion inverse (à t_2). Le signal mesuré, qui est la différence Δi entre les courants mesurés de deux impulsions successives est enregistré comme une réponse nette et il est tracé en fonction du potentiel correspondant de la forme escalier d'onde [139,144,145].

La SWV permet d'améliorer la sensibilité non seulement par une augmentation du rapport courant faradique/courant capacitif mais également par la réduction du temps de mesure [138].

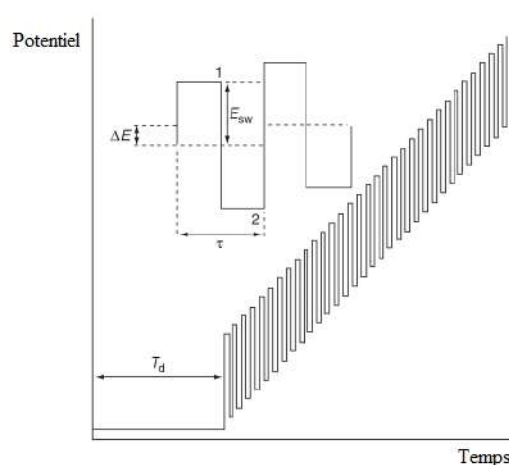


Figure III.9. Forme d'onde de l'onde carrée montrant l'amplitude, la hauteur du pas, la période de l'onde carrée, temps de retard, et les temps de mesure de courant 1 et 2 [140].

La courbe dimensionnelle du courant net est donnée dans la figure III.10. La forme de pic résultant de voltammogramme est symétrique autour du potentiel de demi-onde, et le courant de pic est proportionnelle à la concentration [140].

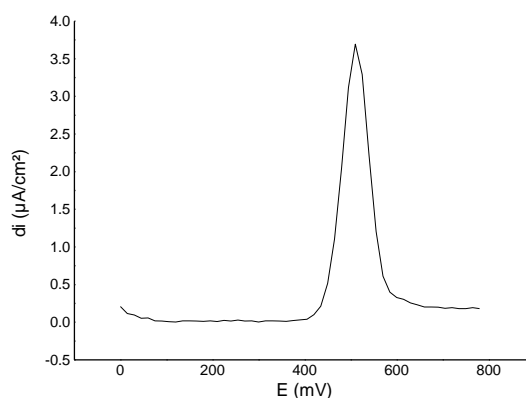


Figure III.10. Voltammogramme à onde carrée.

Le courant net de pic peut être calculé par la relation suivante :

$$\Delta i_p = nFSD_r^{1/2} \Delta\phi_p f^{1/2} C$$

Où n est le nombre d'électrons, F est la constante de Faraday, S est la surface de l'électrode, C est la concentration de l'espèce Ox ou Red, D est le coefficient de diffusion de l'espèce Ox ou Red, f est la fréquence d'onde carrée et E est le potentiel de demi-onde de la réaction. La réponse nette adimensionnelle $\Delta\phi_p$ est fonction de E_{SW} : l'amplitude d'onde carrée et ΔE : l'incrément du potentiel [146].

➤ **Voltammétrie impulsionnelle différentielle :**

La voltammétrie impulsionnelle différentielle est une technique extrêmement utile pour mesurer les niveaux des traces d'espèces organiques et inorganiques. Dans la voltammétrie impulsionnelle différentielle, des impulsions d'amplitude fixe-superposées sur un rampe linéaire de potentiel- sont appliquées à l'électrode de travail à un temps juste avant la fin de la baisse (Figure III.11). L'importance de la DPV dans l'analyse chimique est basée sur son élimination supérieure du courant capacitif / arrière-plan. Cela est obtenu en mesurant le courant deux fois: juste avant l'application de chaque impulsion (à 1) et encore une fois juste à la fin de la vie d'impulsion (après ~ 40 ms, au 2, lorsque le courant de charge a pourri) (Figure III.11). Le premier courant est instrumentalement soustrait du second, et cette différence de courant [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] est tracée en fonction du potentiel appliqué. Le voltammogramme impulsionnelle différentielle résultant est en forme de pic de courant, dont la hauteur est directement proportionnelle à la concentration des analytes correspondants [140, 146]:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_p}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right)$$

Où $\sigma = \exp \left[\left(\frac{nf}{RT} \right) \left(\frac{\Delta E}{2} \right) \right]$ (ΔE est l'amplitude de l'impulsion). La valeur maximale du quotient $(1 - \sigma)/(1 + \sigma)$, obtenu pour les grandes amplitudes d'impulsions, est égale à l'unité.

Le potentiel de pic (E_p) peut être utilisé pour identifier les espèces, comme il se produit à proximité du potentiel de demi-onde polarographique [140, 146]:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$$

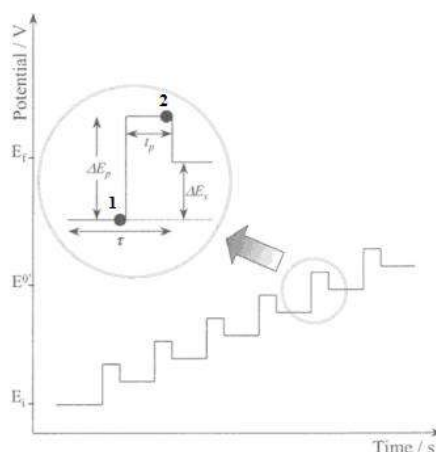


Figure III.11. Programme du potentiel pour la voltammétrie impulsionnelle différentielle [146].

L'opération d'impulsion différentielle résulte d'une correction très efficace du courant de fond de chargement. La contribution du courant de charge au courant différentiel est négligeable, elle est décrite par la formule suivante:

$$\Delta i_c \approx -0.00567 C_i \Delta E m^{2/3} t^{-1/3}$$

Où C_i est la capacité intégrale. Cette contribution de fond est inférieure de plus d'un ordre de grandeur que le courant de charge de la voltammétrie impulsionnelle normale. En conséquence, la voltammétrie impulsionnelle différentielle permet à l'analyste de détecter les analytes présents dans la solution jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} (environ $1 \mu\text{g} / \text{L}$) [140].

La réponse en forme de pic des mesures d'impulsions différentielles résulte aussi d'une résolution améliorée entre deux espèces avec des potentiels redox similaires. Dans des diverses situations, les pics séparés par 50 mV peuvent être mesurés. Une telle quantification ne dépend que des potentiels des pics correspondants seulement, mais également de la largeur du pic. La largeur du pic (à mi-hauteur) est liée à la stoechiométrie d'électrons:

$$W_{1/2} = \frac{3.52 RT}{nF}$$

et correspond donc à 90.4, 45.2 et 30,1 mV pour $n = 1, 2$ et 3 , respectivement (à 25°C) [140].

La sélection de l'amplitude d'impulsion et la vitesse de balayage de potentiel nécessite habituellement un compromis entre la sensibilité, la résolution et la vitesse. Par exemple, les grandes amplitudes d'impulsions se traduisent par des pics plus grands et plus larges. Des amplitudes d'impulsion de 25-50 mV, couplés avec une vitesse de balayage de 5 mV/s, sont couramment utilisés. Les systèmes redox irréversibles entraînent des pics de courant inférieurs et plus larges (c.-à-d, sensibilité et une résolution inférieure) par rapport à ceux prévus pour les systèmes réversibles. En plus de l'amélioration de la sensibilité et de la résolution, la technique peut fournir des informations sur la forme chimique dans laquelle l'analyte apparaît (les états d'oxydation, complexation, etc.) [140].

III.2.3.2.B. Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental pour réaliser les mesures électrochimiques nécessite la présence des composants suivants :

Potentiostat :

C'est un appareil électronique d'asservissement, aux bornes duquel les trois électrodes sont connectées (Figure III.12). On l'utilise pour imposer à l'électrode indicatrice un potentiel bien contrôlé. Cet appareil fournit automatiquement la tension électrique entre l'électrode indicatrice et la contre-électrode, nécessaire pour que la tension entre l'électrode indicatrice et l'électrode de référence soit maintenue égale à une valeur de consigne affichée sur l'appareil.

Pour décrire un voltammogramme, on effectue alors un balayage de potentiel en modifiant progressivement la tension de consigne contrôlée par le potentiostat, au moyen d'un système de pilotage automatique [139].

Cellule électrochimique :

C'est une cellule de mesure en verre de volume bien définie, elle renferme la solution électrolytique contenant l'échantillon à analyser et dans laquelle plongent les électrodes : de travail, auxiliaire et de référence comme illustre les figures III.12 et III.13.

L'électrolyte support, composé d'espèces chargées présent en grande quantité devant les espèces d'intérêt, ce qui assure la conductivité (le transport des ions) et ne participe pas aux réactions. Il est important en effet, afin d'assurer une densité de courant homogène à l'électrode de travail, de minimiser le phénomène de la chute ohmique, et de maintenir aussi proche que possible l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire [144].

Electrodes :

Il faut opérer dans une cellule d'électrolyse comportant trois électrodes auxquelles un circuit extérieur se trouve connecté [139].

a) Electrode de référence:

L'électrode de référence possède un potentiel spécifique et constant. Cette propriété permet de pouvoir imposer un potentiel précisément défini entre cette électrode et l'électrode de travail afin de forcer l'oxydation de la molécule étudiée. Les électrodes de références les plus utilisées sont celles au calomel saturé $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$, et celles au chlorure d'argent Ag/AgCl (KCl 3M).

b) Electrode de travail :

En règle générale, l'électrode de travail (ou encore, électrode indicatrice) où doivent avoir lieu les réactions que l'on désire produire, doit être stable pendant une très grande période, doit posséder un bon rapport signal/ bruit de fond et doit être également simple à manipuler et à conditionner. Le potentiel de cette électrode peut être contrôlé à l'aide d'une électrode de référence.

De plus, les solutés à analyser doivent y développer une cinétique de réaction électrochimique rapide dans un large domaine de potentiel accessible [145].

Dans notre étude, nous avons choisis l'électrode au carbone vitreux de diamètre 3 mm comme une électrode de travail en raison de sa facilité de mise en œuvre et de son faible courant résiduel.

c) Electrode auxiliaire:

L'électrode auxiliaire appelée aussi contre-électrode qui permet de mesurer l'intensité du courant circulant dans la cellule électrochimique au cours de l'électrolyse. Le potentiel de la contre-électrode n'ayant en général pas besoin d'être lui-même contrôlé [139].

En effet, les électrons libérés au cours de la réaction d'oxydoréduction créent un courant entre l'électrode auxiliaire et l'électrode de travail. Il s'agit d'une électrode en inox, en platine ou bien en carbone qui assure le passage du courant.

Dans notre étude, l'électrode auxiliaire est un fil en platine (Pt) pure à 99.99%. En raison de la formation d'oxyde sur la surface du matériau, les électrodes en platine sont recommandées [147,148].



Figure III.12. Dispositif expérimental électrochimique voltampérométrique.



Figure III.13. Cellule à trois électrodes.

III.2.3.2.C. Expérience :

L'expérience voltammétrique consiste à appliquer un potentiel à l'électrode de travail qui varie avec le temps comme le montre les figures III.6 et III.9. L'expérience enregistre le courant circulant à travers l'électrode de travail en fonction du potentiel appliqué et en même temps un tracé de courant en fonction du potentiel est construit. Le potentiel de l'électrode de travail commence par une valeur, E_1 , généralement mais pas obligatoire, il est choisie pour correspondre à la circulation du courant négligeable afin d'assurer qu'aucune réaction électrochimique ne se produit sur l'électrode de travail.

Le potentiel est ensuite balayé d'une manière linéaire jusqu'à une tension E_2 , mais pour la voltammétrie cyclique, à ce point le sens du balayage est inversé et le potentiel d'électrode de travail est inversé généralement jusqu'au retour à la valeur initiale. Le potentiel E_2 est généralement sélectionné de sorte que l'intervalle de potentiel (E_2-E_1) contient le processus d'oxydation ou de réduction d'intérêt [149]. Tout en gardant la même vitesse de balayage.

Au début de l'application du potentiel, le potentiel imposé est faible, car il n'y a pas de réaction redox. Lorsqu'on augmente le potentiel imposé, la réaction d'oxydation devient favorable et les espèces réduites à proximité de l'électrode sont oxydées avec transfert d'électron à l'électrode de travail, entraînant la diffusion d'espèces réduites vers l'électrode.

III.2.3.2.D. Principe d'étude :

Cet étude repose sur le principe d'obtention des pics d'oxydation d'acides gras insaturés des produits lipidiques riches en antioxydants précédés d'une saponification. La réaction de saponification suivie d'une double extraction liquide-liquide permet

l'élimination des composants insaponifiables. La phase organique supérieure contient les matières non-saponifiables (vitamines, stérols et pigments) tandis que les lipides saponifiés, sous forme carboxylate, sont dissous dans la phase inférieure constituée d'éthanol et d'eau.

III.2.3.2.E. Extraction des insaponifiables :

À 2 g de l'échantillon d'huile pesé dans un ballon, on a ajouté 25 mL de solution de potasse éthanolique à 2M. Le mélange a été agité sous reflux et maintenu dans un bain d'eau à 80 °C pendant 1 h. Une fois la réaction est terminée, on ajoute quelques millilitres d'eau par le haut du réfrigérant. On procède ensuite à l'extraction après refroidissement. La solution est transvasée dans une ampoule à décanter et 25 mL d'eau distillée et 50 mL d'éther de pétrole sont ajoutés, le ballon est également rincé. Le mélange est laissé reposer jusqu'à la séparation de deux phases. La phase d'éther de pétrole (phase supérieure), qui contient la matière non-saponifiable, est recueillie dans une autre ampoule. Afin d'extraire les composants de l'insaponifiable complètement, la procédure a été répétée jusqu'à ce que la phase organique devient incolore.

III.2.3.2.F. Extraction des acides gras :

La phase savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec H_2SO_4 concentré jusqu'à la formation complète des produits amorphes d'acides gras. Les acides gras libres sont ensuite extraits plusieurs fois avec 50 mL d'éther de pétrole puis les extraits d'éther de pétrole ainsi rassemblés sont lavés avec d'eau distillée et séchés sur Na_2SO_4 anhydre, agités rigoureusement pour éliminer l'eau résiduelle et décantés dans un ballon à fond rond à travers un papier filtre. Le solvant est ensuite éliminé à 40 °C sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif et les lipides récupérés sont pesés. Tous les échantillons sont stockés à l'abri de la lumière dans des flacons en verre à -18 °C jusqu'à l'analyse.

III.2.3.2.G. Analyse par la voltammétrie :

Les manipulations électrochimiques sont réalisées à température ambiante (298 K°) dans une cellule électrochimique en verre connectée à un potentiostat voltalab 80. L'interface est pilotée par un microordinateur, utilisant le logiciel Voltmaster 4 version 7.08. Un système à trois électrodes a été utilisé pour toutes les expériences. La meilleure électrode pour cet objectif est en carbone vitreux qui minimise les interférences de l'éthanol qui s'oxyde sur des électrodes métalliques

inertes telles que le platine et l'or [150]. Une contre-électrode en platine et une électrode de référence au calomel saturé $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$, connectées à la cellule, complètent le dispositif de mesure. Tous les potentiels sont exprimés par rapport à cette électrode de référence.

Les solutions électrolytiques sont constituées d'un mélange de solvant organique $\text{EtOH}/\text{C}_6\text{H}_6\text{-CH}_3$ (1 :1 v/v) contenant 0,1 M de H_2SO_4 . Pour chaque courbe intensité-potential, le domaine de potentiel est choisi de manière à éviter l'oxydation et la réduction de solvant.

De plus, entre chaque expérience, un nettoyage systématique de l'électrode de travail est réalisé. Il consiste à polir la surface de l'électrode avec du papier abrasif. Après rinçage à l'eau distillée, l'électrode est immergée dans la solution qui y compris l'extrait à analyser.

Enfin, les voltammogrammes sont effectués dans l'électrolyte support avec le volume ajouté de chaque extrait à $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la CV et $15 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la SWV et la DPV, entre le domaine d'électroactivité des acides gras insaturés (+200 à +1500mV) jusqu'à l'obtention de courbes intensité-potential reproductibles et présentant une allure caractéristique.

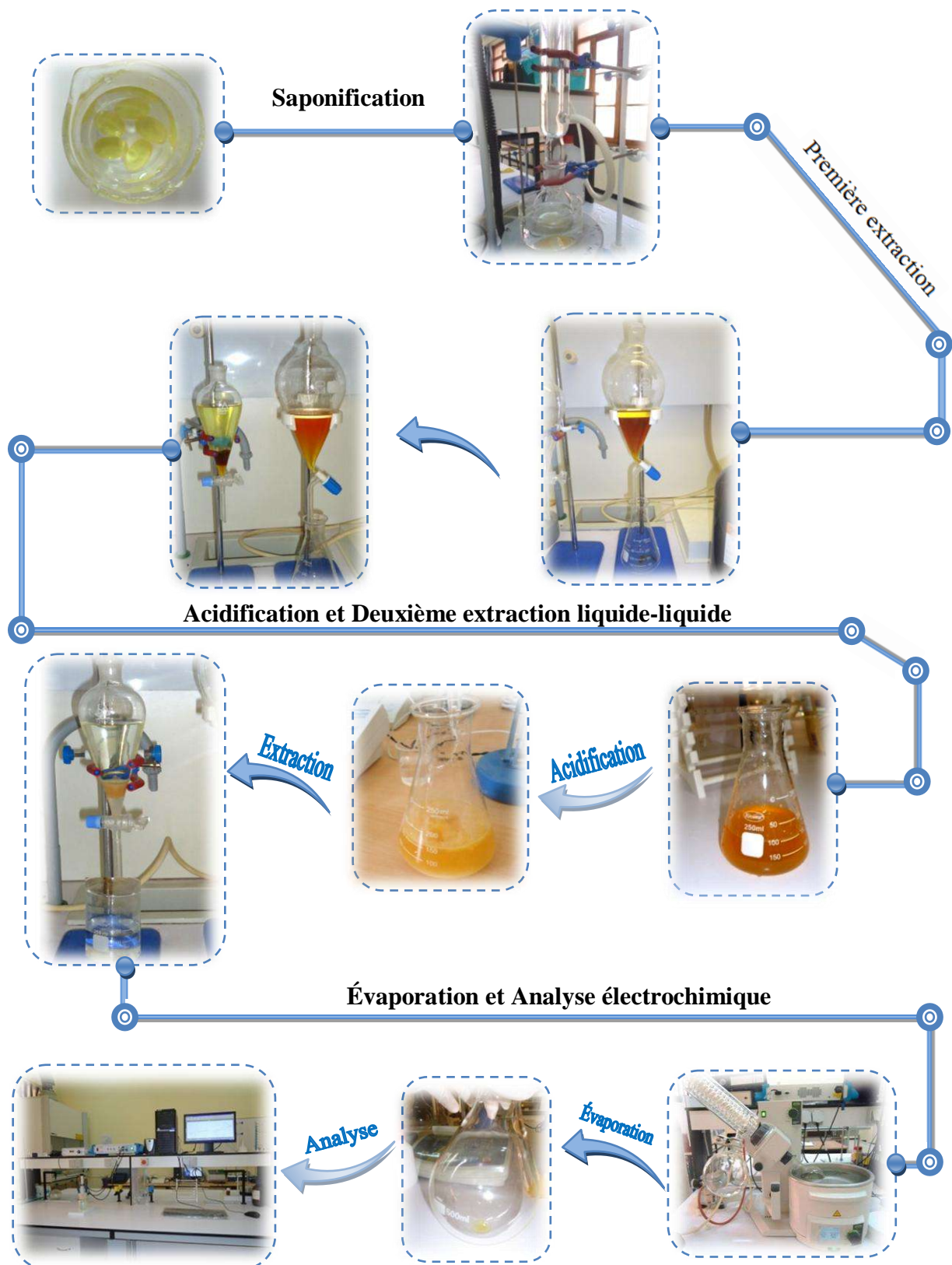


Figure III.14. Différentes étapes de séparation de l'insaponifiable de l'huile et d'extraction des acides gras.

III.3. Traitement thermique des échantillons :

Le traitement thermique a été mis en œuvre dans un four dans lequel les échantillons lipidiques sont chauffés sur une plaque chauffante d'acier. Le traitement thermique consiste à maintenir l'échantillon sous chauffage dans des flacons en verre pendant 15 min. Les températures à étudier sont : 175 °C, 275 °C, 350 °C et 450 °C. Après refroidissement à température ambiante, les échantillons traités sont conservés à l'abri de la lumière, à -18 °C pour la suite d'étude.

III.3.1. Contrôles de l'oxydation des corps gras insaturés :

La qualité de l'huile obtenue par les différentes méthodes d'extraction ainsi que les échantillons préchauffés d'huile d'olive a été évaluée par la détermination de certains paramètres. Il existe plusieurs tests de contrôle de qualité en rapport avec l'oxydation des corps gras: le profil d'acide gras, l'indice d'acidité et l'analyse spectrophotométrique. L'indice d'acidité et l'analyse spectrophotométrique ont été déterminées selon les méthodes officielles décrites dans CEE Reg. N° 2568/91 [151]. Le profil d'acides gras des échantillons préchauffés a été mis en œuvre selon la description au paragraphe III.2.3.1.

III.3.1.1. Analyse de la spectrophotométrie ultraviolette :

Il a été découvert en 1933 que la formation de diènes conjugués dans les graisses et huiles donne lieu à un pic d'absorption à 230-235 nm dans la région ultraviolette (UV). Dans les années 60, la surveillance de diène conjugué est considérée comme une technique utile pour l'étude de l'oxydation des lipides [47]. Lors de la formation d'hydroperoxydes d'acides gras insaturés, des diènes conjugués sont généralement produits, en raison du réarrangement des doubles liaisons. Les diènes conjugués résultants présentent une absorption intense à 234 nm; les triènes conjugués similaire absorbent à 268 nm [44]. Une augmentation de l'absorption UV correspond théoriquement à la formation de produits d'oxydation primaire dans les graisses et les huiles [80, 81].

Selon [40], les hydroperoxydes linoléiques absorbent à 232 nm (fonction diène conjuguée) et les produits d'altération thermoxydative non volatils absorbent à la fois à 232 nm et à 270 nm (cétone désaturée). Le rapport E232/E270 est d'autant plus bas que l'oxydation est plus poussée et qu'elle a eu lieu à température plus élevée.

III.3.1.1.A. Principe :

La détection ultraviolette des diènes conjugués est simple, rapide, et ne nécessite pas des réactifs chimiques, seulement de petites quantités d'extrait lipidique [47, 50]. La matière grasse étudiée est dissoute dans le solvant requis, puis on détermine l'absorbance de la solution à la longueur d'onde prescrite, par rapport au solvant pur. On calcule les absorbances spécifiques à partir de lectures spectrophotométriques.

III.3.1.1.B. Protocole expérimental :

Les échantillons de l'huile (0,5 mg) sont dilués dans du cyclohexane, et la solution obtenue doit être parfaitement limpide. Au cas où la solution présenterait une opalescence ou un trouble, elle est filtrée rapidement sur papier. Le spectre d'absorption de la solution obtenue est enregistré au spectrophotomètre, contre le solvant employé, aux longueurs d'onde comprises entre 200 et 276 nm. Les absorbances des échantillons sont lues à 232 nm et à 270 nm. Les valeurs d'absorbance lues doivent être comprises dans l'intervalle de 0,1 à 0,8; dans le cas contraire, il est nécessaire de répéter les mesures en utilisant les solutions plus concentrées ou plus diluées appropriées. Les analyses des échantillons sont répétées trois fois.

III.3.1.1.C. Expression des résultats :

Rapporter les absorbance spécifiques (coefficients d'extinction) aux différentes longueurs d'onde, calculées comme suit :

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{C \times S}$$

Où :

K_{λ} : Absorbance spécifique à la longueur d'onde λ ;

E_{λ} : Absorbance mesurée à la longueur d'onde λ ;

C : concentration de la solution en grammes par 100 mL ;

S : épaisseur de la cuvette en centimètres.

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

III.3.1.2. Indice de l'acidité :

L'indice d'acide est défini comme étant le nombre de milligrammes de KOH nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme de matière grasse. Il est déterminé par titrage des huiles/matières grasses à l'aide d'une solution éthanolique standard d'hydroxyde de potassium.

III.3.1.2.A. Principe :

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 éthanolique standard d'hydroxyde de potassium.

III.3.1.2.B. Protocole expérimental :

Les prises d'essais sont pesées dans une fiole conique et mise en solution dans 50 mL du mélange éthanol / éther diéthylique (1:1, v/v) préalablement neutralisé. L'ensemble est titré sous agitation magnétique avec une solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/L jusqu'à virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphthaléine persistant durant au moins 10 secondes).

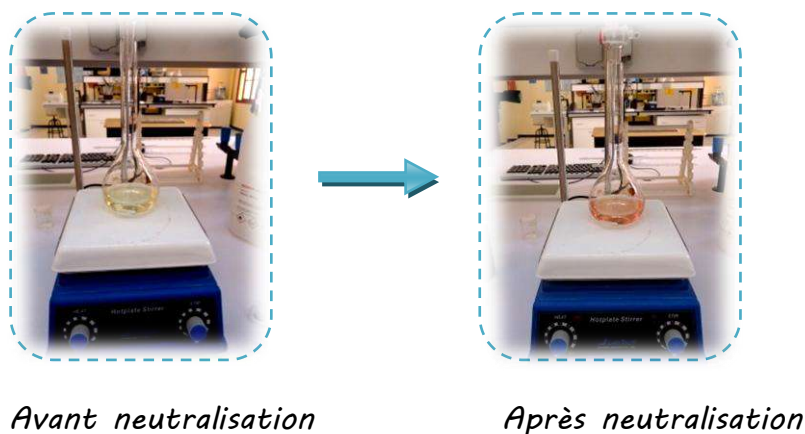


Figure III.15. Dosage des acides gras libres.

L'indice d'acide se détermine comme suit :

$$I_A = V \times C \times \frac{56.1}{m}$$

où:

V: volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée;

C: concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée;

m: poids en grammes, de la prise d'essai.

L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres exprimé en pourcentage en poids d'acide oléique:

$$\text{Acidité (\% acide oléique)} = \frac{I_A}{56.1} \times \frac{M}{1000} \times 100 = \frac{I_A}{1.99}$$

M: masse molaire, en grammes par mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (= 282).

III.4. Étude statistique :

Les analyses de variance à un facteur (ANOVA) ont été réalisées sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail afin de déterminer s'il existait des différences significatives entre les valeurs des différents échantillons. La comparaison des médianes et la recherche des groupes homogènes, c'est à dire la recherche de l'effet significatif, ont été réalisées à l'aide du test de Tukey. Un niveau de probabilité de $P < 0.05$ a été utilisé pour tester la signification statistique de toutes les données expérimentales. Ces études ont été effectuées grâce au logiciel Minitab, version 17.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion :

Ayant réalisé des analyses chromatographiques d'échantillons des huiles avant et après leurs traitements thermiques de mise en évidence l'effet de température sur les AGPIs, nous avons poursuivi notre travail en déterminant l'état d'oxydation de ces échantillons. À cet effet, l'état d'oxydation a été déterminé par deux méthodes : la détermination des diènes conjugués et de l'indice d'acidité. De plus, une technique électrochimique a été développée pour analyser les acides gras polyinsaturés via leurs oxydations, c'est la voltammétrie.

Ce chapitre a pour objectif de se présenter les résultats correspondants. La discussion de ces résultats sera abordée selon trois axes: il s'agira d'une première partie d'évaluer les méthodes d'extraction de l'huile d'olive, prenant en compte l'influence de la méthode d'extraction sur la composition en acides gras, d'une part, et d'une autre part l'influence de la matière première sur la performance de chaque méthode étudiée. Dans une seconde partie, nous avons établi l'influence de température sur la composition en oméga-3 et -6 de quatre variétés étudiées. Ainsi, l'influence de la matière première et la stabilité oxydative des échantillons a été évaluée sur l'effet de température. Enfin, la 3^{ème} partie, il s'agira de choisir un produit alimentaire en tant que aliment riche en oméga-3 ou -6 possédant de stabilité oxydative considérable par rapport aux autres variétés et sources.

IV.1. Caractérisation biochimique :

IV.1.1. Teneurs en eau :

Le matériel végétal frais était séché à la température de 80 °C, les teneurs en eau sont présentées dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1. Teneur en eau des variétés d'olive

Variétés	Teneur en eau (%)
LAR	49,25
MAN	56,84
NEB	72,63
SIG	60,09

IV.1.2. Fraction lipidique :

L'étude bibliographique minutieuse menée sur l'espèce *Oléa europea L.*, révèle que l'espèce de la région d'El-Oued (Sud-est algérien) n'a jamais fait l'objet d'une quelconque étude chimique. Ceci nous a incité à nous intéresser de près à l'étude de leurs composition en acides gras, et par la même occasion de la valoriser pour une future utilisation.

L'analyse des fractions lipidiques se déroule en trois étapes : extraction des composés gras des fruits étudiés, l'analyse de l'extrait et le traitement des résultats pour identifier et/ou quantifier ces fractions.

IV.1.2.1. Extraction des AGPIs d'oméga-3 et-6 :

L'objectif initial de ce travail est de choisir une méthode permettant d'extraire de l'huile à partir de fruits d'oliviers afin d'obtenir un produit lipidique quantitativement riche en AGPIs d'oméga-3 et-6 permettent d'étudier l'effet de température sur ces acides gras. Pour cela, il est nécessaire de limiter au maximum les réactions conduisant à l'altération du produit, en particulier celles résultant de l'oxydation des lipides, au cours de l'extraction et de la conservation.

L'extraction des lipides a été réalisée par deux méthode. Celle-ci a été réalisée en présence d'un solvant organique et l'autre à l'aide d'un pressage mécanique. Ces méthodes sont généralement rencontrées dans la bibliographie. Il est donc indispensable de procéder à une analyse biochimique afin de pouvoir les évaluer et enfin de valoriser les quatre variétés d'olive.

IV.1.2.2. Composition en acides gras :

Afin d'évaluer la performance de deux techniques d'extraction et de valoriser également l'espèce *Oléa europea L.* d'El-Oued, l'idée consiste à extraire et à établir le profil chimique des acides gras présent dans les fruits d'oliviers et qui sont connus pour leur effet bénéfique sur la santé.

À cet effet, l'analyse de la composition en acides gras des extraits a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les analyses ont été réalisées en trois fois, et les acides gras, ainsi que leurs abondances relatives sont regroupés dans les tableaux IV.2 et IV.3.

IV.1.2.2.A. Fractions lipidiques obtenues par ESAU :

L'analyse de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques d'acides gras de tous les lipides de fruit d'olivier extraits par ESAU a révélé la présence de 19 acides gras (Tableau IV.2): 13,14,19 et 17 constituants dans les fractions LAR, MAN, NEB et SIG respectivement, avec des pourcentages respectives de: 96.22%, 93.69 % , 94.88 % et 94.65 % , de la fraction totale en lipide.

Les profils d'acides gras des lipides totaux LT du fruit d'olivier examinés présentent des fortes similarités remarquables, avec des proportions variables d'acides gras insaturés, principalement de l'acide oléique (C18:1 ω -9) et l'acide linoléique (C18:2 ω -6), de même avec des proportions substantielles de l'acide saturé palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0). Les pourcentages d'acides gras dans les fruits d'olivier, ont diminué de l'ordre de AGMI > AGPI > AGS, seule le pourcentage d'acides gras de SIG a décroît de l'ordre de AGMI > AGS > AGPI. Des différences significatives entre les échantillons ont été observés pour les proportions des acides gras mesurées, et pour les rapports d'acides gras (Figure IV.1).

La principale différence en ce qui concerne les acides gras saturés est la concentration la plus élevée significativement de C18:0 ainsi que la présence de C22:0 dans la fraction lipidique de SIG par rapport aux autres échantillons. Par contre, une teneur importante d'acide palmitique C16:0 suivie d'une proportion beaucoup plus faible de C17:0 et C20:0 ont été également déterminées dans tous les échantillons lipidiques.

La comparaison entre les pourcentages d'AG insaturés des fractions lipidiques des différents échantillons du fruit d'olivier a montré que C18:1 ω -9 varient peu, chez les différents lipides étudiés, seul C18:1 ω -9 du lipide MAN est significativement inférieur à celui des autres lipides, tandis que C18:2 ω -6 est significativement plus élevé ($P < 0.05$) chez le lipide LAR, et plus faible dans celui de SIG. L'acide gras d' ω -3 (C18:3) est significativement plus important ($P < 0.05$) chez les lipides LAR et NEB, et inférieur dans ceux de MAN et SIG. Par ailleurs, une moindre quantité de C16:1, C17:1, C20:1 ω -9 a été également estimée dans tous les échantillons lipidiques. Les acides C24:1 ω -9, C18:3 ω -6 et C22:6 ω -3 sont présents dans les échantillons lipidiques LAR et MAN mais sont absents dans les autres échantillons NEB et SIG. Les résultats ci-dessus ont confirmé qu'il y a une grande variation dans toutes les compositions en acides gras analysées des variétés d'olives.

Tableau IV.2. Compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidiques d'olive extraites par ESAU.

Acides gras	LAR	MAN	NEB	SIG
C6:0	0.09±0.01 ^b	0.15±0.00 ^a	0.09±0.03 ^b	nd
C8:0	nd	0.10±0.01 ^a	0.10±0.04 ^a	nd
C10:0	nd	0.09±0.01 ^a	0.10±0.05 ^a	0.10±0.01 ^a
C11:0	nd	0.10±0.04 ^a	0.13±0.05 ^a	0.08±0.03 ^a
C12:0	nd	nd	0.09±0.04	nd
C14:0	0.09±0.02 ^a	nd	0.10±0.05 ^a	nd
C15:0	0.09±0.00 ^a	nd	nd	0.13±0.04 ^a
C16:0	17.10±0.26 ^{bc}	21.53±2.47 ^a	13.41±0.38 ^c	17.77±2.06 ^{ab}
C17:0	0.11±0.00 ^b	0.18±0.07 ^b	0.58±0.11 ^a	0.10±0.06 ^b
C18:0	1.80±0.04 ^c	1.64±0.16 ^c	3.15±0.00 ^b	4.16±0.31 ^a
C20:0	0.33±0.04 ^b	0.41±0.05 ^b	0.71±0.11 ^a	0.39±0.04 ^b
C22:0	nd	nd	nd	0.058±0.00
C16:1	0.94±0.08 ^b	2.67±0.37 ^a	0.90±0.10 ^b	2.43±0.31 ^a
C17:1	0.11±0.02 ^c	0.30±0.01 ^b	0.69±0.12 ^a	0.14±0.07 ^{bc}
C18:1 ω-9 c+t	50.25±0.95 ^b	43.50±0.99 ^c	54.46±3.34 ^{ab}	57.57±2.58 ^a
C20:1 ω-9 cis	0.28±0.10 ^{ab}	0.24±0.06 ^b	0.44±0.05 ^a	0.21±0.03 ^b
C24:1 ω-9 cis	nd	nd	0.08±0.03 ^a	0.07±0.03 ^a
C18:2 ω-6 c+t	23.94±0.35 ^a	21.94±0.37 ^b	18.55±0.93 ^c	10.39±0.36 ^d
C18:3 ω-6 cis	nd	nd	0.15±0.01 ^a	0.35±0.12 ^a
C18:3 ω-3 cis	1.20±0.03 ^a	0.85±0.10 ^b	1.26±0.07 ^a	0.84±0.06 ^b
C22:6 ω-3 cis	nd	nd	0.09±0.052 ^a	0.08±0.03 ^a
AGS	19.49±0.20 ^{bc}	24.20±2.33 ^a	18.32±0.67 ^c	22.71±1.84 ^{ab}
AGMI	51.59±0.96 ^{bc}	46.70±0.62 ^c	56.54±3.15 ^{ab}	60.40±2.27 ^a
AGPI	25.14±0.33 ^a	22.78±0.42 ^b	20.03±0.92 ^c	11.54±0.25 ^d
Σ ω-3 AGPI	1.20±0.03 ^a	0.85±0.10 ^b	1.32±0.02 ^a	0.92±0.04 ^b
Σ ω-6 AGPI	23.94±0.35 ^a	21.94±0.37 ^b	18.70±0.92 ^c	10.63±0.21 ^d
Ratio ω-6/ ω-3	19.94±0.67 ^b	26.12±3.18 ^a	14.16±0.70 ^c	11.58±0.29 ^c

Tous ces résultats indiquent que les acides gras d'huile d'olive sont accumulés de manière différente selon la variété. En fait, l'accumulation de ces métabolites dépend de leurs stockages enzymatiques, qui sont génétiquement déterminés, selon les résultats des autres recherches [152]. Des similarités entre les compositions en acides gras des huiles analysées dans notre recherche et ceux rapportées dans la littérature pour les huiles d'olive ont été trouvées [153-155].

D'après les résultats obtenus, aucune similarité n'a été trouvée dans le contenu en AGS, AGMI et AGPI pour les différentes fractions lipidiques étudiées, ainsi que la proportion ω -6. En revanche, le pourcentage d' ω -3 a été similaire dans les deux lipides LAR et NEB, il a été plus élevé ($P < 0.05$) que dans MAN et SIG. Les valeurs du rapport ω -6/ ω -3 observées pour les lipides NEB et SIG ont été significativement similaires et inférieures ($P < 0.05$) à ceux dans d'autres échantillons lipidiques, mais l'équilibre approprié pour ω -6/ ω -3 recommandé par le ministère de la Santé (1994) est 4. Un équilibre inapproprié de ω -6/ ω -3 AGPI pourraient contribuer à un plus grand risque de maladies coronariennes (CHD) [8].

IV.1.2.2.B. Fractions lipidiques obtenues par EPM:

L'analyse de la composition en acides gras de la fraction lipidique de LAR, MAN, NEB et SIG, extraits par EPM nous a permis l'identification de 13 composés: 13 dans la fraction de MAN, et 12 dans les autres trois fractions LAR, NEB et SIG, avec des pourcentages de: 93.14%, 97.92%, 97.78% et 94.54% respectivement, de la composition totale (Tableau IV.3). En effet, les différentes fractions lipidiques ont été fortement dominées par des acides gras mono-insaturés (53.68%, 46.34%, 58.23% et 61%), suivi par AGPI et AGS, respectivement pour les extraits LAR et NEB. En revanche, dans le cas de MAN et SIG, la teneur en AGS a été supérieure à celle en AGPI (Figure IV.1).

Les quatre fractions sont qualitativement similaires. Cependant, l'acide cis-11,14-Eicosadiénoïque (C20:2 ω -6) (0.04%) a été rapporté seulement dans l'extrait des MAN, et l'acide 12-Méthyl tétradécanoïque (C15:0) (0.05%) dans l'extrait de SIG avec l'absence de l'acide myristique (C14:0).

Tableau IV.3. Compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidique d'olive extraites par EPM .

Acides gras	LAR	MAN	NEB	SIG
C4:0	nd	nd	nd	nd
C6:0	nd	nd	nd	nd
C8:0	nd	nd	nd	nd
C10:0	nd	nd	nd	nd
C11:0	nd	nd	nd	nd
C12:0	nd	nd	nd	nd
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	0.05±0.01 ^{ab}	0.04±0.01 ^b	0.09±0.02 ^a	nd
C15:0	nd	nd	nd	0.05±0.00
C16:0	14.52±0.34 ^c	20.49±0.15 ^a	14.45±0.54 ^c	16.40±0.15 ^b
C17:0	0.07 ±0.02 ^b	0.1±0.06 ^b	0.47±0.01 ^a	0.06±0.01 ^b
C18:0	2.13±0.07 ^c	2.73±1.04 ^{bc}	3.69±0.35 ^{ab}	4.56±0.15 ^a
C20:0	0.36±0.01 ^c	0.40±0.00 ^b	0.61±0.02 ^a	0.43±0.01 ^b
C22:0	nd	nd	nd	nd
C14:1	nd	nd	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:1	0.77 ±0.02 ^b	0.14±0.01 ^c	0.87±0.03 ^a	0.09±0.00 ^c
C17:1	0.09±0.01 ^c	0.28±0.00 ^b	0.62±0.05 ^a	0.11±0.02 ^c
C18:1 ω-9 <i>c+t</i>	52.49±1.02 ^c	45.68±0.56 ^d	56.33±1.49 ^b	60.61±0.46 ^a
C20:1 ω-9 <i>cis</i>	0.33±0.05 ^{ab}	0.24±0.02 ^{bc}	0.42±0.05 ^a	0.19±0.03 ^c
C24:1 ω-9 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C18:2 ω-6 <i>c+t</i>	25.76±0.11 ^a	22.19±0.25 ^b	18.89±0.22 ^c	11.03±0.04 ^d
C18:3 ω-6 <i>cis</i>	0.18±0.14 ^a	0.04±0.00 ^a	0.16±0.02 ^a	0.16±0.16 ^a
C18:3 ω-3 <i>cis</i>	1.18±0.01 ^b	0.79±0.01 ^d	1.23±0.02 ^a	0.85±0.02 ^c
C20:2 ω-6 <i>cis</i>	nd	0.038±0.00	nd	nd
C20:3 ω-3 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C20:4 ω-6 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C22:6 ω-3 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
AGS	17.11±0.309 ^d	23.77±0.94 ^a	19.32±0.71 ^c	21.49±0.16 ^b
AGMI	53.68±0.99 ^c	46.34±0.54 ^d	58.23±1.41 ^b	61 ±0.50 ^a
AGPI	27.14±0.03 ^a	23.04±0.26 ^b	20.23±0.20 ^c	12.05±0.13 ^d
Σ ω-3 AGPI	1.18±0.01 ^b	0.79±0.01 ^d	1.23±0.02 ^a	0.85±0.02 ^c
Σ ω-6 AGPI	25.95±0.02 ^a	22.25±0.26 ^b	18.99±0.22 ^c	11.20±0.13 ^d
Ratio ω-6/ ω -3	21.90±0.11 ^b	28.16±0.52 ^a	15.43±0.46 ^c	13.17±0.30 ^d

De même, les pourcentages en AGS ont présenté des différences quantitatives dans leurs compositions. L'acide palmitique (C16:0) a été identifié comme le principal composant des fractions lipidiques des différents échantillons, mais sa teneur a été significativement plus élevée dans le lipide MAN et très basse dans ceux de LAR et NEB, suivi par l'acide stéarique (C18:0) (respectivement: 2.13%, 2.73%, 3.69% et 4.56%), et associé à des faibles quantités de l'acide Margarique (C17:0), et l'acide arachidique (C20:0), leurs teneurs les plus importantes significativement ont été trouvées dans l'extrait de NEB. Ainsi, une faible teneur en acide myristique (C14:0) est détecté uniquement dans les échantillons lipidiques LAR, MAN et NEB.

En outre, après avoir comparé la composition en acides gras insaturés des différents extraits lipidiques, nous avons trouvé que la concentration la plus élevée de (C18:1 ω -9) a été dans le lipide de l'extrait SIG, suivie par une proportion beaucoup plus faible de (C18:2 ω -6) par rapport aux acides présents dans les échantillons provenant des autres fruits d'oliviers. En effet, le lipide LAR a eu la proportion la plus importante de (C18:2 ω -6) et celui de MAN a eu le pourcentage le plus faible de (C18:1 ω -9). Une autre caractéristique intéressante d'AG insaturé ont été les niveaux nettement élevés, dans le lipide NEB, de l'acide C16:1, C17:1 et C18:3 ω -3, ainsi que la teneur la plus inférieure de ce dernier dans le lipide MAN par rapport à ceux présents dans les autres extraits lipidique. Selon les résultats obtenus, on peut conclure que les différences entre les acides gras d'échantillons du fruit d'olivier dépendent de la différence génétique entre les variétés végétales étudiées, en ce qui concerne la capacité enzymatique d'olive.

Selon les résultats obtenus, aucune similarité n'a été trouvé dans le contenu en AGS, AGMI et AGPI pour les différentes fractions lipidiques extraites à l'aide d'un pressage mécanique, ainsi que la proportion d' ω -6 et d' ω -3.

Les valeurs du rapport ω -6/ ω -3 observées pour les différents extraits lipidiques varient de façon significative ($P < 0.05$). L'extrait MAN a eu la valeur la plus élevée du rapport ω -6/ ω -3. Le rapport le plus faible a été trouvé dans celui de SIG (13.17), mais il est supérieur à 4 (la valeur recommandée par le ministère de la Santé (1994)) [8].

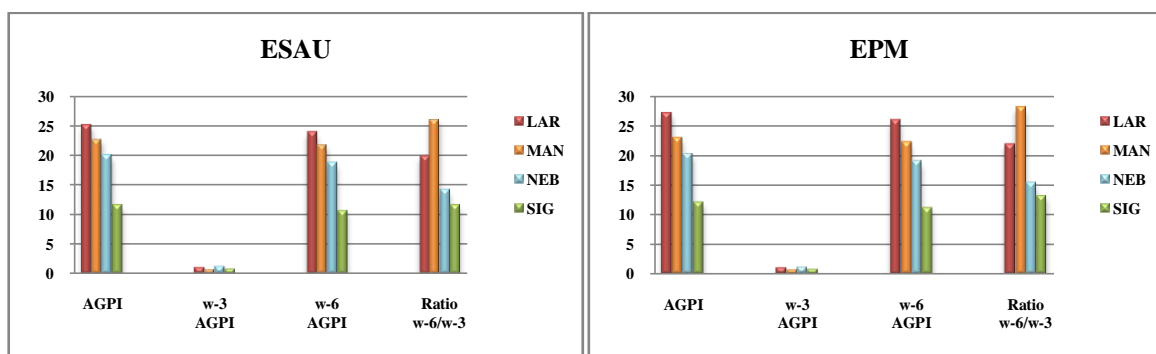


Figure IV.1. Proportions des acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport des extraits lipidiques de différentes variétés d'olive.

IV.1.2.3. Comparaison entre les deux méthodes :

IV.1.2.3.A. Extraction des acides gras :

Pour les composés lipophiliques d'origine végétale, l'extraction est une étape de traitement clé pour les récupérer et les purifier. Des méthodes fiables pour l'extraction quantitative des lipides et des acides gras sont d'une importance capitale en raison de leurs applications biochimiques, physiologiques, cliniques et nutritionnels. Le procédé industriel pour obtenir d'huile d'olive vierge comprend seulement des opérations physiques (règlement CEE 1513/2001). Le processus commence par l'écrasement de l'olive, l'objectif est de déchirer la chair des cellules afin de laisser l'huile couler. Puis la pâte d'olive doit être mixte; dans cette étape les gouttelettes de l'huile se fondent en gouttes plus grosses jusqu'à ce qu'ils forment " poches" (coalescence) qui peuvent être séparés en une phase liquide continue, et ensuite peut être séparées des autres phases par pression, centrifugation ou par percolation. Pas tout l'huile présente dans les olives est libérée: certaine reste à l'intérieur des cellules non abritées, certaine est laissée dans le système colloïdal de la pâte d'olive (microgels) et certaine est liée dans une émulsion avec l'eau végétale [156]. Récemment, le solvant est le plus largement utilisé pour extraire des huiles comestibles complètement à partir de plante [157]. Le choix d'un solvant convenable affecte le processus de transport de masse et ensuite l'efficacité de l'extraction [127]. La précision des différentes méthodes d'extraction de lipide dépend de la solubilité de leurs classes de lipides constitutifs dans les solvants utilisés et de la nature de la matrice de l'échantillon, ces deux paramètres pourraient influencer l'efficacité de l'extraction des lipides. De même, les solvants / mélanges d'extraction doivent être suffisamment polaire pour éliminer les lipides de leurs constituants

cellulaires associants, mais pas trop polaires où les solvants ne solubilisent pas facilement tous les triglycérides (TAG) et d'autres lipides non polaires [158].

La présente étude montre également des variations qualitatives importantes dans le contenu d'acide gras, du fait de l'effet de la méthode d'extraction utilisée. Les différences chimiques observées entre les deux fractions lipidiques extraites respectivement par la méthode de pressage mécanique et la méthode d'extraction par mélange des solvants assisté par ultrasons, peuvent être expliquées par le fait que la première technique (pressage) est basée sur l'extraction quasi- totale de la matière grasse du fruit tandis que la deuxième technique (solvant assisté par ultrasons) est caractérisée par la capacité du système de solvant utilisé à pénétrer dans les membranes cellulaires et dissoudre les lipides piégés de fruits d'oliviers.

Plusieurs études basés sur l'extraction de lipide par un système de solvant polaire et non polaire ont été également réalisées précédemment par de nombreux chercheurs sur des différentes matrices y compris des tissus animaux [8], des tissus végétaux [159, 160]. En fait, le chloroforme et le méthanol en combinaison présentent une forte puissance de dissolution pour toute la gamme de polarité trouvée en lipides, ainsi que la capacité de briser la membrane et de dénaturer les (-lipo) protéines [158].

Afin d'améliorer la libération de lipides à partir de la matrices cellulaires et l'accès des solvants d'extraction à des acides gras, des prétraitements deviennent souvent une condition préalable pour assurer une extraction efficace des lipides. Lou et al. [127] ont recommandé d'une combinaison de la méthode d'extraction par solvant avec une application d'ultrasons pour obtenir des rendements plus élevés d'AG à partir de tissu végétal, et, ainsi, ils ont optimisé la méthode afin d'obtenir un meilleur résultat, en étudiant l'effet du temps de sonication et la température d'extraction, ainsi que la puissance d'ultrasons sur les récupérations des AGs. Alors, selon cet étude, l'application d'ultrasons améliore le transfert de masse après la rupture de la paroi cellulaire, ce qui conduit à la libération maximum de composants cellulaires.

En conséquence, l'utilisation d'un mélange du solvant et l'application de sonication ont été évaluées dans la présente étude et en comparaison avec l'autre méthode d'extraction (Figures IV.2 et IV.3), ont aboutit à l'extraction des acides gras à chaîne moyenne de C6 à C12 ainsi que l'acide gras à longue chaîne d' ω -3 de C22:6 et d' ω -9 de C24:1 dans les échantillons NEB et SIG. Au cours de l'extraction à l'aide d'un pressage mécanique, les composés solubles dans l'eau sont perdus dans l'eau végétale,

alors qu'avec l'extraction ESAU, c'est l'affinité du mélange du solvant, polaire et apolaire à chaque classe de lipide polaire et neutre, respectivement, qui améliore l'extraction des matières grasses après rupture des parois cellulaires à l'aide d'un ultrason.

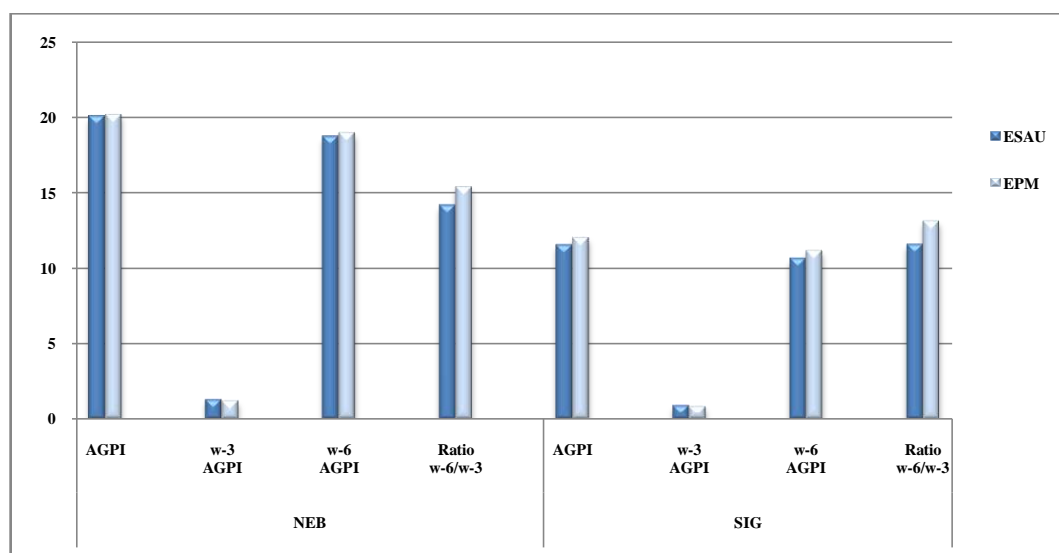


Figure IV.2. Variabilité de la composition en acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport dans les deux extraits lipidiques de chaque variété NEB et SIG.

En revanche, pour l'extrait MAN, on remarque l'absence d'acide gras à longue chaîne d' ω -6 de C20:2 en comparaison avec la méthode d'extraction par pressage, qui pourrait être liée à la solubilité limitée des lipides dans la solution de solvant relativement polaire (chloroforme / méthanol 1/2, v/v) utilisée dans la méthode de BD à cause de la co-extraction de glycérol, phosphate, et des groupes contenus de l'alcool de phospholipides, des poly-phénols, des pigments, de cholestérol, et de leurs dérivés avec les acides gras [158]. Selon [161-163], les fruits d'olivier présentent une abondance considérable des composés phénoliques. Alors, l'absence de ces acides gras peut être dû à l'empêchement posé par leur contenus organiques élevés en particulier les polyphénols. Ces considérations méritent encore d'autres enquêtes sur les fruits d'olivier. Des informations sur la composition en classe de lipide (polaire ou non polaire) est nécessaire, afin de pouvoir choisir le système du solvant convenable pour l'extraction de lipide selon la polarité.

L'ambiguïté dans l'extraction d'acide gras d' ω -6 de C18:3 rapportée par différents échantillons en comparaison avec la méthode d'extraction par pressage, sa présence en

NEB et SIG tandis que son absence en LAR et MAN, peut être attribuée à la nature différente des matrices et de leur chimie avec le mélange de solvant utilisé. La même remarque pour l'acide gras de C14:0, il est absent dans le lipide MAN malgré sa présence dans les autres échantillons étudiés.

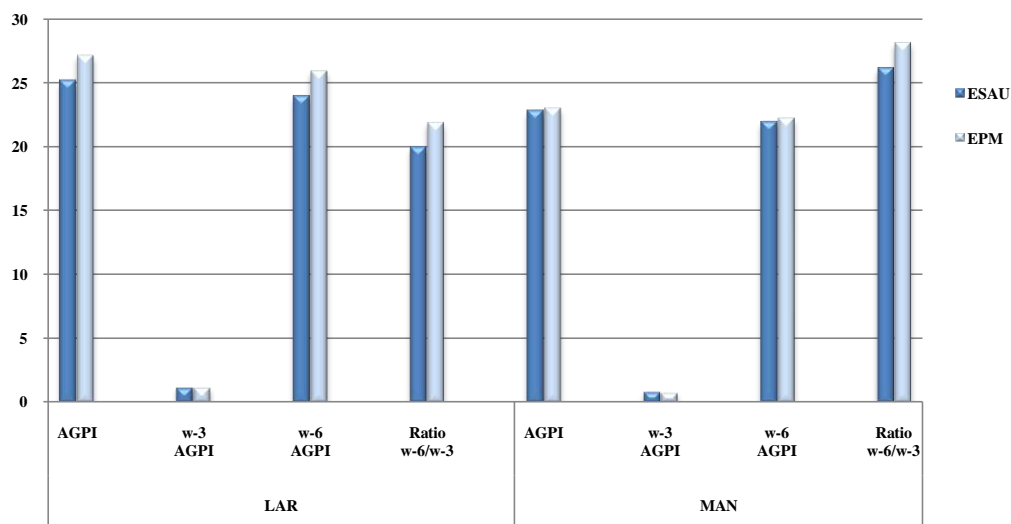


Figure IV.3. Variabilité de la composition en acides gras polyinsaturés totaux, AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport dans les deux extraits lipidiques de chaque variété LAR et MAN.

Cette étude a clairement souligné que les deux méthodes ont montré des compositions d'AG exprimées en p/p % quantitativement similaires pour la NEB, MAN et SIG, à l'exception de C15:0 et C18:2 ω -6 pour la SIG qui présentent une variation significative entre les deux méthodes, mais pour la MAN, on trouve une différence significative en C16:1 et C18:1 ω -9, tandis que les lipides LAR ont donné une forte variation en leur composition en acides gras : C16:0, C18:0, C16:1 et C18:2 ω -6.

Malgré les variations entre les compositions en AG de chaque méthode, les quatre fruits d'oliviers ont montré des profils typiques correspondant à leurs variétés respectives. Toutes les variétés étudiées dans la présente étude sont riches en AGPI de C18 ω -9 et ω -6.

IV.1.2.3.B. Acidité libre (%) :

L'acidité libre, exprimée en acide oléique, est une mesure importante pour évaluer la pertinence des huiles végétales pour la consommation humaine, corrélée avec la perception globale de l'acidité [43]. La figure IV.4 représente l'acidité (exprimée en % d'acide oléique) des échantillons d'huiles d'olive issues des quatre variétés étudiées. Sur la base de cette analyse et selon la méthode EPM, toutes les huiles analysées se classent dans la catégorie « Huile d'olive vierge » puisque la teneur en acides gras libres des échantillons analysés reste inférieure à 0,8%, qui sont respectivement: 0.48%, 0.79%, 0.099% et 0.52% pour l'huile LAR, MAN, NEB et SIG. En revanche, selon les méthodes d'extraction utilisées et les échantillons analysés, une différence très importante entre les huiles extraites par la méthode d'ESAU et celles de EPM est observée. Cette différence montre que l'acidité des huiles de la méthode ESAU est supérieure à celle des huiles de la méthode EPM, et qui sont: 3.32%, 2.82%, 3.83% et 1.28% respectivement pour l'extrait LAR, MAN, NEB et SIG. Cette augmentation dans les pourcentage en AGL est attribuée à l'hydrolyse des triglycérides sous l'effet d'ultrasons. Pourtant, d'après [23], les voies de dégradation des lipides induite par ultrasons n'ont pas été encore élucidées; par conséquent, l'étude des mécanismes possibles et des facteurs influençant l'oxydation sont importantes pour mieux comprendre les effets des ultrasons sur les lipides.

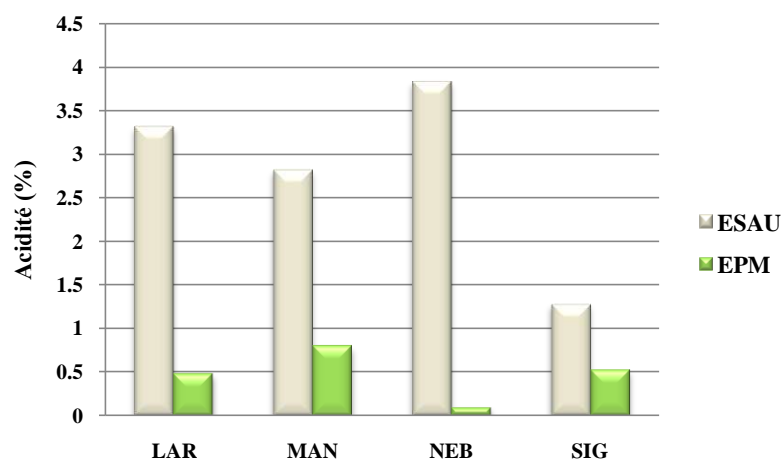


Figure IV.4. Variation des niveaux d'acidité de l'huile d'olive de quatre variétés extraite par deux méthodes d'extraction différentes .

Les résultats montrent aussi que les valeurs d'acidités d'huile SIG (1.28%) sont les plus faibles parmi les différents échantillons des huiles extraites par ESAU tandis que l'huile NEB présente le pourcentage le plus élevé (3.83%). Inversement, dans le cas de l'extraction par EPM, l'huile NEB révèle le pourcentage d'acidité le plus inférieur (0.099%) par rapport aux autres échantillons, tandis que le plus important est enregistré dans l'échantillon MAN (0.79%). Le rôle de la variété reste assez important, du moins parce qu'elle affecte, dans l'huile, les niveaux des polyphénols et des tocophérols. Ces composés déterminent la stabilité de l'huile, sa résistance à l'oxydation et, en conséquence, son pouvoir de conservation.

IV.2. Étude de l'influence de température sur la fraction lipidique :

IV.2.1. Caractérisation chimique:

IV.2.1.A. Variations des acides gras libres:

L'AGL, résultant principalement de l'hydrolyse des triglycérides, a été évalué par la mesure de l'acidité conventionnelle [164]. Les changements de l'acidité ou des acides gras libres (AGL) ont été présentés dans la figure IV.5. Toutes les huiles d'olive étudiées ont présentés un niveau d'acidité inférieur à 0,8%, avant le chauffage. Comme prévu, les valeurs d'acidité pour l'huile LAR, MAN et NEB ne sont pas affectées par le chauffage à température inférieure à 450 °C. L'invariabilité de la AGL pour l'huile d'olive pourrait en raison de sa stabilité thermique élevée, confirmée par certaines études [165].

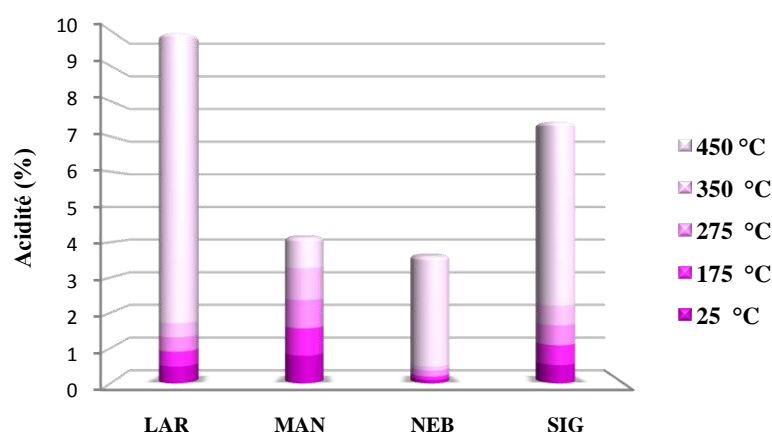


Figure IV.5. Évolution de l'acidité (%) des huiles d'olive au cours du traitement thermique.

Les quantités d'AGL sont également corrélées directement avec les limites supérieures de température en raison de leurs points d'ébullition inférieurs. Dans des conditions similaires, un chauffage à 180 °C n'augmente pas l'hydrolyse de TAG. Toutefois, probablement dérivé de la teneur en humidité de l'huile [43]. Normalement l'huile SIG devrait montrer les mêmes résultats que les autres trois huiles en point de sa haute stabilité. Il semble que chaque huile effectue un comportement spécifique vers le traitement de chauffage, ce qui pourrait expliquer les données observées et devrait être confirmée par l'établissement de nombreuses corrélations entre les différents paramètres tels que l'indice Rancimat, les niveaux de la AGL, stabilité oxydative et la composition en acides gras [165].

Une augmentation considérable de l'acidité a été observée pour toutes les huiles d'olive après chauffage à 450 °C pendant 15 min avec des valeurs finales entre 3,15% et 8,27%, à l'exception de celle de l'huile MAN (Figure IV.5), qui montre une variation significative atteint 0.9% au bout de 15 min de chauffage à 350 °C et à 450°C, un pourcentage trop faible que celles à 450 °C des autres huiles d'olive considérées. Ces différences s'expliquent par une teneur en humidité inférieure que celles des autres huiles d'olive considérées.

IV.2.2. Évolution de l'oxydation des acides gras :

La température est un des facteurs qui peut être aboutir à une dégradation thermo-oxydative des acides gras insaturés et plus favorablement les polyinsaturés. Ces réactions en chaîne, une fois amorcées, s'amplifient très fortement. Elles induisent à une dégradation des propriétés chimiques et sensorielles des lipides. Il est donc indispensable de déterminer les conditions de traitement des lipides favorables à ces réactions afin de pouvoir les contrôler.

Afin de mettre en évidence l'impact de température sur le développement des réactions d'oxydation des lipides, les cinétiques d'oxydation des lipides ont été déterminées pour quatre températures. Dans un premier temps, il s'agissait d'identifier la composition en acides gras de chaque variété préchauffée durant 15 min à différentes températures à étudier, ensuite des analyses de qualité ont été également réalisés après chaque degrés afin de déterminer les degrés critiques vis à vis de l'altération des lipides

IV.2.2.1. Niveau d'oxydation des lipides :

IV.2.2.1.A. Produits primaires de l'oxydation des lipides :

- **Diènes conjugués :**

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé résultant du départ d'un hydrogène sur un acide gras possédant au moins deux doubles liaisons en position 1,4-pentadiène.

L'oxydation thermique des acides gras insaturés est accompagnée d'une isomérisation des doubles liaisons considérable conduisant à des produits contenant des doubles liaisons *trans* et des systèmes à doubles liaisons conjuguées [166].

Tableau IV.4. Évolution des concentrations en produits primaires de l'oxydation des lipides, diènes conjugués, de différents échantillons des huiles d'olive préchauffés à différentes températures étudiées. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$); ($n=3$).

T °C Variété	25	175	275	350	450
LAR	1.72 ± 1.30 ^d	22.28 ± 2.32 ^b	8.07 ± 1.79 ^c	5.42 ± 1.89 ^{cd}	34.13 ± 0.52 ^a
MAN	3.36 ± 1.39 ^c	24.03 ± 0.92 ^a	20.85 ± 1.26 ^a	10.41 ± 2.30 ^b	5.32 ± 0.64 ^c
NEB	2.87 ± 1.22 ^b	4.23 ± 0.40 ^b	0.35 ± 0.11 ^c	2.40 ± 0.02 ^{bc}	19.61 ± 1.60 ^a
SIG	5.64 ± 1.71 ^d	11.07 ± 0.59 ^c	25.83 ± 1.12 ^b	6.55 ± 0.04 ^d	40.33 ± 0.16 ^a

Les valeurs de diènes conjugués obtenues pour l'échantillon LAR préchauffé, fluctuent entre 1.72 et 34.13. Par rapport à la température de 25 °C, une augmentation de la concentration en diènes conjugués de 22.28 est observée après chauffage à 175 °C, puis les quantités de diènes conjugués diminuent significativement jusqu'à 5.42 à 350 °C. À 450 °C, la valeur de diènes conjugués augmente de nouveau de façon significative (Tableau IV.4, Figure IV.6). Par contre, les valeurs de diènes conjugués mesurées sur les échantillons MAN varient de 3.36 à 24.03. Après son augmentation significative jusqu'à 275 °C, la valeur de diènes conjugués revient à diminuer jusqu'à 5.32 à 450 °C.

Au cours du traitement thermique de l'échantillon NEB, on voit que l'absorbance UV augmente initialement dès 175 °C puis diminue après 15 min de chauffage à 275 °C. Les quantités de diènes augmentent de nouveau et atteignent un maximum à 450 °C. Dans le cas d'un échantillon SIG, les valeurs des diènes conjugués amorcent une croissance significative et jusqu'à une valeur de 25.83 à 275 °C de chauffage. Après sa diminution significative à 350 °C, la valeur des diènes conjugués revient à augmentée jusqu'à 40.33 à 450 °C (Tableau IV.4, Figure IV.6).

Les diènes conjugués sont formés au cours des premières étapes de l'oxydation des lipides. Une légère augmentation des valeurs de diènes conjugués détectée confirme que l'oxydation a eu lieu [79]. Alors, comparée à la température ambiante, les réactions d'oxydation des lipides semblent amorcées après chauffage à 175 °C pendant 15 min en favorisant la formation des diènes conjugués.

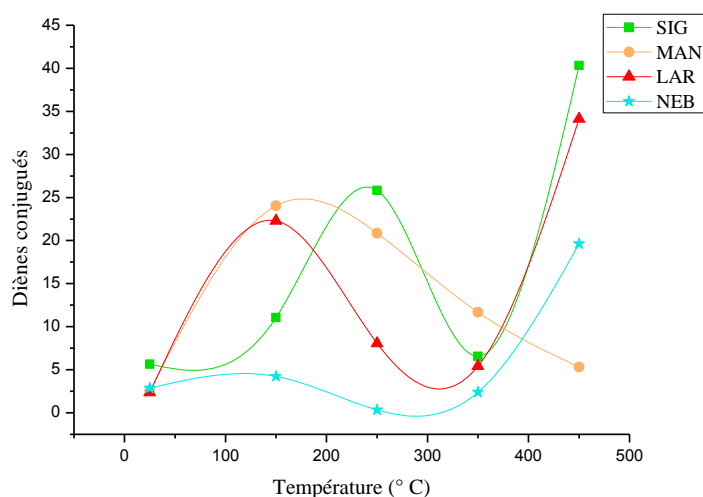


Figure IV.6. Évolution des valeurs de diènes conjugués des échantillons d'huile d'olive au cours du traitement thermique.

Le chauffage à 175 °C favorise fortement l'apparition des composés primaires de l'oxydation dans les échantillons des huiles d'olive étudiés, quelque soit sa variété. Une fois le phénomène d'oxydation amorcé, l'augmentation de la quantité des diènes conjugués est très brutale mais avec des valeurs différentes. Pour l'échantillon LAR, la quantité des diènes conjugués est près de 22 fois plus importante par rapport au mesure initiale en comparaison avec l'échantillon NEB, ce qui présente une augmentation d'environ 1.5 fois par rapport au mesure initiale, ce qui est expliquée par la différence de leurs stabilités oxydatives et de leurs richesses en antioxydant ainsi que la composition initiale de l'huile d'olive. D'après les résultats obtenus dans une étude

précédente sur les teneurs en α -tocophérols et en phénols totaux [14], les auteurs ont souligné que lorsque l'oxydation se déroule dans des conditions non-accélérées, l' α -tocophérol est préférentiellement consommés pour protéger l'huile contre l'oxydation. Toutefois, lorsque l'oxydation se déroule dans des conditions accélérées, les meilleures corrélations ont été trouvées entre la teneur en phénol total et de la stabilité de l'huile. Cela illustre la stabilité de lipide NEB contre la température. Cependant, la quantité des diènes conjugués dans les échantillons NEB est systématiquement supérieure à celle détectée dans le LAR, ceci dès le début des mesures.

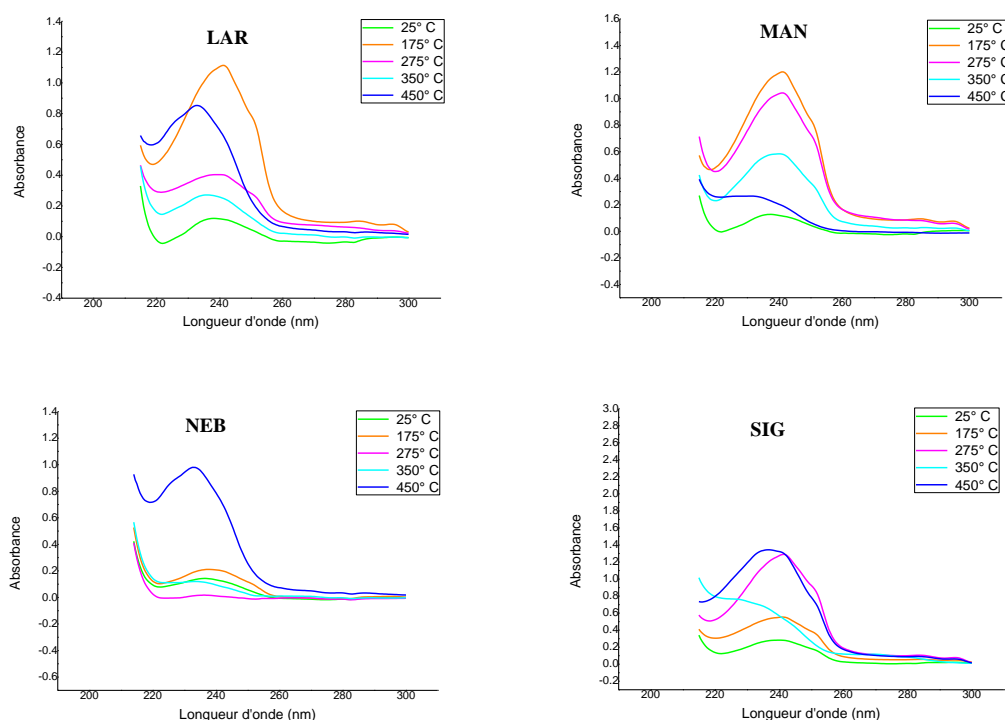


Figure IV.7. Spectre d'absorption UV de quatre échantillons de l'huile d'olive.

Pour les variétés LAR, MAN, NEB et SIG, les valeurs de diènes conjugués diminuent après avoir atteint un maximum (Figure IV.6). Ces fluctuations résulteraient des déséquilibres entre la formation et la décomposition des produits primaires de l'oxydation des lipides. Au cours du chauffage, la formation des produits primaires serait favorisée dans les 15 min du traitement thermique à 175 °C tandis que ces produits primaires, peu stables, sont rapidement décomposés, lorsque la température va accroître. Cependant, une nouvelle augmentation a été remarquée pendant le chauffage à 350 °C pour l'échantillon NEB et à 450 °C pour LAR et SIG. Enfin, les diènes conjugués issus de l'oxydation des acides gras polyinsaturés à longues chaînes présentent des structures complexes pouvant interférer sur les mesures d'absorbance

[45,167], ce qui expliquerait alors la croissance des quantités des diènes conjuguées observées après leurs dégradations.

IV.2.2.2. Cinétique d'oxydation des lipides :

IV.2.2.2.A. Composition en acides gras :

La cinétique de disparition d'un ou plusieurs acides gras peut être étudiée. L'analyse des acides gras est réalisée après extraction des lipides, méthylation des acides gras et chromatographie en phase gazeuse. La difficulté consiste à extraire quantitativement la matière grasse et à minimiser les pertes au niveau des réactions de méthanolyse [46]. Les changements dans les compositions en acides gras de quatre différentes huiles pendant 15 minutes du traitement thermique sont donnée dans les tableaux IV.5 et IV.6. Le chauffage pendant 15 min affecte les huiles considérés. Les changements observés ne sont pas similaires pour les différents acides gras parce que certains acides gras ont diminué, certains d'autres ont augmenté et d'autres n'ont pas changé.

Au cours du traitement thermique des échantillons LAR, les proportions des acides gras saturés ne présentent pas de différences significatives qu'après chauffage durant 15 min à 175 °C et à 450 °C séparément, tandis que les proportions d'acides gras saturés de deux échantillons NEB et SIG n'augmente que dès 450 °C durant 15min, seule celle d'échantillon MAN ne révèle aucune variance significative. Concernant les proportions d'acides gras mono-insaturés, ces acides gras ne présentent pas de différence significative en fonction des différentes températures étudiées pour les différents échantillons étudiés hormis pour les échantillons LAR et MAN à 175 °C et à 450 °C respectivement (Tableaux IV.5 et IV.6, Figure IV.8).

Les proportions d'acides gras polyinsaturés analysées dans les échantillons LAR, MAN, NEB et SIG diminuent avec les températures étudiées notamment ceux sous l'effet de degrés 350 °C et 450 °C qui correspondent aux valeurs les plus basses. Ainsi, la proportion d'acides gras polyinsaturés dans l'échantillon LAR préchauffée à 175 °C est significativement inférieure à celle calculée à l'état initial. Les teneurs en AGPIs à ces degrés (350 °C et 450 °C) pour les différents prélèvements préchauffés et à 175 °C pour LAR sont inversement proportionnelles à leurs teneurs en diènes conjugués; les teneurs les plus basses en AGPIs correspondent aux teneurs les plus élevées en diènes conjugués. Les travaux de Pantzaris [168] ont également montré une diminution des pourcentages en AGPIs en fonction des hautes températures. La variation des

proportions d'acides gras polyinsaturés est, dans certains cas, un marqueur de l'oxydation des lipides [169]. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont oxydés prioritairement en raison de leur points d'ébullition le plus bas par rapport aux acides gras saturés [165,170], et leur proportion diminue au cours de l'avancement des réactions d'oxydation. Cette diminution observée dans nos résultats a été alors attribuée à une dégradation thermo-oxydative de ces acides gras, les polyinsaturés, qui se transforment en produits d'oxydation primaire et secondaire pendant le processus du chauffage [166, 171, 172].

À ces degrés (350 °C et 450 °C), il a été constaté qu'il y avait une diminution à la fois du contenu de l'acide linoléique (C18:2) et de l'acide linoléique (C18:3) dans les quatre échantillons d'huile, tandis que l'acide palmitique (C16:0) a augmenté certains fois avec ces degrés. D'après [168], la diminution de la teneur en acide linoléique et l'acide linoléique des huiles pendant la friture, est due à leur destruction par oxydation, polymérisation, etc.

Au cours de la friture et le chauffage, l'oxydation, la polymérisation, l'isomérisation (dans les deux cas, le chauffage et la friture) et l'hydrolyse (uniquement pendant la friture) se produisent dans l'huile générant d'une multitude de produits. Parmi ces produits, ceux de poids moléculaire plus élevé par rapport aux triglycérides, sont générés, provenant de réactions de polymérisation et d'oxydation.

Dans le présent travail et pour des raisons de simplicité, tous ces composés seront appelés polymères, un terme habituellement utilisé dans la littérature comme un terme générique pour définir ces composés. Les polymères ont été liés dans le passé à l'augmentation de la densité des huiles [173].

Les acides gras insaturés sont oxydés différemment. Les différentes forces de la liaison hydrogène-carbone d'acides gras explique les différences des vitesses d'oxydation des acides: stéarique, oléique, linoléique et linoléique pendant l'oxydation thermique [174]. Selon [172], la vitesse relative d'auto-oxydation des acides: oléique, linoléique, et linoléique est 1:40 à 50:100 en se basant sur la consommation d'oxygène. Les vitesses de réaction entre O₂ et C18:0, C18:1, C18:2 et C18:3 sont de $1,2 \times 10^4$, $5,3 \times 10^4$, $7,3 \times 10^4$, et $10,0 \times 10^4 \text{ m s}^{-1}$, respectivement. La vitesse de réaction relative de C18:3 avec l'oxygène est beaucoup plus rapide que celle de C18:2 et C18:1.

Tableau IV.5. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport ω -6/ ω -3 des lipides totaux de différents échantillons LAR et MAN préchauffés à différentes températures. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$) ; (n=3).

Échantillon LAR					
T °C	25	175	275	350	450
AG					
AGS	17.11±0.31 ^c	20.56±1.27 ^a	18.20±0.98 ^{bc}	17.25±0.50 ^c	19.77±0.26 ^{ab}
AGMI	53.68±0.99 ^a	47.05±2.12 ^b	53.30±0.98 ^a	54.13±0.33 ^a	54.79±0.90 ^a
AGPI	27.14±0.03 ^a	24.71±0.80 ^b	26.58±0.52 ^a	25.56±0.20 ^{ab}	12.42±1.08 ^c
Σ ω-3 AGPI	1.18±0.01 ^a	1.19±0.05 ^a	1.16±0.02 ^a	0.79±0.00 ^b	0.36±0.09 ^c
Σ ω-6 AGPI	25.95±0.02 ^a	23.52±0.79 ^b	25.42±0.50 ^a	24.76±0.21 ^{ab}	12.06±1.01 ^c
Ratio ω-6/ ω-3	21.90±0.11 ^b	19.77±0.84 ^b	21.96±0.02 ^b	31.27±0.37 ^a	34.49±7.23 ^a

Échantillon MAN					
T °C	25	175	275	350	450
AG					
AGS	23.77±0.94 ^a	22.26±0.24 ^a	24.10±2.42 ^a	26.51±4.35 ^a	27.26±0.44 ^a
AGMI	46.34±0.54 ^b	47.69±0.20 ^{ab}	46.42±2.30 ^{ab}	46.95±3.80 ^{ab}	51.72±0.24 ^a
AGPI	23.04±0.26 ^a	23.46±0.07 ^a	22.80±1.00 ^{ab}	20.54±1.59 ^b	9.33±0.32 ^c
Σ ω-3 AGPI	0.79±0.01 ^a	0.83±0.02 ^a	0.79±0.02 ^a	0.47±0.06 ^{ab}	0.27±0.37 ^b
Σ ω-6 AGPI	22.25±0.26 ^{ab}	22.63±0.08 ^a	22.00±0.997 ^{ab}	20.07±1.55 ^b	9.05±0.08 ^c
Ratio ω-6/ ω-3	28.16±0.52 ^b	27.21±0.79 ^b	27.73±1.16 ^b	42.58±3.71 ^b	164.6±64.4 ^a

Les vitesses de ces réactions d'oxydation dépendent du nombre de doubles liaisons dans la chaîne carbonée. La présence de deux doubles liaisons dans la chaîne d'acide gras augmente la vitesse d'oxydation d'environ 10 fois par rapport à l'acide oléique [175,176]. Par conséquent, la plus forte réduction de C18:3 et la plus basse réduction en C18:1 sont attendus. Les tableaux IV.5 et IV.6 confirme cette attente à 350 °C et 450 °C, malgré, en huile LAR, C18: 1 a montré une plus forte réduction (13.69%) que le C18:2 (10.94%) à 175 °C (Figure IV.8, Annexe 1). Cette dernière variation de la composition en acides gras insaturé du LAR ne serait pas liée à l'effet de température mais résulterait de la perte de la matière grasse au niveau de la réaction de dérivaison. Cette différence ne permet pas de mettre en évidence l'effet du degré 175 °C sur la composition en acides gras de l'extrait lipidique LAR.

Dans les autres cas du préchauffage (175 °C et 275 °C) pour les différents échantillons à l'exception de celui à 175 °C pour LAR, les teneurs en AGPIs ne montrent aucune diminution significative, malgré leurs teneurs élevées en diènes conjugués. Ce désaccord apparent avec nos résultats s'expliquerait par l'effet d'un autre facteur, l'oxygène. En effet, le traitement thermique des échantillons a été réalisé en absence de vide. Comme l'analyse spectrophotométrique est réalisée après l'analyse chromatographique, la présence d'oxygène a ainsi favorisé les réactions d'oxydation des lipides pendant l'entreposage. Cette condition aussi ne permet pas de mettre en évidence l'effet de ces degrés sur la formation des diènes conjugués à partir des AGPIs des extraits lipidiques considérés. Ainsi, ces résultats corroborent ceux obtenus par Sebedio et al. qui n'ont pas observé des variations significatives des proportions d'AGPI d' ω -3 marine des poissons gras lorsque la température du milieu ne dépasse pas 180 °C [177]. En conformité avec les données de [178], aucune décomposition thermique était évidente à température inférieure à 300 °C.

Pour l'huile de l'échantillon SIG, la plus forte réduction était en AGPIs d' ω -3 (91.61%). En d'autres échantillons, la grande réduction parmi les AGs appartenait à AGPI d' ω -3. Ces réductions ont été formées comme suit: LAR (69.51%), NEB (87.21%) et MAN (65.31%). Les réductions des AGPIs d' ω -6 dans les autres échantillons d'huile étaient LAR (53.51%), SIG (44.32%), NEB (33.49%) et MAN (59.31%). Dans tous les extraits de l'huile, la diminution la plus faible d'AGPIs d' ω -3 appartenait à l'échantillon MAN (65.31%), et la diminution la plus élevée a été observée en huile SIG (91.61%).

Tableau IV.6. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et -6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport ω -6/ ω -3 des lipides totaux de différents échantillons NEB et SIG préchauffés à différentes températures. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$) ; (n=3).

Échantillon NEB					
T °C AG	25	175	275	350	450
AGS	19.32±0.71 ^{ab}	17.87±0.36 ^b	18.28±0.17 ^b	18.24±0.32 ^b	20.66±0.92 ^a
AGMI	58.23±1.41 ^a	59.17±0.59 ^a	59.57±0.23 ^a	59.64±0.92 ^a	59.31±1.63 ^a
AGPI	20.23±0.20 ^a	20.18±0.15 ^a	20.13±0.09 ^a	18.72±0.08 ^b	12.79±0.21 ^c
Σ ω -3 AGPI	1.23±0.02 ^a	1.48±0.36 ^a	1.23±0.00 ^a	0.10±0.01 ^b	0.16±0.05 ^b
Σ ω -6 AGPI	18.99±0.22 ^a	18.71±0.23 ^a	18.90±0.09 ^a	18.62±0.09 ^a	12.63±0.23 ^b
Ratio ω -6/ ω -3	15.43±0.46 ^c	14.82±0.28 ^c	15.42±0.14 ^c	171.6± 14.9 ^a	66.9±0.59 ^b

Échantillon SIG					
T °C AG	25	175	275	350	450
AGS	21.49±0.16 ^b	20.81±0.08 ^b	21.55±0.29 ^b	21.69±0.34 ^b	24.38±1.03 ^a
AGMI	61±0.50 ^a	61.98±2.00 ^a	61.52±2.29 ^a	60.04±0.15 ^a	63.51±0.85 ^a
AGPI	12.05±0.13 ^{ab}	12.87±0.01 ^a	12.20±0.62 ^{ab}	11.32±0.13 ^b	6.31±0.02 ^c
Σ ω -3 AGPI	0.85±0.02 ^a	0.87±0.05 ^a	0.81±0.02 ^a	0.73±0.00 ^b	0.07±0.01 ^c
Σ ω -6 AGPI	11.20±0.13 ^{ab}	12.00±0.04 ^a	11.38±0.62 ^{ab}	10.59±0.13 ^b	6.24±0.03 ^c
Ratio ω -6/ ω -3	13.17±0.30 ^b	13.86±0.80 ^b	13.99±0.73 ^b	14.48±0.12 ^b	88.16±10.31 ^a

La réduction la plus faible en AGPIs d' ω -6 a été remarquée dans l'huile NEB (33.49%), et la plus élevée a été constatée pour l'huile MAN (59.31%).

Comme le montre les tableaux IV.5 et IV.6, le traitement thermique à haute température (450 °C par exemple) a diminué la quantité des AGPIs dans tous les échantillons de la façon suivante: MAN (59.51%) > LAR (54.21%) > SIG (47.66%) > NEB (36.76%), en même temps, on a constaté que la quantité des AGS a augmenté significativement chez LAR, NEB et SIG et dans l'extrait MAN, l'augmentation est remarquée dans le contenu en AGMI. Cela pourrait être dû à des ruptures des doubles liaisons des AGPI d' ω -3 et AGPI d' ω -6 qui sont principalement C18:3 et C18:2, qui pourrait ensuite être transformé en AGs ayant le même nombre d'atomes de carbone ou une chaîne plus courte [172].

Nos résultats montrent que les acides gras d' ω -6 déterminés dans l'échantillon LAR à 175 °C sont très sensibles aux réactions d'oxydation malgré que les acides gras d' ω -3 possèdent un nombre important de doubles liaisons que ceux d' ω -6. La priorité d'oxydation des acides gras de la famille d' ω -6 avant ceux d' ω -3 observée après 15 min du chauffage à 175 °C pourrait être liée à leurs abondance : 25.95%, contre 1.18% pour la teneur en ω -3.

À l'inverse, les proportions en acides gras d' ω -3 déterminées dans les échantillons NEB et SIG montrent une diminution significative avant ceux d' ω -6. Ceci se traduit: comme, le rapport initial ω -6/ ω -3 est inférieur à celui d'échantillon LAR, le pourcentage d' ω -3 présente au sein des ces échantillons, est suffisante d'amorcer la réaction d'oxydation. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente [174], qui montre que la stabilité de l'acide oléique et l'acide linoléique peut être attribuée à la facilité d'oxydation de l'acide linoléique ou l'acide gras polyinsaturé en raison de la présence de doubles liaisons.

L'évolution des teneurs en ω -3 et ω -6 au cours du traitement thermique à différentes température étudiées conduit à une augmentation significative des rapports ω -6/ ω -3 pour les échantillons MAN et SIG à 450 °C (164.6 et 88.16) (Figure IV.8). De même, on ne remarque pas une variation significative pour les échantillons LAR et NEB à 175 °C et 275 °C, mais une accroissance très importante de ce rapport a été enregistrée pour ces deux échantillons à 350 °C et 450 °C. Dans cette étude, la plus grande augmentation de rapport ω -6 sur ω -3 revient à l'échantillon NEB (156.17) au chauffage à 350 °C, qui a un niveau élevé d'acides gras polyinsaturés d' ω -3 (1.23%).

Malgré le fait que l'échantillon LAR avait la plus forte teneur en AGPI d' ω -6 (25.95%) par rapport aux autres échantillons, et un contenu important en AGPI d' ω -3 après NEB (1.18%), une faible augmentation (9.37) du rapport ω -6/ ω -3 a été observée dans l'huile LAR au cours du chauffage à 350 °C. Ceci indique le rôle des antioxydants

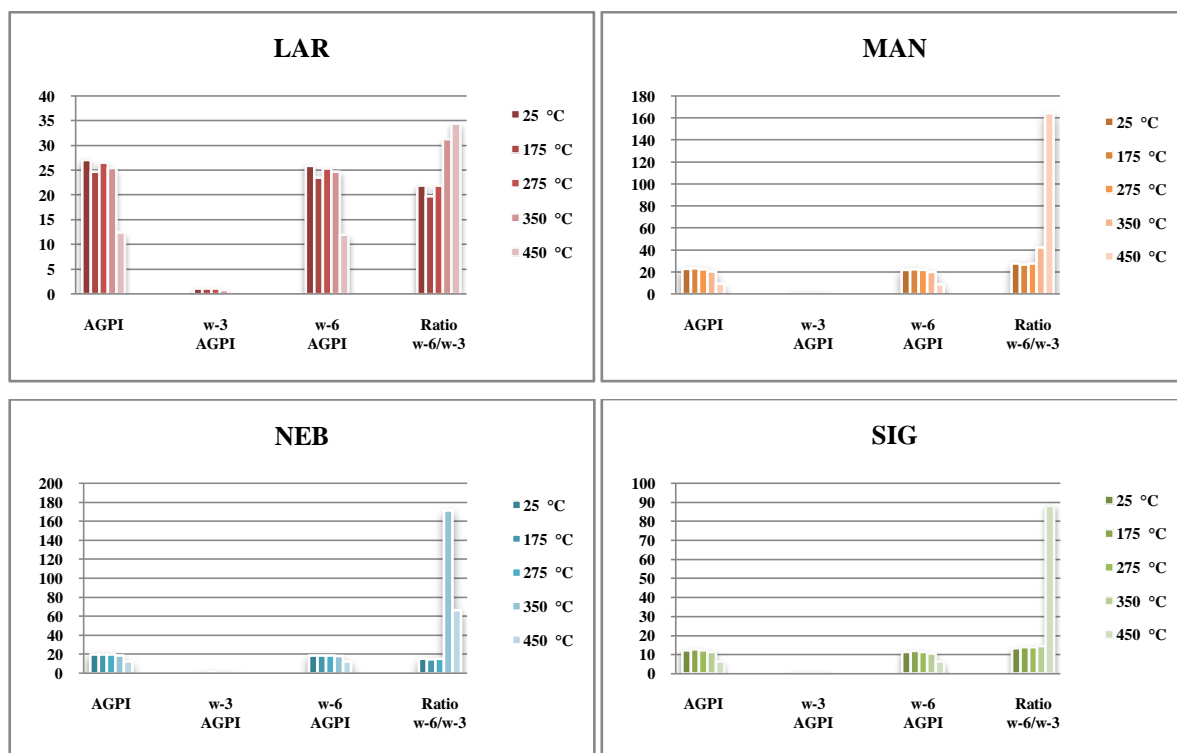


Figure IV.8. Évolution des proportions d'acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, et AGPI d' ω -3 et 6 (g pour 100 g de lipides totaux) ainsi que leur rapport des lipides totaux de différents échantillons d'olive au cours du traitement thermique pour les différentes températures.

naturels de l'huile LAR dans la protection contre l'oxydation à haute température [43,161,162,179,180]. Cette observation révèle également que cet extrait (LAR) est plus stable que les autres huiles à haute température.

Comparé aux autres échantillons d'huile d'olive étudiés, l'échantillon SIG semble le plus stable que les autres. Les valeurs du rapport sont inférieures à celles dans les autres lipides et le traitement thermique pendant 15 min à chaque degré réalisé séparément, n'induit pas de variation du rapport ω -6/ ω -3, que dès 450 °C (Tableau IV.6). Cependant, les valeurs du rapport, dans les échantillons SIG ainsi que les autres échantillons étudiés sont supérieures à celle recommandée par le ministère de la santé, qui est 4, ceci dès le début des mesures.

IV.3. Analyse électrochimique :

Ces méthodes sont basées sur l'électroactivité du substrat dans les conditions opératoires choisis. L'électroactivité du substrat et son comportement dans le milieu sont traduit par des voltammogrammes reproductibles. L'évaluation de l'effet de température sur nos extraits lipidiques bruts de l'espèce étudiée d'olive est effectuée à l'aide de l'huile à base d'acides gras d'oméga-3 et-6 et de vitamine E naturelle (Annexe.7).

Puisque la vitamine E est connue comme antioxydant lipophile majeur et biologiquement la plus active [181], il est donc nécessaire de la séparer afin de pouvoir obtenir l'oxydation des acides gras insaturés de l'huile qui est utilisée comme standard dans notre étude, nous notons que l'étude est effectuée dans le domaine d'électroactivité d'acide gras d'oméga-3 et-6 pour quantifier leurs teneurs dans les échantillons des huiles étudiées.

IV.3.1. Caractérisation électrochimique d'acide gras d' ω -3 et ω -6 :

Les études de la voltammétrie à onde carrée, impulsionnelle différentielle et cyclique d' ω -3 et ω -6 sur l'électrode de carbone vitreux ont été réalisées dans une solution de mélange éthanol/ toluène (1:1 v/v) à 0,1 M de H₂SO₄.

IV.3.1.1. Voltammétrie différentielle pour l'acide gras d' ω -3 et ω -6:

IV.3.1.1.A. Voltammétrie à onde carrée:

L'analyse par la voltammétrie à onde carrée de l'acide gras d' ω -3 et ω -6 est illustrée dans la figure IV.9. La SWV à vitesses de balayage de 15 mV s⁻¹ pour la solution de l'huile d' ω -3 sans vitamine E montre clairement deux pics anodiques bien définis autour des potentiels de 1.11 et 1.42 V, qui sont attribué à l'oxydation de l'acide gras d' ω -3, tandis que en présence de la vitamine E, on n'observe qu'un seul pic anodique à 0.54 V dû à son oxydation.

La figure IV.9 montre également les voltammogrammes SWV pour l'huile d' ω -6, avec et sans la vitamine E. À partir de la SWV, on remarque même situation que pour l' ω -3 mais avec quatre pics d'oxydation, qui apparaissent à un potentiel de 0.54, 0.67, 1.11, et 1.45 V vs. SCE, respectivement, les deux premiers pour l'oxydation de la vitamine E et les deux autres pour l' ω -6.

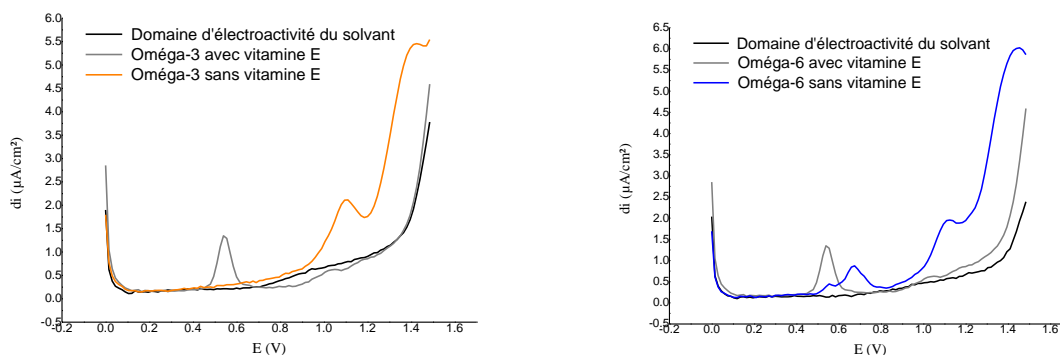


Figure IV.9. Voltammogrammes à onde carrée de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C₆H₆-CH₃ à 0.1 M de H₂SO₄.

IV.3.1.1.B. Voltammétrie impulsionnelle différentielle:

La voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV) a été utilisée pour étudier sa sélectivité et sa sensibilité pour la détermination des acides gras d' ω -3 et ω -6. Les paramètres expérimentaux de DPV ont été optimisés à vitesse de balayage de 250 mV/s, largeur d'impulsion de 20 ms et d'amplitude d'impulsion de 5 mV. La figure IV.10 montre la DPV pour une solution d' ω -3 et d' ω -6 séparément avec et sans la vitamine E.

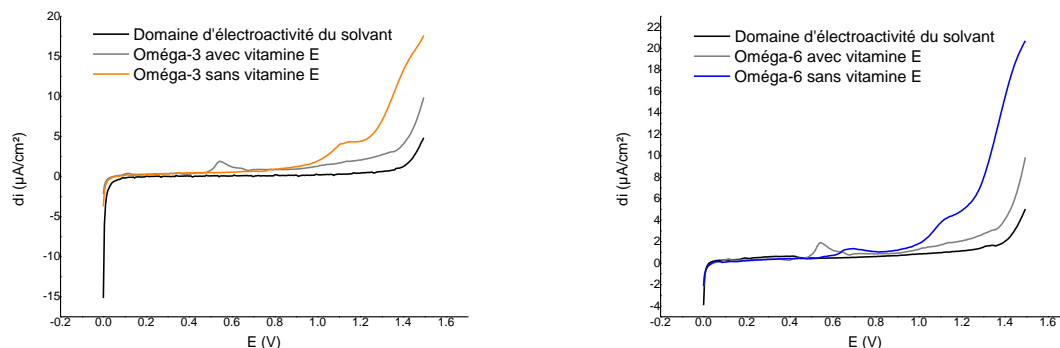


Figure IV.10. Voltammogrammes impulsionnelle différentielle de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C₆H₆-CH₃ à 0.1 M de H₂SO₄.

Les pics d'oxydation DPV des acides gras ne sont pas bien définis comme ceux dans la SWV. Il est intéressant d'observer que le courant de pic d'oxydation par DPV est plus élevé que celui dans le cas de la SWV à la même concentration. Il est augmenté par un facteur de deux et trois fois pour la vitamine E et les acides gras polyinsaturés, respectivement, ce qui indique clairement que la surtension d'oxydation est considérablement réduite et l'activité d'oxydation électrochimique est fortement améliorée par la méthode DPV.

IV.3.1.2. Voltammétrie cyclique :

La figure IV.11 montre les voltammogrammes cycliques enregistrés à vitesse de balayage de 100 mV s^{-1} de l'huile d' ω -3 et d' ω -6 après la séparation de la vitamine E. Avant la saponification, le voltammogramme ne présente qu'un seul pic anodique de vitamine E à 611 mV vs SCE (Figure IV.12, Courbe (1)). En revanche, après la séparation de la vitamine E, on remarque aussi un seul pic anodique mais à un potentiel de 1.22 V due à l'oxydation des acides gras d' ω -3 en absence de l'antioxydant, la vitamine E.

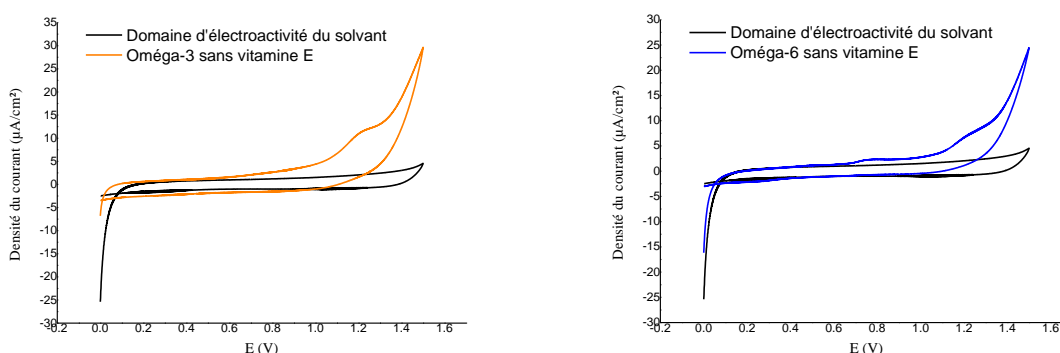


Figure IV.11. Voltammogrammes cycliques de l'huile d'oméga-3 et-6 sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C₆H₆-CH₃ à 0.1 M de H₂SO₄.

Même observation a été obtenue pour l'huile d' ω -6 (Figure IV.11), mais dans ce cas, on peut voir deux pics d'oxydation de vitamine E et d' ω -6 avec des potentiels situés, respectivement, à 0.75 et 1.21 V par rapport à SCE. Ainsi, les résultats indiquent que l'oxydation de la vitamine E, de l' ω -3 et l' ω -6 représente un processus hautement irréversible et subit à un processus cinétique lent de transfert d'électrons.

IV.3.2. Détermination simultanée d'acides gras d' ω -3 et d' ω -6 :

Comme le montre la figure IV.13, d'après l'analyse électrochimique, le courant de pic d'oxydation à potentiel d'environ 1.11 V et à 1.42 V est impossible de distinguer le potentiel de pic pour l'oxydation indépendante d'acide gras d' ω -3 et d' ω -6. En outre, le potentiel de pic d'oxydation d' ω -3 et d' ω -6 dans la solution de mélange est environ le même que le potentiel de pic en solution séparée (Figure IV.9), ce qui prouve que l'oxydation d' ω -3 et d' ω -6 dans la solution de mélange a lieu dépendamment sur la surface d'électrode.

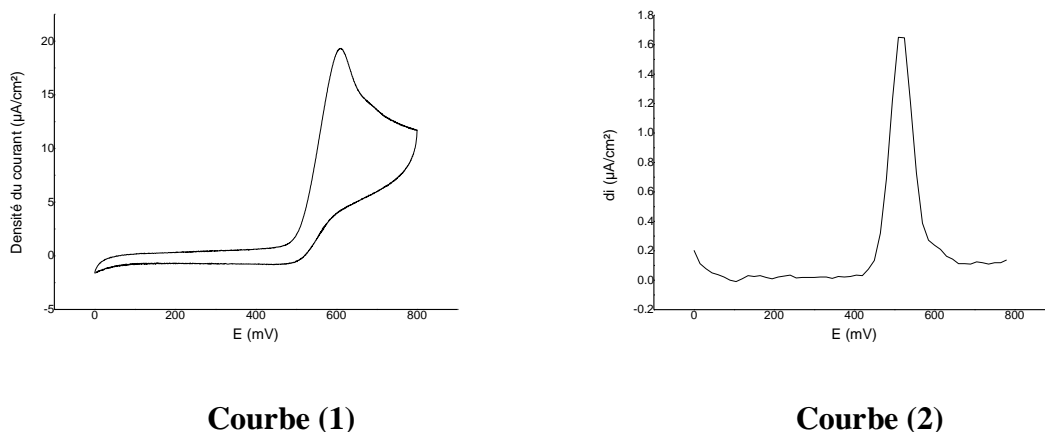


Figure IV.12. Voltammogrammes pour un mélange de l'huile d'oméga-3 et-6 avant la saponification sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C₆H₆-CH₃ à 0.1 M de H₂SO₄ pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : CV et courbe (2) : SWV.

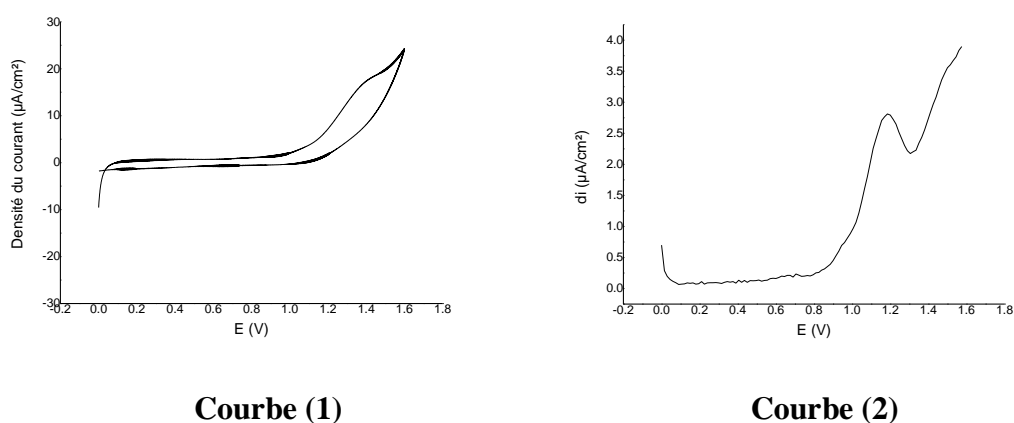


Figure IV.13. Voltammogrammes pour un mélange de l'huile d'oméga-3 et-6 après la saponification sur l'électrode du carbone vitreux en solution EtOH/C₆H₆-CH₃ à 0.1 M de H₂SO₄ pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : CV et courbe (2) : SWV.

Par conséquent, il est évident que la détermination électrochimique simultanée d'acides gras d' ω -3 et d' ω -6 dans une solution de mélange est impossible dans cette condition, ce qui ne permet pas d'étudier la teneur en oméga-3 et -6 de l'échantillon de l'huile. Du fait que ces échantillons présentent des teneurs en acides gras insaturés très différentes rend difficile l'interprétation des résultats.

Les figures IV.14 et IV.15 montrent la dépendance du courant de pic SWV et DPV avec la concentration d' ω -3 et d' ω -6, séparément. De toute évidence, on peut voir que le courant du pic d'oxydation d' ω -3 et d' ω -6 est augmenté de façon linéaire avec le volume [182], dans la gamme de 50 à 450 μ L pour l' ω -3 et l' ω -6. Le facteur de corrélation de la ligne droite pour la SWV (Courbe 2), est respectivement, de 0,94 et 0.98 pour les deux familles d' ω -3 et d' ω -6.

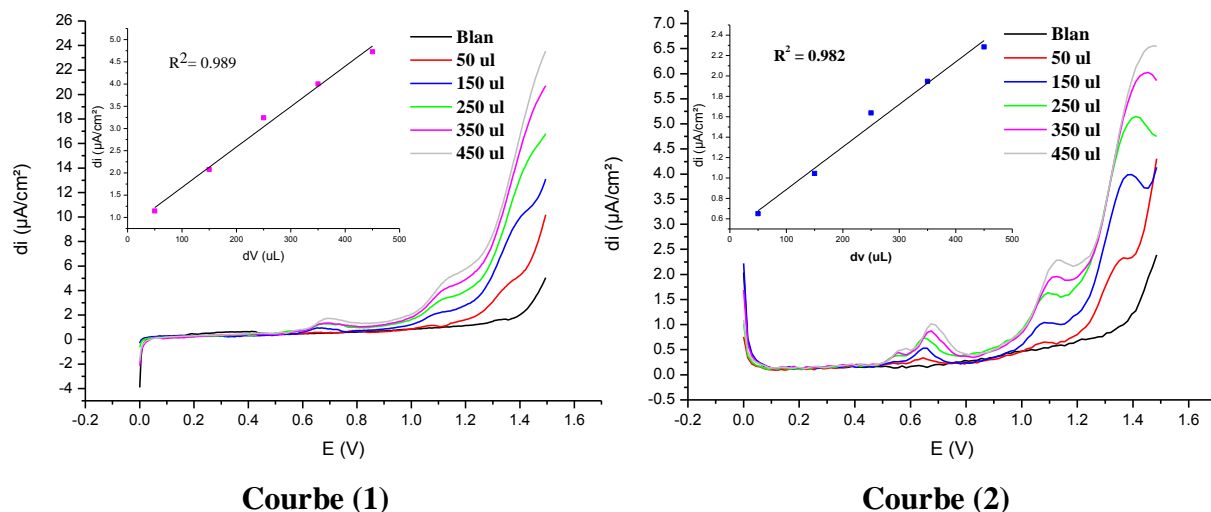


Figure IV.14. Courbe d'étalonnage de la teneur en oméga -6 pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : DPV et courbe (2) : SWV.

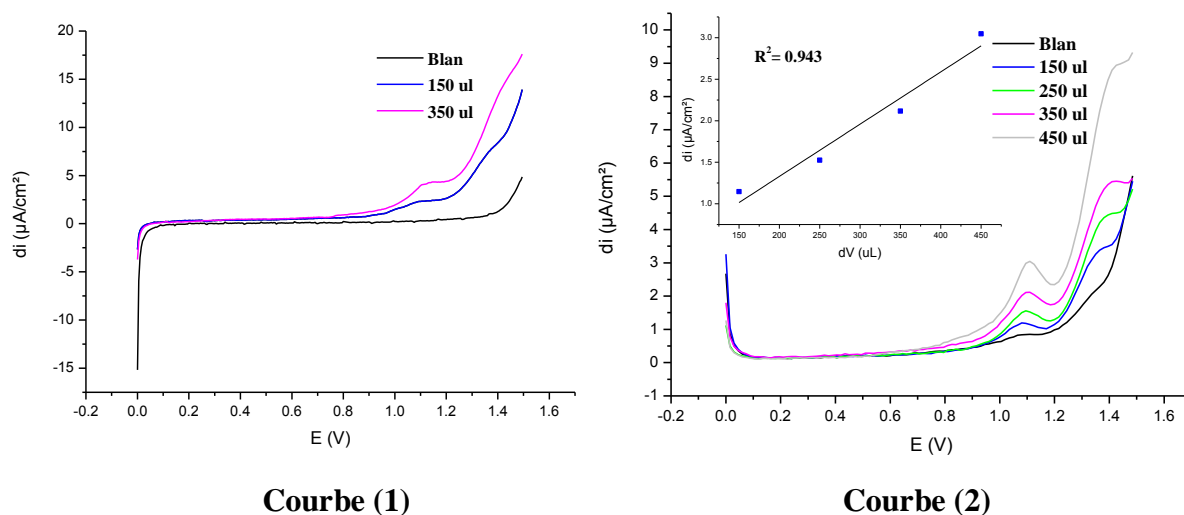


Figure IV.15. Courbe d'étalonnage de la teneur totale en oméga -3 pour les deux méthodes d'analyse électrochimiques utilisées : courbe (1) : DPV et courbe (2) : SWV.

Conclusion générale

et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette étude était d'identifier les teneurs en oméga-3 et -6 présentes dans l'huile d'olive et les graisses alimentaires, afin de pouvoir étudier l'effet de température sur ces acides gras polyinsaturés, ce qui nous a permis de valoriser les produits alimentaires étudiés en terme de leurs stabilités thermo-oxydative contre les réactions d'oxydation responsables de la dégradation des propriétés organoleptiques et biochimiques des produits au cours du chauffage. Pour ce là, trois expérimentations ont été réalisées afin d'atteindre cet objectif. Ainsi après avoir déterminé les teneurs en oméga-3 et -6 par la chromatographie gazeuse des huiles avant et après le chauffage, les teneurs en oméga-3 et -6 ont été identifiées électro-chimiquement et des propositions en vue d'améliorer la détection ont été formulées. L'étude du chauffage des échantillons de l'huile d'olive à différentes températures a été réalisée par la suite, afin de suivre l'évolution des teneurs en oméga-3 et-6 des huiles d'olives au cours de leur traitement thermique.

Dans un premier temps, l'extraction de l'huile de différents fruits d'olivier apparaît comme la meilleure voie de valorisation de ces variétés. Dans ce contexte, nous avons évalué deux méthodes permettant leur obtention; l'extraction assisté par pressage mécanique et l'autre par solvant organique avec assistance d'ultrasons. L'EPM et l'ESAU ont été étudiée pour évaluer la sélectivité de l'extraction des composés d'acides gras polyinsaturés. Pour cela et afin de déterminer l'effet de chaque méthode sur la composition en acides gras de l'huile extraite, quatre variétés d'olive ont été comparées: LAR, MAN, NEB et SIG. Des teneurs en acides gras polyinsaturés d' ω -3 plus élevées significativement ont été obtenues avec les huiles LAR et NEB extraites par ESAU, en même temps l'huile LAR est présente la teneur la plus importante d'acides gras polyinsaturés de type ω -6. Alors que pour les extraits de EPM, l'huile NEB et celle de LAR ont la teneur la plus importante d' ω -3 et d' ω -6, respectivement. L'huile SIG extrait par deux méthodes montre la teneur la plus faible d' ω -6 par rapport aux autres extraits. Par ailleurs, les deux extraits d'huile MAN révèlent la teneur la plus faible d' ω -3. Au cours de ces études, les résultats obtenus, nous ont démontré que l'extrait NEB et SIG de ESAU, ainsi que l'extrait LAR et SIG de EPM renferment les teneurs d' ω -3 et d' ω -6, respectivement, les plus importantes par comparaison avec la même huile extraite par l'autre méthode, EPM et ESAU respectivement.

En ce qui concerne le rapport entre l' ω -6 et l' ω -3, les huiles SIG et NEB extraites par ESAU et EPM, respectivement, montrent les rapports les plus inférieurs

significativement mais très supérieurs à celui recommandé par le ministère de la santé, ce qui rend les quatre variétés d'olive moins intéressantes pour le consommateur. En outre, si on compare entre les deux méthodes d'extraction utilisées, l'extrait LAR et SIG par EPM montre le ratio le plus élevé par rapport à l'huile correspondante extraite par ESAU. Il a été ainsi montré un effet positif du solvant organique ESAU sur la teneur en acides gras à courte chaîne. Ce qui montre que la composition de l'huile a été modifiée par les méthodes d'extraction. De plus, une augmentation considérable de teneur en acides gras libres a été remarquée pour les extraits de ESAU.

Dans un deuxième temps, la teneur en oméga-3 et-6 de l'huile d'olive, son acidité et sa teneur en diènes conjugués avant chauffage ont été déterminés. Les cinétiques d'oxydation des lipides ont été suivies pour quatre températures: 150 °C, 275 °C, 350 °C et à température de 450 °C. Au cours du chauffage durant 15 min, les concentrations en produits primaires de l'oxydation des lipides, diènes conjugués, dans les différents échantillons d'huile fluctuent. Ces composés instables sont rapidement décomposés en produits secondaires, et sont donc difficilement quantifiables. À partir du traitement à 350 °C, les réactions d'oxydation se développent très rapidement dans tous les extraits lipidique étudiés. Quinze minutes après chauffage élevé à température supérieure à 275 °C, la concentration en produits primaires de l'oxydation des lipides a diminué après son augmentation et à l'inverse de l'acidité, les teneurs en oméga-3 et-6 ont diminué de façon très importante selon l'analyse chromatographique. Alors, l'exposition pendant quinze minute à chaleur devra donc être réalisée avant ce degré. Pour l'échantillon MAN, la diminution des pourcentages d' ω -3 et d' ω -6 apparaît après 15 min du chauffage à 450 °C, et la famille des acides gras d' ω -3 présente le pourcentage de diminution le plus faible par rapport aux autres extraits lipidiques, les diènes conjugués se décomposent graduellement, en comparaison avec les échantillons LAR et NEB, ce qui montre sa stabilité oxydative pour l'utilisation à futur. Le développement des réactions d'oxydation des lipides étant très rapide à 350 °C il est vivement conseillé de l'éviter.

Cette étude a également permis d'adapter et valider différentes méthodes électrochimiques afin d'analyser les acides gras polyinsaturés d' ω -3 et d' ω -6. Les méthodes de la voltammétrie cyclique, onde carrée, et impulsionnelle différentielle ont été validées et mises au point à l'huile à base d'acides gras d' ω -3 ou d' ω -6 et de vitamine E naturelle. Pour atteindre cet objectif, une étape de saponification préalable et une double extraction liquide-liquide de l'huile riche en antioxydants est nécessaire.

Cependant, quelle que soit l'échantillon de l'huile, ces mesures ne pourraient pas permettre d'identifier et de quantifier les compositions des huiles en acides gras d' ω -3 et d' ω -6 séparément dans ces conditions. Par la suite, il serait intéressant de tenter de séparer les réponses obtenues par l'analyse électrochimique de ces deux familles afin de pouvoir les étudier dans l'huile d'olive et les graisses alimentaires.

La validation complète de l'analyse électrochimique des acides gras polyinsaturés nécessitera le dosage de la concentration en acides gras de chaque famille séparément dans l'huile. Même si l'analyse électrochimique n'est pas encore entièrement validée, ce travail a toutefois permis de recenser un jeu de paramètres électrochimiques et d'identifier, via l'étude de la voltammétrie cyclique, les comportements électrochimiques des acides gras polyinsaturés. En outre, les questions soulevées lors de la tentative de séparer la réponse électrochimique des acides gras d' ω -3 et d' ω -6, ont permis d'orienter les futurs travaux à réaliser.

Références bibliographiques

- [1] Bauer W.J., Badoud R., Löliger J., Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. 1^{ère} Ed. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes, 2010, 719 p.
- [2] Dupin H., Cuq J.-L., Malewiak M.-I., Leynaud-Rouaud C., Berthier A.-M., Alimentation et nutrition humaines. Paris : ESF éditeur, 1992, 1515p.
- [3] Gładkowski W., Kiełbowicz G., Chojnacka A., Gil M., Trziszka T., Dobrzanski Z., Wawrzenczyk C., Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations, Food Chem., 2011, 126, 1013–1018.
- [4] Kalonji E., Dumas C., Berta J.-L., Acides gras de la famille oméga 3 et système cardio-vasculaire : intérêt nutritionnel et allégations. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2003.
- [5] Simopoulos A.P., The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, Biomed. Pharmacother., 2002, 56, 365–379.
- [6] Brémaud C., Claisse J.-R., Leulier F., Thibault J., Ulrich E., Alimentation, santé, qualité de l'environnement et du cadre de vie en milieu rural. DIJON Cedex, France : Educagri éditions, 2006, 232 p.
- [7] Publication du conseil supérieur de la sante N° 8310 , Sécurité des huiles et graisses, Bruxelles, Janvier, 2011.
- [8] Sinanoglou V. J., Strati I. F., Miniadis-Meimaroglou S., Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study, Food Chem., 2011, 124 (3), 971–977.
- [9] Lecerf J.-M., Les aliments. In : Schlienger J.-L., Nutrition Clinique Pratique : Chez L'adulte et L'enfant. 2^{ème} éd. Paris : Elsevier Masson SAS ,2014, pp.19-41.
- [10] Flash info, Les lipides alimentaires*Les matières grasses : alliées ou ennemies de notre santé ?, Journal de pédiatrie et de puériculture, 2006, 19, pp.138–143.
- [11] Leray C., Les lipides dans le monde vivant. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, 2010, 277 p. (Introduction à la lipidomique).
- [12] Haran T I., Marion-Latard F., De Glisezinski I., Pillard F., Crampes F., Rivière D., Lipides et Exercice. In : Bigard X., Guezennec C.-Y., Nutrition du sportif. 2^{ème} éd. Paris : Elsevier Masson SAS, 2007, pp. 44–68.
- [13] Wémeau J.-L., Métabolisme des lipides, Endocrinologie, Diabète, Métabolisme et Nutrition pour le Praticien, Paris : Elsevier Masson SAS, 2014, pp. 469–474.

- [14] Apfelbaum M. , Romon M., Lipides d’assaisonnement ou de cuisson. In : Apfelbaum M. , Romon M., Dubus M., Diététique et nutrition. 7^{ème} éd. Paris : Elsevier Masson SAS,2009, pp. 321–335.
- [15] Wémeau J.-L. , Les aliments. In : Wémeau J.-L., Vialettes B., Schlienger J.-L. Endocrinologie, Diabète, Métabolisme et Nutrition pour le Praticien. Paris : Elsevier Masson SAS, 2014, pp. 339–347.
- [16] Chevallier L., Les lipides. In : Nutrition : principes et conseils. 3^{ème} éd. Paris : Elsevier Masson SAS ,2009, pp.14-25.
- [17] Montfort P. Les epicuriens de montbrison [en ligne]. Disponible sur : <<http://lesepicuriensdemontbrison.jimdo.com/espace-etudiants/2%C3%A8me-ann%C3%A9e-bep/les-corps-gras/>> (consulté le 23.05.2015).
- [18] Laura. Je mange donc je maigris [en ligne]. Disponible sur : <<http://jemangedoncjemaigris.com/margarine-vs-beurre/>> (consulté le 23.05.2015).
- [19] Leray C., Les lipides – nutrition et santé. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, 2013, 333 p.
- [20] Médart J., Manuel pratique de nutrition : l’alimentation préventive et curative. 2^{ème} Ed. Bruxelles : De Boeck, 2009, 289 p.
- [21] Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Métailler R., Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Paris, France : INRA Editions,1999, 487p.
- [22] Bauchard D., Picard B., Muscle et viande de ruminant publié. Paris : Éditions Quæ, 2010, 289 p.
- [23] Pingret D., Fabiano-Tixier A.-S. , Chemat F., Degradation during application of ultrasound in food processing :A review. Food Control, 2013, 31, 593-606.
- [24] Michel F., Bonnefont-Rousselot D., Mas E., Draï J., Théron P., Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. Ann. Biol. Clin., 2008, 66 (6), 605-620.
- [25] Frankel E.N., Lipid oxidation, Prog. Lipid Res., 1980, 19 (1-2) , 1-22.
- [26] Schultz H. W., Day E. A., Sinnhuber R. O., Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Westport, Connecticut (USA): The Avi Publishing Company, Inc, 1962, 442 p.
- [27] Choe E., Min D. B., Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2006, 5(4), 169-186.
- [28] Brimberg U. I., Kamal-Eldin A., On the kinetics of the autoxidation of fats: influence of pro-oxidants, antioxidants and synergists. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2003, 105 (2), 83-91.

- [29] Andreo A. I., Doval M.M., Romero A. M., Judis M.A., Influence of heating time and oxygen availability on lipid oxidation in meat emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2003, 105 (5), 207-213.
- [30] Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P., Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S : Med. Sci.*, 2004, 20 (4), 458-463.
- [31] Velasco J., Dobarganes C., Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2002, 104 (9-10), 661-676.
- [32] Khayat A., Schwall D., Lipid oxidation in seafood. *Food Technol.*, 1983, 37 (7), 130-140.
- [33] Genot C., Congélation et qualité de la viande. Paris, France : INRA Editions, 2000, 98 p. (Techniques et pratiques).
- [34] Ke P.J., Ackman R.G., Linke B.A., Nash D.M., Differential lipid oxidation in various part of frozen mackerel. *J. Food Technol.*, 1977, 12 (1), 37-47.
- [35] De Leonardis A. , Macciola V., Catalytic effect of the Cu(II)- and Fe(III)-cyclohexanebutyrates on olive oil oxidation measured by Rancimat. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2002, 104 (3) , 156-160.
- [36] Frankel E.N., Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food chem.*, 1996, 57 (1), 51-55.
- [37] Frankel E.N., Lipid oxidation. Dundee, Scotland: The Oily Press, 1998, 303 p.
- [38] Frankel E.N., Photooxidation of unsaturated fats. In: Lipid oxidation. Dundee, Scotland: The oily Press, 1998, pp 4-54.
- [39] Frankel E. N., Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog. Lipid. Res.*, 1984, 23 (4), 197-221.
- [40] Frénot M., Vierling E., Biochimie des aliments : Diététique du sujet bien portant. 2^{ème} Ed. Aquitaine, France: doin éditeurs, 2001, 301 p.
- [41] Frankel E.N., Secondary products of lipid oxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 1987, 44 (2-4), 73-85.
- [42] Fardet A., Souchon I., Dupont D., Structure des aliments et effets nutritionnels. Paris : Éditions Quæ, 2013, 456 p.
- [43] Santos C. S.P., Cruz R., Cunha S. C., Casal S., Effect of cooking on olive oil quality attributes, *Food Res. Int.*, 2013, 1-9.

- [44] Shahidi F., Wanasundara U.N., Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. In: Akoh C. C., Min D. B., eds., *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Basel, New York: Marcel Dekker, Inc., 2002, pp. 465–487.
- [45] Dobarganes M.C., Velasco J., Analysis of lipid hydroperoxides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, 104 (7), 420-428.
- [46] Berset C., Cuvelier M. E., Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sci. Aliments*, 1996, 16 (3) , 219-245.
- [47] Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127 (1), 183–198.
- [48] Niklová I., Schmidt Š., Habalová K., Sekretár S., Effect of evening primrose extracts on oxidative stability of sunflower and rapeseed oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001, 103 (5), 299–306.
- [49] Velasco J., Dobarganes C., Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2002, 104 (9-10), 661-676.
- [50] Gordon M., Measuring antioxidant activity. In: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, Ltd., 2001, pp. 71–84.
- [51] Chung H. J., Colakoglu A. S., Min D. B., Relationships among Headspace Oxygen, Peroxide Value, and Conjugated Diene Content of Soybean Oil Oxidation. *J. Food Sci .*, 2004, 69 (2), 83–88.
- [52] Melton S. L., Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.*, 1983, 37 (7), 105–116.
- [53] Fruhwirth G. O., Wenzl T., El-Toukhy R., Wagner F. S., Hermetter A., Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol .*, 2003, 105 (6), 266–274.
- [54] Hudson B. J. F., In: Allen J. C., Hamilton J., *Rancidity of Foods*. London, England: Applied Science Publishers, 1983, pp. 47–58.
- [55] Yin H., Xu L., Porter N. A., Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 2011, 111 (10), 5944 - 5972.
- [56] Choe E., Min D. B., Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2006, 5(4), 169 -186.
- [57] Shahidi F., Zhong Y., Lipid oxidation: Measurement Methods. In: Bailey 's *Industrial Oil and Fat Products*. 6^{ème} Ed. New York: John Wiley& Sons, Inc., 2005, pp. 357-385.

- [58] Koskas J.P., Cillard J., Cillard P., Direct high-performance liquid chromatographic separation of hydro-peroxide isomers of linoleic acid. *J. Chromatogr. A*, 1983, 258, 280-283.
- [59] Yang G.C., Qiang W., Morehouse K.M., Rosenthal I., Ku Y., Yurawecz P., Determination of hydroperoxides in edible oils by electron spin resonance, thiobarbituric acid assay, and liquid chromatography-chemiluminescence techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39 (5), 896-898.
- [60] Van Kuijk F.J.G.M., Thomas D.W., Stephens R.J., Dratz E.A. Gas chromatography-mass spectrometry assays for lipid peroxides. *Methods Enzymol.*, 1990, 186, 388-398.
- [61] Frankel E.N., Neff W.E., Weisleder D., Determination of methyl linoleate hydroperoxides by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods in Enzymology*, 1990, 186, 380-387.
- [62] Sergent O., Morel I., Cogrel P., Chevanne M., Beaugendre M., Cillard P., Cillard J., Ultraviolet and infrared spectroscopy for microdetermination of oxidized and unoxidized fatty acyl esters in cells. *Anal. Biochem.*, 1993, 211(2), 219-223.
- [63] Ruíz A., Cañada M.J.A., Lendl B., A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *Analyst*, 2001, 126, 242-246.
- [64] Yildiz G., Wehling R.L., Cuppett S.L., Comparison of Four Analytical Methods for the Determination of Peroxide Value in Oxidized Soybean Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2003, 80 (2), 103-107.
- [65] Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, 6th ed. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2009.
- [66] Eymard S., Genot C., A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2003, 105(9), 497-501.
- [67] Jiang Z.-Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P., Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 1991, 26 (10), 853-856.
- [68] Wolff S.P., Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.*, 1994, 233, 182-189.

- [69] Burat K.M., Bozkurt O., Improvement of calibration curve for determining peroxide values of food lipids by the modified ferrous oxidation-xylene orange method. *J. AOAC Int.*, 1996, 79 (4), 995-997.
- [70] Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Birlouez-Aragon I., Wolff S.P., Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylene orange assay. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43 (1), 17-21.
- [71] Grau A., Codony R., Rafecas M., Barroeta A.C., Guardiola F. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylene orange method. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(9), 4136-4143.
- [72] DeLong J.M., Prange R.K., Hodges D.M., Forney C.F., Bishop M.C., Quilliam M., Using a modified ferrous oxidation-xylene orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (2), 248-254.
- [73] Jahouach-Rabai W., Trabelsi M., Van Hoed V., Adams A., Verhé R., De Kimpe N., Frikha M.H., Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor compounds of olive oil. Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by SPME coupled to GC/MS). *Ultrason. Sonochem.*, 2008, 15 (4), 590-597.
- [74] Klein R. A., The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochim. Biophys. Acta- Lipids and Lipid Metabolism*, 1970, 210 (3), 486-489.
- [75] Corongiu F. P., Banni S., Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol.*, 1994, 233, 303-310.
- [76] Devasagayam T. P., Bloor K. K., Ramasarma T., Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2003, 40 (5), 300-308.
- [77] Shahidi F., Quality assurance of fats and oils. In: *Bailey's industrial oil and fat products*, Vol. 1-6, Vol. 1, 6th ed. New Jersey: Wiley and Blackwell, 2005, pp. 565 - 575.
- [78] Gray J. I., Measurement of lipid oxidation: A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1978, 55 (6), 539-546.
- [79] Chemat F., Grondin I., Shum Cheong Sing A., Smadja J., Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.*, 2004, 11 (1), 13-15.
- [80] Shahidi F., Wanasundara U., Brunet N., Oxidative stability of oil from blubber of harp seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. *Food Res. Int.*, 1994, 27 (6), 555-562.

- [81] Wanasundara U. N., Shahidi F., Jablonski C. R., Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils, *Food Chem.*, 1995, 52 (3), 249–253.
- [82] Kamal-Eldin A., *Lipid oxidation pathways*. Champaign Illinois: AOCS Press, 2003.
- [83] Judde A., Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?, *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)*, 2004, 11(6), 414 - 418 .
- [84] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., *Antioxidants in food: Practical applications*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd, 2001, 373 p.
- [85] Doleschall F., Kemény Z., Recseg K., Kővári K., A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, 104 (1), 14 -18.
- [86] Van der Merwe G. H., du Plessis L. M., Taylor J. R., Changes in chemical quality indices during long-term storage of palm-olein oil under heated storage and transport-type conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 2004, 84(1), 52-58.
- [87] List G. R., Evans C. D., Kwolek W. F., Warner K., Boundy B. K., Cowan J. C., Oxidation and quality of soybean oil: A preliminary study of the anisidine test. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1974, 51 (2), 17-21.
- [88] Guillen M. D., Cabo N., Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.*, 2002, 77 (4), 503-510.
- [89] Stauffer C. E., *Fats and oils*. USA: Eagan Press, St. Paul, Minnesota, 1996, 149 p.
- [90] Kiritsakis A., Kanavouras A., Kiritsakis K., Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, 104 (9-10), 628 –638.
- [91] Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L. R., Gardner P. T., Heinonen M. I., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. H., Tijburg L., Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 212 (3), 319–328.
- [92] Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N., Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index Method. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (7), 1845 –1851.

- [93] De la Presa-Owens S., Lopez-Sabater M. C., Rivero-Urgell M., Shelf-Life Prediction of an Infant Formula Using an Accelerated Stability Test (Rancimat). *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43(11), 2879–2882.
- [94] Cañizares- Macías M. P., García-Mesa J. A., Luque de Castro M. D., Determination of the oxidative stability of olive oil, using focused-microwave energy to accelerate the oxidation process. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378 (2), 479–483.
- [95] Tan C. P., Che Man Y. B., Selamat J., Yusoff M. S. A., Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chem .*, 2002, 76 (3), 385–389.
- [96] Aparicio R., Roda L., Albi M. A., Gutiérrez F., Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 (10), 4150–4155.
- [97] Anwar F., Bhangar M. I., Kazi T. G., Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 2003, 80 (2), 151–155.
- [98] Boyd L. C., Nwosu V. C., Young C. L., MacMillian L., Monitoring lipid oxidation and antioxidant effects of phospholipids by headspace gas chromatographic analyses of rancimat trapped volatiles . *J. Food Lipids* , , 1998, 5 (4) , 269–282.
- [99] Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226(1), 497–509.
- [100] Bligh, E.G., Dyer W.J., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37 (8), 911–917.
- [101] Bailey S.K., Wells D.E., The Measurement of Lipids as a Co-factor for Organic Contaminants in Biota, in *Proceedings of the QUASIMEME Lipid Workshop*, Dublin, 1994.
- [102] Smedes F., Askland T.K., Revisiting the Development of the Bligh and Dyer Total Lipid Determination Method, *Mar. Pollut. Bull.*, 1999, 38, 193–201.
- [103] Ackman R.G., Fish Lipids, Part 1. In: Connell J.J., *Advances in Fish Science and Technology*. Surrey , England: Fishing News Books, 1980, pp. 86–103.
- [104] Linko R.R., Kaitaranta J.K., Vuorela R., Comparison of the Fatty Acids in Baltic Herring and Available Plankton Feed, *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1985, 82 (4) , 699–705.

- [105] Sargent J.R., Parkes R.J., Mueller-Harvey I., Henderson R.J., Lipid Biomarkers in Marine Ecology. In: Sleight, M.A.(ed.), *Microbes in the Sea*. Chichester, United Kingdom: Ellis Horwood, 1988, pp. 119–138.
- [106] Roose P., Smedes F., Evaluation of the Results of the QUASIMEME Lipid Intercomparison: The Bligh and Dyer Total Lipid Extraction Method. *Mar. Pollut. Bull.*, 1996, 32 (8-9), 674–680.
- [107] Iverson S.J., Frost K.J., Lowry L.F., Fatty Acid Signatures Reveal Fine Scale Structure of Foraging Distribution of Harbor Seals and Their Prey in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1997, 151, 255–271.
- [108] Montgomery W.L., Umino T., Nakagawa H., Vaughn I., Shibuno T., Lipid Storage and Composition in Tropical Surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae), *Mar. Biol.*, 1999 133 (1) , 137–144.
- [109] Payne S.A., Johnson B.A., Otto R.S., Proximate Composition of Some North-Eastern Pacific Forage Fish Species, *Fisheries Oceanogr.*, 1999, 8 (3) , 159–177.
- [110] Christie W.W., *Lipid Analysis*, 2nd ed. Oxford, New York: Pergamon Press, 1982, 207 p.
- [111] Wamberg S., Olesen C.R., Hansen H.O., Influence of Dietary Sources of Fat on Lipid Synthesis in Mink (*Mustela vison*) Mammary Tissue, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, 103(1) , 199–204.
- [112] Arnould J.P.Y., Boyd I.L., Clarke A., A Simplified Method for Determining the Gross Chemical Composition of Pinniped Milk Samples, *Can. J. Zool.*, 1995, 73, 404–410.
- [113] Fairbanks H.V., Drying powdered coal with the aid of ultrasound. *Powder Technology*, 1984, 40 (1), 257–264.
- [114] Mason T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P., The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.*, 1996, 3 (3), S253–S260.
- [115] Knorr D., Ade-Omowaye B.I.O., Heinz V., Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2002, 61 (2), 311–318.
- [116] Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A., Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason. Sonochem.*, 2006, 13 (6), 543–548.

- [117] Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P.R., Rathod V.K., Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J. Food Eng.*, 2009, 93, 421–426.
- [118] Ma Y., Ye X., Hao Y., Xu G., Xu G., Liu D., Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem.*, 2008, 15 (3), 227–232.
- [119] Reverchon E., Senatore F., Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42 (1), 154–158.
- [120] Romdhane M., Gourdon C., Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chem. Eng. J.*, 2002, 87 (1), 11–19.
- [121] Vinatoru M., An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.*, 2001, 8 (3), 303–313.
- [122] Yang B., Zhao M., Shi J., Yang N., Jiang Y., Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chem.*, 2008, 106 (2), 685–690.
- [123] Halim R., Danquah M. K., Webley P. A., Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 2012, 30 (3), 709–732.
- [124] Kates M., Lipid extraction procedures. In: *Techniques of lipidology: isolation, analysis, and identification of lipids*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1986b, pp. 100-111.
- [125] Robles Medina A., Molina Grima E., Giménez Giménez A., Ibañez González M.J., Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.*, 1998, 16 (3), 517–580.
- [126] Halim R., Gladman B., Danquah M.K., Webley P.A., Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102 (1), 178–85.
- [127] Lou Z., Wang H., Zhang M., Wang Z., Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. *J. Food Eng.*, 2010, 98 (1), 13–18.
- [128] Mulinacci N., Ieri F., Ignesti G., Romani A., Michelozzi M., Creti D., Innocenti M., Calamai L., The freezing process helps to preserve the quality of extra virgin olive oil over time: A case study up to 18 months, *Food Res. Int.*, 2013, 54 (2), 2008-2015.
- [129] Fadda C., Del Caro A., Sanguinetti A.M., Urgghe P.P., Vacca V., Arca P.P., Piga A., Changes during storage of quality parameters and *in vitro* antioxidant activity

of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction technologies, *Food Chem.*, 2012, 134 (3), 1542-1548.

[130] Santos O.V., Corrêa N.C.F., Carvalho Jr. R.N., Costa C.E.F., França L.F.F., Lannes S.C.S., Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake, *Food Res. Int.*, 2013, 51 (2), 841-847.

[131] Ulberth F., Schrammel F., Accurate quantitation of short-, medium-, and long-chain fatty acid methyl esters by split-injection capillary gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1995, 704(2), 455-463.

[132] Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R., Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 465(1-2), 39-62.

[133] Knothe G., Avocado and olive oil methyl esters. *Biomass Bioenerg.* , 2013, 58,143-148.

[134] Royer A., Gerard C., Naulet N., Lees M., Martin G.J., Stable Isotope Characterization of Olive Oils.I—Compositional and Carbon-13 Profiles of Fatty Acids. *JAOCS*, 1999, 76 (3), 357-363.

[135] Brooks S. C., Richter M. M., Determination of DNA Bases Using Electrochemistry: A Discovery-Based Experiment. *Chem. Educator.*, 2002, 7, 284-287.

[136] Boubekri C., Lanez T., Djouadi A., Rebiai A., Effect of drying and freezing on antioxidant capacity and polyphenolic contents of two south Algerian eggplants cultivars. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, 5(3), 244-248.

[137] Ceballos C., Fernández H., Synthetic Antioxidants in Edible Oils by Square-Wave Voltammetry on Ultramicroelectrodes, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000,77(7), 731-735.

[138] Clough A.E., The determination of tocopherols in vegetable oils by square-wave voltammetry, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992, 69 (5) , 456-460.

[139] Bedioui F., Voltampérométrie sur électrode solide. Introduction. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 1999, 3 (P2125), pp. P2125-1.

[140] Wang J., *Analytical Electrochemistry*. 3rd ed. New Jersey, USA: John Wiley and Sons, Inc, 2006, 245 p.

[141] Mirčeski V., Komorsky-Lovrić Š., Lovrić M., *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*. Berlin Heidelberg, Allemagne: Springer-Verlag , 2007, 201 p.

[142] Rusling J.F., Kumosinski T.F., *Nonlinear Computer Modeling of Chemical and Biochemical Data*. California, USA: Academic Press, Inc, 1996, 268 p.

- [143] Bartlett P.N., *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. England: John Wiley and Sons Ltd, 2008, 478 p.
- [144] Otake T., Tabuchi M., Sato T., Susaki H., Korenaga T., Fluorescent Derivatization of Nitrite Ions with 2,3-Diaminonaphthalene Utilizing a pH Gradient in a Y-shaped Microchannel. *Analytical Sciences*, 2001,17 (4), 535 p.
- [145] Kissinger P.T., Heineman W. R., *Laboratory techniques in electroanalytical Chemistry*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1984.
- [146] Scholz F., *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. 2nd ed. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2010, 347 p.
- [147] Lacourcelle L., *Traité de galvanotechnique*. France : Galva-Conseils Editions, 1997, 569 p.
- [148] Gilman S., Studies of hydrocarbon surface processes by the multipulse potentiodynamic method. Part 3.- Kinetics of adsorption of ethylene and acetylene on platinum and the structure of the adsorbed layer at low potentials. *Trans. Faraday Soc.*, 1966, 62, 466-480.
- [149] Compton R. G., Banks C. E., *Understanding Voltammetry*, 2nd ed. London: Imperial College Press, , 2011, 107 p.
- [150] Kilmartin P., Zou H., Waterhouse A. L., A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (4), 1957-1965.
- [151] CEE. Caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes. 1991R2568, 2001,115 p.
- [152] Shaker M. A., Azza A. A., Relationship between volatile compounds of olive oil and sensory attributes, *International Food Research Journal*, 2013, 20 (1), 197-204.
- [153] Anwar P., Bendini A., Gulfranz M., Qureshi R., Valli E., Di Lecce G., Naqvi S.M. S., Toschi T. G., Characterization of olive oils obtained from wild olive trees (*Olea ferruginea* Royle) in Pakistan, *Food Res. Int.*, 2013, 1–7.
- [154] Fuentes de Mendoza M., De Miguel Gordillo C., Marín Expósito J., Sánchez Casas J., Martínez Cano M., Martín Vertedor D., Franco Baltasar M. N., Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives, *Food Chem.*, 2013, 141 (3), 2575–2581.
- [155] Abd El-Moneim Mahmoud E., Dostálová J., Pokorný J., Lukešová D., Doležal M., Oxidation of Olive Oils during Microwave and Conventional Heating for Fast Food Preparation, *Czech J. Food Sci*, 2009, 27, Special Issue, S173- S177.

- [156] Espínola F., Moya M., Fernández D. G., Castro E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant, *J. Food Eng.*, 2009, 92 (1), 112–118
- [157] Serrato A.G., Extraction of oil from soybeans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, 58 (3), 157–159.
- [158] Kumari P., Reddy C.R.K., Jha B., Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae, *Anal. Biochem.*, 2011, 415 (2), 134–144.
- [159] Sakouhi F., Herchi W., Sebei K., Absalon C., Kallel H., Boukhchina S., Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L., *Sci. Hortic.*, 2011, 132, 7–11.
- [160] Laffargue A., De Kochko A., Dussert S., Development of solid-phase extraction and methylation procedures to analyse free fatty acids in lipid-rich seeds, *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, 45, 250 -257.
- [161] Farhoosh R., Khodaparast M. H. H., Sharif A., Alavi Rafiee S., Olive oil oxidation: Rejection points in terms of polar, conjugated diene, and carbonyl values, *Food Chem.*, 2012, 131 (4), 1385–1390.
- [162] Hadj-Taieb N., Grati N., Ayadi M., Attia I., Bensalem H., Gargouri A., Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation, *Biochem. Eng. J.*, 2012, 62, 79– 85.
- [163] Ouni Y., Guerfel M., Ben Yahia L., Zarrouk M., Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their blending proportions, *Afr. J. Biotechnol.*, 2014, 13(12),1386-1392.
- [164] Casal S., Malheiro R., Sendas A., Oliveira B.P.P., Pereira J.A., Olive oil stability under deep-frying conditions, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48 (10), 2972–2979.
- [165] Gharby S., Harhar H., Boulbaroud S., Bouzoubaâ Z., El Madani N., Chafchaouni I., Charrouf Z., The stability of vegetable oils (sunflower, rapeseed and palm) sold on the Moroccan market at high temperature, *Int. J. Chem. Biol. Sci.*, 2014, 5, 47-54.
- [166] Marinova E. M., Seizova K. A., Totseva I. R., Panayotova S. S., Marekov I. N., Momchilova S. M., Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature, *Bulg. Chem. Commun.*, 2012, 44(1), 57 – 63.

- [167] Aubourg S.P., Sotelo C.G., Pérez-Martin R., Assessment of Quality Changes in Frozen Sardine (*Sardina pilchardus*) by Fluorescence Detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998b, 75, 575-580.
- [168] Pantzaris T.P., Comparison of monounsaturated and polyunsaturated oils in continuous frying, *Grasas y Aceites*, 1998, 49 (3-4), 319-325.
- [169] Gray J.I., Monahan F.J., Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends Food Sci. Technol.*, 1992, 3, 315-318.
- [170] Borugadda V. B., Goud V. V., Thermal, oxidative and low temperature properties of methyl esters prepared from oils of different fatty acids composition: A comparative study, *Thermochim. Acta*, 2014, 577, 33– 40.
- [171] O’Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T., A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils and feedstuffs, *J. Anim. Sci.*, 2007, 85, 1511–1521.
- [172] Alireza S., Tan C. P., Hamed M., Che Man Y. B. , Effect of frying process on fatty acid composition and iodine value of selected vegetable oils and their blends, *Int. Food Res. J.*, 2010, 17, 295-302.
- [173] Kalogianni E.P., Karapantsios T.D., Miller R., Effect of repeated frying on the viscosity, density and dynamic interfacial tension of palm and olive oil, *J. Food Eng.*, 2011, 105, 169–179.
- [174] Alam Zeb, Effects of β -carotene on the thermal oxidation of fatty acids, *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, 10(68), 15346-15352.
- [175] Boselli E., Di Lecce G., Strabbioli R., Pieralisi G., Frega N. G., Are virgin olive oils obtained below 27 °C better than those produced at higher temperatures?, *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42, 748–757.
- [176] Morello J.R., Motilva M.J., Tovar M.J., Romero M.P., Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction, *Food Chem.*, 2004, 85, 357–364.
- [177] Sebedio J. L., Ratnayake W. M. N., Ackman R. G., Prevost J., Stability of polyunsaturated omega-3 fatty acids during deep fat frying of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.), *Food Res. Int.*, 1993, 26, 163-172.
- [178] Olivares-Carrillo P., Quesada-Medina J., Thermal decomposition of fatty acid chains during the supercritical methanol transesterification of soybean oil to biodiesel, *J. Supercrit. Fluids*, 2012, 72, 52– 58.

[179] Hassanien M. M. M., Adel G. Abdel-Razek , Improving the Stability of Edible Oils by Blending With Roasted Sesame Seed Oil as a Source of Natural Antioxidants, J. appl. sci. res., , 2012, 8(8), 4074-4083.

[180] Silva L., Pinto J., Carrola J., Paiva-Martins F., Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils, Food Chem., 2010, 121(4), 1177–1187.

[181] Herrera E., Barbas C., Vitamin E: action, metabolism and perspectives, J. Physiol. Biochem., 2001, 57 (2), 43-56.

[182] Ahmed S., Shakeel F., Voltammetric determination of antioxidant character in *Berberis lycium* Royel, *Zanthoxylum armatum* and *Morus nigra* Linn plants, Pak. J. Pharm. Sci., 2012, 25 (3), 501-507.

Annexe

Annexe.1. Matériels de laboratoire.

Equipements :

- Etuve (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800).
- Balance de précision (ADVENTURER 310g, précision 0.001g).
- Chauffe ballon.
- Bain à ultrasons.
- Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath B-490).
- Chromatographe (GC-2014, Shimadzu, Japon)
- Potentiostat/Galvanostat Model PGZ402.
- Cellule électrochimique à trois électrodes.
- Logiciel VoltaMaster4, version 7.08.
- Papier abrasif p 4000.
- UV spectrophotometer (SHIMADZU)

Verrerie et matériel plastique :

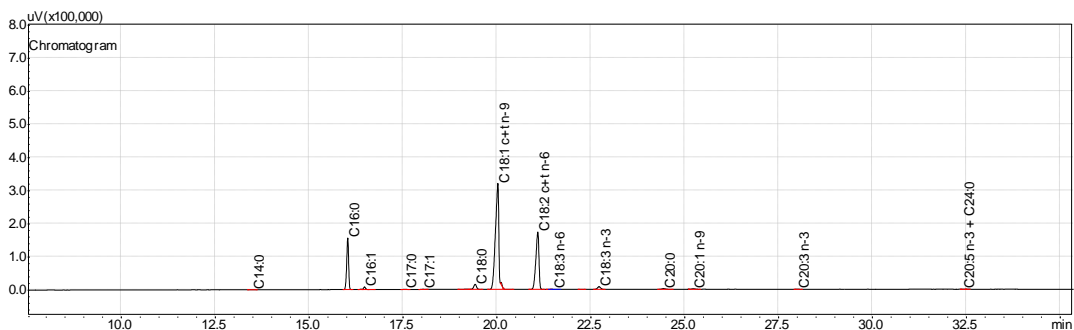
- Verrerie: pipettes (5mL,10 mL), ballons (100, 250, 500 mL), éprouvettes graduées (mL), Ampoule à décanter (60, 250, 500 mL).
- Micropipettes (100 et 1000 μ L).

Solvants et réactifs :

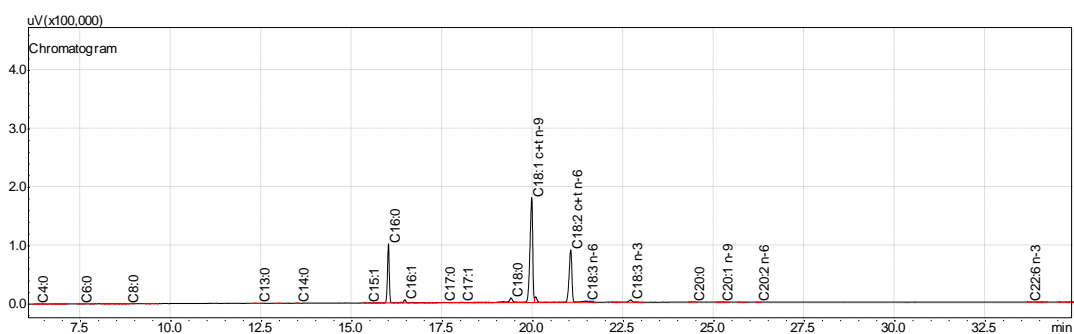
Methanol ($\geq 99.7\%$), Chloroforme (99-99.4 %), Ethanol absolue ($\geq 99.8\%$), Ethanol (96%) and Diethyl ether ($\geq 99.5\%$), Hexane. Acide Sulfurique (96-98%), Bicarbonate de Sodium (CHNAO_3), Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), Hydroxide de potassium (KOH). Étalon des esters méthyliques d'acide gras (37 composé EMAG, mélange de C4-C24).

Annexe.2. Chromatogrammes de CPG des échantillons de l'huile d'olive extraits par pressage mécanique après 15 min de chauffage à températures : (A) 25 °C, (B) 175 °C, (C) 275 °C, (D) 350 °C, (E) 450 °C.

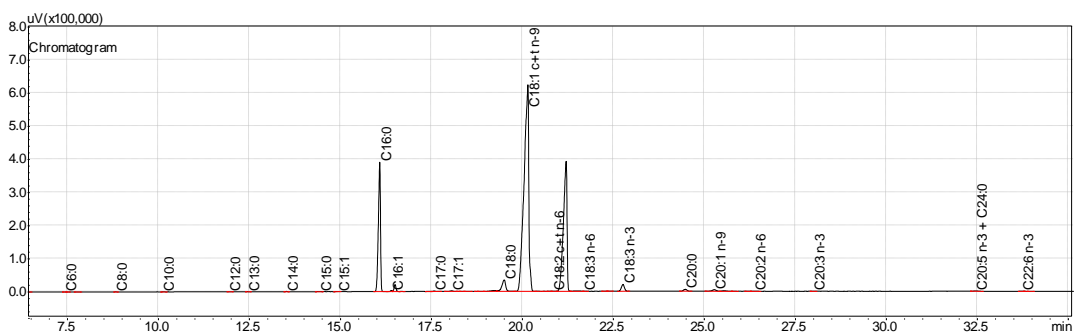
Échantillon LAR :



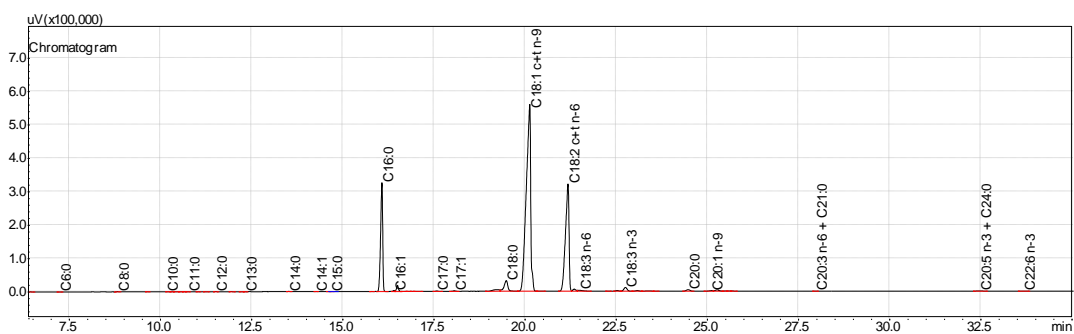
(A)



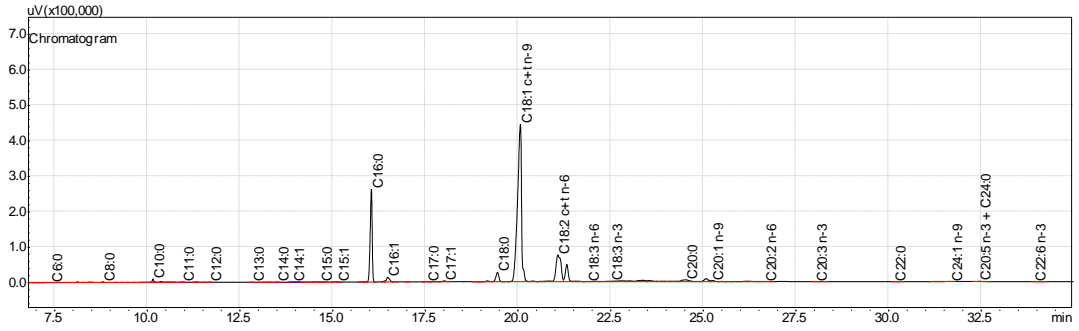
(B)



(C)

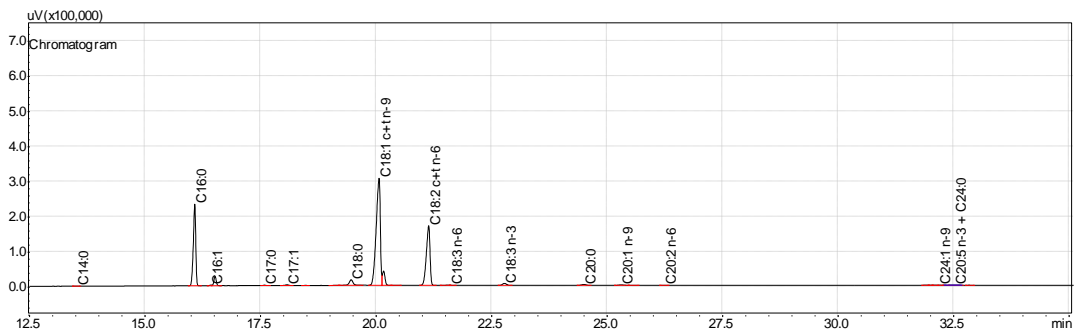


(D)

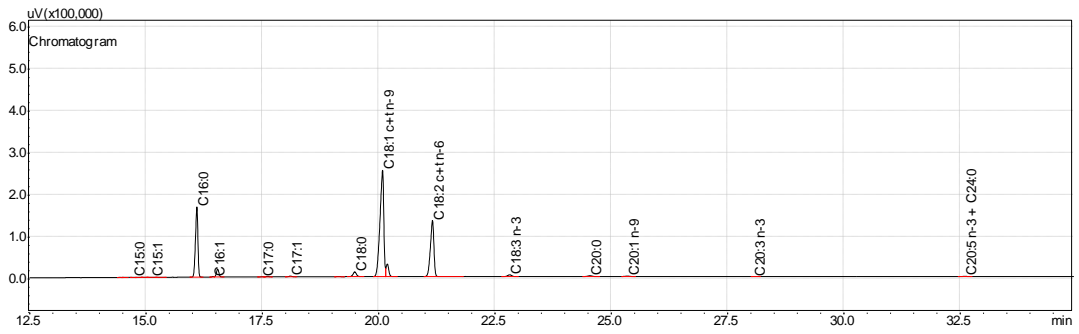


(E)

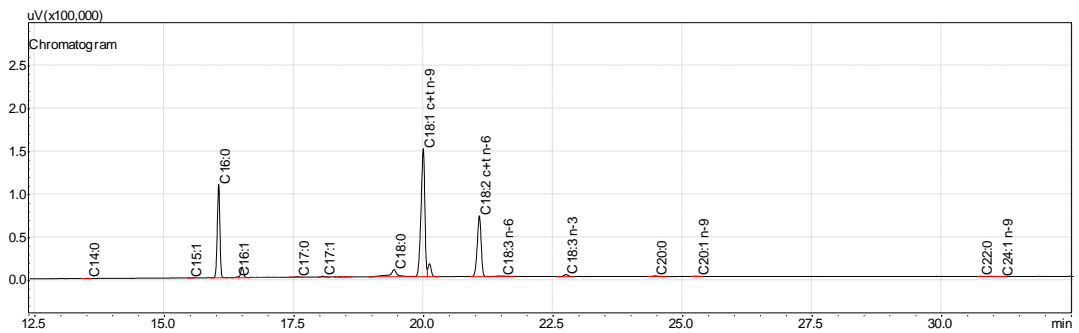
Échantillon MAN :



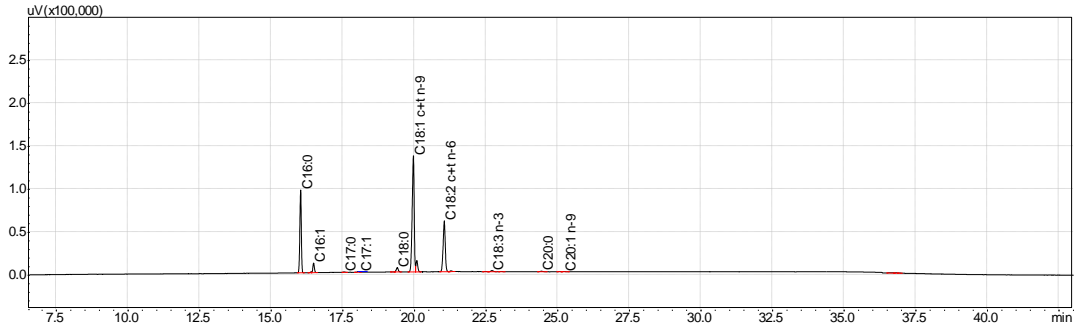
(A)



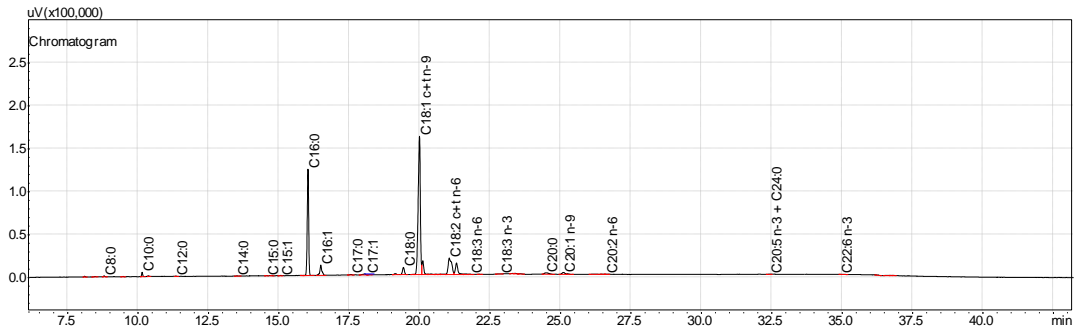
(B)



(C)

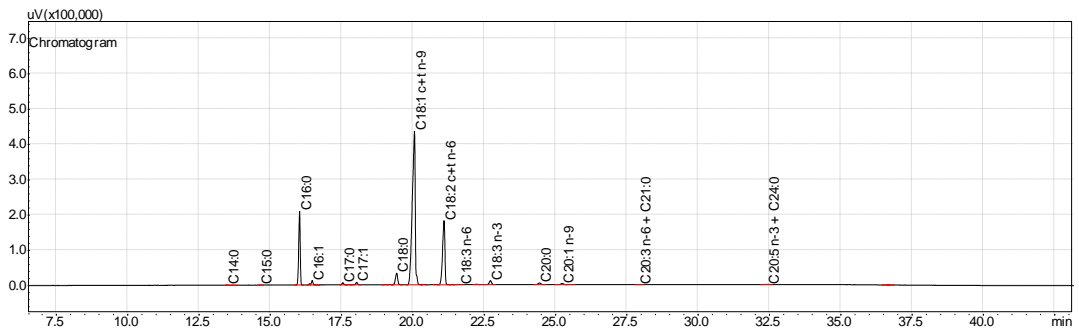


(D)

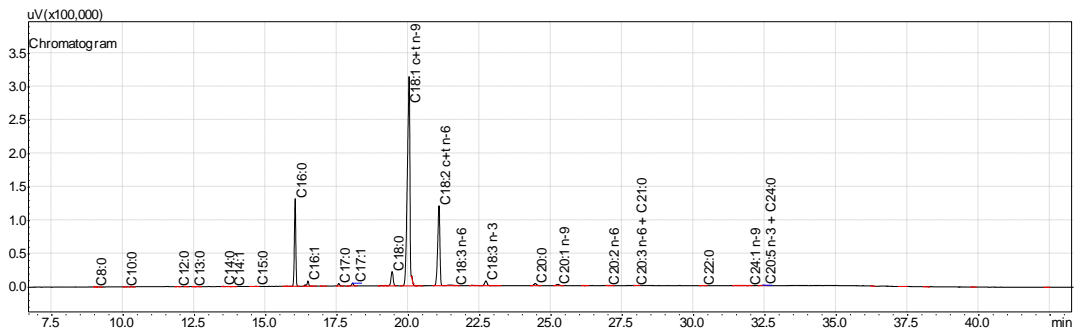


(E)

Échantillon NEB :

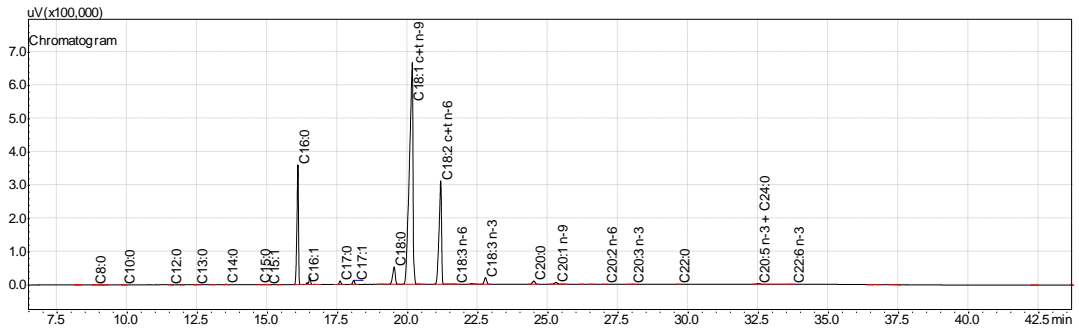


(A)

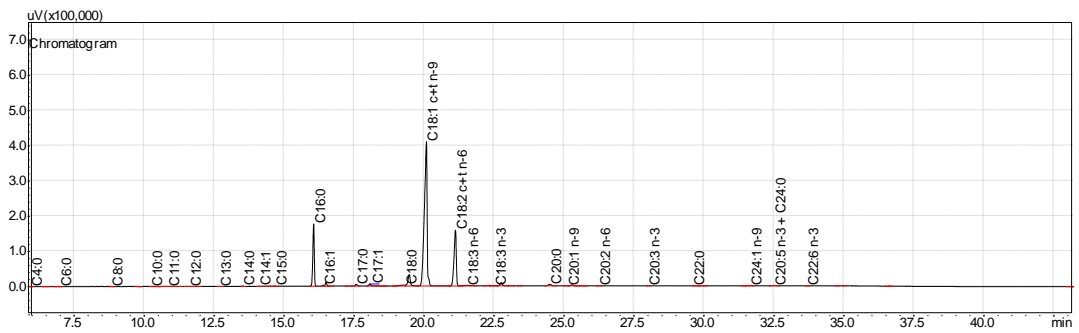


(B)

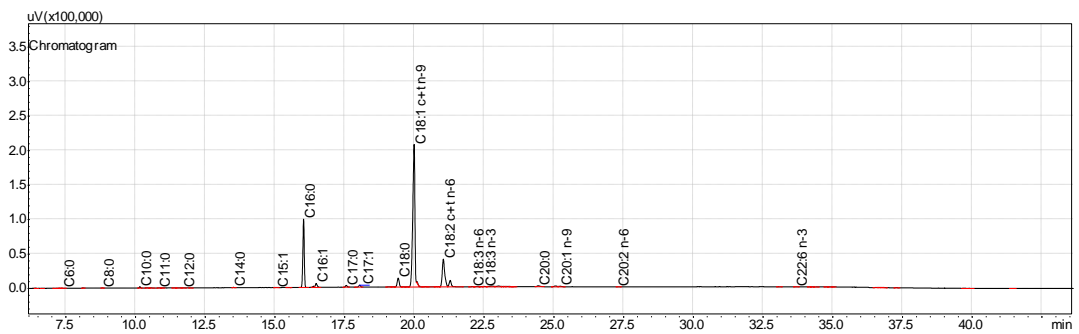
Annexe



(C)

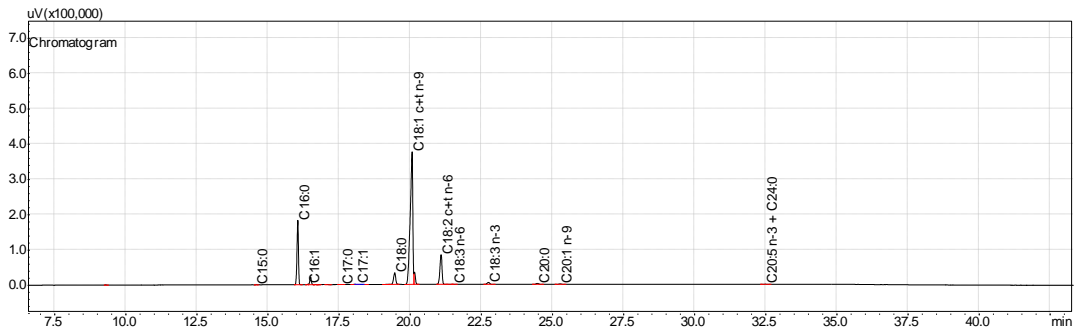


(D)

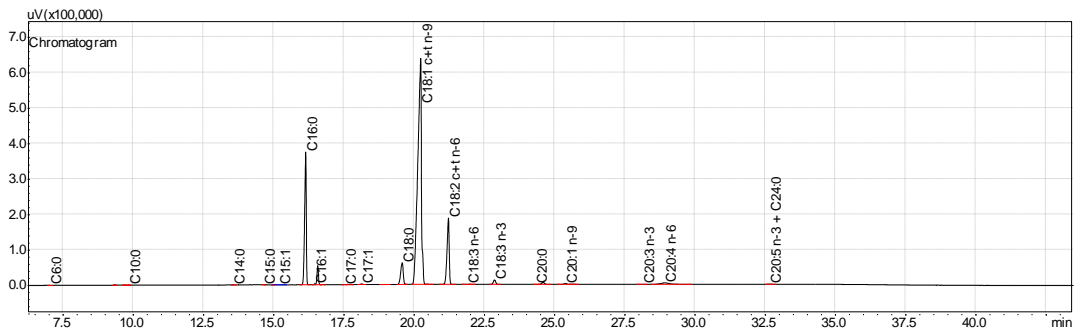


(E)

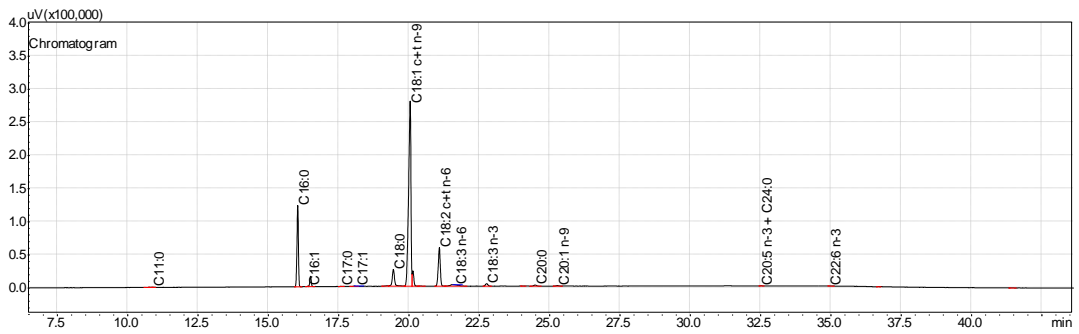
Échantillon SIG :



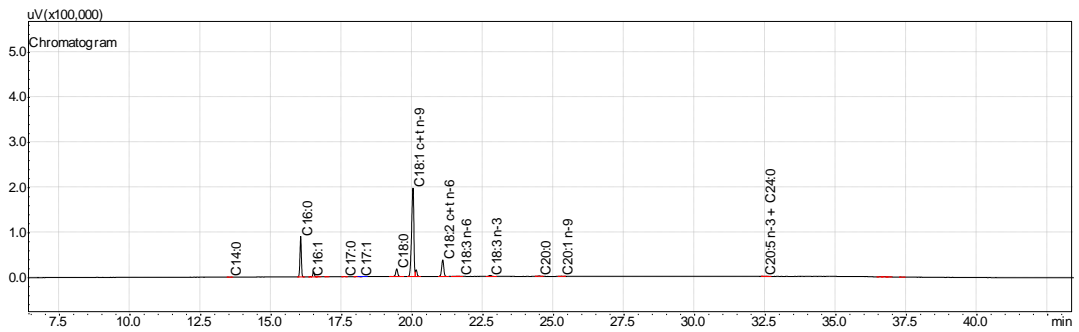
(A)



(B)

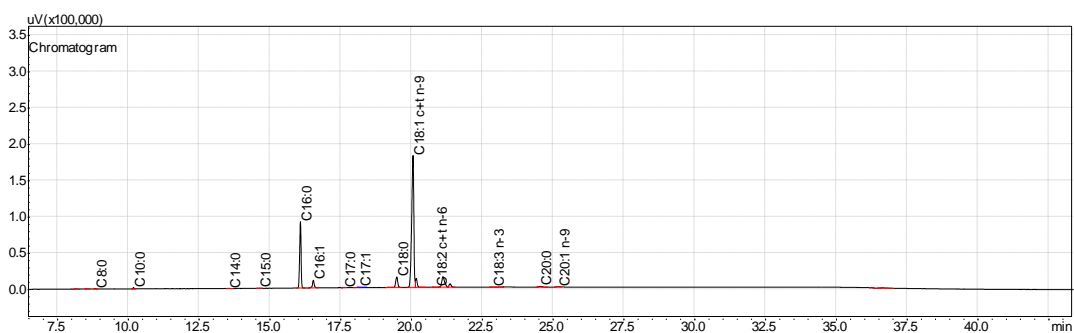


(C)



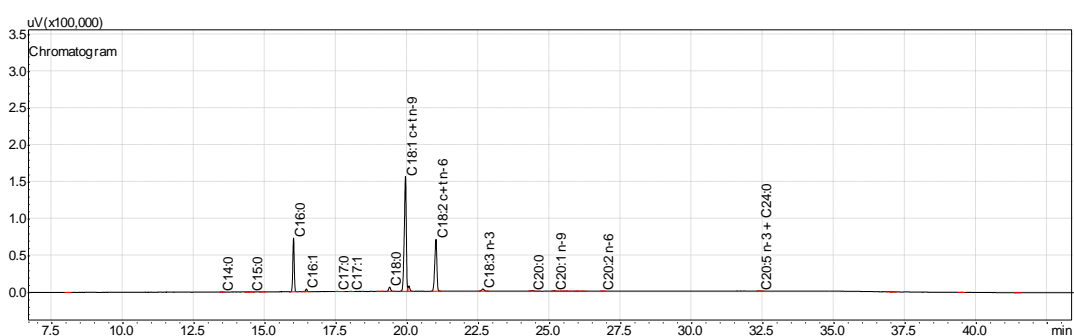
(D)

Annexe

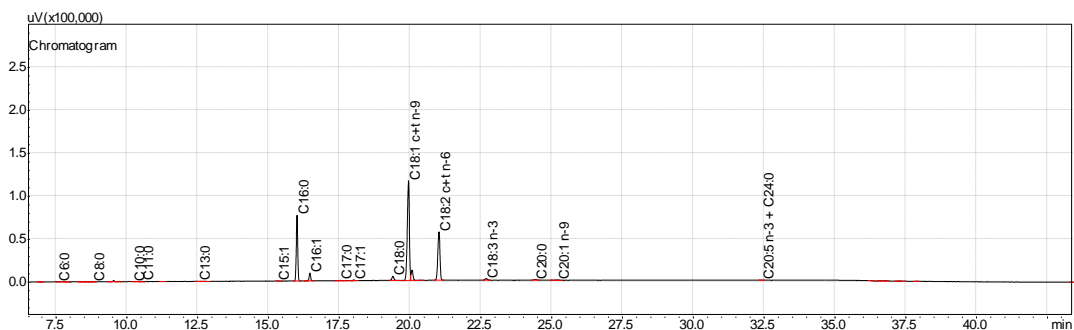


(E)

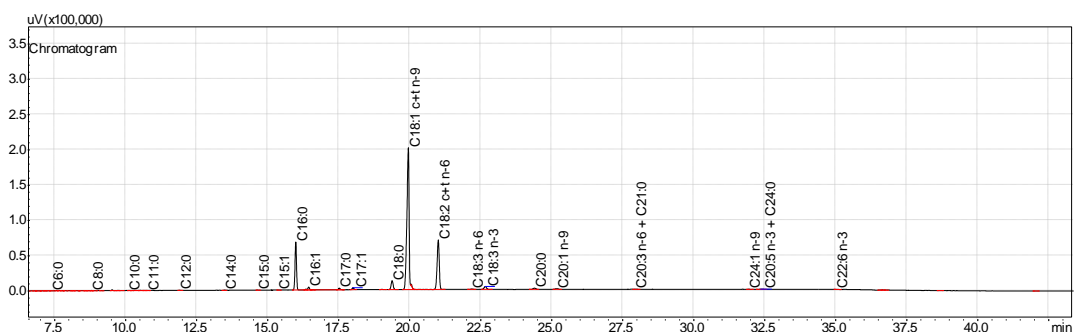
Annexe.3. Chromatogrammes de CPG des échantillons de l'huile d'olive extraits par ESAU.



-LAR-

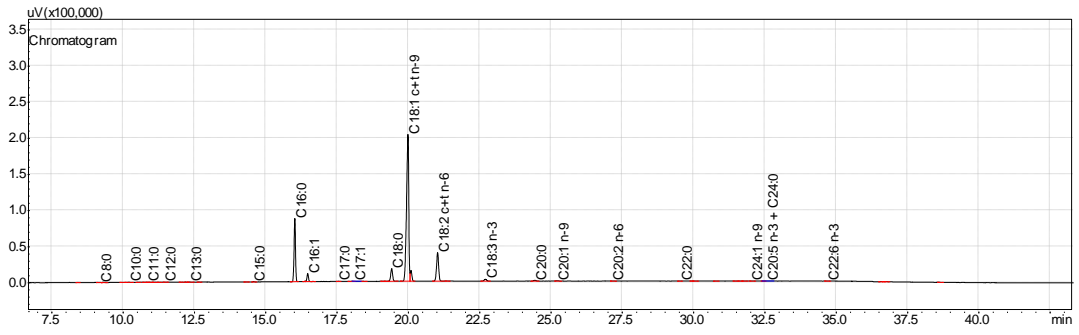


-MAN-



-NEB-

Annexe



-SIG-

Annexe

Annexe.4. Évolution des compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidiques de différents échantillons d'olive au cours du traitement thermique pour les différentes températures. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$). (n=3).

Acides gras MAN	25 °C	175 °C	275 °C	350 °C	450 °C
C8:0	nd	nd	nd	nd	0.15±0.04
C10:0	nd	nd	nd	nd	0.60±0.10
C11:0	nd	nd	nd	nd	0.05±0.00
C12:0	nd	nd	nd	nd	0.06±0.02
C14:0	0.04±0.01a	0.04±0.00a	0.04±0.02a	nd	0.07±0.04a
C15:0	nd	0.03±0.02a	0.02±0.00a	nd	0.04±0.02a
C16:0	20.49±0.15a	20.00±0.31a	20.73±0.68a	24.04±3.96a	22.98±0.36a
C17:0	0.10±0.06ab	0.03±0.00b	0.14±0.03a	0.16±0.02a	0.16±0.01a
C18:0	2.73±1.04a	1.79±0.10a	2.82±1.77a	2.02±0.57a	2.18±0.06a
C20:0	0.40±0.00b	0.38±0.00b	0.36±0.03b	0.29±0.12b	0.99±0.03a
C15:1	nd	0.03±0.02a	0.04±0.03a	nd	0.06±0.01a
C16:1	0.14±0.01b	0.14±0.00b	0.16±0.02b	2.89±0.59a	3.12±0.09a
C17:1	0.28±0.00b	0.22±0.00b	0.23±0.03b	0.26±0.03b	0.46±0.04a
C18:1 ω -9 <i>c+t</i>	45.68±0.56a	47.08±0.18a	45.77±2.38a	43.58±4.36a	47.43±0.67a
C20:1 ω -9 <i>cis</i>	0.24±0.02a	0.22±0.01a	0.20±0.04a	0.22±0.08a	0.65±0.40a
C24:1 ω -9 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd	nd
C18:2 ω -6 <i>c+t</i>	22.19±0.25ab	22.63±0.08a	22.00±0.10ab	20.07±1.55b	8.91±0.05c
C18:3 ω -6 <i>cis</i>	0.04±0.00a	nd	nd	nd	0.07±0.01a
C18:3 ω -3 <i>cis</i>	0.79±0.01a	0.78±0.01a	0.77±0.01a	0.47±0.06ab	nd
C20:2 ω -6 <i>cis</i>	0.04±0.00a	nd	nd	nd	0.07±0.03a
C20:3 ω -3 <i>cis</i>	nd	0.05±0.02a	0.03±0.02a	nd	nd
AGS	23.77±0.94a	22.26±0.24a	24.10±2.42a	26.51±4.35a	27.26±0.44a
AGMI	46.34±0.54b	47.688±0.20ab	46.42±2.30ab	46.95±3.80ab	51.72±0.24a
AGPI	23.04±0.26a	23.46±0.07a	22.80±1.00ab	20.54±1.59b	9.33±0.32c
Σ ω -3 AGPI	0.79±0.01a	0.83±0.02a	0.79±0.02a	0.47±0.06ab	0.27±0.37b
Σ ω -6 AGPI	22.25±0.26ab	22.63±0.08a	22.00±0.997ab	20.07±1.55b	9.05±0.08c
Ratio ω -6/ ω -3	28.16±0.52 ^b	27.21±0.79 ^b	27.73±1.16 ^b	42.58±3.71 ^b	164.6±64.4 ^a

Annexe

Acides gras LAR	25 °C	175 °C	275 °C	350 °C	450 °C
C4:0	nd	0.12±0.07 ^a	nd	nd	nd
C6:0	nd	0.09±0.04 ^a	0.01± 0.00 ^a	0.01± 0.00 ^a	nd
C8:0	nd	0.10±0.04 ^a	0.02± 0.00 ^b	0.03± 0.00 ^b	0.11±0.04 ^a
C10:0	nd	0.10±0.03 ^b	0.01± 0.00 ^b	0.01± 0.00 ^b	0.44±0.07 ^a
C11:0	nd	0.11 ± 0.01 ^a	nd	0.02± 0.01 ^b	0.04±0.03 ^b
C12:0	nd	0.11± 0.00 ^a	0.02± 0.00 ^b	0.03± 0.01 ^b	0.05±0.04 ^{ab}
C13:0	nd	nd	0.01± 0.00 ^b	0.01± 0.00 ^b	0.03± 0.00 ^a
C14:0	0.05± 0.01 ^{ab}	0.10±0.04 ^a	0.03± 0.00 ^b	0.03± 0.00 ^b	0.05± 0.00 ^{ab}
C15:0	nd	0.11±0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.02± 0.00 ^b	0.02± 0.01 ^b
C16:0	14.52±0.34 ^b	17.43±1.16 ^a	14.93±0.06 ^b	14.21±0.68 ^b	15.80±0.10 ^{ab}
C17:0	0.07 ± 0.02 ^{ab}	0.23±0.15 ^a	0.07± 0.01 ^b	0.06± 0.00 ^b	0.08±0.02 ^{ab}
C18:0	2.13±0.07 ^a	2.01±0.16 ^a	2.73±0.94 ^a	2.47 ±0.33 ^a	2.49±0.23 ^a
C20:0	0.36± 0.01 ^a	0.31±0.11 ^a	0.35± 0.01 ^a	0.35±0.02 ^a	nd
C22:0	nd	nd	nd	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
C14:1	nd	nd	nd	0.01± 0.00 ^b	0.02± 0.00 ^a
C15:1	nd	nd	0.01± 0.00 ^b	nd	0.04±0.02 ^b
C16:1	0.77 ±0.02 ^b	1.07±0.04 ^a	0.11 ± 0.00 ^c	0.12 ± 0.00 ^c	0.13± 0.01 ^c
C17:1	0.09± 0.01 ^b	0.21 ±0.07 ^a	0.10± 0.01 ^b	0.09± 0.00 ^b	0.27±0.02 ^a
C18:1 ω-9 <i>c+t</i>	52.49±1.02 ^a	45.30±1.95 ^b	52.72±0.95 ^a	53.77±0.33 ^a	53.98±0.90 ^a
C20:1 ω-9 <i>cis</i>	0.33±0.05 ^a	0.30 ±0.10 ^a	0.35±0.02 ^a	0.13±0.01 ^b	0.32±0.02 ^a
C24:1 ω-9 <i>cis</i>	nd	0.10±0.03 ^a	nd	nd	0.03±0.01 ^a
C18:2 ω-6 <i>c+t</i>	25.76±0.11 ^a	22.94±0.86 ^c	25.36±0.50 ^{ab}	24.45±0.19 ^b	11.38±0.16 ^d
C18:3 ω-6 <i>cis</i>	0.18±0.14 ^a	0.52±0.68 ^a	0.02± 0.00 ^a	0.31±0.04 ^a	nd
C18:3 ω-3 <i>cis</i>	1.18±0.01 ^a	1.14±0.06 ^a	1.12±0.01 ^a	0.78± 0.00 ^b	0.32±0.07 ^c
C20:2 ω-6 <i>cis</i>	nd	0.08±0.05 ^a	0.03± 0.01 ^a	nd	0.09±0.07 ^a
C20:3 ω-3 <i>cis</i>	nd	nd	0.02± 0.00 ^a	nd	nd
C20:4 ω-6 <i>cis</i>	nd	nd	0.01± 0.00 ^a	nd	0.05±0.04 ^a
C22:6 ω-3 <i>cis</i>	nd	0.08±0.0311 ^a	0.02± 0.00 ^b	0.02± 0.00 ^b	0.02± 0.00 ^b
AGS	17.11±0.31 ^c	20.56±1.27 ^a	18.20±0.98 ^{bc}	17.25±0.50 ^c	19.77±0.26 ^{ab}
AGMI	53.68±0.99 ^a	47.05±2.12 ^b	53.30±0.98 ^a	54.13±0.33 ^a	54.79±0.90 ^a
AGPI	27.14±0.03 ^a	24.71±0.80 ^b	26.58±0.52 ^a	25.56±0.20 ^{ab}	12.42±1.08 ^c
Σ ω-3 AGPI	1.18±0.01 ^a	1.19±0.05 ^a	1.16±0.02 ^a	0.79±0.00 ^b	0.36±0.09 ^c
Σ ω-6 AGPI	25.95±0.02 ^a	23.52±0.79 ^b	25.42±0.50 ^a	24.764±0.21 ^{ab}	12.06±1.01 ^c
Ratio ω-6/ ω-3	21.90±0.11 ^b	19.77±0.84 ^b	21.96±0.02 ^b	31.27±0.37 ^a	34.49±7.23 ^a

Annexe

Acides gras NEB	25 °C	175 °C	275 °C	350 °C	450 °C
C4:0	nd	nd	0.01±0.00a	0.02±0.01a	nd
C6:0	nd	0.02±0.00b	0.01±0.00b	0.02±0.01b	0.06±0.01a
C8:0	nd	0.03±0.00b	0.02±0.00b	0.03±0.00b	0.1±0.03a
C10:0	nd	0.03±0.00b	0.01±0.00b	nd	0.2574±0.04a
C11:0	nd	nd	0.01±0.00b	nd	0.08±0.01a
C12:0	nd	0.03±0.01a	0.01±0.00a	0.02±0.01a	nd
C13:0	nd	0.03±0.01a	0.02±0.00a	nd	nd
C14:0	0.09±0.02a	0.07±0.01a	0.06±0.00a	0.06±0.01a	0.09±0.04a
C15:0	nd	0.04±0.01a	0.03±0.01a	0.03±0.00a	nd
C16:0	14.45±0.54ab	13.25±0.31b	13.70±0.16b	13.45±0.43b	15.60±1.16a
C17:0	0.47±0.01a	0.47±0.04a	0.44±0.00a	0.44±0.01a	0.50 ±0.03a
C18:0	3.69±0.35a	3.31±0.12a	3.33±0.08a	3.54±0.36a	3.46±0.25a
C20:0	0.61±0.02ab	0.63±0.03a	0.62±0.03ab	0.62±0.00ab	0.52±0.07b
C22:0	nd	nd	0.02±0.01	nd	nd
C14:1	nd	0.03±0.00a	nd	0.02±0.01b	nd
C15:1	nd	0.02±0.00b	0.01±0.00c	0.01±0.00c	0.06±0.00a
C16:1	0.87±0.03b	0.82±0.01b	0.20±0.01c	0.20±0.01c	1.14±0.12a
C17:1	0.62±0.05a	0.55±0.03ab	0.53±0.01b	0.54±0.00b	0.62±0.01a
C18:1 ω-9 c+t	56.33±1.49a	57.28±0.56a	58.39±0.25a	58.41±0.92a	57.15±1.68a
C20:1 ω-9 cis	0.42±0.05a	0.44±0.02a	0.42±0.01a	0.45±0.03a	0.36±0.05a
C24:1 ω-9 cis	nd	0.03±0.00a	0.01±0.00a	0.03±0.02a	nd
C18:2 ω-6 c+t	18.89±0.22a	18.54±0.20a	18.85±0.10a	18.38±0.40a	12.50±0.25b
C18:3 ω-6 cis	0.16±0.02a	0.14±0.00a	0.04±0.02a	nd	0.09±0.03a
C18:3 ω-3 cis	1.23±0.02a	1.46±0.35a	1.17±0.00a	0.04±0.01b	0.16±0.05b
C20:2 ω-6 cis	nd	0.03±0.02ab	0.01±0.00b	0.02±0.01b	0.06±0.00a
C20:3 ω-3 cis	nd	nd	0.04±0.00a	0.04±0.00a	nd
C20:4 ω-6 cis	nd	nd	nd	nd	nd
C22:6 ω-3 cis	nd	0.02±0.00a	0.02±0.00a	nd	nd
AGS	19.32±0.71ab	17.87±0.36b	18.28±0.17b	18.24±0.32b	20.66±0.92a
AGMI	58.23±1.41a	59.17±0.59a	59.57±0.23a	59.64±0.92a	59.31±1.63a
AGPI	20.23±0.20a	20.18±0.15a	20.13±0.09a	18.72±0.08b	12.79±0.21c
Σ ω-3 AGPI	1.23±0.02a	1.48±0.36a	1.23±0.00a	0.10±0.01b	0.16±0.05b
Σ ω-6 AGPI	18.99±0.22a	18.71±0.23a	18.90±0.09a	18.62±0.09a	12.63±0.23b
Ratio ω-6/ ω-3	15.43±0.46 ^c	14.82±0.28 ^c	15.42±0.14 ^c	171.6± 14.9 ^b	66.9±0.59 ^b

Annexe

Acides gras SIG	25 °C	175 °C	275 °C	350 °C	450 °C
C8:0	nd	nd	nd	nd	0.11±0.03a
C10:0	nd	nd	nd	nd	0.30±0.06
C14:0	nd	0.03±0.02a	0.03±0.01a	nd	0.08± 0.00a
C15:0	0.05± 0.00a	0.03± 0.02a	nd	nd	nd
C16:0	16.40±0.15b	16.37±0.20ab	16.33±0.29b	16.80±0.29ab	18.50±1.29a
C17:0	0.06±0.01ab	0.07±0.02ab	0.05±0.00b	0.10±0.02a	0.07±0.00ab
C18:0	4.56± 0.15a	4.27± 0.04a	4.74± 0.56a	4.40± 0.10a	4.72± 0.28a
C20:0	0.43±0.01b	0.03±0.02c	0.40±0.01b	0.40± 0.07b	0.63±0.06a
C15:1	nd	nd	nd	nd	nd
C16:1	0.09±0.00b	0.09±0.00b	0.10±0.01b	0.10±0.01b	2.66±0.16a
C17:1	0.11±0.02a	0.13±0.03a	0.11±0.013a	0.17±0.06a	0.19±0.03a
C18:1 ω-9 c+t	60.61±0.46a	61.53±2.04a	61.11±2.29a	59.59±0.17a	60.32±0.88a
C20:1 ω-9 cis	0.19±0.03a	0.20±0.01a	0.21±0.01a	0.19±0.02a	0.34±0.12a
C18:2 ω-6 c+t	11.03±0.04a	10.91±0.06ab	10.85±0.21ab	10.51±0.13b	6.24±0.03c
C18:3 ω-6 cis	nd	nd	nd	0.08±0.00a	nd
C18:3 ω-3 cis	0.85± 0.02a	0.82±0.02a	0.81±0.02a	0.73±0.00b	0.07±0.01c
C20:3 ω-3 cis	nd	0.04±0.02	nd	nd	nd
C20:4 ω-6 cis	nd	nd	nd	nd	nd
AGS	21.49±0.16b	20.81±0.08b	21.55±0.29b	21.69±0.34b	24.38±1.03a
AGMI	61±0.50a	62±2.00a	61.52±2.29a	60.04±0.15a	63.51±0.85a
AGPI	12.05±0.13ab	12.87±0.01a	12.20±0.62ab	11.32±0.13b	6.31±0.02c
∑ ω-3 AGPI	0.85±0.02a	0.87±0.05a	0.81±0.02a	0.73±0.00b	0.07±0.01c
∑ ω-6 AGPI	11.20±0.13ab	12.00±0.04a	11.38±0.62ab	10.59±0.13b	6.24±0.03c
Ratio ω-6/ ω-3	13.17±0.30b	13.86±0.80b	13.99±0.73b	14.48±0.12b	88.16±10.31a

Annexe

Annexe.5. Évolution des compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidiques des échantillons LAR et MAN extraits par ESAU ou EPM. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$). (n=3).

Acides gras	LAR-S	LAR-P	MAN-S	MAN-P
C4:0	nd	nd	nd	nd
C6:0	0.09±0.01	nd	0.15±0.00	nd
C8:0	nd	nd	0.10100±0.01	nd
C10:0	nd	nd	0.09±0.01	nd
C11:0	nd	nd	0.10±0.04	nd
C12:0	nd	nd	nd	nd
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	0.09±0.02a	0.05± 0.01a	nd	0.04±0.01
C15:0	0.09±0.00	nd	nd	nd
C16:0	17.10±0.26a	14.52±0.34b	21.53± 2.47a	20.49±0.15a
C17:0	0.11±0.00a	0.07 ± 0.02a	0.18±0.07a	0.10±0.06a
C18:0	1.80±0.04b	2.13±0.07a	1.64±0.16a	2.73±1.04a
C20:0	0.33±0.04a	0.36± 0.01a	0.41±0.05a	0.40±0.00a
C22:0	nd	nd	nd	nd
C14:1	nd	nd	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:1	0.94±0.08a	0.77 ±0.02b	2.67±0.37a	0.14±0.01b
C17:1	0.11±0.02a	0.09± 0.01a	0.30±0.01a	0.28±0.00a
C18:1 ω-9 <i>c+t</i>	50.25±0.95a	52.49±1.02a	43.50±0.99b	45.67±0.56a
C20:1 ω-9 <i>cis</i>	0.28±0.10a	0.33±0.05a	0.24±0.06a	0.24±0.02a
C24:1 ω-9 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C18:2 ω-6 <i>c+t</i>	23.94±0.35b	25.76±0.11a	21.94±0.37a	22.19±0.25a
C18:3 ω-6 <i>cis</i>	nd	nd	nd	0.04±0.00
C18:3 ω-3 <i>cis</i>	1.20±0.03a	1.18±0.01a	0.85±0.10a	0.79±0.01a
C20:2 ω-6 <i>cis</i>	nd	nd	nd	0.04±0.00
C20:3 ω-3 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C20:4 ω-6 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
C22:6 ω-3 <i>cis</i>	nd	nd	nd	nd
AGS	19.49±0.20a	17.11±0.31b	24.20±2.33a	23.77±0.94a
AGMI	51.59±0.96a	53.68±0.99a	46.705±0.617a	46.34±0.54a
AGPI	25.14±0.33b	27.14±0.03a	22.783±0.416a	23.04±0.26a
Σ ω-3 AGPI	1.20±0.03a	1.18±0.01a	0.8479±0.1040a	0.79±0.01a
Σ ω-6 AGPI	23.94±0.35b	25.95±0.02a	21.935±0.373a	22.25±0.26a
Ratio ω-6/ ω-3	19.94±0.67b	21.90±0.11a	26.12±3.18a	28.16±0.52a

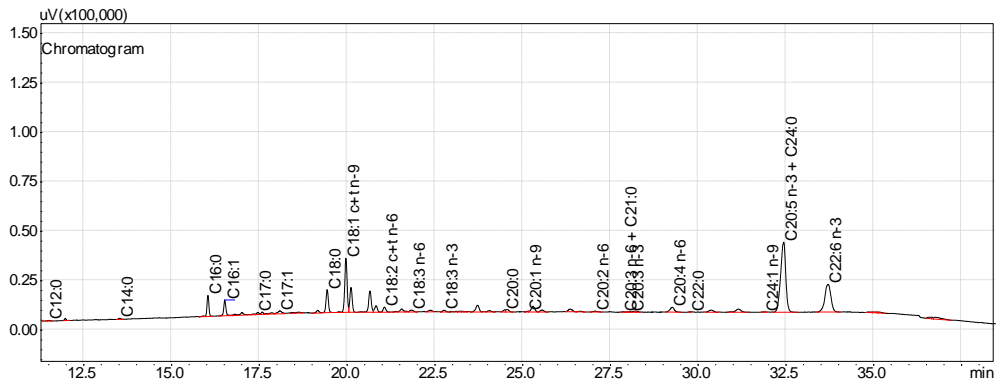
Annexe

Annexe.6. Évolution des compositions en acides gras (g/100g de lipides totaux) des fractions lipidiques des échantillons NEB et SIG extraits par ESAU ou EPM. Pour chaque ligne, des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$). (n=3).

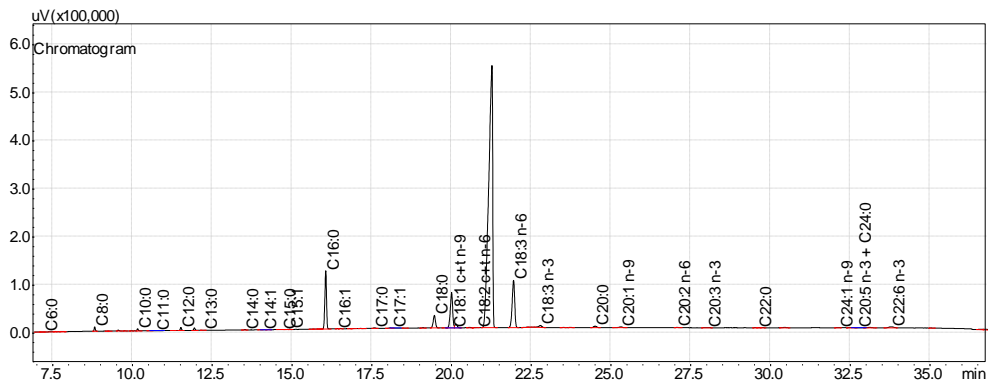
Acides gras	NEB-S	NEB-P	SIG-S	SIG-P
C4:0	nd	nd	nd	nd
C6:0	0.09±0.03	nd	nd	nd
C8:0	0.10±0.04	nd	nd	nd
C10:0	0.10±0.05	nd	0.10±0.01	nd
C11:0	0.13±0.05	nd	0.08±0.03	nd
C12:0	0.09±0.04	nd	nd	nd
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	0.10±0.05a	0.09±0.02a	nd	nd
C15:0	nd	nd	0.13±0.04a	0.05± 0.00b
C16:0	13.41±0.38a	14.45±0.54a	17.77±2.06a	16.40±0.15a
C17:0	0.58±0.11a	0.47±0.01a	0.10±0.064a	0.06±0.01a
C18:0	3.15±0.00a	3.69±0.35a	4.16±0.31a	4.56± 0.15a
C20:0	0.71±0.11a	0.61±0.02a	0.39±0.04a	0.43±0.01a
C22:0	nd	nd	0.06±0.00	nd
C14:1	nd	nd	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:1	0.90±0.10a	0.87±0.03a	2.43±0.31a	0.09±0.00b
C17:1	0.69±0.12a	0.62± 0.05a	0.14±0.07a	0.11±0.02a
C18:1 ω-9 c+t	54.46±3.34a	56.33±1.49a	57.57±2.58a	60.61±0.46a
C20:1 ω-9 cis	0.44±0.05a	0.42±0.05a	0.21±0.03a	0.19±0.03a
C24:1 ω-9 cis	0.08±0.03	nd	0.08±0.03	nd
C18:2 ω-6 c+t	18.55±0.93a	18.89±0.22a	10.39±0.36b	11.03±0.04a
C18:3 ω-6 cis	0.15±0.01a	0.16±0.02a	0.35±0.12a	nd
C18:3 ω-3 cis	1.26±0.07a	1.23±0.02a	0.84±0.06a	0.85± 0.02a
C20:2 ω-6 cis	nd	nd	nd	nd
C20:3 ω-3 cis	nd	nd	nd	nd
C20:4 ω-6 cis	nd	nd	nd	nd
C22:6 ω-3 cis	0.09±0.05	nd	0.08±0.03	nd
AGS	18.32±0.67a	19.32±0.71a	22.71± 1.84a	21.49±0.16a
AGMI	56.54±3.15a	58.23± 1.41a	60.40± 2.27a	61±0.50a
AGPI	20.03±0.92a	20.23±0.20a	11.54±0.25b	12.05±0.13a
Σ ω-3 AGPI	1.32±0.02a	1.23±0.02b	0.92±0.04a	0.85±0.02b
Σ ω-6 AGPI	18.70±0.92a	18.99±0.22a	10.63±0.21b	11.20±0.13a
Ratio ω-6/ ω-3	14.16±0.70a	15.43±0.46a	11.58±0.29b	13.17±0.30a

Annexe.7. Chromatogrammes de CPG de l'huile à base d'acides gras d'oméga-3 et-6

(A) : Oméga-3, (B) : Oméga-6



(A)



(B)