UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

N° d'ordre
N° de série

FACULTE DES SCIENCES ET SCIENCES DE L'INGENIEUR

Département de Génie des Procédés

Mémoire
Présenté pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Chimie

Option : Chimie organique physico-chimie et moléculaire

Par : HAMIA Chahrazed

Thème

Contribution à la composition et à l'étude chimique de l'huile du fruit de l'Arganier "Argania spinosa"

Soutenu publiquement le : 03 /07/2007
Devant le jury composé de :

Mr	**T. LANEZ**	**Professeur**	**Université de Ouargla**	**Président**
Mr	**B. NADJEMI**	**Professeur**	**E.N.S kouba- Alger**	**Examinateur**
Mr	**M. SAIDI**	**Professeur**	**Université de Ouargla**	**Examinateur**
Mr	**M. YOUSFI**	**Maitre de conférences**	**Université de Laghouat**	**Rapporteur**

Juin 2007

A mes parents et mes beaux parents que Dieu les garde

A mon époux et ma petite fille

A mes sœurs et mon petit frère

Remerciements

Ce travail a été entrepris au sein du laboratoire des Sciences fondamentales à l'Université de Laghouat grâce à Monsieur D. BENBARTAL directeur de ce laboratoire pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire et disponible pour mener à bien ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à mon promoteur, Monsieur M. YOUSFI pour l'aide qu'il m'a apportée et pour l'intérêt constant qu'il n'a cessé d'accorder pour l'orientation de ce travail.

Je remercie doublement Monsieur T. LANEZ qui m'a honoré en acceptant la présidence du jury de mon présent mémoire.

J'adresse mes vifs remerciements à monsieur B. NADJEMI d'avoir pu se déplacer d'Alger à Ouargla et d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur.

Que monsieur M. SAIDI reçoit mes remerciements chaleureux pour avoir accepté d'examiner ce présent travail.

Je ne peux bien sur oublier tous mes enseignants de post-graduation auxquels je suis reconnaissante de m'avoir donné toutes les connaissances qui m'ont enseignées.

Mes remerciements vont aussi à tous mes amis et mes collègues du laboratoire qui m'ont continuellement soutenu durant mon travail.

J'aimerai enfin exprimer mon éternelle reconnaissance à mes parents, mon époux et à mes soeurs, tout en leur exprimant mon affection particulière, pour m'avoir constamment soutenu durant mes études et notamment dans les moments difficiles.

Liste des notations

A:	Absorbance
AFNOR:	Association Française de NORmalisation
AGE:	Acides gras essentiels
AGI:	Acides gras insaturés
AGS:	Acides gras saturés
LDL :	Lipoprotéine à basse densité
APGI:	Acides Gras PolyInsaturés
BHA:	Butylhydroxyanisole
BHT:	Butylhydroxytoluène
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
DPPH:	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DHHDP:	déhydro-hexa-hydroxydi-phenilyde
AAO :	Activité Antioxydante
SOD :	Les superoxydes dismutases
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
EMAG	Esters méthyliques d'acides gras
TMSH	Triméthyl hydroxysulfonium
FID	Détecteur à ionisation de flamme
I.A:	Indice d'acide
I.I:	Indice d'iode
I.S:	Indice de saponification
I.R:	Indice de réfraction
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
RMN^{13}C:	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone
RMN^{1}H:	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
UV:	Ultra violet

Liste des figures

Chapitre –I - Généralité sur l'Arganier

Figure I.1: L'Arganier 3

Figure I.2: L'Arganier dans l'Atlas 4

Figure I.3: Fruit de l'Arganier 5

Figure I.4: La graine de l'Arganier 6

Chapitre –II - Etude de la fraction saponifiable

Figure II.1: Chromatogrammes des EMAG 22
-a- des acides gras libres -b- de l'huile brute du fruit de l'Arganier

Figure II.2: Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff 28

Figure II.3: Différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG 29

Figure II.4: Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses végétales 29

Figure II.5 : Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses animales 22

Figure II.6: Action de la lipase pancréatique sur les triglycérides 31

Figure II.7 : Différent isomères de position d'un TAG ABC 33

Figure II.8 : Chromatogramme des monoglycérides 35

Figure II.9 : Les principaux triglycérides contenus dans l'huile 36

Figure II.10: Composition glycéridique pour la distribution positionnelle (GUNSTONE) 37

*Chapitre –**III**- Analyse de certains composés mineurs*

Figure.III.1: Structure des différents tocophérols et tocotriénols 42

Figure.III.2: Courbe d'étalonnage de la vitamine E 44

Figure.III.3: Courbes d'étalonnages externes 45

Figure.III.4: Chromatogramme CLHP de la fraction tocophérolique de l'huile de l'Arganier 46

Figure.III.5: Chromatogramme CLHP des tocophérols étalons 46

Figure.III.6: Structure du cyclopentanperhydrophénanthrène 48

Figure.III.7 : Courbe d'étalonnage du Cholestérol 49

Figure.III.8: Le glycérophospholipide dérivé de l'ester de l'acide phosphorique 51

Figure.III.9: Les glycérophospholipides 51

Figure.III.10: Les phosphatidyléthanolaines 52

Figure.III.11: Les phosphatidyl**s**érine 53

Figure.III.12: Les lécithines 53

Figure.III.13: Myoinositol 54

Figure.III.14: Phosphatidylinositol 54

Figure.III.15: Les sphingolipides 55

Figure III.16: Monogalactosyl diglycéride 56

Figure III.17: Digalactosyl diglycéride 56

Figure III.18: Cérébroside 56

Figure III.19: Courbe d'étalonnage du phosphore 58

Figure III.20: Chromatogramme des lipides neutres 59

Figure III.21: Chromatogramme des glycolipides 60

Figure III.22: Chromatogramme des phospholipides 61

Figure III.23: Chromatogramme de l'huile brute 61

Chapitre –IV- Activité antioxydante de l'huile de l'Arganier

Figure IV.1: Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique vis-à-vis d'un radical acide gras 65

Figure IV.2: Action pro-oxydante des métaux 66

Figure IV.3: Quelques antioxydants de synthèse 67

Figure IV.4: Les dérivés de l'Acide p-hydroxybenzoique 69

Figure IV.5: Les acides hydroxycinnamiques 69

Figure IV.6: Structures chimiques de quelques stilbènes 70

Figure IV.7: Structure de base des flavonoides: la phénil-2 benzopyrone 70

Figure IV.8: Structures des différentes classes des flavonoides 72

Figure IV.9: Structure de base des anthocyanes 73

Figure IV.10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 76

Figure IV.11: Chromatogramme montrant la détection: a- 280nm, b- 340nm 77

Figure IV.12: Courbe représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH 79

Figure IV.13: Réduction du radical libre DPPH· 79

Figure IV.14: Courbe de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration pour différents extraits phénoliques et de l'huile d'olive: a- hexanique b- chloroforme/MeOH c- extrait phénolique huile c- huile d'olive 81

Liste des tableaux

Tableau.II.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'Arganier 15

Tableau.II.2 : Caractéristiques physico-chimiques pour quelques corps gras végétaux 16

Tableau.II.3: Comparaison des indices physico-chimiques 16

Tableau.II.4: Comparaison relative en acides gras de l'huile de fruit de l'Arganier 23

Tableau.II.5: Composition en acides gras de quelques espèces de *S*apotaseae 24

Tableau.II.6: Principaux acides gras en position Sn-2 des TAG 32

Tableau.II.7: Taux des différents AG dans les positions Sn-2 et Sn-1+3 34

Tableau.II.8.a: Composition triglycériques de l'huile de l'Arganier selon Coleman 38

Tableau.II.8.b: Les triglycérides de l'huile de l'Arganier 39

Tableau.II.9: Les quatre catégories des triglycérides 36

Tableau.III.1: Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales 40

Tableau.III.2: Quantité des tocophérols dans l'huile de l'Arganier 44

Tableau.III.3: Composition de la fraction tocophérolique de l'huile de l'arganier 47

Tableau.III.4: Quantité des stérols dans les huiles 50

Tableau.III.5: Le pourcentage des classes lipidiques et la composition en acides gras des lipides 62

Tableau.IV.1: Activités biologiques des composés phénoliques 75

Tableau.IV.2: Différentes classes des composés phénoliques de l'huile de l'Arganier 78

Tableau.IV.3: Résultat du test DPPH (mg/ml) 80

Sommaire

Introduction générale 1

Chapitre –I- Généralités sur l'arganier

I.1. Aspect historique 3
I.2. Répartition géographique 4
I.3. Botanique de l'arganier 5
I.3.1. Son aspect général 5
I.3.2. Son fruit 5
I.3.3. Sa graine 6
II. ARGANIER: Arbre à usage multiple 6
II.1. Utilisation de l'arganier 6
II.2. Utilisation comme fourrage 7
II.3. Utilisation de l'huile 7
II.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle 8
II.3.2. D'autre utilisation de l'huile de l'arganier 8
III. Les rôles de l'arganier 9
III.1. Rôle environnemental 9
III.2. Rôle socio-économique

Chapitre –II- Etude de la fraction saponifiable

I. Travaux antérieurs 10
I.1. Extraction de l'huile d'amande d'arganirer 11
II. Procédés d'extractions 11
II.1.Extraction à la manière traditionnelle 11
II.2. Extraction à l'hexane 12
III. Caractéristiques physico-chimiques 12
III.1. Indice d'acidité 12
III.2. Indice de saponification 13
III.3. Indice d'iode 14
IV. Analyse des acides gras 17
IV.1. Les acides gras 17
IV.1.1. Donnés générales 17
IV.1.2. Analyse des acides gras 18
IV.1.2.1. Préparation des esters méthyliques 19
IV.2. Résultats 21
V. Etude des triglycérides 25
V.1.Introduction 25
V.2. Méthodes d'analyse des triglycérides 26
V.2.1. Les acides gras des triglycérides 30
V.2.2. Analyse des acides gras en position 2 31
V.2.2.2. Isolement des mono glycérides en position -2 par CCM 32
V.2.2.3. Détermination des acides gras en position Sn-2 33

Chapitre –III- Analyse de certains composés mineurs

I. La fraction insaponifiable 40
I.1. Introduction 40
I.2. Etude des tocophérols 42
I.2.1. Introduction 42
I.2.2. Dosage quantitatif des tocophérols 43
I.2.2.1. Dosage des tocophérols totaux 43
I.2.2.2. composition de la fraction tocophérolique 45
I.3. Etude des stérols 48
I.3.1. Description générale des stérols **48**
I.3.2. Dosage des stérols 49
I.3.3. Résultats 50
II. Etude Des acides gras des lipides polaires 50
II.1. Les phospholipides 50
II.2.1. Les glycérophospholipides 51
II.2.2. Les sphingolipides 55
II.2. Les glycolipides 55
II.3. Acides gras des lipides polaires de l'huile de l'arganier 57
II.3.1. Extraction 57
II.3.2. Quantification des phospholipides 57
II.3.3. Fractionnement des classes des lipides de l'huile de l'arganier 58
II.3.4. Préparation d'esters méthyliques d'acides gras de l'huile brute et des différentes classes de lipides 59

Chapitre -IV- Activité antioxydante de l'huile de l'arganier

I. Activité antioxydante 63
II. Rôle des antioxydants 64
II.1. Définition d'un antioxydant **64**
II.2. Mécanisme d'action des antioxydants **64**
III. Principaux antioxydants **66**
III.1. Les antioxydants synthétiques 66
III.2. Les antioxydants naturels 67
III.2.1. La vitamines E 67
III.2.2. L'acide ascorbique 68
III.2.3. Les composés phénoliques 68
III.2.3.1. Les composés non flavonoides 68
III.2.3.2. Les composés flavonoïdes 70
III.3. Action et intérêt des polyphénols 73
III.4. Les principales méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante 74

IV. Extraction des composés phénoliques 75
IV.1. Quantification des composés phénoliques 75
IV.1.1. Dosage des phénols totaux 76
IV.2. Analyse des phénols de l'huile de l'arganier 77
V. Technique d'analyse du pouvoir antioxydant 79
V.1. Application du test chimique (Test du DPPH$^{\bullet}$) 79
V.2. Résultats 80
Conclusion finale 82
Références bibliographiques 84
Annexe 92

Introduction générale

Ce travail est une contribution à l'étude chimique d'un certain nombre de constituants de l'huile, extraite des graines de l'arganier, arbre, dont le nom latin est "Argania spinosa" (L), et le nom vernaculaire argan.

L'arganier est l'espèce végétale la plus caractéristique du Maroc ; c'est le seul représentant marocain de la famille tropicale des *Sapotaceaes*

La richesse principale de l'arganier est son fruit qui est composé d'une pulpe charnue destinée essentiellement à l'alimentation du bétail, et d'un noyau très dur renfermant la graine oléagineuse.

Parmi les raisons qui nous ont incitées à entreprendre cette étude, il faut citer le triple intérêt que revêt l'arganier :

- Au point de vu écologique, il peut servir au reboisement des zones arides, dans les zones que gagne la désertification ; sa présence le long de l'OUED ELMA (près de la ville de Tindouf) dans le Sahara est un exemple à suivre.

- Au point de vue économique, la graine oléagineuse et sa pulpe servent à l'alimentation du bétail et à la production de l'huile d'argan. Extrêmement dur, le bois de l'arganier est fort apprécié comme matériau de charpente et pour la fabrication de toutes sortes d'outils agricoles. Parce qu'il est dense et se consume lentement, il est massivement utilisé en tant que combustible, sous forme de charbon. ***(DE Ponteves. E et al., 1990).***

- Un certain nombre de produits provenant de cette famille ont des propriétés plus au moins curatives dans la médecine traditionnelle ; ceci nous a incité à chercher la présence d'éventuelles molécules bioactives et d'étudier l'activité antioxydante de l'huile et ses constituants.

Si l'étude de l'arganier marocain a déjà fait l'objet de nombreuses études sur la composition de l'huile en acides gras, triglycérides, stérols, tocophérols et composés phénoliques et leurs activités biologiques ***(Charrouf. M,1984, Charrouf. Z, 1995, Radi. N, 2003, Charrouf. Z et al., 2007, Berrougui. H, 2006 et Rezanka. T, 1999)***, aucun travail n'a été consacré à la valorisation de l'arganier algérien.

Il nous a paru donc intéressant, d'une part, de confirmer puis d'approfondir ces observations et de les comparer, et d'autre part d'étendre cette étude aux autres constituants de l'huile comme les

acides gras des lipides polaires, glycolipides et phospholipides de l'arganier qui, à notre connaissance n'ont pas été étudiés.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous présentons quelques données générales sur l'arbre de l'arganier citons par exemple : sa botanique, l'utilisation de ses différentes parties et les rôles qu'il occupe dans l'environnement et dans le domaine économique.

Le deuxième chapitre de ce travail sera consacré à l'étude de la fraction saponifiable de l'huile extraite de l'amande de l'arganier. Nous déterminons dans un premier temps les principales caractéristiques physico-chimiques qui caractérisent les huiles végétales alimentaires. Dans un second temps, nous étudions la composition qualitative et quantitative de l'huile en acides gras.

Nous montrerons comment par hydrolyse enzymatique des huiles et en combinant les différentes méthodes chromatographiques nous déterminerons la composition triglycéridiques, ainsi que la distribution des acides gras sur les positions internes et externes de la molécule du glycérol.

Le troisième chapitre étudie la composition de l'huile de l'arganier en composés mineurs tel que les stérols et les tocophérols, nous aborderons aussi l'étude des acides gras dans les lipides polaires à savoir les glycolipides et les phospholipides, car à notre connaissance aucune analyse chimique de ce type de composé n'a été conduite auparavant sur cette huile, même celle du Maroc.

Nous terminerons cette étude par un quatrième chapitre qui sera consacré à l'étude de l'activité antioxydante de l'huile de l'arganier et ses composés phénoliques.

Chapitre-I-
Généralités sur l'arganier

L'arganier (argania spinosa) est un arbre qui pousse depuis 80 millions d'années exclusivement dans le Sud Ouest Marocain, en zone très aride. Il est d'ailleurs le seul arbre à croître au Nord du Sahara (**Figure.I.1.**) (***Radi. N, 2003)***.

Figure.I.1. L'arganier

La famille des Sapotacées est reconnue pour donner naissance à des arbres dont la dureté et la fermeté leur ont octroyé la réputation " d'arbres de fer ".

I.1. Aspect historique

L'arganier daterait de l'ère tertiaire, à l'époque où vraisemblablement existait une connexion entre la cote marocaine et les îles canaries. Il se serait alors répandu sur une grande partie du Maroc puis, au quaternaire, l'arganier aurait été refoulé au sud-ouest par l'invasion glaciaire.

L'arbre est très anciennement connu et utilisé par l'homme. En 1219, Ibn Al Baythar, médecin égyptien, décrit dans son "Traité des simples" (traduit par Lederc en 1877) l'arbre et la technique d'extraction de l'huile.
En 1929, Battino s'intéresse à l'huile de l'arganier et d'autres produits de l'arganier notamment l'arganine isolée par Cotton et laquelle il prête une action hymolitique in vivo et in vitro (***Wagret. P, 1962)***.

En 1938, Emberger publie "Les chèvres et l'arganier" tandis qu'en 1965, Monnier, ingénieur des Eaux et Forêts montre déjà que l'exploitation abusive et le défrichement sont les deux principaux dangers qui guettent l'arganier. En 1999, l'UNESCO a ajouté cet arbre à la liste de l'héritage mondial (***Morocco Guide, 2006***).

L'arganier appartient à la famille des Sapotacées qui renferme environ 600 espèces et 40 genres. Actuellement le véritable nom de cet arbre est, d'après l'index Kewensis (1911), argania spinosa Skeels.

C'est le représentant le plus septentrional d'une famille essentiellement tropicale dont plusieurs espèces présentent un grand intérêt économique, d'ordre alimentaire ou industriel.

I.2. Répartition géographique

L'arganier est une espèce endémique du sud-ouest Marocain où il couvre une superficie de plus de 830000 ha (à peu près 21 millions d'arbres, de même des colonies isolées d'arganier se trouvent également au nord-est du Maroc du côté d'Oujda, dans les monts des Béni-Snassen, et dans le sud-ouest de l'Algérie, dans la région de OUED ELMA près de la wilaya de Tindouf (**Figure.I.2.**) (***Benarbi et Fennane, 1994***).

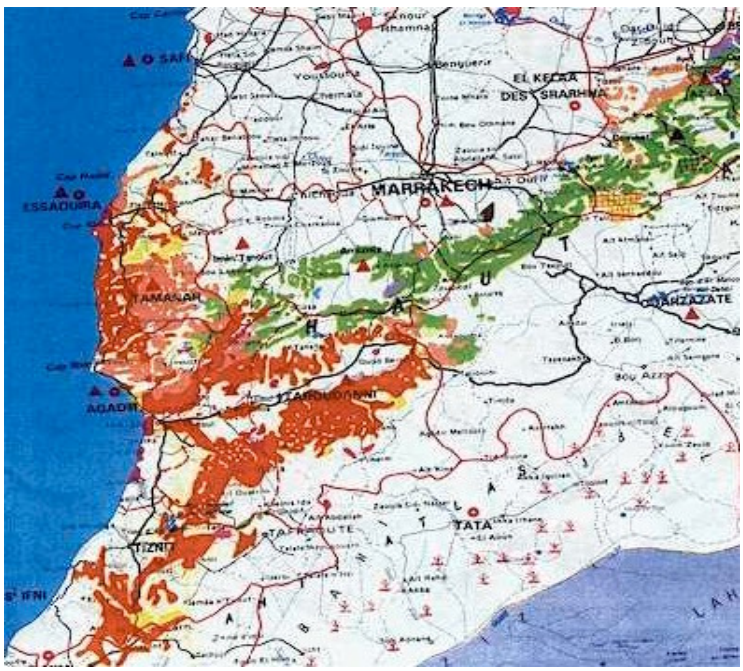


Figure.I.2. L'arganier dans l'Atlas

Les zones rouges : zones à fort peuplement en arganiers

I.3. Botanique de l’arganier

I.3.1. Son aspect général

L’arganier, curiosité floristique et botanique, est l’arbre le plus remarquable du Maroc. C’est un arbre épineux, de belle taille pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut (***Jaccard, 1926, Emberger, 1925 et Wagret, 1962***).

Le caractère polymorphe de l’arganier est très frappant : en effet, on trouve des formes extrêmement variées selon les secteurs et le stade de développement de l’arbre.

Parfois, il présente l’apparence majestueuse d’un chêne, d’autres fois son tronc noueux et ses rameaux le font ressembler à un olivier.

I.3.2. Son fruit

Le fruit de l'arganier (**Figure.I.3.**) dont l'étude morphologique a fait l'objet de nombreux travaux (***Emberger, 1925, 1960***) est une baie sessile formée d'un péricarpe charnu ou pulpe et d'un "pseudo endocarpe" ou noyau, où sont incluses les graines. Les graines sont généralement soudées et leur nombre varie de une à plusieurs par noyau.

Figure.I.3. Fruit de l’arganier

I.3.3. Sa graine

Le fruit de l'arganier renferme une graine composée, appelée vulgairement noyau. Ce dernier est très dur et renferme une ou plusieurs amandes (**Figure.I.4.**).

L'amande elliptique, oléagineuse et aplatie représente au plus le vingtième du poids du fruit (***Emberger, 1925***).

Figure.I.4. La graine de l'arganier

II. ARGANIER : Arbre à usage multiple

L'arganier est un arbre à usage multiple. Chaque partie ou production de l'arbre utilisable est une source de revenus ou de nourriture pour l'usager.
Cet arbre a des propriétés écologiques et physiologiques telles qu'il est le plus adapté aux région arides et semi-arides où il pousse. Dans ces zones, l'arganier est pratiquement irremplaçable pour la conservation des sols et des pâturages et pour la lutte contre la désertification.
Grâce à ses racines, qui peuvent atteindre plusieurs mètres de long, cet arbre très rustique participe à la fixation des sols qu'il enrichit par ailleurs en matières organiques issues de feuilles mortes.
Sous des arganiers, des chercheurs ont recensé jusqu'à cent variétés végétales, qui ne doivent leur survie qu'à son abri protecteur.

II.1. Utilisation de l'arganier

L'arganier joue un rôle très important en s'opposant à l'érosion pluviale. Il est, en effet, un excellent fixateur de sol des montagnes. De plus, il dresse un rempart contre la désertification dans les zones pré sahariennes de la plaine du Souss (***Benzyane M. et al., 1991***).

Extrêmement dur, le bois de l'arganier est fort apprécié comme matériau de charpente et pour la fabrication de toutes sortes d'outils agricoles. parce qu'il est dense et se consume lentement, il est massivement utilisé en tant que combustible, sous forme de charbon.

En effet, à partir de 1917, une crise de combustible à entraîné la destruction de milliers d'hectares d'arganier (***DE Ponteves E et al., 1990***).

Ceci aboutit à la prise en charge de l'arganeraie par l'administration des eaux et des forets en 1925. L'arganeraie fut alors placée dans le domaine privé de l'état, et seul les populations locales ont eu le privilège de pouvoir l'exploiter.

II.2. Utilisation comme fourrage

Les feuilles de l'arganier sont consommées par les camelins et les caprins. La pulpe des fruits représente également une source de nourriture pour les animaux.

Le tourteau, résidu d'extraction d'huile, est utilisé comme complément énergétique pour l'engraissement des bovins.

II.3. Utilisation de l'huile

L'huile d'argan est une huile d'excellente valeur alimentaire. Elle est très appréciée par les populations du sud-ouest marocain qui aiment son goût très fruité et l'utilisent pour la préparation de leurs plats traditionnels. Elle est utilisée soit fraîche soit cuite mais jamais dans les fritures.

L'huile de fruits de l'arganier est extraite de l'amande. Elle est non seulement comestible et d'un goût agréable, mais elle possède des propriétés diététiques très intéressantes, car elle est constituée à 80% d'acides gras insaturés (***Radi. N, 2003)***.

Dans la pharmacopée traditionnelle, l'huile de l'arganier et divers produits dérivés de l'arbre ont été de tout temps utilisés pour leurs propriétés réelles ou supposées.

De fait, plusieurs composés biochimiques tirés de fruits de l'arganier, possèdent des propriétés biologiques qui peuvent justifier leur utilisation en pharmacie et en cosmétologie.
Actuellement la production totale de l'huile de l'arganier varie de 3000 à 4000 tonnes et représente donc au maximum 1.6% de la consommation marocaine en huile alimentaire (***Rahmani, 1979***).

II.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Depuis l'antiquité, l'huile d'argan a suscité l'intérêt des médecins égyptiens célèbres qui lui ont alors reconnu un certain nombre de propriétés très intéressantes.
Voici quelques utilisations actuelles à cette huile (***Radi. N, 2003)***.

- **Utilisation en dermatologie**

L'huile d'argan est préconisée dans le traitement de l'acné juvénile, l'eczéma et pour soulager les manifestations cutanées de la rougeole et la varicelle.
L'huile d'argan est également utilisée dans le traitement des teignes humaines et même animales.
Elle est aussi préconisée dans le nettoyage et la désinfection des blessures.

- **Traitement des maladies ORL**

L'huile d'argan est utilisée dans les maux d'oreilles.

- **Infection des voix respiratoires**

Surtout chez les enfants présentant des symptômes d'infection respiratoire.

- **Spasmes intestinaux**

L'huile d'argan est préconisée pour soulager les coliques des petits enfants.

- **L'asthénie**

L'huile d'argan est conseillée pour ses propriétés fortifiantes dans l'asthénie, car il est reconnu qu'elle donne à l'organisme une grande vigueur.

- **Rhumatismes**

L'huile d'argan est proposée dans le traitement et le soulagement des douleurs rhumatismales.
Il est conseillé, pour cela, de la prendre le matin au petit déjeuner et ceci en trempant du pain dans l'huile pure.

II.3.2. D'autres utilisations de l'huile de l'arganier

Le rapport du pourcentage des acides gras polyinsaturés sur celui des acides gras saturés, fait que cette huile est recommandée par les nutritionnistes.

De type oléique-linoléique, l'huile d'argan renferme 80% d'acides gras insaturés comme l'huile d'olive. Néanmoins, elle possède une nette supériorité sur celle-ci à cause de sa richesse en acides gras essentiels (acide linoléique 34%).

Au moment ou l'acide oléique se caractérise par une efficacité sur l'induction d'une augmentation significative du taux sérique en HDL cholestérol, l'acide linoléique présente l'avantage de pouvoir se métaboliser en eicosanoide, lesquels ont montré des effets antithrombogènes, sur l'hypertension artérielle ainsi que sur la contractilité myocardique et la circulation coronaire.

Ceci justifierait l'utilisation de l'huile dans les maladies cardio-vasculaires, tel réduire les risques de l'infarctus du myocarde et améliorer les performances de l'appareil circulatoire.

III. Les rôles de l'arganier

III.1. Rôle environnemental

L'arganier joue un rôle irremplaçable dans l'équilibre écologique. Grâce à son système racinaire puissant il contribue au maintien du sol et permet de lutter contre l'érosion hydrique et éolienne qui menace de désertification.

De plus, grâce à son effet ombrage et améliorateur du sol, il peut permettre une production agricole non négligeable dans les conditions climatiques actuelles.

Enfin, de nombreux organismes vivants (faune, flore et microflore) sont directement liés à sa présence. La disparition de l'arganier entraînerait inéluctablement la disparition de plusieurs espèces, provoquant une diminution de la biodiversité dans la région, d'où une réduction du patrimoine génétique, aussi bien pour l'arbre que les autres espèces animales, végétales ou microbiennes (***Radi. N, 2003)***.

III.2. Rôle socio-économique

Outre qu'elle offre le pâturage, l'huile alimentaire et le bois de chauffage, l'arganeraie assure la subsistance de quelques trois millions de ruraux. Elle permet ainsi de limiter le phénomène de l'exode rural.

Chapitre-II-
Etude de la fraction saponifiable

I. Travaux antérieurs

A notre connaissance aucun travail de recherche n'a été consacré à la valorisation phytochimique de l'arganier de l'Algérie, par contre, cette huile a été exploitée tant de fois au Maroc.

Plusieurs travaux de recherche portés sur la composition chimique du fruit de l'arganier ainsi que leurs activités biologiques menés par plusieurs chercheurs marocains et français ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques ***(Charrouf. M, 1984, Charrouf. Z, 1995, Radi. N, 2003, Charrouf. Z et al., 2007, Berrougui. H, 2006 et Rezanka. T, 1999)***.

Les caractéristiques générales comme les indices de : saponification, d'iode et d'acidité d'une huile commerciale d'arganier ont été déterminées par plusieurs auteurs. Les valeurs de ces indices se situent entre 93,4 et 102 pour l'indice d'iode et 189,4 et 201 pour l'indice de saponification et de 1,02 à 1,30 pour l'indice d'acidité (***Charrouf. M, 1984*****).**

La composition de l'huile du fruit de l'amande d'arganier d'origine marocaine en acides gras, en triglycérides et en matières insaponifiables tels que les tocophérols, stérols, les méthyles stérols et les alcools tritérpéniques a été déterminée pour la première fois par M. Charrouf (***Charrouf. M, 1984***)**.** La composition en acides gras indique la présence des acides gras habituels rencontrés dans les graines oléagineuses avec des proportions importantes en acides gras insaturés comme l'oléique (44,8-46,9%) et linoléique (31,6-35,7%).

L'analyse des triglycérides par CLHP a confirmé l'existence des triglycérides résultants de la combinaison des acides gras palmitique, oléique et linoléique. Les différents isomères des tocophérols sont aussi présents dans l'huile et leur somme s'échelonne entre 620 et 900 mg /Kg. Les composés phénoliques du fruit de l'arganier (huile et pulpe) ainsi que leurs activités biologiques ont fait aussi l'objet de quelques publications récentes. Ces études ont montrées que les phénols de l'huile d'amande sont de bons inhibiteurs de LDL (***Berrougui. H et al., 2006***).

La fraction triterpénique est constituée essentiellement du tirucallol, de l'alpha Amyrine et du Butyrospermol ***(Farines. et al., 1984)***.

La fraction stérolique est représentée par un chiffre allant de 130 à 230 mg/100g qui est composée principalement de Spinastérol et Schottenol ***(Farines. et al., 1981)***.

Par contre, nous n'avons pas trouvé de références bibliographiques sur la composition des lipides polaires de l'arganier (glycolipides et phospholipides).

I.1. Extraction de l'huile d'amande d'arganier

L'arganier fructifie dès l'age de 5 ans mais son rendement optimal n'est atteint qu'à l'âge de 60 ans (***Rahmami M, 1979***).

Rappelons que le fruit est composé d'un péricarpe ou pulpe et d'une graine composée renfermant des amandes oléagineuses qui contiennent une quantité importante en matière grasse. La récolte des fruits doit se faire quand ils sont vraiment murs car c'est à ce moment là que les amandes sont les plus riches en huiles et le rendement d'extraction sera de ce fait meilleur (***Jaccard,1926***).

II. Procédés d'extractions

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction de l'huile à partir du fruit de l'arganier :

II.1. extraction à la manière traditionnelle

Pour obtenir de l'huile, les noix d'argan sont soumises à une série d'opérations :

- Le dépulpage des fruits : la pulpe séchée et séparée de la noix par écrasement.
- Le concassage de la coque.
- Les amandes sont après grillées à feu doux, puis moulues. La poudre est ensuite chauffée dans une casserole en présence d'un demi volume d'eau jusqu'à complète absorption. Cette pâte chaude est ensuite enveloppée dans un tissu blanc et propre, puis pressée à la main.

Les rendements en huile sont faibles et correspondant à 3% du poids sec [3.3 L par 100 kg de fruits secs]. Par ce procédé, l'extraction est très incomplète, et les tourteaux contiennent encore 20% d'huile.

L'extraction traditionnelles qui met en jeu des quantités importantes d'eau, contribue à la modification de la composition de l'huile et donc à sa mauvaise conservation. (***Radi. N, 2003***).

De façon à éviter toute ambiguïté liée au mode d'extraction artisanale de l'huile ; nous avons travaillé sur la fraction lipidique extraite de l'amande broyée par l'hexane à froid selon une méthode classique (macération).

Les fruits de l'arganier récoltés en juillet 2006 d'une forêt situé dans la région d'OUED ELMA dans la wilaya de Tindouf, sont d'abord dépulpés. Les amandes sont broyées en poudre fine à l'aide d'un mortier traditionnel. La poudre séchée à l'étuve à 60°C pendant 24 heures pour inactiver les enzymes susceptibles d'hydrolyser les glycosides.

II.2. Extraction à l'hexane

Afin de déterminer la teneur en huile nous avons procédé à une extraction de l'huile à reflux pendant 6 heures par soxlhet en utilisant de l'hexane comme solvant ***(AFNOR.1978)***. Pour les analyses, l'huile est obtenue par macération à froid dans de l'hexane pendant 24 heures. Après séchage par de sulfate de sodium anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient des rendements en huile de 39.5% dans le cas où l'extraction est faite à reflux et de 36 % lorsque l'extraction est réalisée à froid.

Si nous comparons ces valeurs avec celle de Charrouf (50 %) nous remarquons que l'arganier étudié est relativement faible en huile. Ces différences sont due peut être à : l'origine de l'espèce, le climat, et le sol. Par contre les rendements sont élevés par rapport à d'autres graines oléagineuses alimentaires comme le tournesol, le soja et l'olive (20-35%) ***(Karleskind, 1992)***, donc on peut conclure que l'amande d'arganier est relativement riche en huile. L'huile a une couleur brune claire, assez fluide, d'odeur agréable.

III. Caractéristiques physico-chimiques

Nous avons déterminé quelques indices chimiques qui caractérisent les matières grasses, nous avons utilisé les normes AFNOR (Association Française de Normalisation) (***AFNOR, 1984***). Ces indices permettent de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification (I.S), sur le nombre des insaturations par la mesure de l'indice d'iode (I.I) et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A). Nous avons également déterminé la teneur de l'huile en matières insaponifiables et quelques caractéristiques physiques tels que l'indice de réfraction et la densité.

III. 1. Indice d'acide (I.A)

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras.

$$R\text{-}COOH + OH^- \longrightarrow R\text{-}COO^- + H_2O$$

C'est un dosage qui nous permet de connaître le degré d'altération de l'huile et d'estimer le taux d'acides gras libres dans l'huile exprimé en acide oléique (***Perrin. J.L, 1992***).

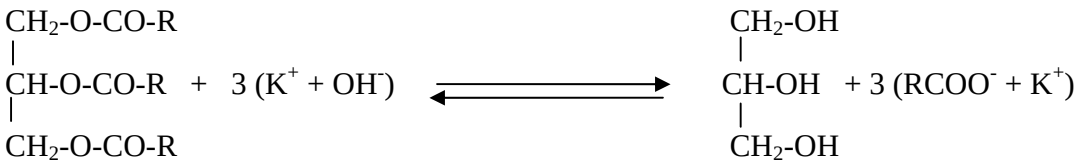
La détermination de l'indice d'acide est réalisée en utilisant la norme (***AFNOR NFT60-204***). Une quantité de masse bien précise d'huile est solubilisée dans 10 ml de chloroforme.
La solution organique est ensuite dosée par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0.1N jusqu' au virage de l'indicateur coloré utilisé. L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$I.A = \frac{V.N.56.1}{m}$$

I.A : indice d'acide
N : normalité de la solution éthanolique de KOH
V : volume de la solution éthanolique de KOH exprimé en ml
m : masse de la prise d'essai d'huile en gramme
56,1 : masse molaire de KOH

III.2. Indice de saponification (I.S)

Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la saponification d'un gramme de corps gras suivant la réaction chimique suivante :



La valeur de l'indice de saponification nous permet d'estimer les longueurs des chaînes de carbone des acides gras constituants l'huile d'une part, et de calculer les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides qui renferment l'huile.

La détermination de l'indice de saponification est réalisée en utilisant la norme (***AFNOR. NF T60-206***) en suivant les étapes suivantes :

Une quantité d'un gramme d'huile est saponifiée à reflux par 25 ml de KOH éthanolique (0.5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par de l'acide hydrochlorique (HCl) (0.5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile. L'indice de saponification est calculé par la relation suivante:

$$I.S = \frac{N.(V_0 - V_1).56.1}{m}$$

I.S : Indice de saponification

V_0 : volume de HCl en ml dans le test à blanc en ml

V : volume de HCl en ml nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse

m : masse d'huile prise en gramme

N : la normalité de la solution potassique.

56,1 : masse molaire de KOH.

III.3. Indice d'iode (I.I)

L'indice d'iode (I.I) d'une matière grasse est le nombre de grammes d'halogène exprimé en iode fixé par 100 grammes de corps gras. Le principe de sa détermination est basé sur la fixation d'halogènes par les doubles liaisons des acides gras insaturés, il permet donc d'évaluer le taux des insaturations moyennes de l'huile (***Mordet. F, 1992***).

La norme (***AFNOR NFT 60-203***) est utilisée pour la détermination de I.I en suivant le mode opératoire :

Une quantité de 0.2g d'huile est solubilisée dans 20 ml dans de CCl_4. A cette solution on ajoute 20ml de réactif de Wijis (solution de concentration de 0,1M de monochlorure d'iode (ICl). Le mélange est bouché et mis à l'obscurité pendant 1 heure. On ajoute au mélange précédent 20ml d'une solution de 10 % m/v d'iodure de potassium (KI) et 100ml d'eau distillée puis on dose l'excès d'iode par une solution de thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$ (0.2N) en utilisant l'amidon comme indicateur.

L'équation du dosage est la suivante :

L'indice d'iode est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I.I = \frac{(V_0 - V).C.12.69}{m}$$

V_0 : volume de thiosulfate de sodium dans le test à blanc exprimé en ml

V : volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour la neutralisation de l'excès d'iode exprimé en ml

C : concentration molaire de la solution de thiosulfate de sodium

m : masse prise d'essai d'huile en gramme

Nous avons également déterminé la teneur de l'huile en matières insaponifiables et quelques indices physiques comme l'indice de réfraction et la densité.
Les valeurs obtenues sont la moyenne de trois mesures pour chaque indice. Les résultats sont résumés dans le **Tableau.II.1**.

Tableau.II.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'arganier

Indices	Valeurs
I.A	2.23
I.I	132.36
I.S	184.4
$M^{(AG)}$	292
$M^{(TAG)}$	913
η^{20}	1.4853
d^{20}	0.9450
Insaponifiables %(m/m)	1.17

I.A : Indice d'acide ; **I.S** : indice de saponification ; **I.I** : indice d'iode ; η : indice de réfraction ; **d** : densité
$\mathbf{M^{(AG)}}$: masse moléculaire moyenne des acides gras ; $\mathbf{M^{(TAG)}}$: masse moléculaire moyenne des triglycérides.

Pour l'huile de l'arganier on trouve un indice d'acide de 2 ,23. L'acidité exprimée en acide oléique est de : 0.056% (56mg/100g).
A l'aide des relations qui expriment les masses moléculaires moyennes des triglycérides et des acides gras montrées ci-dessous et en utilisant la valeur de l'indice de saponification, on peut calculer la valeur moyenne de la masse moléculaire des triglycérides M^{TAG} et la masse moyenne des acides gras M^{AG}. Les valeurs calculées indiquent une forte prépondérance d'acides gras de longueurs de chaînes moyennes entre 16 à 18 atomes de carbone. La valeur de l'indice d'iode (132,4g/100g) envisage une insaturation élevée dans l'huile. La teneur en insaponifiable de 1,77 %(m/m) correspond à une huile relativement riche en insaponifiable, puisque l'on admet qu'elle ne dépasse pas la valeur de 2%(m/m) dans les huiles du règne végétal alimentaires.
Il en ressort que l'huile de l'arganier est une huile assez semblable aux autres huiles végétales connues comme l'huile de tournesol, d'arachide, de soja et de colza (***Karleskind. A, 1992***). **Tableau.II.2**.

Tableau.II.2. Caractéristiques physico-chimiques pour quelques corps gras végétaux

	I.S	I.I
Coprah	255-267	5-9
Palmiste	246-254	12-19
Palme	195-205	45-58
Olive	188-196	83-87
Arachide	189-196	90-98
Mais	187-193	110-128
Tournesol	188-194	120-136
Soja	187-192	125-138
Noix	189-197	135-150
Lin	187-192	170-202
Colza	170-192	97-106

Ce sont des huiles assez insaturées et riches en acides gras en 18 atomes de carbone (C18), et ne contiennent pas un taux élevé d'acides gras à chaîne très courte ou très longue.

Nous avons aussi comparé nos résultats avec ceux que l'on a rencontrés dans la littérature comme le montre le **Tableau.II.3**.

Nous avons des résultats analogues à ceux de nos prédécesseurs ; les petites différences peuvent s'expliquer par la disparité d'origine des échantillons d'huile et leur mode d'extraction et de conservation. L'huile de l'arganier présente les mêmes caractéristiques que les huiles semi siccatives telles que les huiles de maïs et de coton.

$$M_{moy}^{TAG} = \frac{3.56110}{IS} \qquad M_{moy}^{AG} = \frac{M_{moy}^{TAG} - 38}{3}$$

Tableau.II.3. Comparaison des indices physico-chimiques

Auteur	I.I	S.I	A.I	Originee
Jaccard	95.3	189.7	1.33	Commerciale
Dicharth	96.4	190.4	1.5	Commerciale
Rahmani	93.4	192.1	1.13	Maroc
Charrouf	102.5	201	1.30	Maroc
Nos résultats	132،36	184	2.23	Algérie

IV. Analyse des acides gras

Les corps gras naturels sont constitués essentiellement par des triglycérides, triesters d'acides gras et du glycérol accompagnés en petites quantités de diglycérides, de monoglycérides, de phospholipides et d'acides gras libres.
Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à déterminer la composition de l'huile d'argan en acides gras, et nous essayerons d'établir la structure glycérique de l'huile en étudiant la répartition des acides gras dans les trois positions du glycérol.

IV.1. Les acides gras

IV.1.1. Données générales

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

Ces acides gras, généralement non ramifiés, différents entre eux par la longueur de leur chaîne, la présence et le nombre et la position de leurs doubles liaisons. On observe une prédominance très marquée des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal. La double liaison, lorsqu'elle existe, est plus généralement de configuration *cis*. La plupart des organismes vivants sont capables de synthétiser des AG mono-insaturés par désaturation des AG saturés correspondants (***Guingnard, J.L, 1985***).

Les acides gras les plus généralement rencontrés sont :

- En série saturé, l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) sont les plus fréquents dans les huile végétales, alors que les acides laurique (C12 :0), myristique (C14 :0) et arachidique (C20 :0) ne sont rencontrés généralement qu'à l'état de trace.
- En série moninsaturée, l'acide oléique (C18 :1) est l'acide gras le plus répondu dans la nature ; on le trouve dans tous les lipides végétaux.
- En série polyinsaturée, il faut citer l'acide linoléique (C18 :2), l'acide arachidonique (C20 :1), et l'acide linolénique (C18 :3).

L’acide linoléique et l’acide oléique, sont l’un des constituants les plus rencontrés dans les huiles végétales.

Les AG poly-insaturés sont intéressants sur le plan nutritionnel. Certains d’entr-eux jouent un rôle vital dans la cellule, d’où leur dénomination d’acides gras essentiels (AGE) : il s’agit des acides linoléiques (série n-6) et α-linolénique (série n-3) et arachidonique et de leurs dérivés supérieurs. Ces AGE doivent être apportés par l’alimentation car ils ne sont pas synthétisés par l’organisme humain, jouant un rôle fondamental dans la biosynthèse des prostaglandines ; un manque de ces acides gras essentiels chez les jeunes entraîne un retard de croissance et des troubles cutanés. L’acide linoléique est le précurseur des thromboxanes, des prostacyclines, des leucotriènes et des prostaglandines qui ont un rôle préventif vis-à-vis des troubles du métabolisme et des maladies cardiovasculaires, ainsi qu’une action sur la structure des membranes biologiques et de certaines de leurs fonctions ***(Helme, J.P et al., 1984)***. Ceci explique l’intérêt croissant des AGE en cosmétologie et en agroalimentaire.

IV.1.2. Analyse des acides gras

Les acides gras étant les constituants essentiels des triglycérides, c'est par leur connaissance que l'analyste peut déterminer les caractéristiques d'identité des corps gras selon :

- la présence ou non de certains acides gras.
- les proportions des acides gras entre eux.

Les acides gras peuvent être analysés sous forme libre, mais généralement se sont analysés qu’après leurs transformations en leurs esters méthyliques (EMAG), qui sont plus volatils. (***Cocallemen, S et al., 1988***).

Les méthodes d'estérification sont nombreuses. Le choix s'effectuera en fonction des acides gras à analyser : présence d'acides gras libres, d'acides gras à chaîne courte, acides gras à fonction alcools ou acides.

La plupart des méthodes d'estérification se réalisent en présence d'un excès d’alcool. Il est possible d'utiliser l'alcool méthylique, éthylique, propylique, isopropylique, ou encore butylique, de façon à former des esters ayant des températures d'ébullition plus élevées. L'alcool le plus généralement utilisé étant le méthanol, on parle des esters méthyliques d'acides gras (EMAG).

IV.1.2.1. Préparation des esters méthyliques

Les techniques de préparation des esters méthyliques sont relativement nombreuses. (***Olle. M, 1996***).

- Méthode au triméthyl hydroxy sulfonium TMSH S $(CH_3)^+{}_3OH^-$

  En présence de TMSH, les triglycérides sont estérifiés au moment ou ils pénètrent dans l'injecteur du système chromatographique (250C°)

- Méthode générale au tri fluorure de bore BF_3/ CH3OH

  Le corps gras en premier temps est saponifié en présence de potasse alcoolique d'estérification et ensuite réalise en présence de BF_3 méthanol (***Kuksis. A, 1978 et Paqout, C et al., 1987***). Après l'addition de l'eau, les esters sont récupérés à l'aide d'un solvant.

- Estérification en milieu acide

  Il est possible d'obtenir des esters en milieu H_2SO_4/alcool, en ampoule scellée à chaud (bain marie).

- Méthode applicable aux corps gras neutres (ou ayant une faible acidité)

  La réaction s'effectue à chaud en présence de potasse méthanolique environ 1N les esters étant récupérés par un solvant (pentane, hexane) après addition de l'eau

- Méthode à froid (cors gras à chaîne courte)

  Dans le cas des corps gras possédant des chaînes courtes (acide butyrique) il est nécessaire d'opérer à froid, dans un tube ou ampoule fermée on solubilise les triglycérides dans le pentane puis on le estérifie par le potasse méthanolique environ 2N par agitation.

- Méthode applicable aux corps gras acide et acide gras

  Méthode au méthanol/acide sulfurique dans un ballon ou ampoule scellée pendant 25min

Pour notre huile nous avons déterminé sa composition en acides gras par deux méthodes selon le produit de départ. Dans la première méthode, nous avons réalisé la saponification directement sur l'huile brute puis estérification des acides gras par le tri fluorure de bore méthanolique, alors que la deuxième méthode est basée sur la saponification de l'huile par une solution alcoolique de potasse. Après l'ajout d'une quantité d'eau, on extrait la partie insaponifiable par l'éther éthylique, on acidifie la phase aqueuse restante par une solution d'acide chlorhydrique à 30% pour libérer les acides gras libres qui sont ensuite extraits par de l'hexane. Le détail des deux méthodes est le suivant :

La première méthode

- **Saponification**

Dans un ballon on pèse 0.2 à 0.5g d'huile, on ajoute 10ml de solution méthanolique de soude (2%), celui-ci est adapté au réfrigérant, et porté à une ébullition à reflux pendant 15 à 20 min.

- **Estérification**

L'estérification est réalisée en ajoutant par le haut de réfrigérant 5ml d'une solution méthanolique à 20 %de BF3. Le mélange est maintenu encore à reflux pendant 10min. Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau distillée. Les esters méthyliques sont récupérés par une extraction liquide- liquide en utilisant l'hexane. La phase organique est lavée plusieurs fois par de l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est filtré puis vaporisé sous pression réduite. Les EMAG ainsi obtenus sont repris dans l'hexane et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

La deuxième méthode

- **Saponification de l'huile**

Dans un ballon de capacité de 250 mL, on introduit 5 g d'huile et 100 mL d'une solution hydroalcoolique de potasse de 1N. On chauffe à reflux pendant 1h 30 mn. Après ajout de 200 mL d'eau distillée, on sépare les fractions saponifiable et insaponifiable

- **Traitement de la phase aqueuse**

La phase aqueuse basique est extraite par 3 fois 50 mL éther éthylique. La phase éthérée est lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. On obtient ainsi un rendement de 1,77% de la fraction insaponifiable.

- **Traitement de la phase organique**

Les acides sous forme de sels de potassium dissous dans la phase aqueuse, sont régénérés par addition d'une solution d'acide chlorhydrique à 30 %(v/v). Ils sont ensuite extraits par 3 fois 50 mL de l'hexane. La phase hexanique est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite, on obtient ainsi les acides gras libres.

- **Préparation des esters méthyliques d'acides gras libres**

100 mg d'acides gras sont mis en solution dans 5 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 20 %. L'ensemble est porté à reflux pendant 10 mn. Après avoir laissé reposer 5 minutes, on ajoute 20 mL d'eau distillée. Après décantation, les esters méthyliques sont extraits par 3 fois 20 mL de l'hexane. La phase hexanique est lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralisation, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Les esters méthyliques ainsi obtenus sont conservés au réfrigérateur à 6°C.

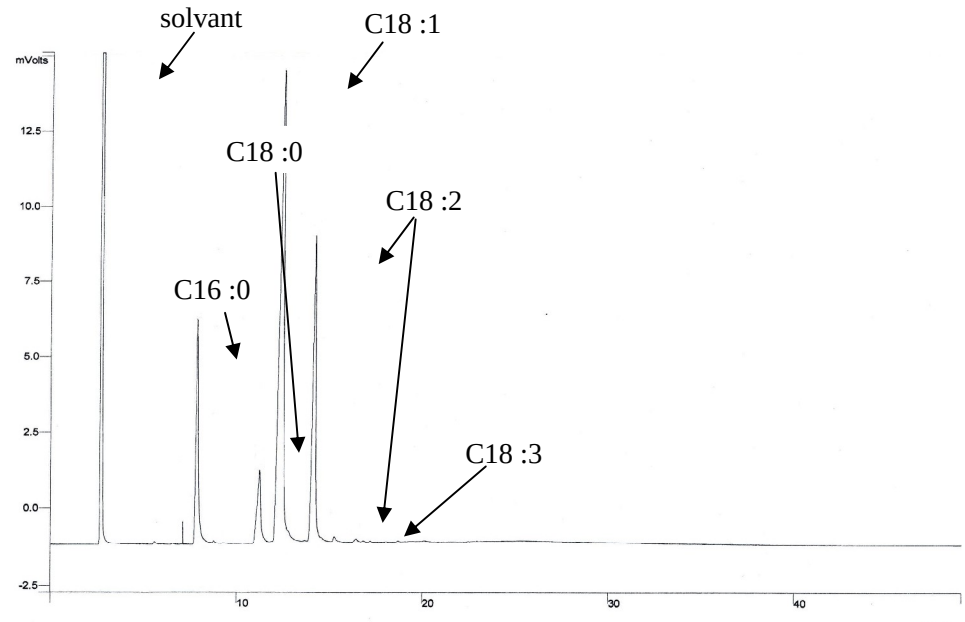
- **Analyse par CPG**

Nous avons utilisé un chromatographe Delsi gaz-chromatography muni d'un détecteur à ionisation de flamme FID.

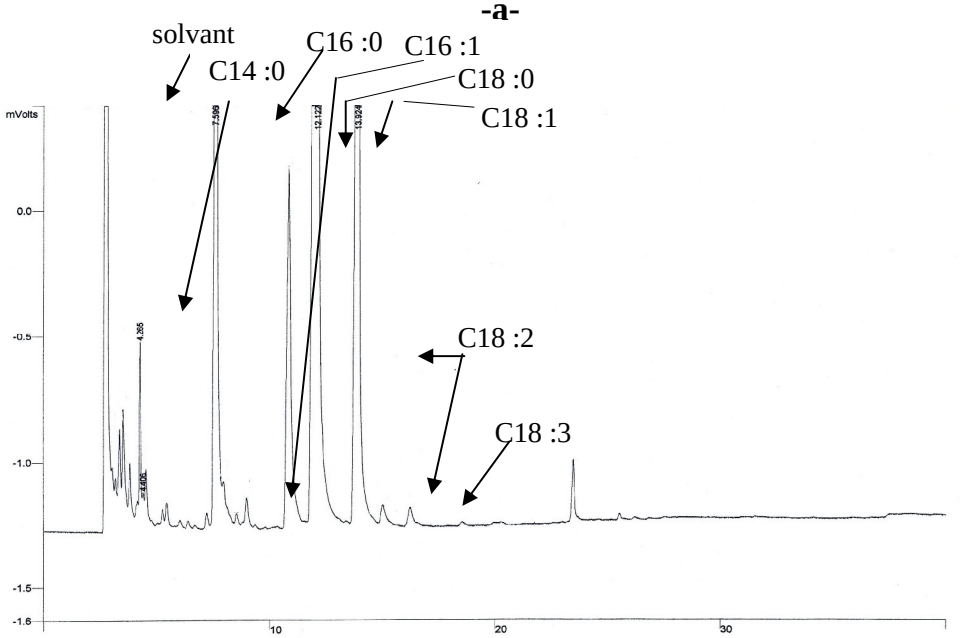
- Colonne capillaire MEGA 10, longueur 30 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25µm
- Programmation de température de 150°C à 200°C à raison de 2°C /mn
- Température de l'injecteur à 220°C
- Température de détecteur à 220°C
- Gaz vecteur : azote à la pression de 34 KPa.

IV.2. Résultats

A partir des deux chromatogrammes des EMAG (**Figure.II.1.**) nous avons dressé le **Tableau.II.4** qui indique les proportions relatives des divers esters méthyliques d'acides gras obtenus par saponification de l'huile de l'arganier et estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore, soit par estérification des acides gras libres par le trifluorure de bore méthanolique (BF_3/CH_3OH à 20%).



-a-



-b-

Figure.II.1. Chromatogrammes des EMAG

–**a-** des acides gras libres, **-b-** de l'huile brute du fruit de l'arganier

Nous observons que l'huile du fruit de l'arganier contient sept acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales, en l'occurrence les acides : myristique, palmitique, palmitéolique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique.

Cette huile est caractérisée par sa richesse en acides gras mono- et di-insaturés.

Les acides gras insaturés représentent 80 % des acides gras totaux. On note aussi une valeur assez importante du taux d'acides gras saturés et en particulier de l'acide palmitique (12.44%).
Il ressort de ces résultats que l'huile d'argan est une huile de type oléique- linoléique ; les principaux acides gras sont l'acide oléique et l'acide linoléique. La teneur en acide linoléique 22 %(acide gras polyinsaturé) représente, du point de vue alimentaire un intérêt certain.

D'autre part, la faible quantité de l'acide linolénique présente un avantage technologique : l'huile est peu susceptible de s'oxyder ou de se polymériser pendant la conservation, l'utilisation ou une transformation éventuelle.

Il faut noter aussi que le choix de la méthode de préparation des esters méthyliques d'acides gras n'influe pas beaucoup sur la composition d'huile en acides gras.

Si on compare nos résultats avec celles trouvés par Charrouf, on remarque une différence importante dans les teneurs en acides gras insaturés individuels et notamment dans les deux acides majoritaires oléique et linoléique, alors que leur somme est toujours près de 80 %. Cette différence peut-être due à l'origine des espèces étudiées ou aux conditions de climat d'une part ou bien aux conditions opératoires telles que le mode d'extraction, méthodes de préparation des EMAG, de traitement de l'échantillon et leurs analyses (type de colonne).

Tableau.II.4. Composition relative en acides gras de l'huile de fruit de l'arganier

Acides gras		AGL	Huile brute	Z. Charrouf.
Myristique	C14 :0	/	1.14	0.15
Palmitique	C16 : 0	14.65	12.44	12-13
Palmitéolique	C16 : 1	/	2.18	≤ 0.12
Stéarique	C18 : 0	7.06	6.27	5-7
Oléique	C18 : 1	52.86	51.55	43-49.1
Linoléique	C18 : 2	25	22.03	29.3-36
Linolénique	C18 :3	0.32	3.63	≤ 0.1
Arachidique	C20 :0	/	/	0.3-0.5
Gadoléique	C20 :1	/	/	0.4-0.5
Béhénique	C22 :0	/	/	≤ 0.1
Total AGS		21.71	19.85	20.75
Total AGI		78.18	79.42	79.62

Nous rapportons à titre indicatif la composition en acides gras de certains *S*apotaceae (***Misra. M et al., 1974 et Gaydou. EM et al., 1983***).

Tableau.II.5. Composition en acides gras de quelques espèces de *Sapotaceae*

Nom de la plante	C16 :0	C18 :0	C20 :0	C18 :1	C18 :2
Mimusops Manilka	12,6	12	-	66,2	1,4
Butyrospermum Parkii	5,7	41	-	49,0	4,3
Calocarpum Mammosum	10	22, 3	-	54,3	13,4
Dumoria Africana	-	46	-	54	-
Madhuca Butyraceae	54	-	46		
M.Longifola	27,1	2,0	-	41,0	13 ,6
M. Mottleyana	28,2	14,1	-	48,8	8,9
Mimusops Elengi	11	10 ,1	0,4	64	14,5
M.Hexandra	19	14	1,4	63	3
M.Heckelii	4,2	35,5	1,1	58,5	
M.Djave	4,4	36	0,5	58,5	
Palaquim Oblongifolium	6,5	57,5	-	36	
Payena Lanciofola	-	58,0	-	42	-
Sideroxylon Tomentosum	11	17 ,9	-	57,8	13, 3
Donella Fenerivensis	19,5	5,6	1,4	24,6	40
Mimusops Commersonii	22,7	7,5	1,4	43,1	20,2
Argania Spinosa	13,9	5,6	0,4	46,9	31,6

Sur la base de ces données, on peut remarquer que la composition en acide gras de l'huile de l'arganier diffère de la plupart des genres décrits dans la littérature. On remarque qu'elles renferment toutes un fort pourcentage d'acide oléique.

V. Etude des triglycérides

Après avoir déterminé la composition en acides gras de l'huile d'arganier, nous avons étudié les différentes combinaisons possibles de ces acides sur la molécule de glycérol. Rappelons tout d'abord quelques définitions relatives aux triglycérides

V.1. Introduction

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

- les triglycérides simples, où les fonctions alcools du glycérol sont estérifiées par des AG identiques.
- les triglycérides mixtes, où les fonctions alcools du glycérol sont estérifiées par deux ou trois AG différents.

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

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

Afin d'obtenir le maximum de renseignements sur la nature des TAG dans l'huile d'arganier, nous avons étudié successivement :

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

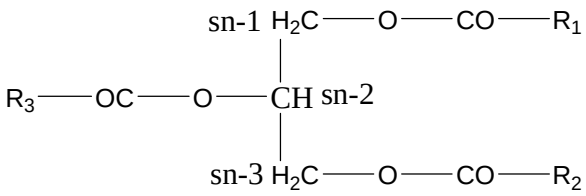
La combinaison de ces trois types des résultats expérimentaux nous conduira à une composition en TAG, où ne seront pas distinguées les positions Sn-1 et Sn-3.

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

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

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

- N_1 TAG, si on considère l'ensemble des TAG et de leurs isomères de positions et optiques (distinction des positions 1 et 3 du glycérol), avec $N_1 = n^3$
- N_2 TAG, si l'on inclut les isomères de position, mais sans tenir compte des énantiomères (pas de différentiation des positions 1 et 3), avec $N_2 = \frac{n^3 + n^2}{2}$
- N_3 TAG, différents entre eux uniquement par la nature des AG, avec $N_3 = \frac{n^3 + 3n^2 + 2n}{6}$



Où R_1, R_2 et R_3 représentent les radicaux des chaînes d'acides gras.

V.2. Méthodes d'analyse des triglycérides

En pratique, il n'existe pas une méthode parfaite pour déterminer la composition glycéridique exacte d'une matière grasse, mais on peut la faire en combinant plusieurs méthodes d'analyse.

La majorité des méthodes utilisées pour identifier les TAG sont des techniques chromatographiques :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire OV_1 : dans ce cas, la séparation se fait en fonction du nombre total d'atomes de carbone (***Monseigny. A et al., 1979***).
- L'inconvénient de cette méthode est que les TAG de même condensation en carbone, ayant des nombres différents d'insaturations, ont le même temps de rétention. En plus, l'opération de l'analyse demande une température très élevée dans le four d'environ 350°C.
- la chromatographie sur couche mince (CCM) de silice imprégnée d'une solution de nitrate d'argent : le fractionnement se fait en fonction du degré d'insaturation des différents TAG (***Hamilton, R et al., 1986***), des TAG, ayant le même nombre d'insaturation mais des condensations en carbone différentes, ont le même facteur de rétention R_f.
- la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) utilisant une colonne en phase inverse de type RP18 : la séparation a lieu en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'insaturation (***Goiffon, J et al., 1981***).
- les analyses stéréospécifiques : l'analyse stéréospécifique des TAG consiste à déterminer la distribution des différents AG sur les trois positions du glycérol. Si l'estérification des positions 1 et 3 se fait par des AG différents, les TAG résultants sont asymétriques et optiquement actifs. Cependant, l'activité optique de ces stéréoisomères est trop faible pour être détectée. Des méthodes, autres que physiques, de détermination de la configuration des TAG ont été ainsi mises au point.

La détermination des AG estérifiant la position 2 du glycérol a été réalisée pour la première fois en 1965 par Brockerhoff (***Brockerhoff. H, 1971***), en effectuant une digestion enzymatique de TAG par la lipase pancréatique de porc qui est une enzyme esterhydrolase spécifique de la position 2. Il existe une autre méthode déterminant les acides gras estérifiant les fonctions alcools primaires du glycérol. Il s'agit de la réaction de Grignard qui utilise le bromure d'éthylmagnésium, réactif sans spécificité de chaîne, ni régiosélectivité (***Brockerhoff. H, 1967***). Ces deux méthodes ne donnent que la répartition des AG sur les positions Sn-2 et Sn-1,3 du glycérol. Néanmoins, la comparaison des résultats obtenus par hydrolyse enzymatique et hydrolyse chimique permet de

mettre en évidence une éventuelle spécificité de chaîne de la lipase vis-à-vis d'un ou plusieurs acides gras.

La méthode de Brockerhoff est aussi adoptée pour déterminer les AG en positions Sn-1, Sn-2 et Sn-3 (**Figure.II.2.**). Les 1,2- et 2,3-diacylglycérols (DAG) obtenus après action du bromure d'éthylmagnésium sur les TAG et séparation par CCM, sont transformés en 1- et 3-phosphatidylphénols. Ceux-ci subissent alors une digestion enzymatique par la phospholipase A_2 du venin de serpent qui n'hydrolyse que les 3-phosphatidylphénols.

La (**Figure.II.3.**) regroupe les différentes méthodes d'analyses stéréospécifiques des TAG.

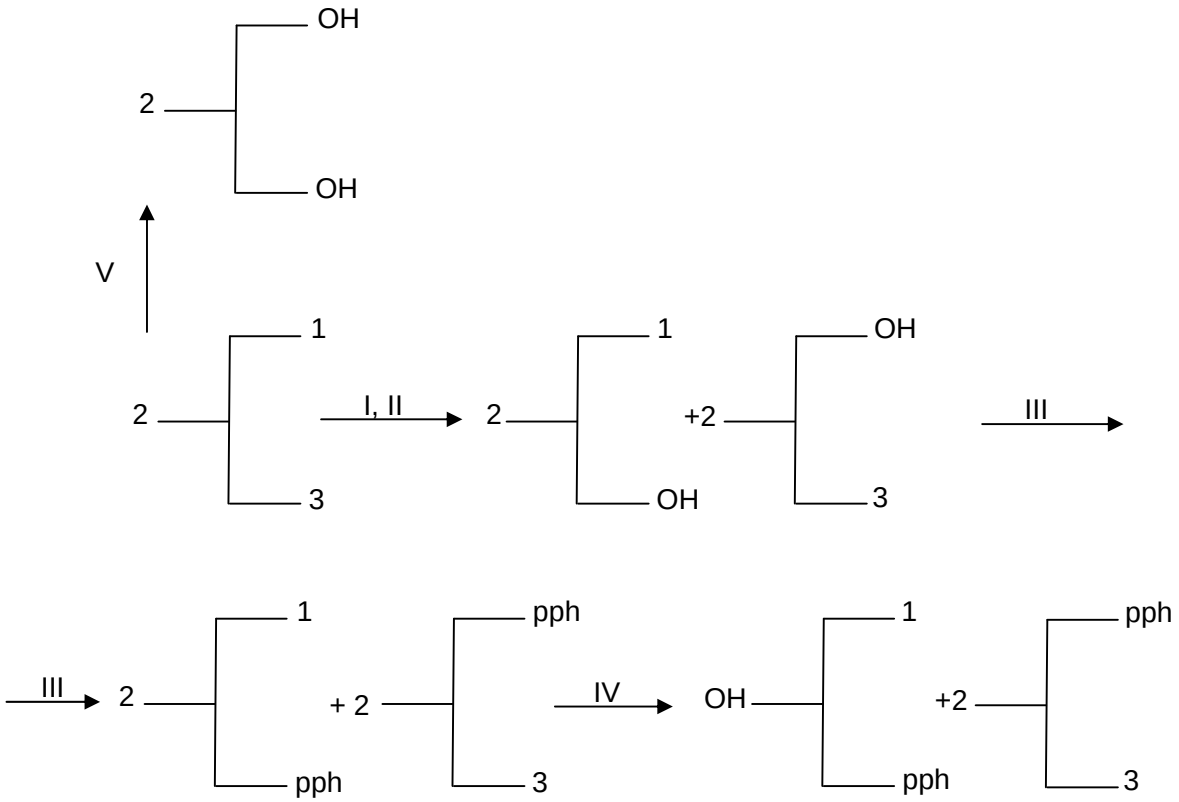


Figure.II.2. Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff. I : EtMgBr ; II : C.C.M; III : dichlorophosphate de phényle, pyridine ; IV: phospholipase A_2 ; V : lipase pancréatique du porc.

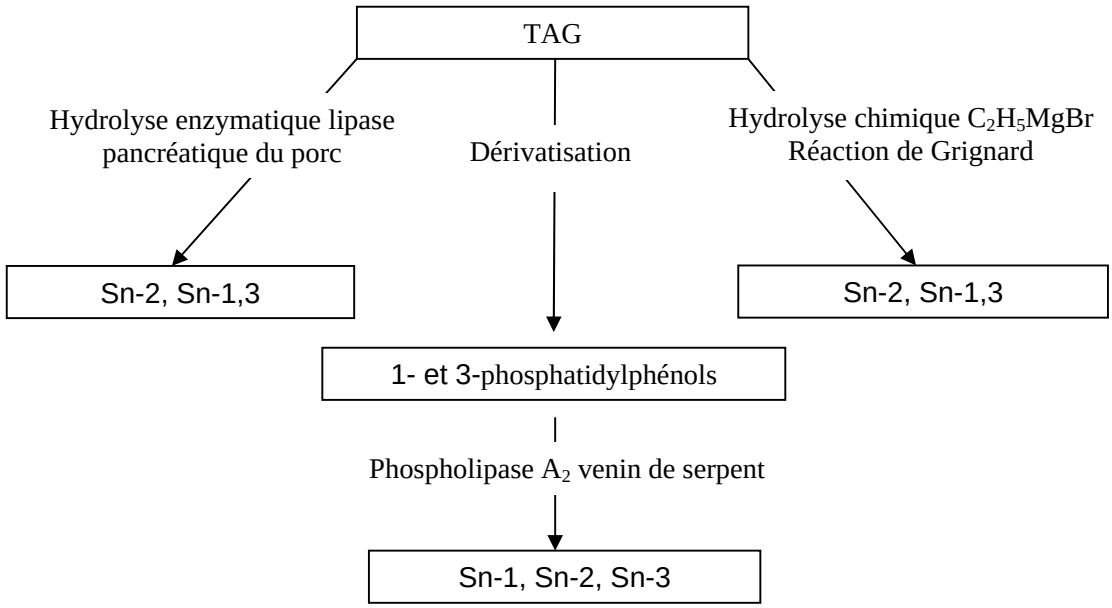


Figure.II.3. : Différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG

L'ensemble de ces méthodes appliquées à un grand nombre de corps gras d'origines diverses (graisses animales, huiles végétales, laits) ont permis d'énoncer des règles générales de distribution des AG au sein de TAG naturels (***Hamilton, R. et al., 1986***).

Ainsi, dans les TAG végétaux, les AG saturés estérifient préférentiellement les positions Sn-1 et Sn-3 du glycérol. La position Sn-2 est occupée principalement par les acides gras mono- ou poly-insaturés. Les acides gras particuliers se retrouvent majoritairement en position Sn-3 (**Figure.II.4.**).

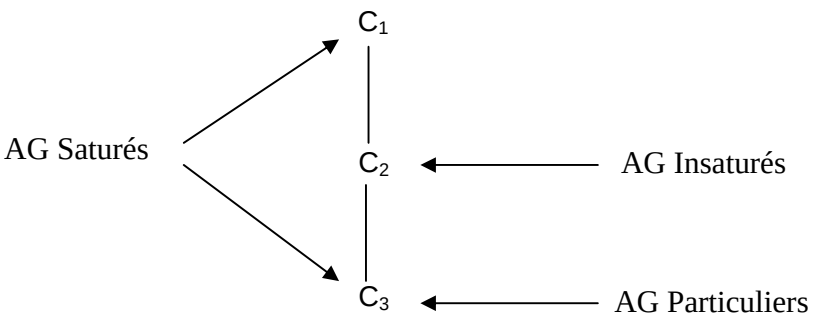


Figure.II.4. Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses végétales

La distribution des AG des TAG des graisses animales diffère des graisses végétales. La position Sn-1 est ainsi occupée par des AG saturés. Les AG courts et insaturés estérifient la position Sn-2. Enfin la position Sn-3 est occupée par les AG longs (**Figure.II.5.**).

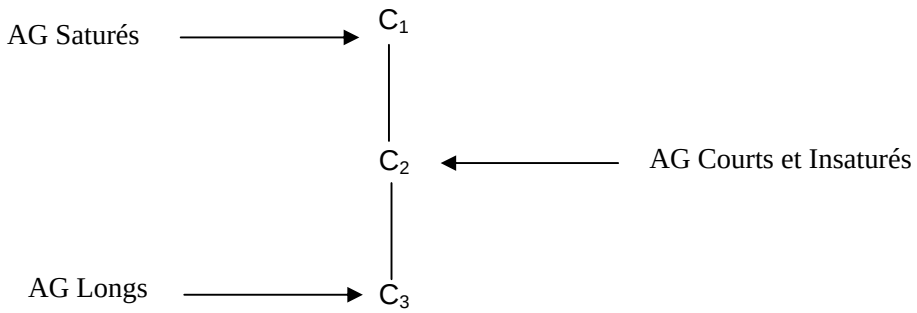


Figure.II.5. Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses animales

L'étude de la distribution stéréospécifique des AG dans les TAG est intéressante à plusieurs points de vue. La plus grande importance accordée à la détermination des AG en position Sn-2 est due à un intérêt historique. Son analyse a été la première à être développée. Cette analyse est très importante puisque, lors de la digestion chez les mammifères, les 2-monoacylglycérols, ainsi que les AGL correspondants, sont absorbés par les muqueuses intestinales après hydrolyse préférentielle des TAG sur les positions Sn-1 et Sn-3 par la lipase pancréatique du porc (***Well, J, 1972 et Gargouri, Y et al., 1992***).

V.2.1. Les acides gras des triglycérides

Acides gras des TAG obtenus par CPG

Les TAG sont isolés de l'huile brute par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice avec comme éluant le benzène selon la norme IUPAC 2.231 (***Paqout, C et al., 1987***).10g de gel de silice sont mise en suspension dans le dichlorométhane puis transvasés dans une colonne en verre. Environ 3g d'huile sont dissous dans un minimum de dichlorométhane et déposée en tête de colonne. L'élution est réalisée par 200 ml de benzène. Les triglycérides purifiés sont obtenus après avoir évaporé le solvant sous pression réduite.

Après une estérification en milieu basique, les EMAG correspondants ont été analysés par CPG. Dans le **Tableau.II.6** nous rapportons les proportions des EMAG des TAG de l'huile purifiée de l'huile de l'arganier.

Du fait qu'un certain nombre d'AG sont en proportion très faibles (< à 1,0%), lors de la quantification des TAG, nous ne nous sommes intéressés qu'aux acides gras majoritaires, les acides oléiques, linoléique,palmitique et stéarique dont les proportions sont supérieures à 1 %.

V.2.2. Analyse des acides gras en position 2

V.2.2.1. Hydrolyse enzymatique

Certains organismes vivants possèdent des enzymes lipolytiques susceptibles d'agir sur les liaisons ester de glycéride, tenant compte des positions occupant sur le glycérol. La lipase extrait du pancréas du porc intervenant spécifiquement sur la position 1,3 de triglycéride et permettant d'obtenir un monoglycéride-2 et des acides gras libres, une méthode a été développée dans le cadre des travaux du conseil oléicole international et normalisée (U PAC et AFNOR NF ISO 6800) (**Figure II.6.**)

Après l'hydrolyse enzymatique du corps gras dans des conditions déterminées : température de milieu et PH., les monoglycérides en position-2 sont isolés par chromatographie sur couche mince (CCM), puis ces acides constitutifs sont transformés en ester méthyliques pour déterminer leur composition par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette méthode est utile pour le controle de pureté des huiles.

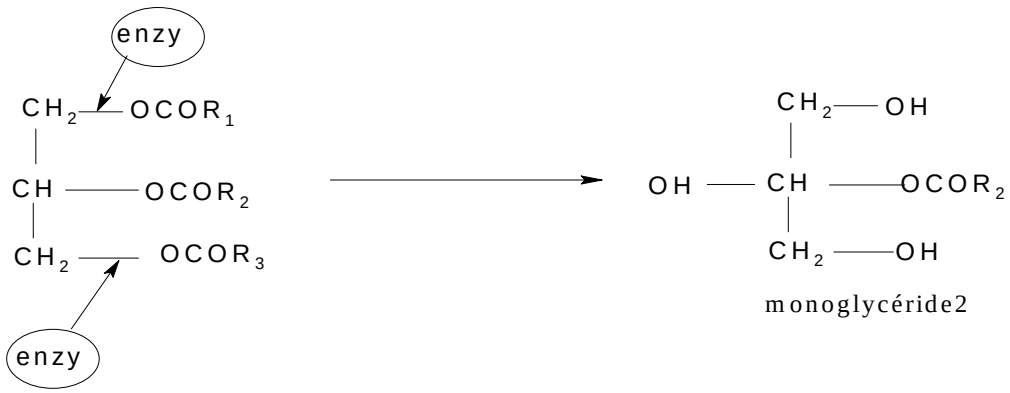


Figure II.6. Action de la lipase pancréatique sur les triglycérides

Une quantité de 2g de TAG déjà purifiés sont hydrolysés en présence de 10ml d'une solution tampon de 1,2M de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et 2ml de chlorure de calcium hydraté à 22 % ($CaCl_2.2H2O$) et 0.1ml de sel biliaire à 25%. Quand le mélange réactionnel atteint la température de 37C°, on ajoute 200 mg de la lipase et on agite pendant 30min. la réaction est stoppée en ajoutant 1ml d'une solution aqueuse d'acide hydrochlorique (4N).

Les produits de l'hydrolyse sont récupérés avec le diéthyl éther par une extraction liquide – liquide. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau afin d'éliminer toutes traces d'acide, puis traitée par du sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 40 °C.

V.2.2.2. Isolement des mono glycérides en position -2 par CCM

Les produits de l'hydrolyse sont solubilisés dans 500µl de chloroforme, puis fractionnés par chromatographie préparative de couche mince de Gel de silice (***Quinlin, P et al., 1958, Bilyk, A et al., 1991***). L'élution est réalisée par un système de solvant constitué par hexane : diéthyl éther : acide formique : 5/5/0,1 V/V/V. Deux migrations successives sont nécessaires. Les mono glycérides en position -2 sont visualisées par une lampe UV à 254 nm. Après désorption des mono glycérides, ils sont récupérés par le chloroforme et le méthanol sous agitation pendant deux heures. Le solvant est filtré et évaporé sous pression réduite. Les EMAG des mono glycérides sont préparées de la même manière que ceux des EMAG d'acides gras totaux. Egalement sont analysés par CPG dans les mêmes conditions que celles des acides gras.

La proportion des acides gras des positions Sn-1 et Sn-3 du glycérol est calculée par la relation suivante (***Hamilton, R et al., 1986***) :

$$[Sn-1,3]\,\% \;=\; \frac{3\;[T.A.G]\% \;-\; [Sn-2]\%}{2}$$

Le **Tableau.II.6** résume les résultats obtenus sur l'huile de l'arganier.

Tableau.II.6. Composition relative des principaux acides gras en position Sn-2 des TAG

AG	TAG	Position Sn-2
C16:0	14.5	5.2
C16:1	/	/
C18:0	7.21	/
C18:1	53.71	58.01
C18:2	25	36.8
AGS	**78.71**	**5.2**
AGI	**21.71**	**94.81**

La digestion enzymatique des TAG de l'huile de l'arganier par la lipase pancréatique du porc nous montre que les acides oléique et linoléique représentent respectivement environ 58 % et 37 % des acides gras en position interne. On remarque que l'acide stéarique est absent et l'acide palmitique a une proportion d'environ 5 %. On remarque également que les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique sont aussi répartis sur les positions externes (Sn-1 et Sn-3) avec des teneurs de 14.5 %, 7.21 %, 53.71 % et 25% respectivement. En revanche, la position Sn-2 est très largement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique) avec un taux de 94.81% des acides gras du TAG de l'huile.

L'ensemble de ces résultats confirme bien les règles de distributions stéréospécifiques des acides gras sur la molécule de glycérol. En effet, dans les huiles végétales les acides gras insaturés C18 occupent préférentiellement la position Sn-2 du glycérol (***Vandewal., R et al., 1960 et Coleman, M et al., 1961***).

V.2.2.3. Détermination des TAG à partir des acides gras en position Sn-2

Si l'on considère que les acides gras estérifiant la molécule de glycérol en suivant une loi de distribution de position des acides gras dans les triglycérides établie par plusieurs auteurs (***Vandewal, R, 1960, Youngs, C.G, 1958 - Coleman, M et al., 1960, Coleman, M, 1963***), il nous est alors possible, en utilisant les résultats de la digestion de la lipase pancréatique des triglycérides, de quantifier les isomères de position des différents TAG.

Soit ABC, un TAG, mixte. Six isomères différents de positions existent (**Figure.II.7.**).

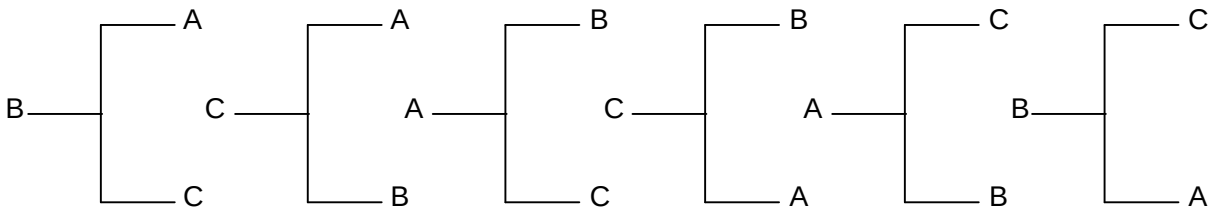


Figure.II.7. Différents isomères de position d'un TAG ABC

On a déjà vu que la digestion des TAG par la lipase pancréatique donne uniquement les pourcentages des acides gras en Sn-2 et en Sn-1,3. Les positions Sn-1 et Sn-3 ne sont pas

différenciées. Donc, seuls trois types de TAG peuvent être quantifiés. Ils seront notés A(BC), B(AC), C(AB). Les AG entre parenthèses estérifient les positions Sn-1 et Sn-3.

Pour déterminer la composition des TAG, nous avons adopté la méthode de Coleman (***Coleman, M.H, 1961et 1963***). Si *x* est le pourcentage d'un acide gras dans le triglycéride et *y* le pourcentage de cet acide gras en position Sn-2 dans le triglycéride, alors que le quotient $\frac{3x-y}{2}$ représente le pourcentage de l'acide en position Sn-(1+3). De la même manière, on peut calculer le pourcentage de tous les acides gras de l'huile de l'arganier dans les trois positions Sn-2 et Sn-(1+3). Le **Tableau. II.7.** regroupe ces valeurs.

Tableau. II.7. Taux des différents AG dans les positions Sn-2 et Sn-1+3

Acide gras	**P**	**S**	**O**	**L**
x	14.5	7.21	53.71	25
3x	43.5	21.63	161.13	75
y	5.2	/	58.01	36.8
(3x – y) / 2	19.15	10.81	51.56	19.1

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

En suivant le même calcul, nous obtenons les proportions de tous les différents isomères des triglycérides contenus dans l'huile de l'arganier. Les proportions relatives des différentes molécules sont regroupées dans le **Tableau.II.8.a.**

Nous avons aussi calculé les taux des différents isomères des TAG par une méthode statistique décrite dans la littérature dite 1-random, 2-random, 3-random. Dans cette méthode on suppose que les acides gras sont distribués au hasard sur les trois positions de la molécule de glycérol, la proportion statistique de chacun des TAG est calculée de la façon suivante :

Si a, b et c sont respectivement les proportions des acides gras A,B et C dans les TAG déterminés par CPG ; les proportions sont :

- Pour une molécule composée par un seul acide gras A

  $\%AAA = (\%A_1)\ (\%A_2)\ (A_3)/10000$

- Pour une molécule composée par deux acide gras A et un acide gras B

  $\%ABA = (\%A_1)\ (\%B_2)\ (A_3)/10000$

$$\%AAB = (\%A_1)\ (\%A_2)\ (B_3)\ (2)/10000$$

- Pour une molécule composée par trois acides gras différents A, B et C

$$\%ABC = (\%A_1)\ (\%B_2)\ (C_3)\ (2)\ /10000$$

$$\%ACB = (\%A_1)\ (\%C_2)\ (B_3)\ (2)\ /10000$$

$$\%BAC = (\%B_1)\ (\%A_2)\ (C_3)\ (2)\ /10000$$

Ces dernières formules tiennent compte de la distribution réelle des acides gras sur la molécule de glycérol. En réalité, et d'après les résultas obtenus lors de l'hydrolyse enzymatique des TAG, les positions Sn-1 et Sn-3 du glycérol sont occupées préférentiellement par les acides gras saturés et la position Sn-2 est estérifiée par les acides gras insaturés C18.

Egalement nous avons déterminé la composition triglycéridique de l'huile de l'arganier par la méthode de position de Gunstone. Le détail de calcul de toutes les méthodes utilisées pour la détermination de la composition triglycérique de l'huile est donné dans l'annexe.

A partir des méthodes de détermination des TAG présentés, nous avons calculé les proportions probables des divers isomères de position en tenant compte des concentrations mesurées pour les acides gras en position Sn-2 déterminées par CPG (**Figure.II.8.**).

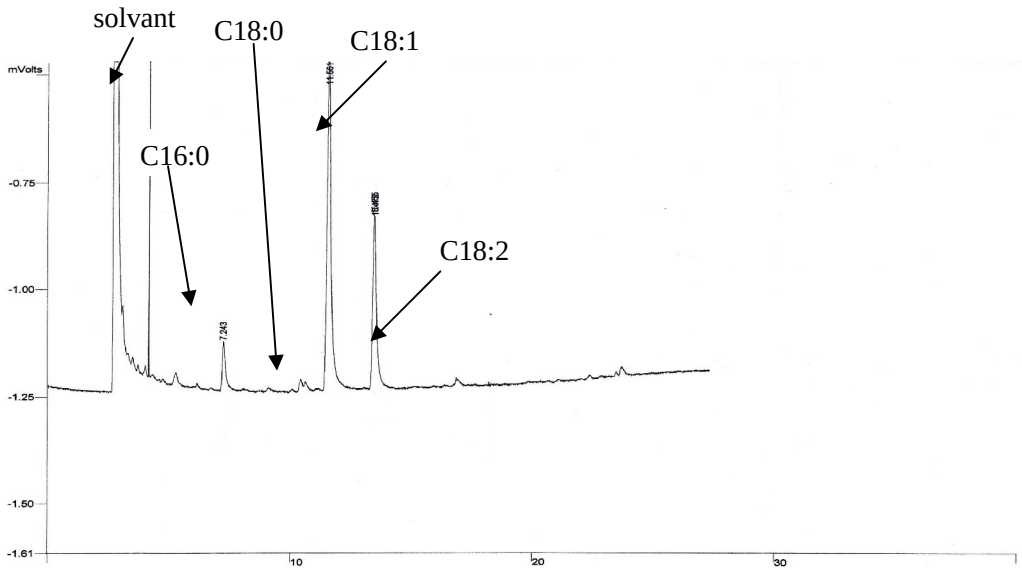


Figure.II.8. Chromatogramme des EMAG des monoglycérides -2

Les **Tableaux.II.8** regroupent les diverses espèces moléculaires de TAG contenus dans l'huile.

Dans l'huile du fruit de l'arganier, nous retrouvons systématiquement de façon majoritaire les TAG suivants : POO, PLO, OOL, OOO, LLO et PPO **Figure.II.9**. Il est clair que l'huile étudiée est riche en TAG formés de la combinaison des acides gras oléique, linoléique palmitique et stéarique ; acides gras que l'on retrouve couramment dans la composition des huiles végétales.

La position Sn-2 est estérifiée principalement par les acides mono et di-insaturés en 18 atomes de carbone.

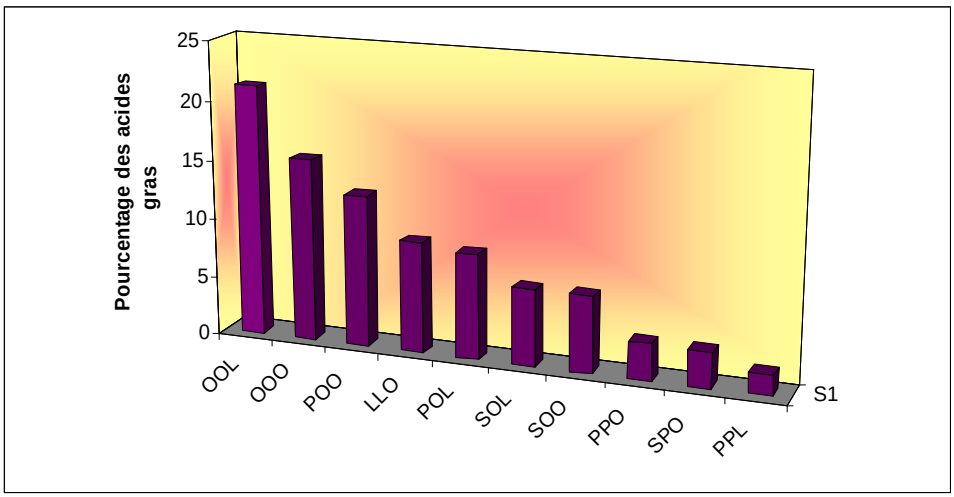


Figure.II.9. Les principaux triglycérides contenus dans l'huile de l'arganier

Les triglycérides de l'huile de l'arganier sont largement représentés par des espèces moléculaires possédant l'acide oléique (OOO, O(LO), O(OP), O(PP), ainsi que l'acide linoléique [L(OO), L(LO), L(PO)] en position Sn-2.

Le **Tableau.II.9** montre le pourcentage des quatre catégories de classes des TAG : trisaturés (GS_3), disaturés (GSU_2), monosaturés (GSU_2) et tri-insaturés (GU_3). Il est clair que le tripalmitin (PPP) est le composé majoritaire triglycéridique de la classe GS_3. Les triglycérides disaturés atteint une teneur de 9 %. Cette valeur considérable est due à la présence de 14,5 % d'acide palmitique. D'une façon générale les triglycérides de type GSU_2 qui contiennent de l'acide palmitique constituent une fraction considérable dans l'huile d'arganier. Ce résultat est justifié par la présence d'une proportion élevée de palmito-oleolinolein POL (8.86%), qui est le composé principal des TAG de type GSU_2.

Tableau.II.9. Les quatre catégories des triglycérides

	Coleman	**Gunstone**	**1**	**2 et 3**
GS_3	0.47		/	/
GS_2U	9.3		5.86	/
GSU_2	43.95		44.3	65.1
GU_3	45.2		46.31	36.12

Les proportions élevées des acides oléique, linoléique et palmitique justifient la prédominance du triglycéride POL. Il est très clair que le pourcentage du POO est supérieur à celui de PLL car la quantité de l'acide oléique dans l'huile est supérieure à celle de l'acide linolénique.

La somme des triglycérides insaturés (GU_3) représente plus de 43.95%. Le dioleolinoléin OOL (21.2%) représente le taux le plus élevé. Le triolein OOO (15.42%) et le dilonoléo-olein LLO (9.35%) sont les TAG ayant les pourcentages les plus élevés dans l'huile.

La présence de l'acide oléique comme composé majoritaire dans l'huile et dans les monoglycérides-2 montre sa contribution d'environ 87 % dans les triglycérides totaux comme de mono et dilinoléin. Le disaturés oléin (S2O) représente environ 6.85% des TAG totaux, alors que les TAG de type saturés oléin (SO2) ont des taux plus élevés 19.26%, par contre le taux du trioléin (OOO) est de15.42 %.

D'un autre coté l'acide linoléique contribue aussi dans la composition des TAG de l'huile de l'arganier, on le trouve sous forme (SOL) oléo-linoléique saturé et qui représente 6.48% des TAG totaux, et saturé dilinolein (SLL) dont sa teneur atteint la valeur 4.4%. Le troisième représentant triglycéride de l'acide linoléique est le oléo-dilinolein (OLL) avec un pourcentage de 9.35% ; le trilinoléin (LLL) est représenté par un taux très faible 1,34%.

Les présents résultats sont en accords avec la théorie de la distribution de position représentée par le graphique publié par Gunstone (**Figure.II.10**).

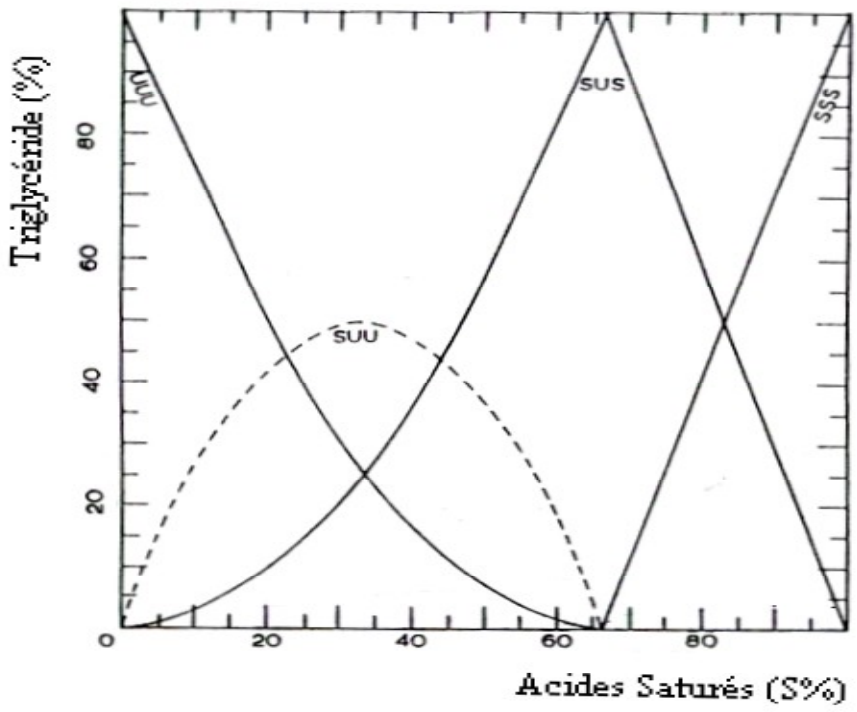


Figure II.10. Composition glycéridique pour la distribution positionnelle (GUNSTONE)

Tableau.II.8.a. Composition triglycérique de l'huile de l'arganier selon Coleman

	%	TAG	%	TAG	%	Totale
PPP	0.19					0.19
PPS	0.11					0.11
PPO	1.02	POP	2.11			3.13
PPL	0.38	PLP	1.34			1.72
SPO	0.58	SOP	2.38			2.96
SPL	022	SLP	1.58			1.74
OPO	1.38	POO	11.42			12.8
LPL	0.19	LLP	2.68			2.87
POL	4.22	LPO	1.02	PLO	3.62	8.86
SLS	0.34					0.34
SOS	0.76					0.76
SPS	0.06					0.06
SLL	1.52					1.52
SOO	6.46					6.46
SOL	2.38	SLO	4.1			6.48
OOO	15.42					15.42
OOL	11.42	OLO	9.78			21.2
LLO	7 .24	LOL	2.11			9.35
LLL	1.34					1.34
Autres						2.7

Tableau.II.8.b. Les triglycérides de l'huile de l'arganier

Coleman	**%**	**Gunstone**	Théorie1	Téorie 2 et 3	**Méthode aléatoire**
PPP	0.19	P,P,P	ND	ND	0.1
PPS	0.11	P,P,S	ND	ND	0.21
POS	2.35	P,O,S	3.2	/	2.4
OPS	0.58				0.67
SOS	0.76	S,O,S	0.79	/	0.68
SLS	0.34	S,L,S	0.37	/	0.43
SPS	0.06	S,P,S			0.06
OPP	1.02				1.02
POP	2.11	P,O,P	3.2	/	2.12
OOP	11.42				11.45
OPO	1.38	P,O,O	13.78	20.25	1.38
SOO	6.46	S,O,O	6.85	10.07	6.46
PLP	1.34	P,P,L	1.5	/	1.35
PPL	0.38				0.3
PLS	1.52	P,S,L	1.49	/	1.52
SPL	0.22				0.21
OOO	15.42	O,O,O	14.72	11.48	15.42
POL	8.44				4.24
LPO	2.04	P,O,L	12.83	18.85	1.02
PLO	7.24				7.26
OLS	4.1	S,O,L	6.38	9.37	4.1
SOL	2.38				2.13
OOL	11.42	O,O,L	20.55	16.03	11.42
OLO	9.78				9.78
PLP	2.68	P,L,L	2.98	4.38	1.35
LPL	0.19				0.19
SLL	1.52	S,L,L	1.48	2.18	1.52
OLL	7.24				7.25
LOL	2.11	O,L,L	9.56	7.46	2.11
LLL	1.34	L,L,L	1.48	1.15	1.34

Chapitre-III-
Analyse de certains composés mineurs

I. La fraction insaponifiable

I.1. Introduction

La fraction insaponifiable ou partie non glycéridique est par définition l'ensemble des constituants d'une huile ou d'une graisse qui, après action d'un hydroxyde alcalin (saponification), sont solubles dans les solvants classiques des lipides (solvants apolaires ou peu polaires).

L'étude de la fraction insaponifiable est complexe du fait de la diversité de ses constituants d'une part, et de la faible quantité de matériel de départ disponible d'autre part. En effet, contrairement aux graisses animales, le taux de l'insaponifiable des huiles végétales est relativement faible (0,2 à 2,0 % m/m) (***Ucciani, E, 1995 et Karleskind, A, 1992)***, à l'exception du beurre de karité qui présente une teneur en insaponifiable d'environ 10 % (***Karleskind, A, 1992***) (**Tableau III.1.**).

Tableau III.1. Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales

Huile	**Teneur en insaponifiable (%m/m)**
Tournesol	0,5 – 1,5
Colza	0,7 – 1,8
Soja	0,5 – 1,6
Maïs	0,8 – 2,0
Pépins de raisin	0,8 – 1,5
Carthame	1,0 – 1,5
Sésame	0,5 – 1,5
Oeillette	0,5 – 1,3
Lin	0,3 – 1,2
Amande	0,3 – 1,2
Noisette	0,5 – 0,7
Noix	0,5 – 1,0
Pépin de cassis	1,0 – 1,2
Citrouille	1,2
Courge	2,1
Melon	1,0
Germe de blé	3,0 – 4,0
Arachide Afrique	0,6- 1 0
Arachide Amérique du sud	0,6 – 0,9
Coton	0,6 – 1,5
Coprah	0,6 – 1,5
Palmiste	0,3 – 0,8
Beurre de cacao	0,3 – 0,5
Karité	7,0 – 10,0
Olive vierge	0,4 – 0,8
Palme	0,5 – 1,2
Avocat	1 – 12,0

Les différentes classes de composés pouvant être présentes dans la fraction insaponifiable sont les suivantes :

- les hydrocarbures: notamment les hydrocarbures terpéniques en C30 et C40 (carotènes), ces derniers étant caractérisés par des systèmes polyéthyléniques conjugués ;
- les xanthophylles: qui dérivent des précédents par oxydation (caroténoïdes) contenant une ou plusieurs fonctions oxygénées ;
- des alcools aliphatiques supérieurs (alcools gras de 16 à 30 atomes de carbone) qui, lorsqu'ils sont estérifiés, forment des cires de protection de certains tissus ;
- des aldéhydes et des cétones responsables des flaveurs ;
- des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E). La vitamine E et les composés voisins sont désignés globalement par les termes de tocophérols et tocotriénols. Ces vitamines liposolubles sont observées de façon systématique dans les lipides d'origine naturelle ou avant la saponification. Elles sont également présentes sous forme libre et sous forme d'esters d'acides gras ;
- des composés triterpéniques provenant de la cyclisation du 2,3-époxysqualène. Cette classe de composés regroupe les alcools triterpéniques, les 4α-méthylstérols, les stérols et les dérivés polyfonctionnels de ces composés ;
- des cétones triterpéniques rarement rencontrées dans le règne végétal ;
- les stérols, les 4α-méthylstérols et les alcools triterpéniques, qui, par leur nature et leurs propriétés, constituent une véritable empreinte digitale de l'huile. Ils permettent son identification et par la suite sa détection dans un mélange, d'où l'intérêt en cas de fraudes éventuelles.

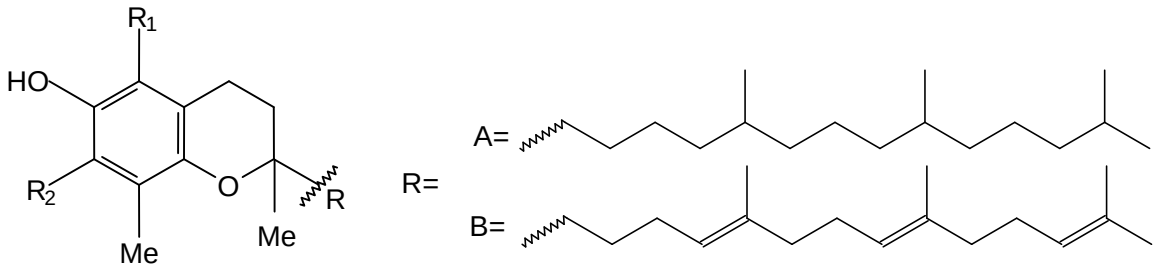
Par ailleurs, ces composés présentent un intérêt chimiotaxonomique important. Les plantes d'une même famille botanique présentent le plus souvent des filières triterpéniques voisines.

Après saponification de l'huile, l'insaponifiable est extrait par l'éther diéthylique. L'huile de l'arganier que nous avons étudiée contient 1,77 % (m/m) d'insaponifiable. Cette valeur indique que l'insaponifiable est une fraction mineure de l'huile. On remarque que la teneur en insaponifiable de l'huile de l'arganier est comparable à d'autres huiles végétales (**Tableau III.1**)

I.2. Etude des tocophérols

I.2.1. Introduction

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possédant un noyau chromane portant en carbone 2 une chaîne latérale tri-isopropénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols. La substitution du noyau aromatique par des groupements méthyles conduit aux huit combinaisons naturelles données dans la **Figure.III.1.**



		Composés	
R_1	R_2	A	B
Me	Me	α-tocophérol	α-tocotriénol
H	Me	β-tocophérol	β- tocotriénol
Me	H	γ-tocophérol	γ- tocotriénol
H	H	δ-tocophérol	δ- tocotriénol

Figure III.1. Structure des différents tocophérols et tocotriénols

Les tocophérols sont généralement des constituants mineurs des corps gras végétaux ; leur présence a été déterminée pour la première fois par EVANS dans l'huile de germe de blé. Ils possèdent un pouvoir vitaminique (vitamine E) lié aux propriétés antioxydantes. Ils existent principalement sous forme monomère (***Mordret, F, 1992***). Ces composés sont classés dans le groupe des vitamines liposolubles (vitamine E de fertilité). Bien que leurs structures diffèrent peu, leurs effets sont très variables.

En effet, la forme α présente l'activité vitaminique la plus importante, tandis que l'isomère γ est plus efficace comme antioxydant. Cet isomère γ économise l'oxygène de la respiration cellulaire,

protége les substances oxydables. De plus, il intervient dans le métabolisme des graisses en empêchant la dégradation des acides gras (***Mordret, F, 1992 - Capella, P, 1960***).

La recherche médicale a démontré les effets bénéfiques de la vitamine E, entre autres dans le retard de l'évolution de l'infection par le virus HIV en SIDA clinique et dans la réduction des symptômes qui y sont associés. Des études cliniques sont requises pour illustrer les effets bénéfiques potentiels de ces nutriments dans la prolongation de la période asymptomatique de l'infection par le virus en HIV en combinaison avec un traitement par un médicament antiviral chez les patients souffrants du SIDA (***Veris, H, 1995***).

I.2.2. Dosage quantitatif des tocophérols

I.2.2.1. Dosage des tocophérols totaux

Nous avons adopté la méthode de dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel (***Emmerie, A et Engel. C, 1939***). Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier, en présence de réactifs spécifiques comme l'orthophénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm et est très élevé.

Ce dosage peut être réalisé soit à partir de l'insaponifiable (***Paquot, C et al., 1962***), soit à partir de l'huile (***Flanzy, M et al., 1964***). Chacun de ces dosages a ses avantages et inconvénients. Lorsque l'on effectue l'analyse à partir de l'huile brute, on ne tient pas compte des composés tocophéroliques engagés dans des combinaisons de type esters. En effet, la réaction d'oxydo-réduction, conduisant à des composés de type quinonique, ne peut avoir lieu. L'analyse effectuée ne tient compte que des tocophérols libres. Dans le cas du dosage à partir de l'insaponifiable, on dose les tocophérols totaux, initialement libres et estérifiés. Lors des différentes manipulations nécessaires, une dégradation partielle de ces composés peu avoir lieu, sauf cas particulier des huiles végétales pauvres en esters tocophéroliques. En fin de compte, les deux méthodes de dosage donnent des résultats assez proches.

Une droite d'étalonnage tracée à partir d'α-tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g/l., (**Figure.III.2.**) A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution fille plus 1ml de réactif (phenantroline) et 0.5ml F_eCl_3 (solutions éthaloniques). Après 3min on mesure l'absorbance à 510nm.

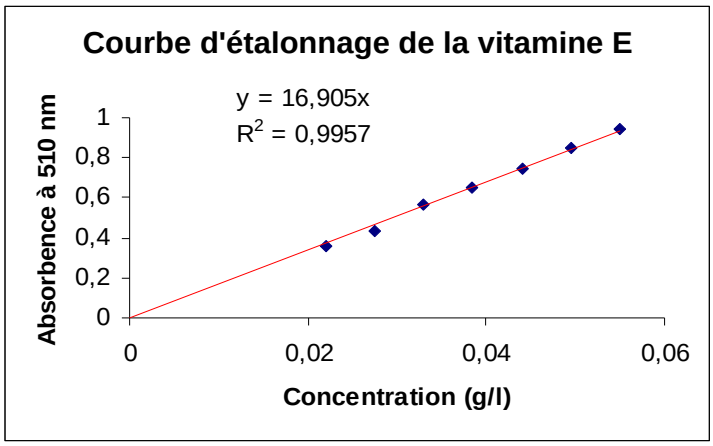


Figure.III.2. Courbe d'étalonnage de la vitamine E

Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir de plusieurs extraits sur l'huile extraite à froid et à chaud, sur l'extrait des lipides polaires et sur l'insaponifiable. Les résultats de ce dosage sont consignés ci-dessous (**tableau III.2**)

La teneur en tocophérols totaux varie d'un extrait à l'autre, elle atteint 444.2 mg /kg quand l'extraction est réalisée à froid et 944,3 mg/kg lorsque l'extraction est faite à chaud ce qui montre que le mode d'extraction influe sur la quantité des tocophérols totaux de plus, le chauffage augmente le taux des lipides ainsi, la teneur en tocophérols totaux avec un ordre plus que le double.

Ces valeurs comparées à la teneur en tocophérols des huiles d'olive (350 mg/kg), de pépins de raisin (700 gm/kg), de mais (900 mg/kg) nous amène à dire que l'huile d'Argan est riche en tocophérols, ce qui lui confère une importante résistance à l'oxydation et une action vitaminique indéniale (***Karleskind, A, 1992***).

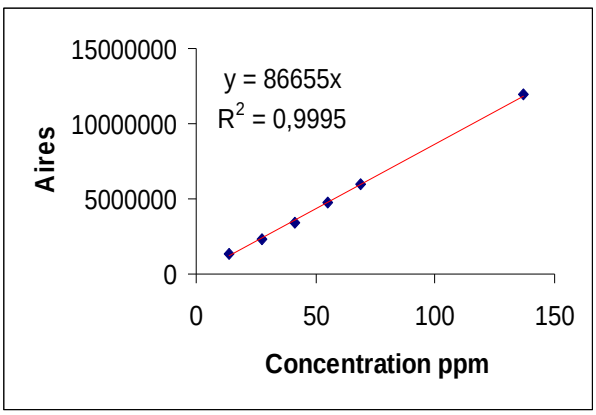
Tableau.III.2. Quantité des tocophérols dans l'huile d'arganier

	Quantité (mg/kg)
Huile extraite à chaud	944.3
Huile extraite à froid	444.2
A partir de l'insaponifiable	1576.5
Lipides neutres	682

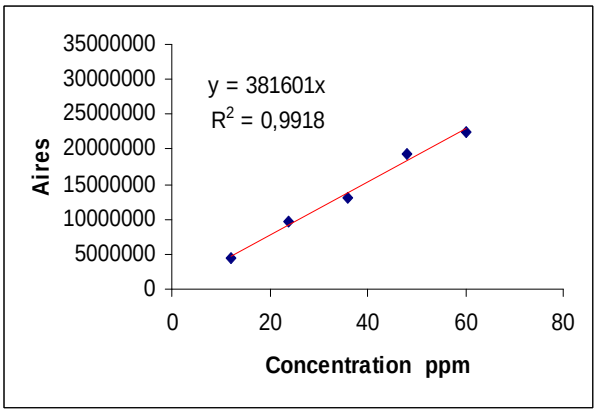
I.2.2.2. Composition de la fraction tocophérolique

Le dosage des tocophérols individuels peut être réalisé soit par CPG (***Meijboom, P.W et al., 1979-Mordret, F et al., 1978***), soit par CLHP (***Deldime, P et al., 1980***). Nous avons choisi cette dernière technique car elle donne de meilleurs résultats. Nous avons effectué l'analyse directement sur l'huile. Nous avons utilisé une colonne apolaire à phase inverse (RP18) et un mélange méthanol/acétonitrile (70:30, v/v) comme éluant. La détection est faite par fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et pour une longueur d'onde d'émission de 330 nm. L'identification des différents tocophérols présents dans l'huile de l'arganier est faite par la co-injection des tocophérols étalons (standards) (α-, β-et δ- tocophérols). Rappelons ici que la colonne inverse ne peut pas séparer les deux isomères β et γ. Un étalonnage externe nous a permis de quantifier chaque tocophérol dans l'huile **Figure.III.3.**

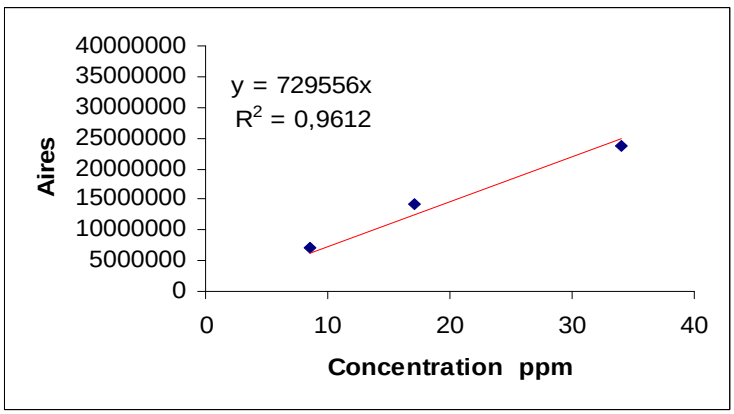
L'étude des chromatogrammes CLHP de l'huile du fruit (**Figure.III.4**.) et des tocophérols étalons (**Figure.III.5.**) nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le **Tableau.III.3.**



-a-



-b-



-c-

Figure.III.3. Courbes d'étalonnages externes
-a- l'α- tocophérol, **-b-** β- tocophérol, **-c-** γ- tocophérol

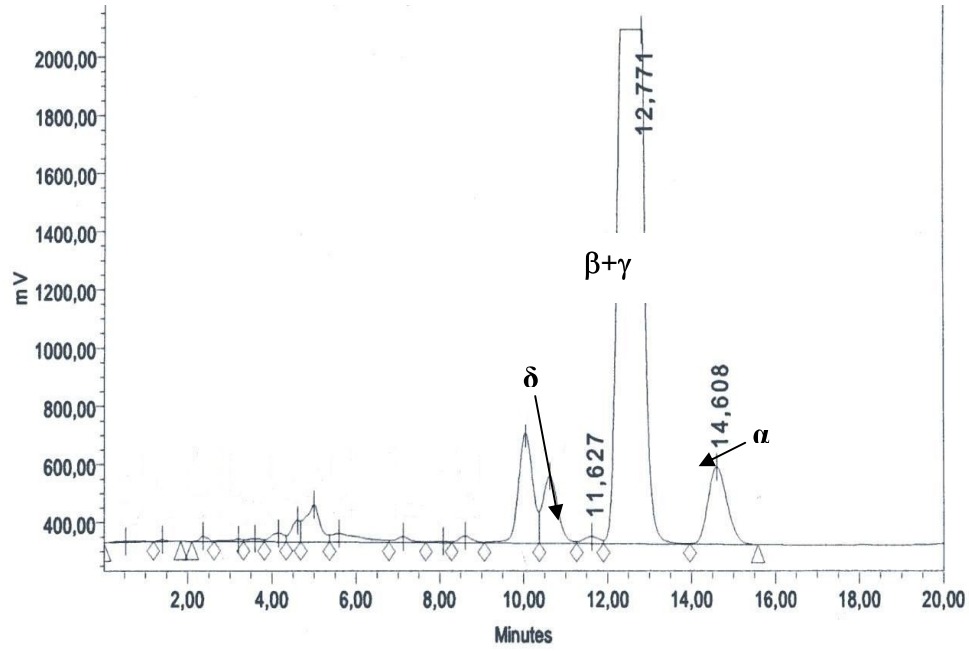


Figure.III.4. Chromatogramme CLHP de la fraction tocophérolique de l'huile de l'arganier

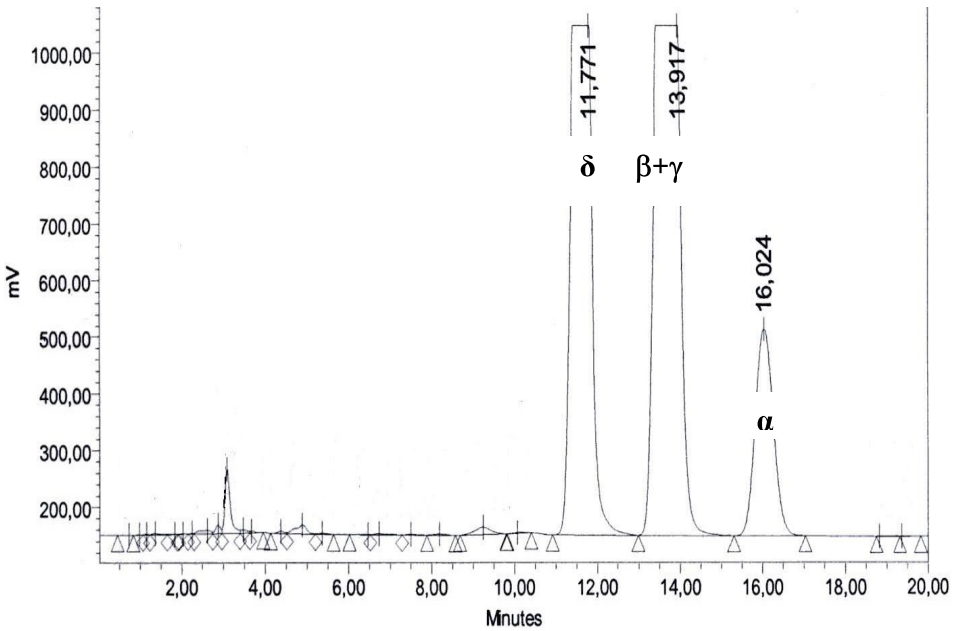


Figure.III.5. Chromatogramme CLHP des tocophérols étalons

Tableau.III.3. Composition de la fraction tocophérolique de l'huile de l'arganier

Tocophérols	*%*	*mg / kg*
α-tocophérol	31.62	325
(β+γ)- tocophérol	68.1	700
δ- tocophérol	0.28	2.86
Total	***100***	***1027.8***

L'analyse des tocophérols de l'huile de l'arganier par CLHP fait apparaître une très forte prédominance des isomères (β+γ)-tocophérol avec une teneur de 700mg / kg suivi de α-tocophérol avec 325mg/kg. Si on compare nos résultas à ceux trouvés par Charrouf, on remarque une très grande différence et que les valeurs des teneurs des tocophérols individuels sont inversées. A notre avis ce grand écart dans les valeurs peut-être dû ; soit à la nature des espèces étudiées, soit aux conditions d'analyses chromatographique car le chromatogramme CLHP présenté par Charrouf est obtenu en utilisant une colonne normal de silice et un système d'élution hexane-alcool isopropylique (99 :1 v/v) et une détection par UV à 295 nm ***(Charrouf. M, 1984)*** En plus il a utilisé l'alpha tocophérol comme étalon externe pour identifier et quantifier les autres isomères de tocophérols chose qui n'est pas toujours juste car les coefficients de réponse des tocophérols ne sont pas toujours égaux.

Il faut noter que la valeur de la teneur en tocophérols totaux trouvée par le dosage colorimétrique (444 mg / kg) est trop inférieure à celle déterminée par CLHP (1027.8 mg / kg), soit une différence de 583.8 mg / kg. On peut expliquer cette grande différence que la courbe d'étalonnage utilisée lors de la quantification des tocophérols totaux par colorimétrie est réalisée avec l'isomère α-tocophérol alors que l'analyse par CLHP montre que le (β+γ)-tocophérol est le plus dominant dans l'huile de l'arganier. Comme la pente de la courbe d'étalonnage dépend de la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'isomère utilisé comme étalon dans le dosage, donc il est tout à fait clair que les valeurs des teneurs en tocophérols totaux ne soient pas les mêmes dans les deux méthodes de quantification. Dans ce cas, nous confirmons que les résultats obtenus par CLHP sont les plus fiables car la détection des tocophérols séparés est faite par fluomètrie, technique plus sensible que l'UV.

En conclusion on peut dire que l'huile de l'arganier est une huile à forte teneur en γ- tocophérols qui contribue fortement à la protéger de l'oxydation ; α-tocophérol qui lui confère une importante activité vitaminique E.

I.3. Etude des stérols

I.3.1. Description générale des stérols

Les stérols sont universellement répandus chez les êtres vivants, aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. On les trouve également chez les micro-organismes.

La plupart des organismes Eucaryotes ont besoin de stérols, qui ont un rôle architectural et interviennent comme une partie intégrante des membranes cellulaires.

Les animaux sont capables de synthétiser certains stérols. Le cholestérol étant l'exemple le plus répandu. D'autres peuvent être contenu dans l'alimentation. En effet, chez les végétaux, les structures stéroliques sont beaucoup plus nombreuses, certaines semblent d'ailleurs caractéristiques d'une famille. Ainsi, les stérols ont un rôle chimiotaxonomique beaucoup plus fin que d'autres composés lipidiques comme les acides gras.

Les phytostérols sont présents dans la fraction lipidique. Dans les huiles de graines ou de fruits, ils sont généralement présents en faibles teneurs. Ils peuvent être rencontrés sous forme libre ou combinée, dont la principale est l'estérification par un corps gras.

Les stérols sont des alcools polycycliques à point de fusion élevés. Ils sont stables, sans odeur et sans goût (***A.J.C, 1962***). Ils sont relativement inertes et contribuent peu aux propriétés des huiles bien qu'ils les caractérisent mieux que ne le font les acides gras.

Les stérols sont des composés tétracycliques. Ils comportent le plus souvent 27, 28 ou 29 atomes de carbone. Le squelette de base est le noyau cyclopentanophénanthrène représenté sur la **Figure.III.6.**

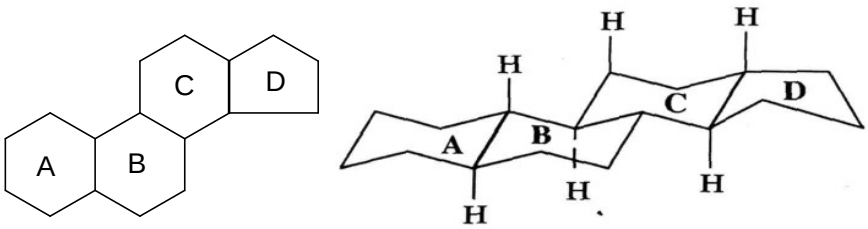


Figure.III.6. Structure du cyclopentanperhydrophénanthrène

Le stérol le plus abondant dans le règne végétal est sans conteste le sitostérol suivi du campestérol, puis du stigmastérol et enfin le Δ_5-avénastérol. Le brassicastérol est présent uniquement chez les *Brassicaceae.* On rencontre certaines familles chez les Δ_7-stérols où ceux-ci sont prépondérants. C'est le cas entre autres des familles botaniques des *Sapotacea (**Farines, M. et***

al., 1984). Le cholestérol, longtemps considéré comme exclusivement animal, a été mis en évidence chez de nombreux végétaux (***Hugel, M.F et al., 1964 - Noda, M et al., 1988***), cependant en petite quantité par rapport aux autres stérols. Le 22-déhydrocholestérol, le démostérol, le 24-méthylène cholestérol et notamment le fucostérol sont caractéristiques des algues marines. Le Δ_7-chlostérol, le zymostérol, le fécostérol et l'ergostérol sont plus fréquemment rencontrés chez les champignons (***Kritchevsky, D, 1963***).

I.3.2. Dosage des stérols

Il s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (***Naudet, N et al., 1986, Barreto. M, 2005)***) basé sur une réaction colorée spécifique des 3 β-hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm.(Le réactif spectrale de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique).

A partir d'une solution choloroformique de cholestérol de concentration 1mg/ml, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de la concentration. On prend 1ml de chaque solution et on ajoute 2 ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 minutes à l'obscurité.

On mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe **Figure.III.7.**

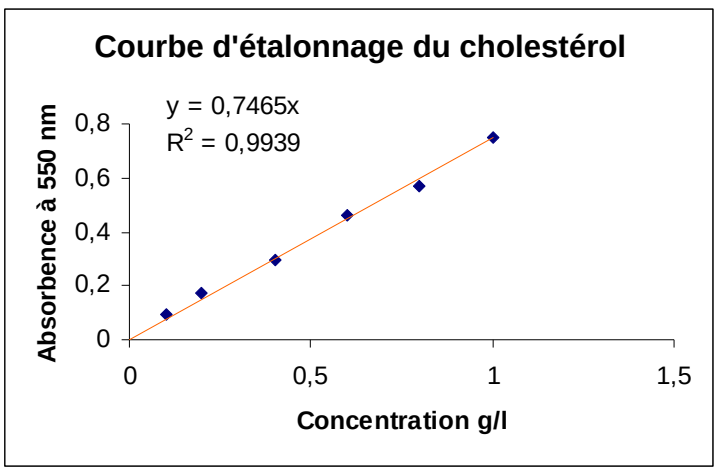


Figure.III.7. Courbe d'étalonnage du cholestérol

Les échantillons sont traités de la même manière et la teneur en stérol sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **Tableau.III.4.**

I.3.3. Résultats

Les résultats de cette analyse montrent que l'huile étudiée contient des Quantités très importantes en stérols. Toutefois les valeurs trouvées sont supérieures à celles collectées de la littérature, car la valeur trouvée par ***N.Radi (2004)*** est de 1600mg/kg, par contre les valeurs de ***Z.Charrouf (1995)*** s'échelonnent entre 1300 et 2300mg/kg. Ces résultats sont beaucoup plus loin de nos valeurs et cela peut-être expliquer aux interférences d'autres composés qui possèdent des structures chimiques semblables à la structure stérolique comme les méthyls stérols et les alcools tritérpèniques , la vitamine D et le béta carotène.

Tableau.III.4. Quantité des stérols dans les huiles

Huile	Concentration (mg/kg)
Huile extraite à chaud	5910
Huile extraite à froid	5058
Extrait brut chloroforme :MeOH	7730
Lipides neutres	8450

II. Etude des acides gras des lipides polaires

Les lipides polaires constituent une fraction mineure dans les huiles végétales, les plus répondus sont les phospholipides et les glycolipides.

II.1. les phospholipides

Les phospholipides sont des lipides contenant du phosphore sous forme d'esters de l'acide O-phosphorique. Nous allons voir quelles sont les structures habituelles de ces composés.

Les phospholipides peuvent se diviser en deux groupes : glycérophospholipides et sphingolipides, selon qu'ils contiennent un glycérophospholipides ou un squelette sphingolipides.

Les glycérophospholipides dérivent des esters de l'acide phosphorique en position 3 du glycérol. Leur squelette général est le suivant :

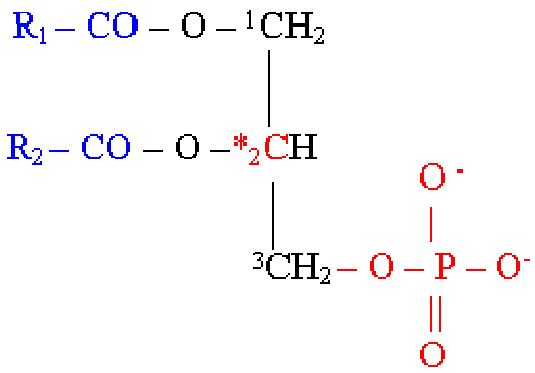


Figure.III.8. Le glycérophospholipide dérivé de l'ester de l'acide phosphorique

Acide phosphatidique = Glycérol + 2 Acides Gras + H_3PO_4

- Les deux acides gras ont une chaîne longue (≥ 14C), l'acide gras en position 2 est souvent insaturé.
- L'acidité de la molécule provient des 2 H mobiles libres de l'acide phosphorique.
- Au pH sanguin (7,35 – 7,45) les 2 fonctions acides sont ionisées.
- L'acide phosphatidique est un second messager intracellulaire.

II.1.1. Les glycérophospholipides (***Karleskind, A, 1992)***

Ils sont constitués d'acide phosphatidique + alcool

A. Nature de l'alcool

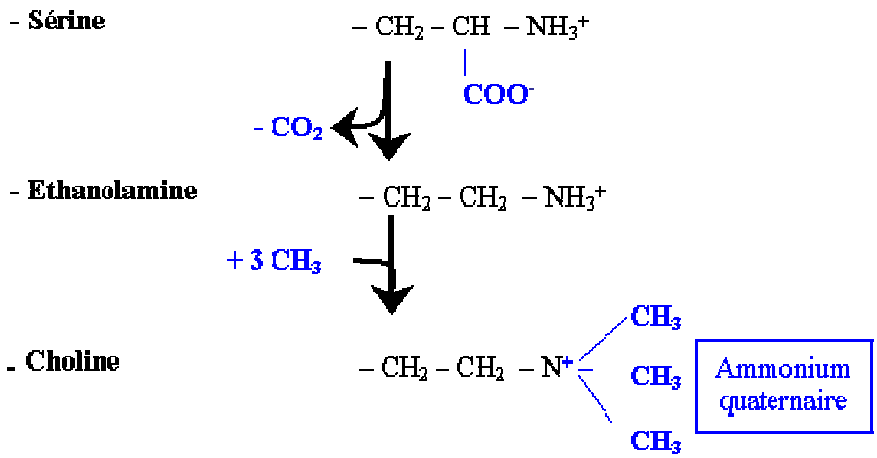


Figure.III.9. les glycérophospholipides

B. Les différentes classes de glycérophospholipides

Le lipide se forme par fixation d'un alcool sur l'acide phosphatidique.

Selon l'alcool, on obtient des classes différentes de lipides.

Phosphatidylsérines	= Acides Phosphatidiques + Sérine
Phosphatidyléthanolamines	= Acides Phosphatidiques + Ethanolamine
Phosphatidylcholines	= Acides Phosphatidiques + Choline
Phosphatidylinositols	= Acides Phosphatidiques + Inositol

B.1. Les Phosphatidyléthanolamines et Phosphatidylsérines

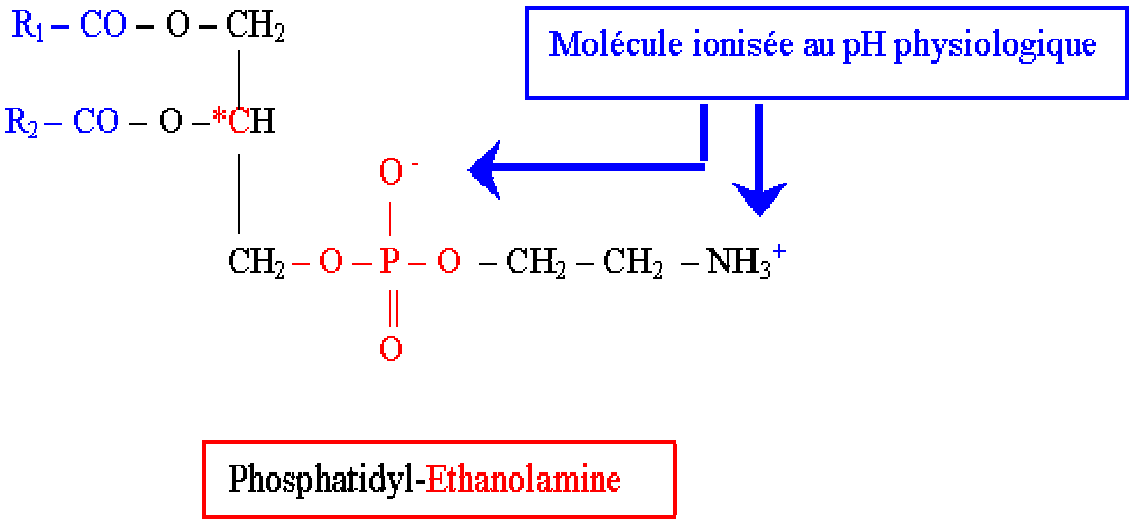


Figure.III.10. Les phosphatidyléthanolamines

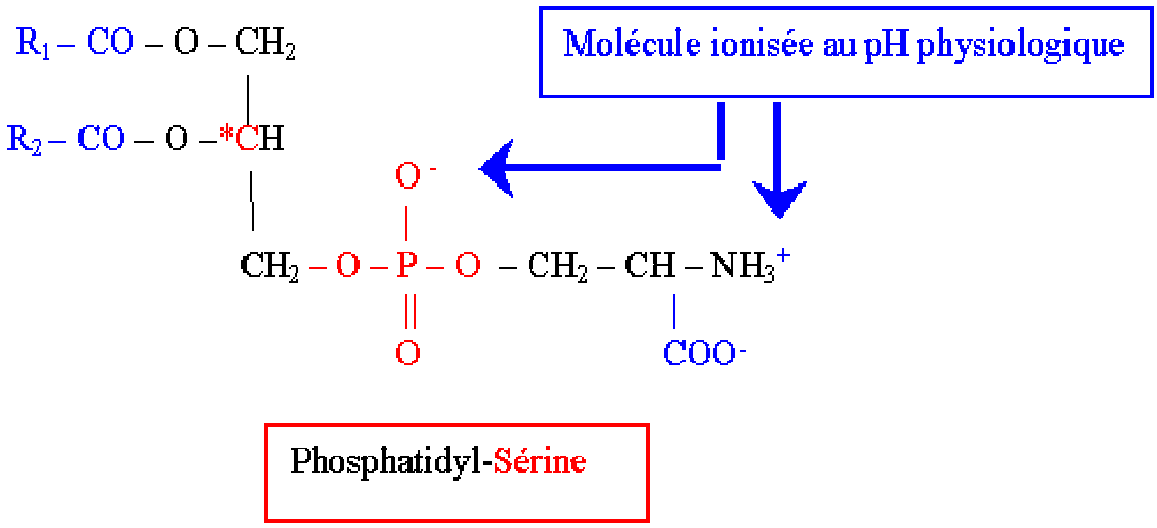


Figure.III.11. Les phosphatidylsérine

Au pH du sang (7,35 - 7,45) les molécules sont ionisées.

B.2. Les Phosphatidylcholines ou Lécithines

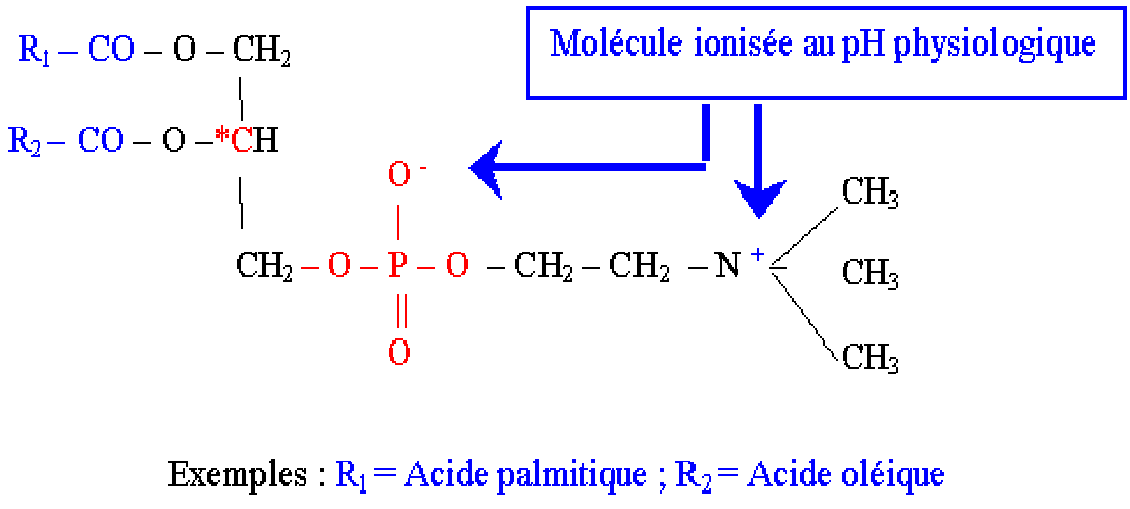
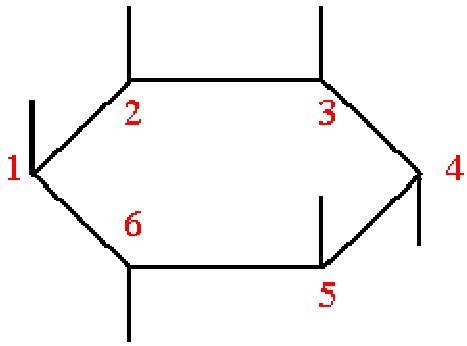


Figure.III.12. Les Lécithines

On les trouve dans le cerveau, le foie, le jaune d'oeuf.

B.3. Les Phosphatidylinositols

- Structure de l'inositol
    - L'inositol est un hexaalcool cyclique qui a 9 isomères possibles. Le myoinositol est le plus fréquent dans les lipides.



Myoinositol

Figure.III.13. Myoinositol

    - C'est un mésoinositol inactif sur la lumière polarisée.

- L'inositol 1, 4, 5 triphosphate ou IP_3 est un second messager

- Structure du phosphatidylinositol

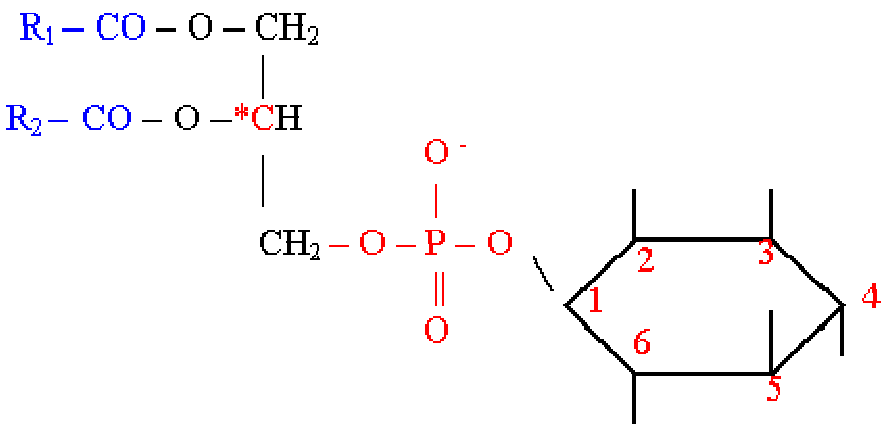


Figure.III.14. Phosphatidylinositol

Propriétés des Glycérophospholipides

- Ce sont des molécules amphipathiques (ou amphiphiles) car elles présentent 2 pôles :
  - l'un hydrophobe dû aux AG ;
  - l'autre hydrophile dû à l'ester phosphorique.
- Elles ont donc des propriétés identiques à celles des savons (émulsionnants, …).
- Ce sont des molécules amphotères car elles possèdent à la fois :
  - une fonction acide apportée par H_3PO_4
  - une fonction basique apportée par l'AA alcool (sérine, thréonine) ou par la choline.

II.1.2. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont les lipides dont l'acide gras est lié à une base azotée à longue chaîne (18-20 carbones) par une liaison amide.

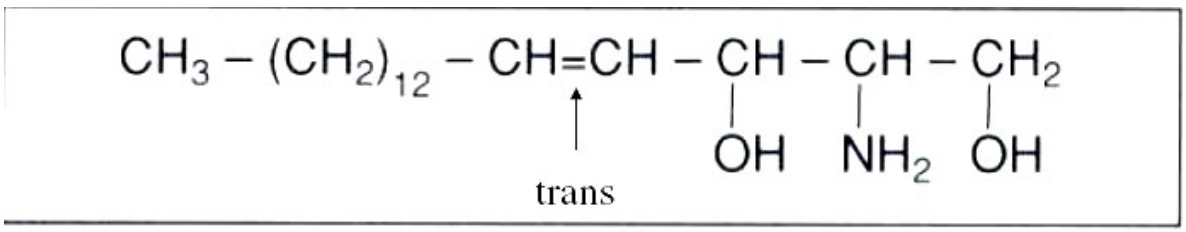


Figure.III.15. Les sphingolipides

- Cette structure ressemble à celle du glycérol (C1-C3) sur laquelle une chaîne apolaire insaturée se serait additionnée sur le C3.

- Structure de base de tous les sphingolipides : un acide gras R-COOH s'associe par liaison amide au groupement amine porté par le C2 de la sphingosine pour donner une famille de composés désignés céramides.

II.2. Les glycolipides

Les phospholipides sont toujours accompagnés de molécules non phosphorées à caractère amphiphile. Il s'agit principalement d'éthers de glycérides avec un mono ou un di saccharide :

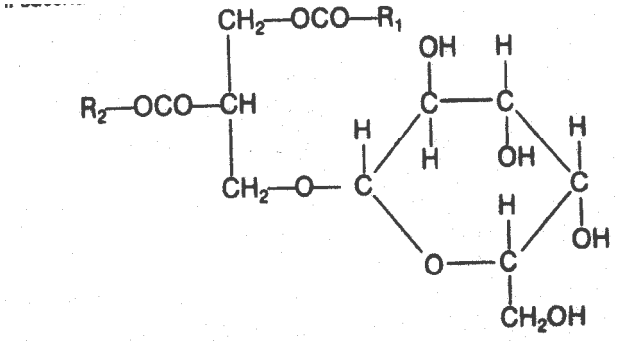


Figure.III.16. Monogalactosyl diglycéride

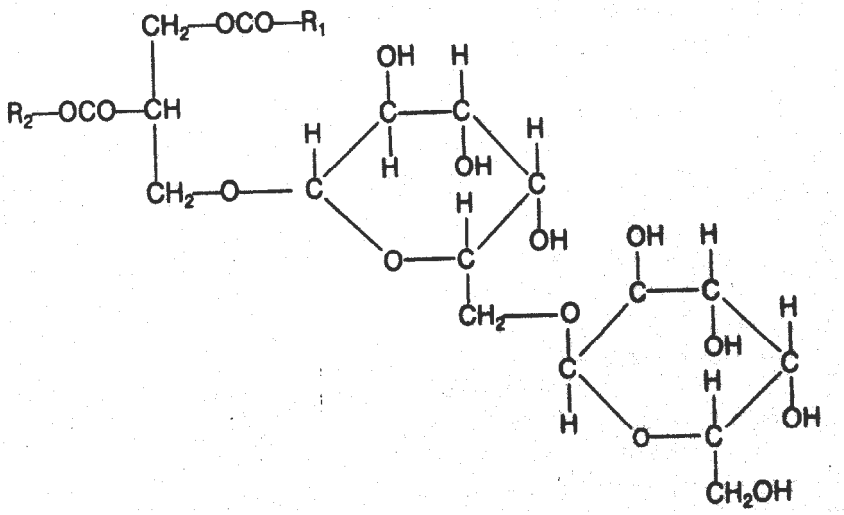


Figure.III.17. Digalactosyl diglycéride

Les céramides et les phytocéramides (amides d'acides gras avec la sphingosine ou la phytosphingosine) peuvent être liées à du galactose (règne animal) ou à du glucose (règne végétal). Les composés formés sont des cérébrosides.

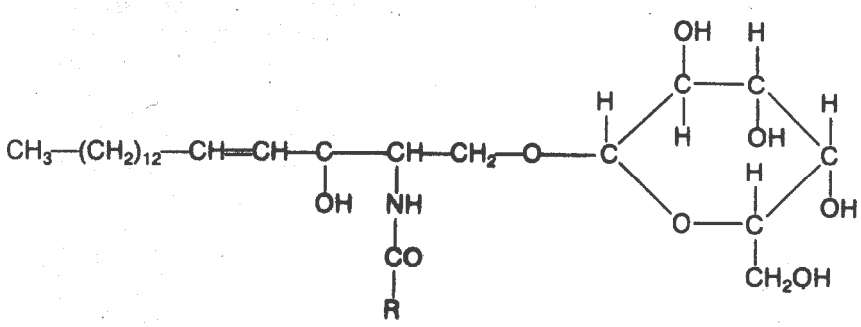


Figure.III.18. Cérébroside

II.3. Acides gras des lipides polaires de l'huile de l'arganier

Dans ce qui suit, nous allons présenter les méthodes qui nous on permit d'accéder à la quantification des phospholipides et à l'identification de leurs acides gras ainsi que les résultats que nous avons obtenus lors de leur analyse

II.3.1. Extraction

Les phospholipides sont des lipides polaires et par conséquent nous allons réaliser une autre extraction en utilisant un système de solvant d'extraction polaire. Dans la littérature, le solvant le plus utilisé est un mélange de chloroforme –méthanol (2/1 V/V).
Les lipides totaux ont été extraits à froid à partir de graines bien broyées pendant 24 heures avec un mélange chloroforme/méthanol (2 :1 V/V). L'extrait recueilli contient des substances non lipidiques. Nous avons éliminé une grande partie par solubilisation de l'extrait dans le chloroforme à température ambiante, la solution chloroformique ainsi obtenue est filtrée puis séchée sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est évaporé sous pression réduite, on obtient un rendement de 27,5% en lipides totaux.

II.3.2. Quantification des phospholipides

Le pourcentage en masse des phospholipides dans l'huile de fruit de l'arganier a été calculé suivant une méthode normalisée de dosage colorimétrique du phosphore (***AFNOR, 1969***).

Le principe de cette méthode est basé sur la minéralisation de 2g de l'échantillon d'huile, puis attaque nitrique des cendres. Formation, entre les ions phosphoriques et les ions vanadiques et molybdiques, d'un complexe phosphovanadomolybdique jaune qui absorbe à 460 nm. L'intensité de la coloration obtenue est une fonction de la concentration en phosphore qui est mesurée par un spectrophotomètre.

A partir d'une solution mère étalon à 1 mg par millilitre de phosphore, nous avons préparé des solutions filles de concentrations 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 et 0,1 mg de phosphore par millilitre, ajouter à chacune de ces solutions 2 ml de molybdate d'ammonium et 2ml de vanadate d'ammonium (respecter l'ordre). Laisser à l'obscurité pendant 20 minutes et faire la lecture à 460 nm. De ces solutions on a établi une courbe d'étalonnage reliant l'absorbance en fonction de la concentration en phosphore **Figure.III.19.**

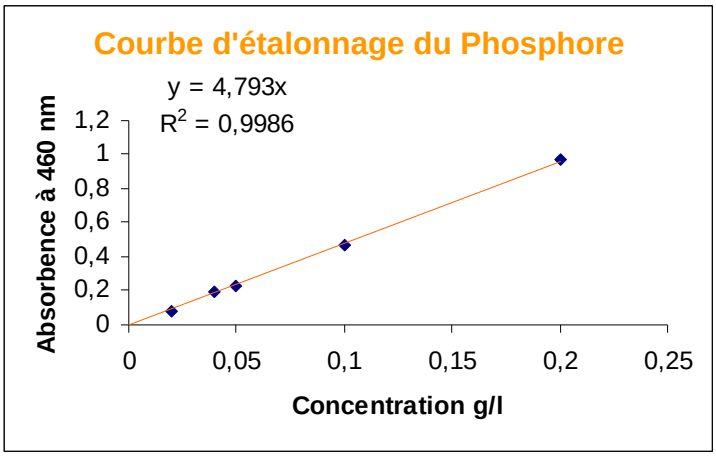


Figure.III.19. Courbe d'étalonnage du phosphore

A partir de cette droite on a calculé la concentration de phosphore dans notre huile qui est 0.153g/l.

Le pourcentage en masse de phosphore dans notre huile est égale à

$$0.004M.\ 100/E$$

Où

M est la teneur en milligramme par millilitre de phosphore lue sur la courbe d'étalonnage.

E est la masse en gramme de la prise d'essais.

Le pourcentage en masse de phosphatides est obtenu conventionnellement en multipliant le pourcentage en masse de phosphore par le coefficient 26. La teneur de l'huile en phospolipides est 0.8mg/100g.

II.3.3. Fractionnement des classes des lipides de l'huile de l'arganier

L'extrait lipidique obtenu est fractionné de façon à séparer les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides. Cette séparation est effectuée par flash chromatographie en mettant en contact 2.9253g de l'huile brute avec 5g de gel de silice. Différents solvants purs sont utilisée pour l'élution des lipides : le chloroforme qui permet d'éluer les lipides neutres, puis l'acétone avec lequel on recueillie les glycolipides, enfin le méthanol pour récupérer les phospholipides. Après séchage des solvants sur sulfate de sodium anhydre et filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite à 40 °C. Les extraits secs obtenus sont pesés afin de déterminer le pourcentage de chaque classe de lipide.

A partir des résultats du **Tableau.III.5**, on remarque que les lipides neutres occupent une proportion très importante dans l'extrait brut comparativement aux glycolipides et phospholipides.

La composition massique de l'extrait brut est 83.42% de lipides neutres, 2,09 de phospholipides si en admettant que le méthanol n'élue que les phopholipides et une quantité plus faible de glycolipides 1,56%.

II.3.4. Préparation d'esters méthyliques d'acides gras de l'huile brute et des différentes classes de lipides :

La préparation des esters méthyliques d'acides gras de l'huile brute et des différentes classes des lipides : lipides neutres, glycolipides et phospholipides ainsi l'analyse des EMAG par CPG est réalisée de la même façon. La composition en acides gras de l'huile et des trois classes des lipides polaires de l'huile de l'arganier est donnée dans le **Tableau.III.5**. D'après une première vision on peut remarquer que toutes les fractions renferment les acides gras habituels rencontrés dans les huiles végétales mais avec des proportions très variables.

La **Figure.II.20** représente le chromatogramme, obtenu des esters méthyliques issus de la fraction des lipides neutres.

Les lipides neutres sont essentiellement constitués d'acides gras en C16 saturé, et en C18 saturés et mono, di-insaturés. Les principaux sont les acides oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2), palmitique (C16 :0) et le stéarique (C18 :0) **Figure.II.20**.

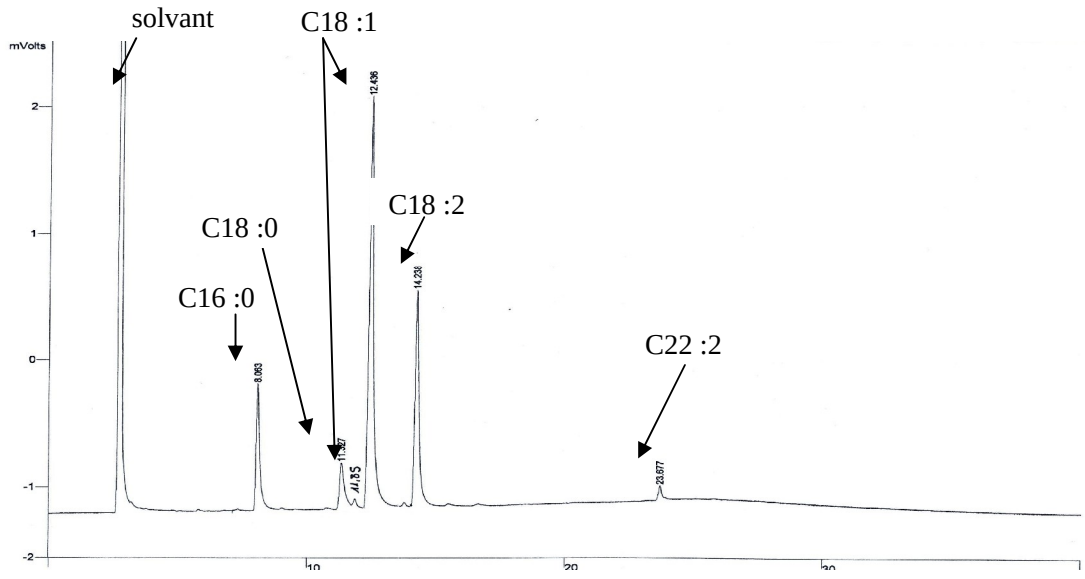


Figure.III.20. Chromatogramme des EMAG des lipides neutres (extraction MeOH/Chloroforme)

Les acides gras des glycolipides **Figure.III.21** ont été analysés dans les mêmes conditions que ceux des lipides neutres.

Ce sont principalement les mêmes acides gras détectés dans la fraction des lipides neutres accompagnés avec des proportions plus faibles en acide palmitique et en acide stéarique et plus élevées en acide gras : oléique et linoléique. La fraction des glycolipides contient une faible quantité d'acide gras en C22 :2 qui est absente dans la fraction des lipides neutres et dans les phospholipides**.**

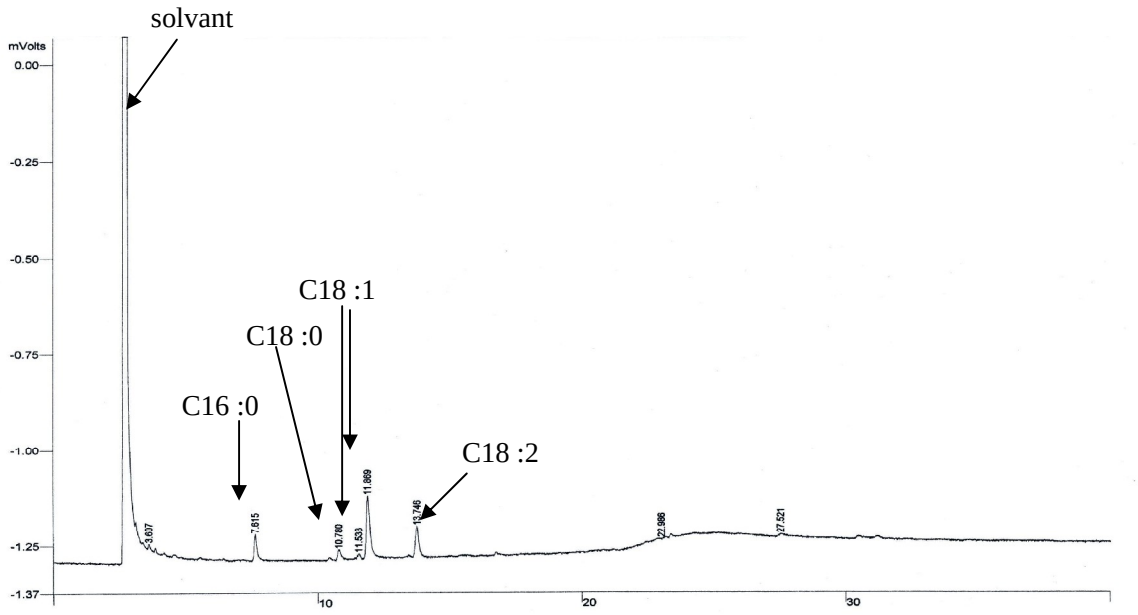


Figure.III.21. Chromatogramme des glycolipides

La composition des phospholipides en acides gras a été déterminée à l'aide du chromatogramme mentionné dans la **Figure.III.22.**

En plus les acides gras détectés dans les deux fractions : lipides bruts, neutres et glycolipides, on trouve aussi les acides gras à chaîne courte d'atomes de carbone comme les acides : C10:0, C12:0 et le C14:0, comme on peut le remarquer dans le tableau ci-dessous. Pour les acides gras palmitique, stéarique, oléique et linoléique, les compositions se distinguent de celle des fractions neutres et glycolipidiques seulement par l'abondance relative des différents acides. L'acide palmitique voie sa teneur augmenter, alors que les parts de l'acide oléique et l'acide linoléique diminuent. Les phospholipides de l'huile de l'arganier contiennet plus d'acides gras saturés que les glycolipides et parallèlement moins d'acides gras insaturés comme l'acide oléique et l'acide linoléique.

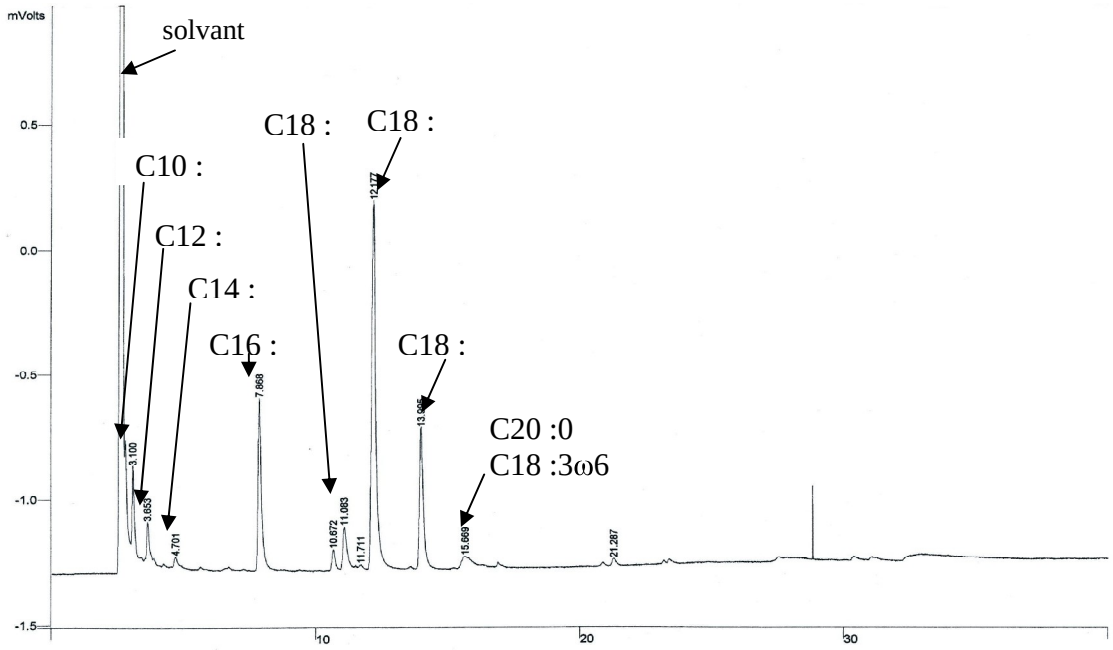


Figure.III.22. Chromatogramme des EMAG des phospholipides

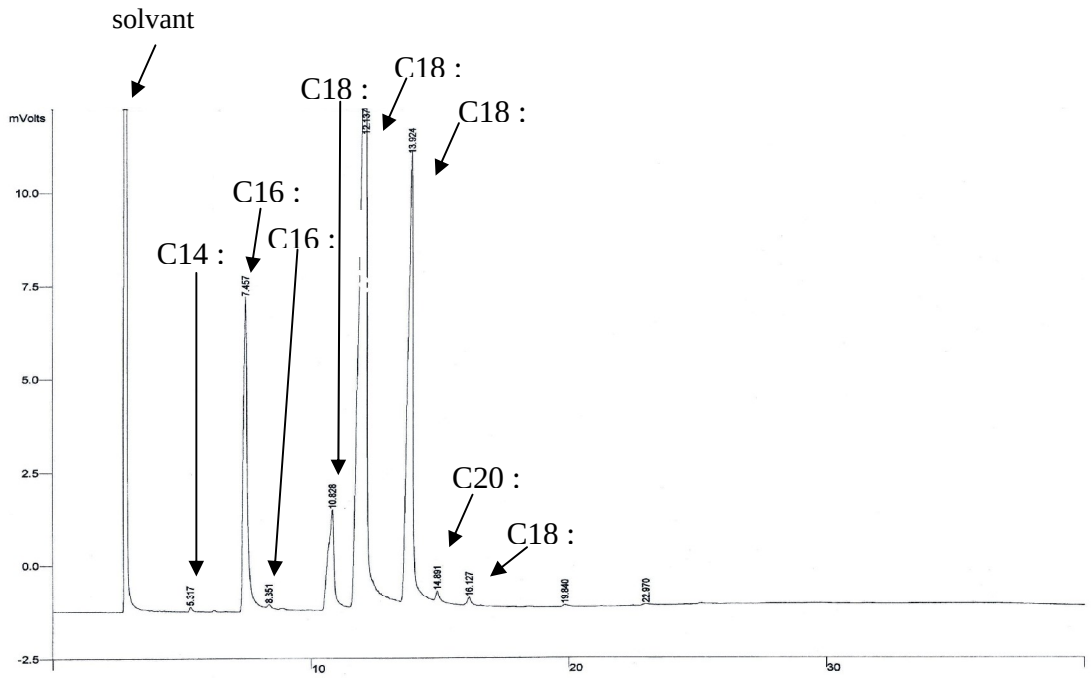


Figure.III.23. Chromatogramme des EMAG de l'huile brute

Tableau.III.5. Le pourcentage des classes lipidiques et la composition en acides gras des lipides

AG	huile brute	lipides neutres (83.42%)	glycolipides (1.56%)	P.lipides (2.09%)
C10 :0	/	/	/	4.9
C12 :0	/	/	/	3.45
C14 :0	0.14	/	/	1.02
C16 :0	14.52	13.49	15.04	17.33
C16 :1	0.11	/	/	/
C18 :0	6.71	2.51	7.4	5.81
C18 :1	51	55.29	53.65	47.21
C18 :2	26.7	26.88	23.92	17.03
C20 :0	0.4	/	/	/
C20 :0		/	/	3.31
C18 3ω6				
C18 :3ω3	0.4	/	/	/
C22 :2	/	1.88	/	/
Totale	100	100	100	100
AGS	21.77	16	22.44	18.49
AGI	78.21	82.17	77.57	81.56
AGI/AGS	3.59	5.13	3.45	4.41

Chapitre-IV- Activité antioxydante de l'huile de l'arganier

L’activité antioxydante (AAO) a été étudiée par de nombreux auteurs, au travers d’une grande diversité de principes actifs, de drogues, de molécules, de modes d’action et de grande variété de tests susceptibles de mettre en évidence cette activité. Les phénomènes caractérisant l’AAO ont été surtout abordés vis à vis des corps gras qui sont un des principaux champs d’application des produits à effet antioxydant. Il y a donc une multitude de résultats concernant ce type d’étude. Ces derniers ne sont malheureusement pas toujours corrélés entr- eux.

I. Activité antioxydante

Activité antioxydante dans le monde végétal

Les plantes, comme tous les êtres vivants, ont à se défendre contre les agressions de l’oxygène. Pour ce faire, elles ont développé tout un ensemble de substances dont certaines ont pérennisé jusque dans le règne animal, tandis que d’autres constituent aujourd’hui des originalités propres aux végétaux.

S’il est probable que certaines molécules ont été sélectionnées au cours de l’évolution grâce à leurs activités, il est certain que l’intégration de l’oxygène moléculaire au métabolisme s’est fait très tôt grâce aux chaînes respiratoires et à des structures spécifiques. Il existe en dehors de ces chaînes les enzymes qui sont chargés de diminuer l’agressivité de l’oxygène et par extension celle des radicaux libres. Parmi elles, on cite plusieurs grandes classes : la catalase, la peroxydase, la superoxyde dismutase, la lipoxydase, la gluthathion-oxydoréductase. Une analogie de structure a été établie entre les sites actifs de ces enzymes et ceux des chaînes respiratoires. On remarque également que ce type de structure se retrouve au sein du règne animal. L’hémoglobine et ses dérivés sont les principaux transporteurs d’oxygène via le fer.

Les végétaux ont mis très tôt au point une structure analogue : la chlorophyle. *In vitro,* il a été démontré qu’elle pouvait réagir en présence d’un radical peroxyle pour donner un radical tétrapyrrole stable (***Knox, J.P. et Dodge, A.D., 1984*****).** *In vivo*, la chlorophylle excitée transmet son énergie aux systèmes photosynthétiques PS I et PS II. Au sein des extraits, un tel système de transmission d’énergie n’existe pas et c’est pour cela que l’on préfère décolorer les extraits afin d’éviter une éventuelle activité pro-oxydante (***Morelle, J., 1988***)**.** On retrouve ces propriétés de capture/stabilisation de radicaux chez de nombreuses substances azotées. Parmi elles, on trouve de nombreux acides aminés, tels la lysine, l’arginine, le l’histidine, le tryptophane, la cystéine,

la méthionine et la thréonine (***Murase, H et al., 1993, Vanela, A et al., 1980***)**.** Il n'est donc pas étonnant que l'on retrouve ce même type d'action chez des composés issus de ce groupe : les alcaloïdes (***Gorman, A.A et al., 1984, Saito, H et al., 1997***)**.** L'AAO apparente de ces substances peut s'expliquer par le fait que l'azote, en relation avec un autre groupement nucléophile de la molécule, permet la décomposition non radicalaire des hydroperoxydes et empêche ainsi la propagation de l'oxydation (***Tanizawa, H et al., 1984***)**.** La caféine a montré une AAO comparable au BHA et au BHT dans un système modèle à base d'acide linoléique (***Navdet, M, 1972***)**.**

Les exemples pourraient s'étendre, mais le fait que les alcaloïdes ne soient pas des substances pharmacologiquement inactives, les recherches d'AAO se sont focalisées vers d'autres familles de composés. Il existe parmi elles un autre groupe propre au règne végétal : les flavonoïdes.

.

II. Rôle des antioxydants

II.1. Définition d'un antioxydant

Le terme antioxydant désigne une substance qui, ajoutée à faible dose à des matières spontanément à l'air, est capable d'empêcher l'action de l'oxygène. Elle interfère sur le processus normal d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel cette oxydation aura produit des odeurs indésirables et une détérioration décelable.

Toutefois, pour être efficace, les antioxydants doivent être additionnés le plus tôt possible dans le processus de fabrication. Ils ne peuvent en effet inverser la réaction d'oxydation, mais seulement la ralentir ou la stopper (***Niki, E, 1987***).

II.2. Mécanisme d'action des antioxydants

- **Antioxydants de rupture de chaînes :** Les antioxydants de rupture de chaîne constituent le groupe le plus largement cité dans les mécanismes d'oxydation faisant intervenir les antioxydants. Ce sont des produits (BH) capables d'interrompre la réaction d'antioxydation comme donneurs d'hydrogènes vis-à-vis d'un radical péroxyle $ROO^{\bullet}$ ou allyle $R^{\bullet}$ formé dans la phase de propagation du processus d'antioxydation pour conduire à un radical stable $B^{\bullet}$ (***Cillard, J et al., 1988, Pascal, G, 1979***).

$$R^{\bullet} + BH \rightarrow RH + B^{\bullet} \qquad (1)$$

$$ROO^{\bullet} + BH \rightarrow ROOH + B^{\bullet} \qquad (2)$$

Il est important de noter que l'addition d'oxygène sur un radical $R^{\bullet}$ dans la réaction d'antioxydation est extrême rapide et que la réaction (2) se fait donc préférentiellement. Les antioxydants de type phénolique, qui sont les plus importants, réagissent selon ce mécanisme. L'antioxydant phénolique cède un hydrogène pour donner un intermédiaire radical stable qui se réarrange pour engendrer une structure quinonique (***Pascal, G, 1979 et Waters, W.A 1971***), selon le schéma représenté dans la **Figure III.2.**

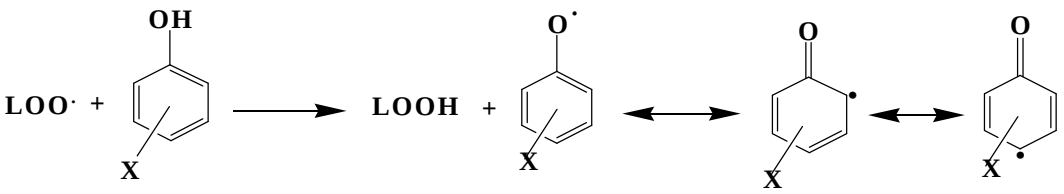


Figure IV.1. Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique vis-à-vis d'un radical acide gras

- **Synergisme** (mot grec *synergos* qui signifie travailler ensemble) **:** C'est le phénomène dans lequel un mélange de deux ou plusieurs composés provoque plus d'activité physiologique que ce à quoi on s'attendait sur la base de leurs efficacités individuelles. Bien que le rôle exact de la synergie des antioxydants ne soit pas connu, beaucoup de ces effets seraient dus à des désactivateurs de métaux ou agents chélatants qui éliminent ou diminueraient les effets de métaux catalysant l'antioxydation des lipides.

- **Action pro oxydante :** Les substances pro-oxydantes favorisent la formation de radicaux en multipliant les possibilités d'initiation de chaîne. Ce sont principalement des traces de métaux sous forme de sels. Ces sels de métaux vont orienter l'évolution des hydroperoxydes vers la réaction de scission O-O-, donc vers la formation de radicaux qui vont servir d'initiateurs à la réaction d'autoxydation **(Figure III.3).** Le retour du métal à sa valence initiale peut s'effectuer selon plusieurs voies, chacune d'entre elles génère également des radicaux libres initiant la réaction d'autoxydation (***Torel, J et al., 1986, Deby, C, 1990***).

$$ROOH + M^{+2} \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{\bullet} + M^{3+}$$

$$M^{3+} + ROOH \rightarrow ROO + M^{2+} + H^{+}$$

$$M^{3+} + RH \rightarrow R^{\bullet} + M^{2+} + H^{+}$$

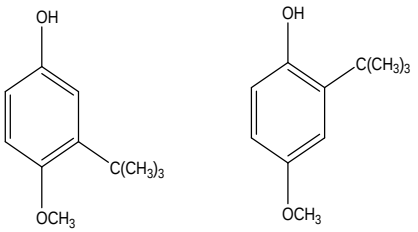
Figure IV.2. Action pro-oxydante des métaux

Notons toutefois que la nature du métal, ainsi que celle de la partie organique à laquelle il est lié par une liaison ionique, influent sur l'activité prooxydante.

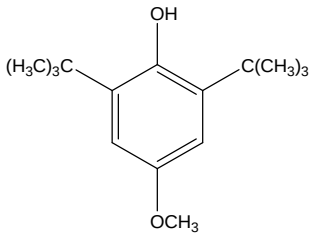
III. Principaux antioxydants

III.1. Les antioxydants synthétiques

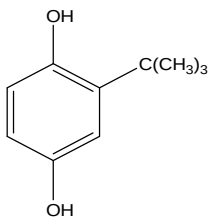
Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (**BHA**), butylhydroxytoluene (**BHT**), gallate propylée (**PG**) et le tetra-butylhydroquinone (**TBHQ**), sont utilisés largement parce qu'ils sont efficaces, et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant leur sécurité, est très discutée, car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (***Lisu Wang1 et al.,2003***)



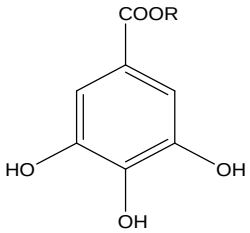
Tertiobutyl hydroxyanisole (BHA)



tertiobutyl hydrox toluène (BHT)



Tertiobutyl hydroquinone (TBHQ)



Esters de l'acide gallique
R=C_3H_7 galate de propyle
R=C_8H_{17} gallate d'octyle
R=$C_{12}H_{25}$ gallate de dodécyle

Figure IV.3. Quelques antioxydants de synthèse

III.2. Les antioxydants naturels

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Les métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont " à faible prix de revient ".

Il existe aussi un métabolisme secondaire, chez les plantes : c'est une exclusivité du monde végétal. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante : on les appelle les métabolites secondaires. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité et sont " à des prix élevés ". Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composes acétyléniques, les cires, les acides aminés, et les composés phénoliques (***Cuendet. M, 1999***).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, en particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines. (***Bahorun.T, 1996***). Ainsi, l'acide ascorbique ou vitamine C qui a été isolé pour la première fois du jus de citron par **Szent-Gyorgyi** 1928 (structure de vitamine C voir annexe) et les tocophérols (***Schuler.P ,1990***).

III.2.1. La vitamines E

Elle est composée d'une ou de plusieurs substances de nature phénolique appelées tocophérols ou tocotriénols Sa grande solubilité dans les huiles et les graisses fait d'elle le meilleur antioxydant naturel lipidique.

On résume le terme de vitamine E à l'α-tocophérol qui est de loin le plus répandu dans les huiles végétales (***Chazan, J.B, 1987***). Dans l'industrie alimentaire, l'utilisation d'extraits d'origines naturelles riches en tocophérols seuls ou en mélange avec l'α-tocophérol de synthèse est permise pour la protection des matières grasses et des margarines, à une concentration de 0,05%. L'α-tocophérol réagit avec les radicaux libres en formant un radical tocophéryle qui stoppe la chaîne de la réaction radicalaire grâce à sa stabilité.

III.2.2. L’acide ascorbique

L’activité antioxydante de l’acide ascorbique ou vitamine C, peut s’exercer de quatre manières :

- Il peut agir comme capteur d’oxygène.
- Il peut agir comme donneur d’hydrogène aux antioxydants phénoliques, après que ceux-ci aient cédé leurs protons au cours de la réaction en chaîne d’antioxydation.
- Il peut agir comme synergiste.
- Il peut agir comme antioxydant préventif par chélation des métaux.

L’acide ascorbique, à cause de son insolubilité dans les corps gras, sera de préférence utilisé en milieux aqueux (jus de fruit, confiture, etc).

III.2.3. Les composés phénoliques

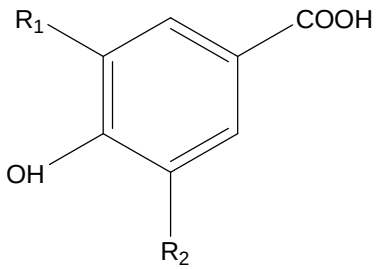
Les composes phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu’aux fruits. Le terme ‘composés phénoliques’ désigne de nombreuses substances regroupées en famille. Les différents composés d’une même famille se différencient par la nature et la position des substituants fixés sur un squelette aromatique commun. Les deux classes principales sont les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes.

III.2.3.1. Les composés non flavonoides

Les composés non flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette «flavone».

- **Les acides phénoliques**

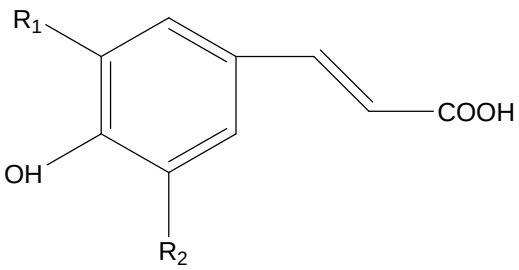
On distingue tout d’abord les dérivées de l’acide benzoïque, composé d’un squelette de sept atomes de carbone **(Figure IV.4).**



Acides hydroxybenzoïques	R_1	R_2
Acide hydroxybenzoïque	H	H
Acide protocatechique	OH	H
Acide vanillique	OCH_3	H
Acide gallique	OH	OH
Acide syringique	OCH_3	OCH_3

Figure IV.4. Les dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de type C_6-C_3 **(Figure IV.5)** et qui sont très répandus dans les plantes supérieures, l'acide p-couramique étant le plus important (***Gentiana, 2002).***



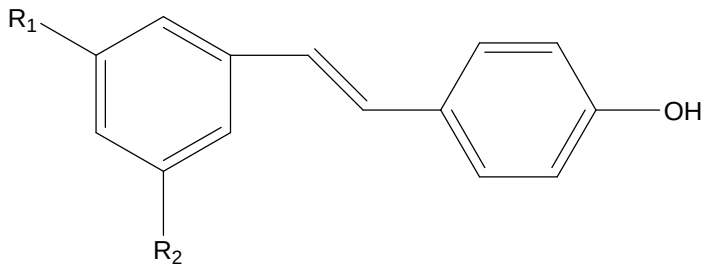
Acides hydroxycinnamiques	R_1	R_2
Acide p-couramique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide férulique	OCH_3	H
Acide sinnamique	OCH_3	OCH_3

Figure IV.5. Les acides hydroxycinnamiques

Parmi les acides hydroxycinnamiques estérifiés, l'acide chlorogénique, ester quinique de l'acide caféique, est très répandu dans les fruits. Ce composé est impliqué dans les mécanismes de brunissement enzymatique. Sa quinone est très réactive et susceptible de réagir par voie d'oxydation couplée (***Cuendet. M, 1999 et Guy R, 2002***).

Les acides hydroxybenzoïques (squelette (C_6-C_1) **(Figure.IV.4)**) sont rarement trouvés dans les fruits mais peuvent être détectés après dégradation des flavonoïdes, et notamment après déglycosylation. Ces composés sont fréquemment présents sous forme liée et peuvent entrer dans la constitution de structures complexes, telles que les tanins hydrolysables. Les esters de l'acide gallique sont retrouvés dans certains fruits notamment le galatte d'épicatéchine qui entre dans la composition des tanins condensés du raisin (***Riberau Gayon, P, 1968***).

- **Les stilbènes**



Stiblènes	R_1	R_2
Pterostilbène	OCH_3	OCH_3
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGL	OH

Figure IV.6. Structures chimiques de quelques stilbènes

Les stiblènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué **(Figure IV.6).** Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans les fruits sont le trans-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères. Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (***Jang, M er al., 1997***). On leur attribue aussi des activités chimio-préventives contre le cancer (***Harborne, J.B, 1975***).

III.2.3.2. Les composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone (C_6-C_3-C_6) comportant deux cycles benzénique A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone qui correspond à la phényl-2 benzopyrone **(Figure IV.6)**, la numérotation notée sera appliquée pour les différentes sous-classes de flavonoïdes. Ces dernières sont différenciées par le niveau d'oxydation du cycle pyrane: on peut aussi distinguer les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et d'autres classes, telles que les flavones, les flavanones et dihydrochalcones.

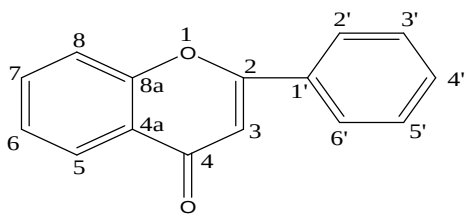
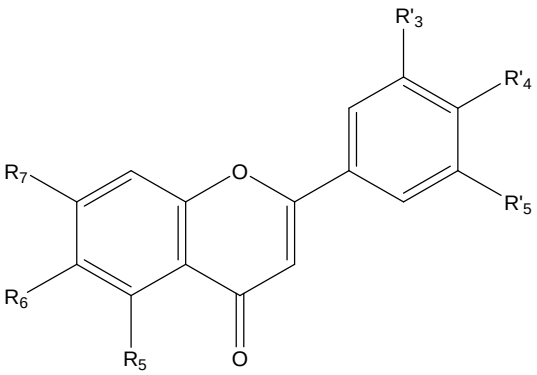
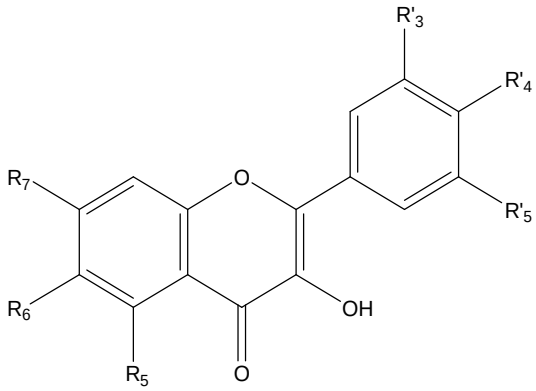


Figure IV.7. Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone

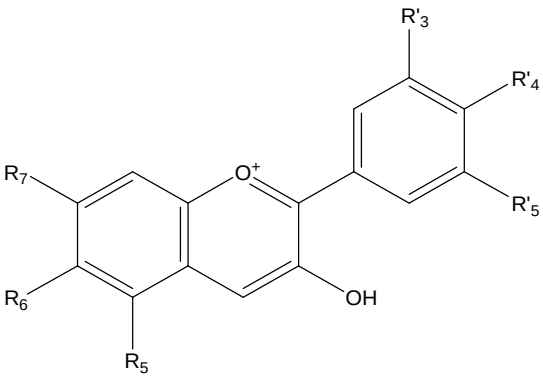
Le terme ‘flavonoïde’, utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner (***Heller, W et al., 1988***), regroupe tous les composés dont la structure est basée sur celle de la flavone, phényl-2 benzopyrone **(Figure IV.7).** Leur biosynthèse se fait à partir d’un précurseur commun, la 4, 2, 4’, 6’ – tétrahydroxychalcone **(Figure IV.7)** (***Swain, T, 1976)***. Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes (***Harborne, J.B, 1988 et Swain, T, 1975***) dont la structure varie selon le degré d’oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central (***Gentiana, 2002***). Les plus importantes sont les flavones et flavonols, pigments jaunes, les anthocyanidines, pigments bleus et rouges des fleurs et des fruits, les catéchines, les flavanones, les flavanols, chalcones, isoflavones etc (**Figure IV.8)**



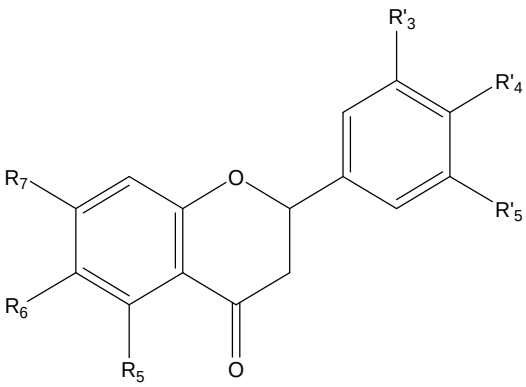
Flavones



Flavonols



Anthocyanidines



Flavanonols

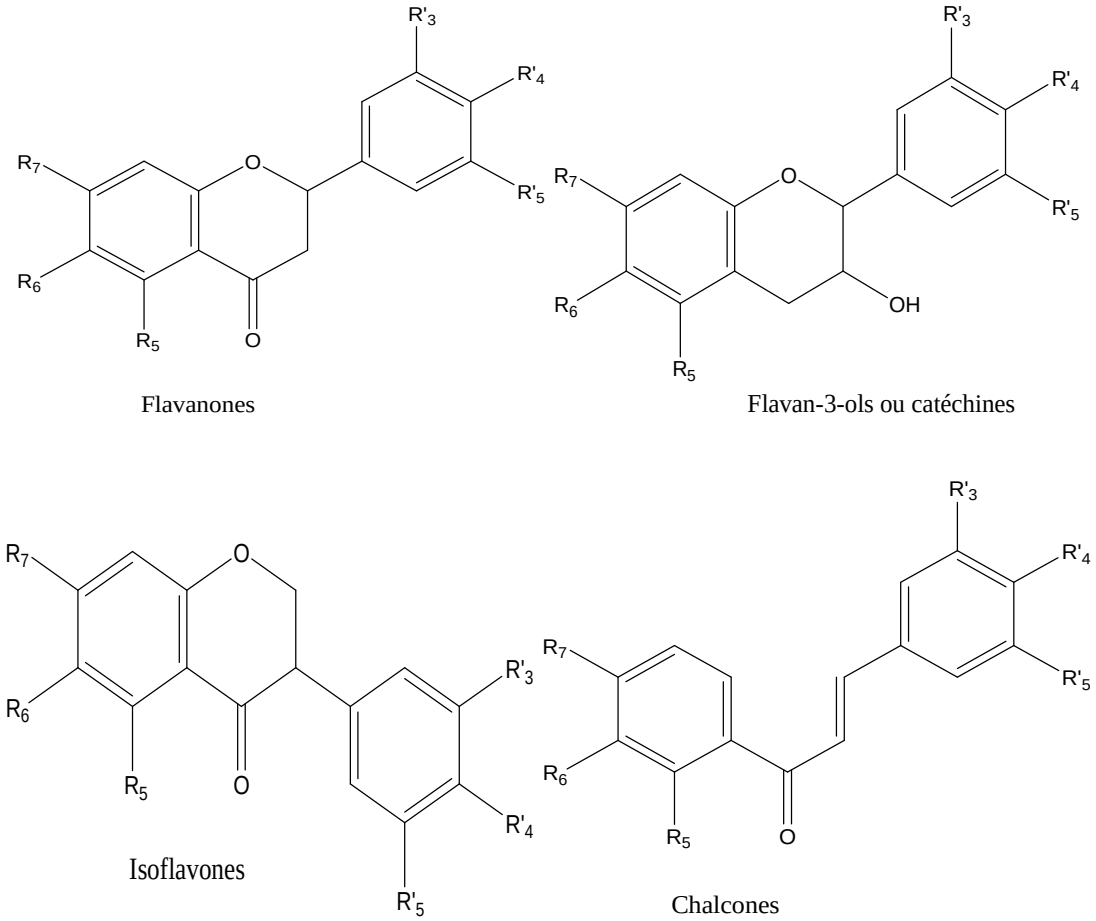


Figure IV.8. Structures des différentes classes des flavonoïdes

- **Les anthocyanes**

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des fruits et des fleurs. Ces pigments rouges hydrolysables sont caractérisés par un noyau de base: le noyau flavylium (phenyl-2 benzopyrilium) qui peut être hydroxylé, méthylé, acylé ou glycosylé. Les anthocyanes sont situés dans les vacuoles, où elles peuvent être intégrées dans les structures appelées anthocyanoplastes (***Jurd, L, 1963***).

L'aglycone, groupement chromophore, est appelée anthocyanidol. Il est généralement substitué, notamment glycosylé en position 3, ce qui a pour effet de stabiliser le pigment, évitent sa décomposition rapide en composés incolores (***Yashuchi, E et al., 1985***).

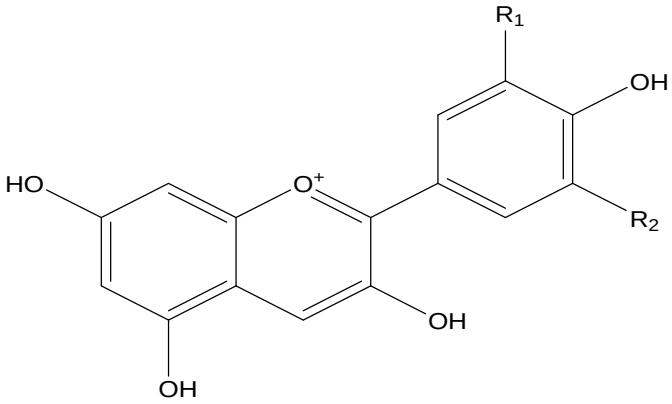


Figure IV.9. Structure de base des anthocyanes

Anthocyanidol	**R_1**	**R_2**
Pélargonidol	H	H
Cyanidol	OH	H
Delphinidol	OH	OH
Péonidol	OCH_3	H
Pétunidol	OCH_3	OH
Malvidol	OCH_3	OCH_3

III.3. Action et intérêt des polyphénols

En tant qu'antioxydants, les polyphénols renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que cancers, maladies cardio-vasculaires ou ostéoporose (***A. Scalbert et al, 2000***).

De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotéines ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués.

Deux études cliniques récentes réalisées aux Etats-Unis et au Chili ont montré que les polyphénols améliorent le fonctionnement de l'endothélium, la couche cellulaire qui tapisse les surfaces des vaisseaux sanguins et qui joue un rôle essentiel dans le contrôle du bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose (***Hames.B.D , 2000)***

Ils ont montré que les polyphénols limitent le développement de tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents

suppresseurs de tumeurs. Les mécanismes impliqués peuvent là encore être très variés: prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, inhibition de l'angiogenèse.

Le **Tableau IV.1** représente quelques propriétés biologiques liées à certains composés phénoliques (***T Bahorun, 1996***).

Tableau IV.1. Activités biologiques des composés phénoliques

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénoliques	Antibactériennes, Antifongiques et Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoides	Antitumorales, Anticarcinogènes, Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, Antioxydantes, Antitumorales, Antifongiques et Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

III.4. Les principales méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les techniques permettant de déterminer l'activité antioxydante d'un composé ou d'un ensemble de composés sont basées sur la mesure de l'oxydation des lipides. L'activité antioxydante (AAO) peut être définie comme une capacité de protection contre l'oxydation. Dans le domaine de la lipochimie, cette notion est souvent assimilée à la défense anti-radicalaire. En effet, l'altération des lipides est un phénomène mettant en jeu des radicaux libres. Cela aboutit à la création de divers produits dont certains modifient sensiblement les qualités des corps gras.

L'oxydation des lipides est aujourd'hui bien connue. Pour son utilisation se pose le problème de la protection de ses produits et donc d'évaluation de cette protection. Pour cela l'analyste doit faire appel à diverses méthodes d'évaluation de l'AAO. On ne peut pas déterminer directement Cette activité. En fait, on mesure l'oxydation, puis l'AAO est déduite par rapport à un témoin. Le

problème consiste donc à choisir un test spécifique de ce que l'on veut mettre en évidence et que les informations de ce dernier soient corrélées par d'autres observations (ranceur, odeur, ou résultat d'autres tests). L'AAO ne résulte pas seulement d'une activité anti-radicalaire mais également d'une capacité à empêcher l'action de substances pro-oxydantes. On trouve ainsi des agents purement anti-radicalaire (BHA, BHT) purement séquestrant (érythrorbate de sodium, dérivés de l'acide citrique) ou des produits dont le mode d'action peut être mixte (flavonoïdes).

A la vue de ces éléments, nous pouvons donc poser une classification des tests d'activité antioxydante en plusieurs catégories :

- Méthodes mettant en évidence l'activité antiradicalaire.
- Méthodes spécifiques aux premiers stades de l'oxydation.
- Méthodes propres aux produits secondaires.
- Méthodes indirectes

IV. Extraction des composés phénoliques

Dans un ballon, une quantité bien déterminée (9g) de l'huile brute extraite par le système de solvant chloroforme/MeOH mise en contact avec 50ml d'hexane et d'un mélange de solvant méthanol : eau (8/2 V/V). Laisser à reflux pendant 2 heures.

Mettre le contenu du ballon dans une ampoule à décanter, les composés phénoliques sont récupérés de la phase hydroalcoolique. Après évaporation du méthanol, la fraction aqueuse est lavée par 50 ml de l'hexane afin d'éliminer les traces des lipides. Les composés phénoliques sont extraits par 3x50 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées et séchées par quelques grammes de sulfate de sodium anhydre. Après filtration et évaporation de l'acétate d'éthyle sous pression réduite à 50°C, le résidu obtenu est solubilisé dans 2 ml de méthanol puis conservé au frais jusqu'à son analyse.

IV.1. Quantification des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Siocalteu (***Singleton.V.L, 1965)***.

IV.1.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage est réalisé selon la méthode citée avant, en utilisant le réactif de Folin. Le réactif est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$ et d'acide phosphotunguestique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_3.Pour ce faire une courbe d'étalonnage était obtenue par des solutions d'acide gallique de concentration de 0.02 jusqu'à 0.28 mg/mL. 100µL de chaque solution ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 0,5 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée, 2 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% . Les solutions ont été secouées immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 760nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure IV.10).**

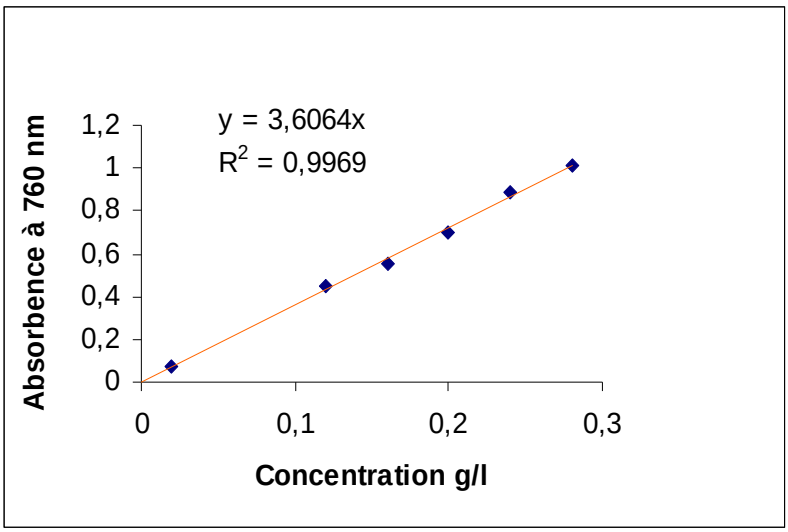


Figure.IV.10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

A partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, nous avons déterminé la concentration des composés phénoliques dans l'huile. Cette valeur vaut 2.8mg/100g.

IV.2. Analyse des phénols de l'huile de l'arganier

Nous avons analysé l'extrait phénolique de l'huile de l'arganier par CLHP. Cette analyse nous permet d'identifier les composes phénolique individuels contenus dans l'huile. L'analyse est realisée par un appareil Agillent 1100 en utilisant une colonne RP18 est une détection par

spectrophotometre UV-Visible à barètte d'iode. Le solvant utilisé est un mélange d'eau acidifiée par l'acide orthophosphorique (A) à 1% et l'acétonitrile (B). Le programme de l'élution est le suivant:

t (min)	% B
0	5
5	5
30	33
40	100
45	100

Le debit de la phase mobile est de 1ml/min, la quantité injectée est 20µl. l'enregistrement des chromatogrammes est réalisé à deux longueurs d'ondes λ=280nm et λ=340nm, caractéristiques des composes phénoliques.Les chromatogrammes ainsi obtenus sont montrés dans la **Figure.IV.10**.

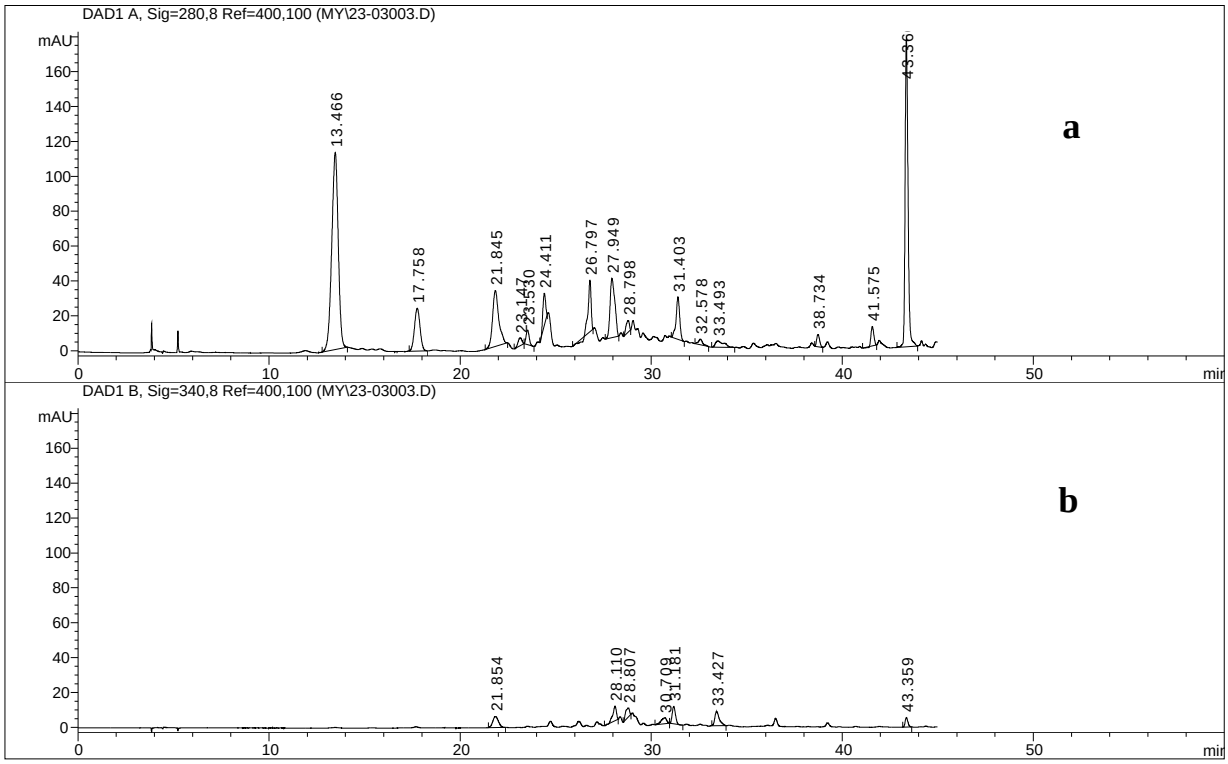


Figure.IV.11. chromatogrammes montrant la détection : **a-** 280nm, **b-** 340nm

Il est clair que la majorité des composés phénoliques de l'huile de l'arganier sont de types benzoïques car la majorité des composés absorbent à 280nm. L'huile de l'arganier contient deux composés phénoliques majoritaires au début et à la fin du chromatogramme, leurs pourcentages

sont respectivement 34.43% et 24.15%. Le taux des autres composés phénoliques varient entre 1.44% et 9.35%.

Nous avons essayé d'identifier les composés phénoliques de l'huile avec la co-injection de plusieurs composés phénoliques standards mis à notre disposition dans le laboratoire, mais malheureusement cette tentative n'a pu être réalisée. L'identification de ces composés nécessite une analyse par CLHP préparative puis une caractérisation des composés par les méthodes spectrales : $RMN^{1}H$, $RMN^{13}C$, spectrométrie de masse et infrarouge. Faute de moyens cette caractérisation n'a pas pu être réalisée, on s'est limité à classer ces composés phénoliques sur la base de leurs spectres UV. Les résultats obtenus par le détecteur à barrette d'iode sont regroupés dans le tableau suivant (**tableau IV.2**).

Tableau.IV.2. Différentes classes des composés phénoliques de l'huile de l'arganier

Temps de rétention	**% relatif**	**Longueur d'onde (nm)**	**Classe des composés phénoliques**
13.466	34.43	225, 280	benzoïque
17.758	6.42	260, 300	Cinnamique
21.845	9.36	230, 275, 320	Cinnamique
24.869	2.3	260, 300	Cinnamique
27.00	3.83	225, 275	benzoïque
27.494	7.66	225, 280, 320	benzoïque
31.403	4.19	225, 265	benzoïque
43.860	24.15	260	benzoïque
Autres	7.66	280	benzoïques

D'après ces résultats il est clair que l'huile de l'arganier ne contient pas des flavonoides et que les dérivés benzoïques sont les majoritaires et qui représente (81.92%), alors que les dérivés hydrocinnamiques ne représentent que (18.08%) de la totalité des composés phénoliques.

Les résultats de l'analyse des composés phénoliques de l'huile de l'arganier confirment ceux obtenus par colorimétrie (test de Folin et Emmerie- Engel).

V. Technique d'analyse du pouvoir antioxydant

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits, a été réalisé par un test chimique in *vitro*. Dans ce test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage de radical libre par les fractions antioxydantes en employant le 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

V.1. Application du test chimique (Test du DPPH$^{\bullet}$)

La réduction du radical libre DPPH$^{\cdot}$ par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm provoquées par la présence des extraits phénoliques (**Figure.IV.12**).

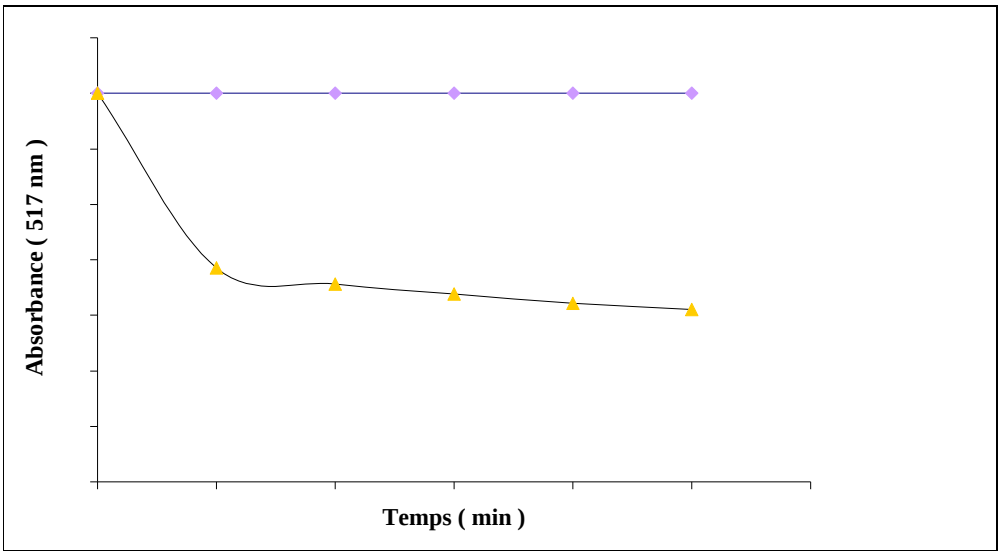


Figure.IV.12. Courbes représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH.

Le DPPH$^{\cdot}$ est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (**Figure.V.13.**). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Plus la chute de l'absorbance du DPPH est importante plus le pouvoir antioxydant des extraits est élevé.

Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques de nos extraits

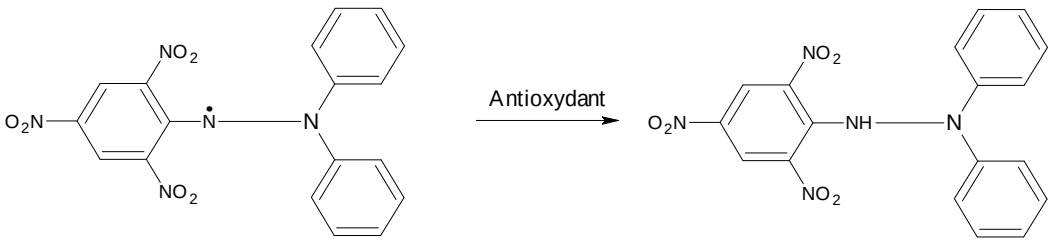


Figure .IV.13. : Réduction du radical libre DPPH$^{\cdot}$

Une quantité de chaque extrait est additionnée à 1ml d'une solution de DPPH• (250µM) préparée dans l'éthanol dans le cas des extraits lipidiques et dans le méthanol lorsqu'il s'agit de l'extrait phénolique de l'huile de l'arganier. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc. Les mesures des densités optiques de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le paramètre IC_{50} qui indique le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait et qui est définit comme étant la concentration de l'extrait exprimée en mg/ml nécessaire pour balayer 50% du radical DPPH. La valeur de IC_{50} de chaque extrait est déduite à partir des équations des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait **Figures.IV.14.** Il faut rappeler que plus la valeur de IC_{50} est petite plus l'activité antioxydante des extraits est grande.

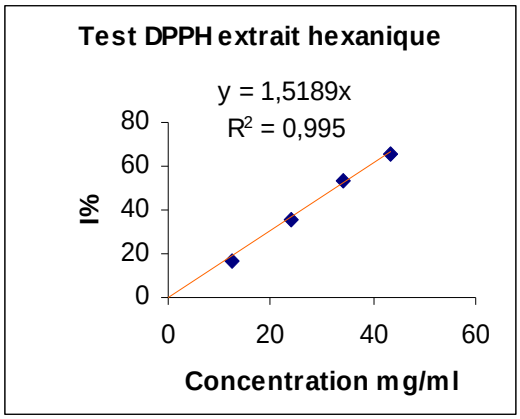
V.2. Résultats

La mesure du pourcentage d'inhibition du $DPPH^{\cdot}$ provoquée par la présence des extraits après 30 minutes ont permis de déterminer les valeurs de IC_{50}. Les résultats sont consignés dans le **Tableau.IV.3**

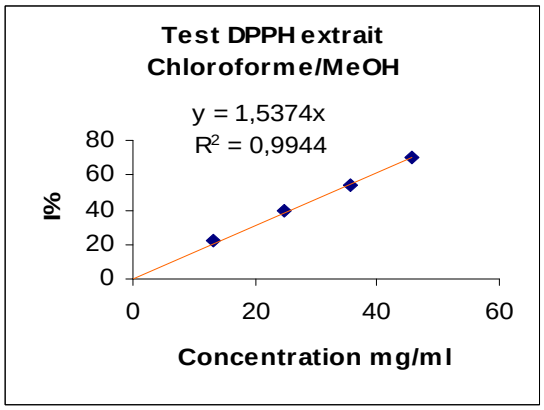
Tableau.IV.3. Résultats du test DPPH (mg/ml)

extraits	IC_{50} (mg /ml)
Hexanique	32.92
Chloroforme/MeOH	32.52
Phénols de l'huile	5.10^{-3}
Huile d'olive	10^{-2}

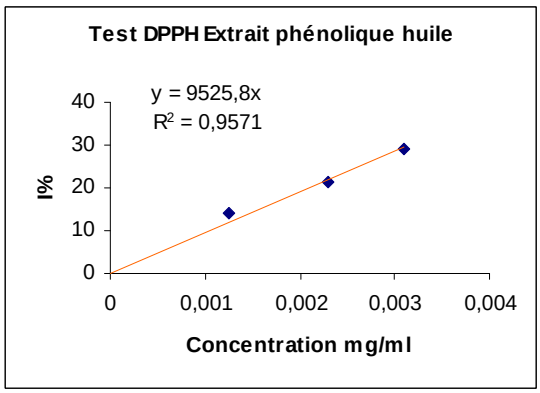
A la lumière des résultats, on remarque que l'extrait phénolique de l'huile de l'arganier possède une activité antioxydante très importante (5.10^{-3}mg/ml) par rapport aux autres extraits lipidiques. Les deux extraits lipidiques de l'arganier ont des pouvoirs antioxydants similaires, ce qui indique que les espèces moléculaires responsables de l'activité antioxydante sont extractibles par les deux solvants. En revanche l'huile d'olive est beaucoup plus puissante comme antioxydant que les extraits lipidiques de l'arganier. Un point qui attire l'intention est que le IC_{50} de l'extrait lipidique de l'arganier est 3200 fois plus faible que celui de l'extrait phénolique de l'huile. Cette large différence peut être expliquée du fait que les composés phénoliques sont masqués par les lipides. Cet effet justifie que les composés phénoliques sont les espèces moléculaires possédant la plus grande activité antioxydante importante vis-à-vis du radical stable DPPH.



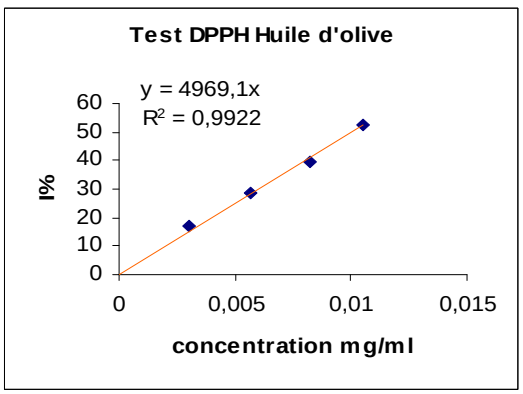
-a-



-b-



-c-



-d-

Figure.IV.14. Courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration pour différents extraits phénoliques et de l'huile d'olive**.**

-a- Hexanique , –b- Chloroforme/MeOH, –c-extrait phénolique huile, –d- huile d'olive

Conclusion finale

Par ce travail consacré à l'étude chimique de l'huile d'Argania spinosa, nous avons voulu établir un profil des caractéristiques chimiques du genre ARGANIA, et approfondir la connaissance de quelques constituants chimiques du fruit de l'arganier.

Pour cela nous avons analysé successivement la fraction glycéridique et la fraction insaponifiable et évalué certaines caractéristiques physico-chimiques.

Nous avons déterminé les principaux indices physico-chimiques de l'huile extraite de l'amande du fruit. Les valeurs de ces indices sont très proches de celles d'autres huiles végétales alimentaires.

La fraction saponifiable de l'huile renferme les acides gras habituels rencontrés dans le règne végétal. L'huile d'Argania est riche en acides gras insaturés (78.8%) représentés par les acides oléique et linoléique. Cette teneur est assez importante en acides gras insaturés, représente d'un point de vue alimentaire un intérêt certain.

La présence de l'acide linolénique en faible quantité (1.97%) et l'absence des acides gras à liaisons conjuguées présente un avantage technologiques : l'huile d'arganier est peu susceptible de s'oxyder ou de se polymériser pendant la conservation, l'utilisation ou une transformation éventuelle. L'huile de l'arganier renferme également une quantité importante d'acides gras saturés (19.78%).

L'hydrolyse enzymatique des triglycérides par la lipase pancréatique de porc, nous indique que l'acide oléique contribue de (58.01%) à l'estérification de la position Sn-2 de la molécule de glycérol, l'acide linoléique y prend part de (36.8%)

La combinaison de la méthode d'hydrolyse enzymatique par la lipase pancréatique du porc, et des méthodes chromatographiques nous a permis d'établir la structure glycéridique de l'huile de l'arganier. Les triglycérides retrouvés dans l'huile sont se qui résultent de la combinaison des acides palmitique, oléique et linoléique OOO, OLL, POL, POO, PPO.

La teneur en triglycérides triinsaturés $\mathbf{GU_3}$ (45.2%) et diinséturés $\mathbf{GSU_2}$ (43.95%) prépondérente comme c'est le cas dans les huiles de type oléique et linoléique.

L'analyse de l'insaponifiable axée sur l'étude de la composition de la fraction tocophérolique, et le dosage des stérols totaux, peuvent être considéré comme une opération de contrôle.

L’étude de la fraction tocophérolique révèle que l’huile de l’arganier est une huile riche en tocophérols (1027mg/kg) ce qui lui confère une aptitude longue à la conservation et une action vitaminique indéniable.
L’étude des acides gras des lipides polaires a été abordée avec la détermination de la quantité des phospholipides dans l’huile de l’arganier, trouvés avec une teneur de (0.8mg/100g). Composés particulièrement intéressants pour leur propriété amphipathiques. L’analyse qualitative et quantitative des acides gras des lipides neutres, des glycolipides et des phospholipides a été aussi réalisée.
Les trois classes des lipides renferment les mêmes composés d’acides gras habituels mais avec des proportions variables.
A notre connaissance, aucun travail de recherche n’a été publié sur les acides gras des phospholipides et glycolipides.

L’activité antioxydante de l’huile de l’arganier et leurs composés phénoliques a été evaluée, l’extrait phénolique de l’huile de l’arganier possède une activité antioxydante très importante (5.10^{-3}mg/ml) par rapport aux autres extraits lipidiques.

Ces résultats contribuent donc à mieux connaître le genre Argania d’Algérie et montre des similitudes avec celui du Maroc. Il serait donc souhaitable de valoriser cet arbre pour des améliorations génétiques permettant d’obtenir un rapport coque/amande plus faible, une pulpe riche en glucides et en protides ; ces données lui permettraient de jouer un rôle écologique et économique plus important.

Références bibliographiques

- Association Française de Normalisation **(AFNOR)** Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérives, 3éme édition, 1984

- A.J.C. dans "Refïning of Oils and Fats of Edible Purpose", Ed. P.W. William Pergamon Press, Oxford, ((1962).

- **Bahorun. T,** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice, 1996

- **Barreto. M Carma,** Lipid extraction and cholesterolquantification, J. Chem. Educ 2005. 82, 103-104)

- **Benabid.A et Fennana.M,** Connaissance sur la végétation du Maroc: phytothérapie, phytosociologie et série de végétation, Lazaroa, 1994, 21-97

- **Benziane. M et Khatouri. M,** Estimation de la biomasse des peuplements d'arganier. Annales de la recherche forestière au Maroc, 1991, 128-140

- **Berrougui. H, Cloutier. M, Isabelle. M and Khalil. A**, Phenolic-extract from argan oil (Argania spinosa L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages Atherosclerosis, Volume 184, Issue 2, February 2006, Pages 389-396

- **Bilyk, A., Piazza, G.J., Bistline, R.G., Hass, M.J.,** Lipids, V.26, (1991), 405.

- **Brockerhoff H., J.** "Stereospecific analysis of triglycérides: an alternative method", Lipids. Res., V.8, (1967), 167-169.

- **Brockerhoff. H.,** "Stereospecific analysis of triglycérides", Lipids, V.6, (1971), 942-956.

- **Capella, P., Dezotti, G., Ricca, G.S., Valentini, A.F., Jacini, G.,** "Chromatography on silicic acid of the unsaponifiable matter of fats", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.37, (1960), 564-567.

- **Charrouf. M,** Contribution chimique à l'huile d'Argania Spinosa (L) (*S*apotaceae). Thèse Science Univ. De Perpignon, 1984

- **Charrouf. Z, Hilali. M, Jauregui. O, Soufiaoui. M and Guillaume. D,** Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy Food Chemistry, Volume 100, Issue 4, 2007, Pages 1398-1401

- **Charrouf. Z,** valorisation des produits de l'arganier In: actes des journées d'étude sur l'arganier, Essaouira, 29-30 septembre 1995

- **Chazan, J.B. et Szulc, M.,** "Free radicals and vitamin E", Cah. Nutr. Diet., V.22, (1987), 66-70.

- **Cillard, J. et Cillard, S.T.P.,** “Phenolic compounds and free radicals”, Pharma, V.4, (1988), 592.-6.
- **Cocallemen, S., Farines M.; Faill H., Soulier, J.; Morin O.,** "Study of the seed oil of eggplant, Solanum melongena (L), Solanaceae", Revue Française des Corps Gras, 35(3), (1988), 105-10.
- **Coleman, M.H.,** "Further studies on the pancreatic hydrolysis of some natural fats", J. Amer. Oil. Chem. Soc, V.38, (1961), 685-688.
- **Coleman, M.H.,** "The pancreatic hydrolysis of natural fats. III. The influence of the extent of hydrolysis on monoglyceride composition", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.40, (1963), 568.
- **Coleman, M.H., Fulture, W.C.,** Enzyme of Lipids Metabolism, P. Deswelle, V.127, (1961).
- **Cuendet. M,** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie: "Fagraea blumei" (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude: "Bartsia alpina" (Scrophulariaceae), "Loiseleuria procumbens" (Ericaceae) et "Camp, Thèse de doctorat, 24 mars 1999.
- **DE Ponteves. E, Bourbouze. A, Narjisse. H,** Occupation de l'espace, doit coutumieret légilation forestière dans un téritoire de l'arganeraie septentrionale au Maroc. Les cahiers de la recherche développement, 1990, 28 43
- **Deby, C.,** “New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases”, Biochem. Pharmacol., V.39, (1990), 399-405.
- **Deldime, P., Lefebvre, G., Cadin, Y., Wibau , M.,** "Analysis of tocopherols in vegetable oils by high performance liquid chromatography", Rev. Fr. Corps Gras, V.27, (1980), 279-282.
- Détermination de l'indice d'acide: AFNOR NFT 60-204. Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérives, Ed. AFNOR, 1984. Paris
- Détermination de l'indice de saponification: AFNOR NFT 60-206. Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérives, Ed. AFNOR, 1984. Paris
- Détermination de l'indice d'iode: AFNOR NFT 60-203. Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérives, Ed. AFNOR, 1984. Paris
- **Dickhart. A,** Amer. J, pharm, 1939, 111-293
- **Emberger. L,** Le domaine naturel de l'arganier, Bull .Soc. Bot, Paris, 1925,770-774
- **Emberger. L,** Les végétaux vasculaires. Masson, Paris, 1960, Tome II, 1540p
- **Emmerie, A., Engel, C.,** "Colorimetric détermination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments" Rec. Trav. Chim, V.58, (1939), 283-289.

- **Farine. M, Charrouf. M, Soulier. J et Cave. A,** Etude de l'huile des graines d'argania spinosa (L) *S*apotaceae. II Stérols, alcooltriterpéniques et métyylstérols de l'huole d'argan, Rev ; Franc. Corps Gras, 31, 443-448, 1984

- **Farine. M, Charrouf. M, Soulier. J,** The sterols of argania spinosa seed oil, Phyto chemistry, 20, 2038-39, 1981

- **Flanzy, M., Dubois, P.,** "The détermination of total tocopherols. Application to grape seed oil", Technol. Agric., V.13, (1964), 67.

- **Gargouri, Y., Bensalah, A., Verger, R.,** "Rôle of human gastric lipase in the digestion of dietary lipids", Rev. Fr. Corps Gras, V.18, (1992), 207-213.

- **Gaydou. E.M, Raman. A.R.P Delina,** Revue Française de corps gras, 1983, 30, 21.

- **Gentiana,** Des plantes pour mieux vieillir :.Vieillir oui, mais en santé, 16-4-2002, Construire No 16.

- **Goiffon J.P., Reminiac C., Olle M.,** "High-performance liquid chromatography application for fatty triglycérides analysis. II. Rétention values of triglycérides". Rev. Fr. Corps Gras, V.28, (1981), 199-207.

- **Goiffon, J.P., Reminiac, Claude; Olle, M.** "High performance liquid chromatography application for fat triglycéride analysis. I. Search for the best operating conditions for soybean oil", Revue Française des Corps Gras, 28(4), (1981), 167-170.

- **Gorman, A.A., Hamblett, I., Smith, K. et Standen, M.C.,** "Strychnine: A Fast Physical Auencher of Singlet Oxygen (1Δg)", Tetrahedron Lett., V.25, (1984), 581-84.

- **Guingnard, J.L.,** Abrégé de Phytochimie, Ed .Masson, Paris (1985), 25-29

- **Guy R**, La méthode naturelle anti-âge, 2002.

- **Hames.B. D,** L'essentiel en biochimie. (Ed)BERTI.Paris , 2000.

- **Hamilton, R.J., Rossel, J.B.,** "Analysis of Oils and Fats", Ed. Elsevier Applied Science Publisher, Londres, V.A, (1986), 155.

- **Harborne, J.B.,** "The Flavonoids Advances in Research since 1980", Harborne, J.B. (Eds), Chapman and Hall, London. , (1988).
- **Harborne, J.B.,** "The Flavonoids", Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London. , (1975).

- **Heller, W. et Geiger, H.,** "The Flavonoids Advances in Research Since 1980, Harborne", J.B.(Eds), Chapman and Hall, London. , (1988), 399

- **Helme, J.P., Chirouze, J.,** "Les Acides Gras Polyinsaturés a Longue chaîne, Application en Cosmétologie", Association Française de Cosmétologie, Symposium Bordeaux, (1984), 107.

- **Hugel, M.F., Vetter, W., Audier, H., Barbier, M. et Lederer, E.,** "Analysis of Pollen Stérols by Mass Spectrometry", Phytochemistery, V.3, (1964), 7.

- **Jaccard. P,** L'arganier *S*apotaceae oléagineusedu Maroc. Pharma.Acta Helvetiae, 1926, 203-209

- **Jang, M., Cai, L. and Vdeani, G.O.,** "Cancer Chimiopreventive Activity of Resverstrol, A Natural Product Derived from Grapes", Science, V.275, (1997), 218-220.

- **Jurd, L.,** "Some Advances in the Chemistry of Anthocyanin – Type Plant Pigments. In : Chichester C.O., The Chemistry of Plant Pigments", Academic Press, New York, (1970), 218.

- **Karleskind,** manuel des corps gras Edition Technique et Documentation Lavoisier, 1992, Paris.

- **Knox, J.P. et Dodge, A.D.,** "Singlet Oxygen and Plant", Phytochemistry, V.24, (1985), 889-96.

- **Kritchevsky, D.,** "Streols, Bile Acids and Steroids - Comprehensive Biochemistery", Ed. M. Flarkin et E.H. Stotz, Elsevier Publishing Company, New York, V.10, (1963), 1.

- **Kuksis, A.,** "Hand Book of Lipid Research: Fatty Acids and Glycerides", Ed. Plénum Press, New York and London, V.l, (1978), 1.

- **Lamaison. J.L, Carnat. C**. Pharm. Acta. Helv., 1990, 65 (11), 315-320.

- **Lisu Wang1, Jui-Hung Yen1, Hsiao-Ling Liang3 and Ming-Jiuan Wu1**. Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn.) .Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 11, No. 1, 2003, Pages 60-66, 2002.

- **Meijboom, P.W., Jongenoter, B.A.,** "A quantitative détermination of tocotrienols and tocopherols in palm oil by TLC-GLC". J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.56, (1979), 33-35

- **Misra. G, Nigam. S.K, Mitra. C.R.,** Planta Medica, 1974, 26, 155.

- **Monseigny, A., Vigneron, P.Y., Levaq, M., Zwobada, F.,** "Quantitative chromatographic analysis of triglycérides in glass capillary tubes", Rev. Fr. Corps Gras, V.26, (1979), 107-120.

- **Mordret, F., Laurent, A.M.,** "Application of gas-phase Chromatography on capillary glass column to the analysis of tocopherols", Rev. Fr. Corps Gras, V.25, (1978), 245-50.

- **Mordret, F.,** Thèse d'Université, Eude DE l'Insaponifiable de l'Huile de Tournesol, Paris, (1971).

- **Morelle, J.,** "Peroxydes Lipidiques, Radicaux Libres, Vieillissement et Lipoaminoacide", Parf. Cosm. Arômes, V.80, (1988), 91-904.

- **Moroco Guide.** Archive for the″ Français Maroc″ Catégoriy, L'arganier une richesse sous estimée du Maroc, 16.11.2006

- **Murase, H., Nagao, A. et Terao, J.,** "Antioxidant and Antiemulsifying Activity of N-(Long Chain Acyl)-Histidine and N-(Long Chain Acyl)-Carnosine", Journal of Agriculture and Food Chemistry, V.41, (1993), 1601-04.

- **Naudet, N. et Hautfenne, A.,** "Méthode Normalisée pour la Détermination des Stérols Totaux dans les Huiles Et Graisses", Rev. Fr. Corps Gras, V.33, (1986), 167.

- **Navdet, M.,** "Problèmes et Techniques", Labo. Pharma., V. 215, (1972), 61.

- **Niki, E.,** Chem. Phys. Lipids, "Antioxidants in relation to lipid peroxidation", V.40, (1987), 227-253

- **Noda, M., Tanaka, M., Seto, Y., Aiba, T. Oku, C.,** "Occurrence of Cholestérol as Major Sterol Component in Leaf Surface Lipid", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.23, (1988), 439.

- **Olle. M,** Analyse des corps gras. Technique de l'Ingénieur, P5, P 3325 décembre 1996 paris.

- **Paqout, C., Hautfenne, A.,** "Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives", International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th Revised and Enlarged Edition, Ed. Black Well Scientific Publication, Oxford, (1987), 123

- **Paquot, C., Mercier, J., Mathieu, A., Lefort, D., Perron, R.,** Méthodes Analytiques des Lipides Naturels, Ed. CNRS, paris, (1962).

- **Pascal, G.,** "Food antioxidants: technological, regulatory, toxicological, and nutritional aspects", Cah. Nutr. Diet., V.14, n°4, (1979), 271-290.

- **Perrin. J.L,** Manuel des Corps Gras, tome 2. Ed. Tekhnique et documentation Lavoisier, 1992, Paris

- **Quinlin, P., Herman, J., Weiser, J.R.,** Separation of mono –glyceride of vegetable oil by column chromatography. J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.7, n°35, (1958), 325-327.

- **Radi. N**, L'arganier: arbre du sud-ouest marocain, en péril, à protéger, thèse Univ. Grenoble 3 novembre 2003

- **Rahmani. M,** Contribution à la connaissance de l'huile d'argan, Mémoire troisième cycle, Institut. Agronomique et Vétérinaire, Rabat, 1979

- Recueil de normes françaises des corps gras d'origine animale et végétale: Dosage colorimétrique du phosphore, méthode vanadomolybdique, AFNOR- NF-60-227, Ed AFNOR, 1969. Paris

- **Riberau Gayon, P.,** "Les Composes Phénoliques des Végétaux" , Dunod, Paris, (1968), 254.

- **Saito, H. et Ishihara, K.,** "Antioxidant Activity and Actives Sites of Phospholipids as Antioxydants", J. Am. Oil Chem. Soc, V.74, (1997), 1531-36.

- **Scalbert. A .**Fruits et légumes, polyphénols et santé. Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand.2004

.

- **Schuler. P,** Naturel antioxidants exploited commercially.food antioxidants, hudsan B.J.F (éd), elsévier.amsterdam, 99-170, 1990.

- **Sherwin, E.R.,** "Antioxidants for vegetable oils", J. Am. Oil Chem. Soc, V.53, (1976), 430-6.

- **Singleton.V.L et Ross. J.A**, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent, Am. J. Enol. Vitic. 16 (1965) 144–158.

- **Swain, T.,** "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Goodwin, T.W. (Ed), 2eme Edition, Academic Press, London, V.1, (1976), 425.
- **Swain, T.,** "The Flavonoids", Harborne, J.B., Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London. , (1975), 1096-1129.

- **Tanizawa, H., Todos, S., Sazuka, Y., Tanizawa, T., Hayashi, T., Arishi, S. et Takino, Y.,** "Natural Antioxidant. Antioxidative Components of Tea Leaf (Thea Sinensis L.)", Chem. Pharm. Bull., V.32, (1984), 2011-14.

- **Tom? ezanka and Hana ezankov?,** Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis, Analytica Chimica Acta, Volume 398, Issues 2-3, 22 October 1999, Pages 253-261

- **Torel, J., Cillard, J. et Cillard, P.,** "Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical", Phytochemistry, V.25, n°2, (1986), 383-5.

- **Ucciani, E.,** Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Composition en Acides Gras., Tec et Doc, Lavoisier. Paris, (1995) 125-128.

- **Vandewal, R.J.,** Calculation of the Distribution of the Unsaturated and Saturated Acyl Groups in Fats from Pancreatic Lipase Hydrolysis Data, J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.37, (1960), 18.

- **Vanela, A., Pinturo, E., Tirolo, P., D'Urso, G., Rizza, V., Di Silvestro, I., Grimaldi, R. et Brai, M.,** "Scavenger Effect of Spermine on Superoxide Anion: Preliminary ESR Data", IRCS Med. Sci. Biochem., V.8, (1980), 940-46.

- **Veris,** Effet Bénéfique Potentiel des anti-oxydants dans F infection par le virus Hiv et le Sida, Vitamin E Research Summary, Dùsseldorf, Août, (1995).

- **Wagret. P,** L'Arganeraiedusud marocain relique du tertiaire et providence des population, Nature Science Progrès, 1962, 390-393

- **Waters, W.A.,** “Kinetics and mechanism of metal-catalyzed autoxidation”, J. Am. Oil Chem. Soc, V.48, (1971), 427-33.

- **Well, J.H.,** Biochimie Générale, Masson, (1972).

- **Yashuchi, E., Ruchiro, U. et Takashi, K.,** “Antioxidant Effect Chlorophyll and Pheophytin on the Autoxidation Of Oils in the Dark. Comparison of Inhibitory Effects”, J. Am. Oil Chem. Soc, V.62, (1985), 1375-78.

- **Youngs, C.G.,** "Glyceride structure of fats", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.36, (1959), 665-667.

Annexe

Calcul de la Composition de triglycéride

Méthode de Coleman (exemple: l'acide oléique en position 2)

Position-2	**%**	**diglycéride**	**%**	**triglycéride**	**%**
-O-	58.01	OO	29.9	OOO OOP OOS OOL	15.71 5.71 3.23 5.71
		PO	11.07	POO POP POS POL	5.71 2.11 1.19 2.11
		SO	6.27	SOO SOO SOS SOL	3.23 1.19 0.67 1.19
		LO	11.07	LOO LOP LOS LOL	5.71 2.11 1.19 2.11

Les équations de la théorie du Gunstone

GS_2U

$$S'U'S''\% = 2S'S''U'X / S^2 U$$
$$S'U'U'\% = S'^2 U'X / S^2 U$$

GSU_2

$$S'U'U''\% = 6S'U'U''(3U - 100) / 200U^2$$
$$S'U'U'\% = 3S'U'^2 (3U - 100) / 200U^2$$

GU_3

$$U'U''U'''\% = 6U'U''U''' (3U - 100)^2 / 400\ U^3$$
$$U'U''U''\% = 3U'U''^2 (3U - 100)^2 / 400\ U^3$$
$$U'U'U'\% = U'^3 (3U - 100)^2 / 400\ U^3$$

Où

GS_3: Triglycéride tri saturé

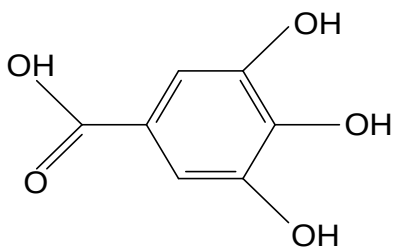
GS_2U: Triglycéride di saturé

GSU_2: Triglycéride mono saturé

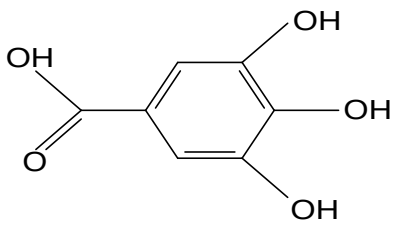
GU_3: Triglycéride tri insaturé

X : la valeur trouvée par la formule suivante :

$X = (3S / 20)^2$ si $S < 66.66\%$



Acide ascorbique
(Vitamine C)



Acide gallique

Résumé

L'étude de la fraction lipidique de l'huile du fruit d'arganier, nous a permis de déterminer les principales caractéristiques physicochimiques de l'huile, les valeurs trouvées appartiennent à la fourchette des huiles végétales alimentaires. L'analyse par CPG des esters méthyliques d'acides gras, montre que l'huile contient des acides gras habituels: oléique, linoléique, palmitique et stéarique. Les espèces moléculaires des TAG ont été identifiées et quantifiées par la combinaison de l'hydrolyse enzymatique et par CPG. La position Sn-2 est estérifiée par les acides gras insaturés (C18). L'huile de l'arganier est riche en tocophérols et en stérols. La quantité des phospholipides a été quantifiée par colorimétrie. Les acides gras des glycolipides et des phospholipides sont identifiés. L'huile possède une activité antioxydante remarquable due à la présence des composés phénoliques.

Mots clés: ***huile d'argan, acides gras, triglycérides, tocophérols, stérols, glycolipides, phospholipides, activité antioxydante.***

ملـــخـــص:

إن دراسة أجزاء الليبيدات على زيت الأرقان سمحت لنا بتعيين الخصائص الأساسية الفيزيوكيميائية . القيم المتحصل تنتمي إلى مجال الزيوت النباتية الغذائية . إن تحليل أسترات المثيل للأحماض الدهنية باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي تبين وجود الأحماض الدهنية (الدسمة) المعروفة : أولييك و لينولييك و بالمتيك وكذا ستيياريك . تم تحديد التركيب الغليسيريدي للزيت بطريقة التحلل الأنزيمي و كروماتوغرافيا الطور الغازي. تفضل الأحماض الدهنية غير المشبعة ذات 18 ذرة كربون أسترة الموضع 2 في جزيء الغليسيرول . الزيت غني بالتوكوفيرولات و كذا الستيرولات . حددت كمية الفوسفوليبيدات بطريقة لونية كما تم تحليل الأحماض الدهنية للفوسفوليبيدات و الغليكوليبيدات .لزيت الأرقان فعالية معتبرة مضادة للأكسدة ناتجة لاحتوائه على نسبة معينة من المركبات الفينولية .

كلمات مفاتيح:

زيت الأرقان ، أحماض دهنية، تريغليسيريدات ، التوكوفيرولات ، الستيرولات ، الغليكوليبيدات ، الفوسفوليبيدات ، الفعالية المضادة للأكسدة .