

***Extraction des polyphénols à partir
des margines et valorisation en tant
qu'antioxydant naturel dans les huiles
végétales***

MBOURMAD Soumaya

Directeur de thèse : M^r AMMOUCHE A. Professeur (ENSA)
Soutenue publiquement: 08/12/2011

Devant le jury : **Président :** M^r BELLAL M.M. Professeur (ENSA) **Examineur:** M^r CHELGHOUM C.
Professeur (USTHB) **Examineur:** M^r BENCHABANE O. Maître assistant (ENSA)

Table des matières

Dédicace . . .	5
REMERCIEMENTS . . .	6
RESUME . . .	8
SUMMARY . . .	9
ص:خلم . . .	10
Liste des abréviations . . .	11
Introduction générale . . .	14
Partie I. Etude bibliographique . . .	17
1 ^{er} Chapitre : I. Données générales sur l'olivier, la production et la technologie oléicole . . .	17
I.1. Historique . . .	17
I.2. Distribution géographique . . .	17
I.3. Nom vernaculaire . . .	18
I.4. Origine botanique de l'espèce <i>Olea europea</i> L . . .	18
I.5. Description botanique de l'olivier . . .	19
I.6. Composition physicochimique du fruit et des feuilles . . .	20
I.7. L'oléiculture dans le monde . . .	20
I.8. L'oléiculture en Algérie . . .	22
2 ^{ème} Chapitre : II. Les sous-produits de l'huilerie d'olive . . .	27
II.1. Introduction . . .	28
II.2. Margines . . .	28
II.3. Grignons . . .	34
3 ^{ème} Chapitre : III. Les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques . . .	36
III.1. Généralités . . .	36
III.2. Définition . . .	36
III.3. La structure . . .	37
III.4. Fonction biologique . . .	39
III.5. Biosynthèse . . .	39
III.6. Biodisponibilité des composés phénoliques . . .	40
III.7. Procédés d'extraction . . .	41
III.8. Analyse des phénols totaux . . .	42
III.9. Les composés phénoliques des olives et des sous-produits . . .	43
4 ^{ème} Chapitre : IV. Altération lipidique . . .	46
IV.1. Introduction . . .	46
IV.2. L'hydrolyse . . .	47
IV.3. Les mécanismes généraux de l'oxydation des lipides . . .	47
IV.4. Initiateurs radicalaires de l'oxydation des lipides . . .	48
5 ^{ème} Chapitre : V. Les antioxydants et activité antioxydante . . .	49
V.1. Définition . . .	49

V.2. Mode d'action . . .	49
V.3. Classement des antioxydants . . .	50
V.4. Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques . . .	53
V.5. Propriétés biologiques des antioxydants phénoliques des olives et dérivés . . .	54
Partie II. Matériel et méthodes . . .	56
1^{er} Chapitre : I. Extraction, dosage et activité antioxydante des polyphénols . . .	56
I.1. Matériel végétal . . .	56
I.2. Produits chimiques et réactifs . . .	57
I.3. Caractéristiques physicochimiques des margines . . .	57
2^{ème} Chapitre: II. Valorisation de l'extrait phénolique . . .	65
II.1. Préparation des doses . . .	65
II.2. Test de la stabilité oxydative . . .	66
II.3. Analyses statistiques des données . . .	68
II.4. Caractérisation des huiles étudiées . . .	68
Partie III. Résultats et discussions . . .	70
1^{er} Chapitre : I. Extraction, dosage et activité antioxydante des polyphénols . . .	70
I.1. Résultats de l'étude physico-chimique des margines . . .	70
I.2. Activité antioxydante des extraits phénoliques . . .	73
I.3. Profil phénolique par HPLC . . .	87
I.4. Le choix de la margine (1) pour l'essai de la stabilité oxydative . . .	92
2^{ème} Chapitre: II. Valorisation de l'extrait phénolique . . .	93
II.1. Détermination de la stabilité oxydative . . .	93
II.2. Extinctions spécifiques . . .	104
II.3. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse . . .	117
II.4. Effet des composés phénoliques sur la stabilité des huiles . . .	121
II.5. Effets d'autres composés que les polyphénols sur la stabilité des huiles . . .	122
II.6. Différence entre l'activité antioxydante des antioxydants liposolubles synthétiques et naturels . . .	122
conclusion générale . . .	124
Références bibliographiques . . .	127
Annexes . . .	141
Annexe I . . .	141
Annexe II . . .	142

Dédicace

*Je dédie le fruit de ce travail s'il a une récompense chez ALLAH à toutes les personnes qui ont une place particulière pour moi : Mes très chers parents auxquels je témoigne toute ma reconnaissance pour leurs inquiétudes, leurs sacrifices et leurs encouragements durant mes études. Mes très chères sœurs Karima, Djaouida, Hafida et particulièrement Nassima. Mes très chers frères. Mes belles sœurs. Mes très chers neveux Sohaïb, Mohamed et ma chère nièce Ritadj. Et enfin, à tous mes amis et collègues et toutes les personnes qui me connaissent de près ou de loin. **Soumaya***

REMERCIEMENTS

Je remercie *Dieu* le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont témoigné leur aide morale et matérielle tout au long de la réalisation de ce travail:

M^r AMMOUCHE A., Professeur au département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine à l'ENSA d'El Harrach, pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour ses précieux conseils.

M^r BELLAL M. M., Professeur au département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine à l'ENSA d'El Harrach de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

M^r BENCHABANE O., Maître assistant au département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine à l'ENSA d'El Harrach, pour avoir bien voulu examiner ce travail et être membre de jury.

M^r CHELGHOUM C., Professeur à la faculté de chimie de l'Université des Sciences et de Technologie Houari Boumediene de BAB-EZZOUAR, pour avoir bien voulu examiner ce travail et être membre de jury.

M^r GUERMOUCHE H., Professeur à la faculté de chimie de l'Université des Sciences et de Technologie Houari Boumediene de BAB-EZZOUAR, pour son aide concernant la réalisation des analyses par HPLC des polyphénols.

M^r MEKIMENE L., **M^r HAZZIT M.**, Chargés de cours au département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine de l'ENSA pour leurs conseils, leur serviabilité et leur gentillesse.

M^r BENCHABANE A., Chef de département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine de l'ENSA pour son aide et son encouragement.

M^r MOUSSAOUI R., Maître de conférences à l'Université de Mouloud MAAMERI de Tizi Ouzou qui m'a aidé pour effectuer l'extraction et également pour sa serviabilité et sa gentillesse.

Mes remerciements vont particulièrement à M^{me} Mina ingénieur de laboratoire de biochimie pour son aide précieuse et encouragement, également à Mohamed ingénieur de laboratoire d'analyse instrumentale qui m'a aidé pour la réalisation de ce travail, sans oublier Lâarbi, Mohamed de microbiologie, Baya, Nadia, Fatima et Mabrouk, du département de Technologie Alimentaire et Redouane, le technicien de département des sciences du sol de l'ENSA.

Je remercie M^r Lamari F., de la faculté de physique de Bab Ezzouar., pour m'avoir fait confiance, ouvert les portes du service et offert le matériel et les conditions nécessaires pour effectuer les recherches bibliographiques, et aussi pour sa modestie et sa gentillesse. Je remercie également M^r Djamel de la faculté de physique de Bab Ezzouar pour son aide, sa sympathie et

sa serviabilité et aussi M^{elle} Lilia-Soraya pour son aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail.

Ma profonde gratitude s'adresse également à tous mes amis de l'ENSA: Sabrina, Mébarka, Aouichette, Sofiane, Djahida, Amel, Rachida, Samira, Kahina et particulièrement Fahima, Sofiane Z, Faïza et Djamel qui m'ont beaucoup aidé, sans oublier ma très chère amie Souhila et ma voisine Nacéra.

Mes plus vifs remerciements et un grand respect vont également à ma chère collègue et amie Amel Chergui, à M^F Harkas, M^F Kemmache le chef d'inspection de contrôle de qualité et de la répression des fraudes du port d'Alger, et également à tous mes chers collègues de la DCP: Amina, Hamama, Khalida, Soumaya, Saliha L, Fella, Saliha D, Safia, Ratiba, Wahiba, Naïma, Salima de l'aéroport d'Alger, Nada, Nacéra, Saïd, Djamel Y, Ismaïl, rafik, Faïza, Kahina, Karima, Mohamed, Sid Ahmed, Amina, Lamia, Amel.

RESUME

Les huileries rejettent dans la nature des quantités énormes des sous-produits, particulièrement les margines qui ont peu de valeur économique en ALGERIE. La présente étude a pour objectif de valoriser les margines, un sous produit d'olive riche en polyphénols. A cette fin, l'étude est divisée en deux chapitres: Le 1^{er} chapitre concerne (a) l'extraction des polyphénols des margines au moyen de l'acétate d'éthyle qui permet d'obtenir de meilleurs rendements en monomères phénoliques (Hydroxytyrosol, Tyrosol, Acide caféique, vanillique...) dotés d'un bon pouvoir antioxydant, et aussi le dosage de ces composants par Folin-Ciocalteu et par HPLC; et (b) la détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques par le piégeage du radical DPPH et la mesure du pouvoir réducteur. Le 2^{ème} chapitre concerne la valorisation de l'extrait phénolique en le comparant avec le BHT suite à son incorporation à des doses différentes dans trois huiles végétales (HS, HT, HO), afin d'étudier l'effet antioxydant des phénols contre la peroxydation lipidique, provoquée par la température, l'O₂, et la lumière. Les résultats obtenus ont montré que les margines d'olive renferment des quantités importantes de composés phénoliques, qui se sont avérés très efficaces dans la prévention de l'oxydation des huiles végétales.

Mots clés : Margines, polyphénols, antioxydants, hydroxytyrosol, activité antioxydante, DPPH, pouvoir réducteur, BHT, huiles végétales.

SUMMARY

Oil mills discharge huge amounts of by-products in nature, particularly olive mill wastewaters (OMWW) that have little economic value in Algeria. The objective of the present study is to promote OMWW, an olive by-product rich in polyphenols. For this purpose, the study is divided into two chapters. Chapter one is concerned with (a) the extraction of polyphenols from OMWW using ethyl acetate which provides better yields of phenolic monomers (hydroxytyrosol, tyrosol, caffeic acid, vanillic...) with a good antioxidant capacity, and also the dosage of these components through Folin-Ciocalteu and HPLC; and (b) the determination of the antioxidant activity of phenolic extracts through trapping DPPH • radical and measuring the reducing power. Chapter two focuses on the promotion of the phenolic extract by comparing it to BHT through incorporating it in different doses in three vegetable oils (soybean oil, sunflower oil, olive oil), the aim of which is to study the antioxidant effect of phenols as against lipid per-oxidation caused by temperature, O₂, and light. The results of the study showed that olive mill wastewaters (OMWW) contain large amounts of phenolic compounds which have proven very effective in preventing the oxidation of vegetable oils.

Keywords : olive mill wastewaters (OMWW), polyphenols, antioxidants, hydroxytyrosol, antioxidant activity, DPPH, reducing power, BHT, vegetable oils.

صخلم:

تقذف معاصر الزيتون في الطبيعة كميات هائلة من المُستخرجات الثانوية وبخاصة مياه عصر الزيتون (الزبيار) التي ليست ذات أهمية اقتصادية كبيرة في الجزائر. و تسعى هذه الدراسة إلى تمييز مياه الزيتون، هذا المُستخرَج الثانوي من الزيتون الغني بالبوليفينولات. و لهذا الغرض فإن دراستنا هذه تنقسم إلى فصلين اثنين. فالفصل الأول يتناول بالبحث (أ) استخراج البوليفينول بواسطة خلاص الإيثيل الذي يمكنا من الحصول على مردود أفضل من المونومرات الفينولية (هيدروكسيبيروزول، ثيروزول، حمض الكافيك، الفانيليك...) التي تتمتع بقدرة جيدة على مقاومة التأكسد، و كذا تقدير جُرْع هذه المكونات عن طريق تقنية Folin-Ciocalteu و HPLC ؛ و (ب) تقدير نشاط مقاومة التأكسد الخاص بالمُستخرجات الفينولية عن طريق حصر جذر ال DPPH و كذا قياس قدرة الإرجاع. أما الفصل الثاني فيهتم بإبراز قيمة المُستخرَج الفينولي و ذلك عن طريق مقارنته بال BHT بعد إدراجه بجرعات مختلفة في ثلاثة زيوت نباتية (زيت الصوجا، زيت عباد الشمس، زيت الزيتون) و هذا بخية دراسة أثر مقاومة التأكسد الخاص بالفينولات ضد تأكسد الدهون الغير مشبعة التي تسببها درجة الحرارة و الأوكسجين و الضوء. و قد أظهرت نتائج هذا البحث أن مياه الزيتون تتطوي على كميات هامة من المركبات الفينولية، التي أثبتت نجاعتها في الوقاية من تأكسد الزيوت النباتية.

الكلمات الأساسية: ماء الزيتون (الزبيار)، البوليفينولات، المواد المقاومة للأكسدة، هيدروكسيبيروزول، نشاط مقاومة التأكسد، DPPH، قدرة الإرجاع، BHT، الزيوت النباتية.

Liste des abréviations

- %: Pourcentage.
- μl : Microlitre.
- **ADN**: Acide désoxyribonucléique.
- **AEP**: alimentation en eau potable.
- **A-H** ou **AH**: Antioxydant phénolique.
- **ARNm**: Acide ribonucléique messenger.
- **Av J. C**: Avant Jésus-Christ.
- **C/N**: Rapport carbone sur azote.
- **C/P**: Rapport carbone sur phosphore.
- $^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius.
- Calpi: Comité d'assistance pour la localisation et la promotion de l'investissement.
- **CE (dS/m)**: Conductivité électrique (déci-Siemens/mètre).
- **cm²** : Centimètre carré.
- **COI**: Conseil Oléicole International.
- **COX-2**: Cyclooxygénase-2.
- **CPG** ou **GC**: Chromatographie en phase gazeuse.
- **CuSO₄** : Sulfate de cuivre.
- **Da**: Dalton.
- **DBO** : Demande biologique en oxygène.
- **DCO** : Demande chimique en oxygène.
- **DCEP**: Direction de la concurrence et des prix.
- **EOR**: Espèces oxygénées réactives.
- **EP**: Extrait phénolique.
- **FC**: Folin-Ciocalteu.
- **g**: Gramme.
- **GC-MS**: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- **H₂SO₄** : Acide sulfurique.
- **ha**: Hectare.
- **HCl**: Acide chlorhydrique.
- **HCO₂H**: Acide formique.
- **HIV-1**: Virus de l'immunodéficience humaine.
- **hl** : Hectolitre.
- **HO**: Huile d'olive.
- **HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.
- **HPLC-CZE** : HPLC avec électrophorèse de zone capillaire.

- **HPLC-DAD** : HPLC à barrette de diodes.
- **HPLC-MS** : HPLC avec détection par spectrométrie de masse.
- **HRGC** : Chromatographie gaz à haute résolution.
- **HS**: Huile de soja.
- **HT**: Huile de tournesol.
- **iNOS** : Inducible nitric oxide synthase.
- **INRA**: Institut National de la Recherche Agronomique.
- **IP**: Indice de peroxyde.
- **K₂SO₄** : Sulfate de potassium.
- **kDa**: kilodalton.
- **kg**: kilogramme.
- **kWh**: kilowatt- heure.
- **l**: Litre.
- **LC-MS** : Chromatographie liquide-spectrométrie de masse.
- **LDL**: Lipoprotéines de basse densité.
- **m**: Mètre.
- **M**: molarité.
- **m³** : Mètre cube.
- **MeCN**: Acétonitrile.
- **méqO₂ /kg**: Milliéquivalent d'oxygène par kilogramme.
- **mg Ac Gal/l**: Milligramme d'acide gallique par litre.
- **mg**: Milligramme.
- **min**: Minutes.
- **ml**: Millilitre.
- **mm**: Millimètre.
- **mol/l**: Mole par litre.
- **N**: Normalité
- **nm**: Nanomètre.
- **NO[•]** : Oxyde nitrique.
- **O₂^{•-}** : Superoxyde.
- **OH** : Hydroxyle.
- **OHTy-DEDA**: Forme dialdéhydrique de décarboxyméthyl oleuropéine aglycone.
- **PAL** : Phénylalanine ammonialyase.
- **PAR**: Pouvoir antiradicalaire.
- **PKC**: Protéine kinase C.
- **PNDAR**: Plan National de Développement Agricole et Rural.
- **ppm**: Partie par million.

- **Prév:** Prévisions.
- **Prov:** Provisions.
- **QI :** Quintal.
- **Rdt:** Rendement.
- **ST:** Solide total.
- **STS:** Solide total en suspension.
- **t/min:** Tour par minute.
- **t:** Temps.
- **T:** Tonne.
- **TN:** Azote total.
- **TOC:** Carbone organique total.
- **TXB2:** Thromboxane B2.
- **UV:** Ultra violet.
- **vit:** vitamine
- **V:** Volume.

Introduction générale

Les pays Méditerranéens sont devenus les plus grands consommateurs, producteurs et exportateurs des olives et de l'huile d'olive. Ils fabriquent approximativement 90 % du total de l'huile d'olive produits (Huang et *al.*, 2008). L'Espagne est le principal producteur mondial, suivi de l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Syrie et la Tunisie. Cependant, beaucoup d'autres pays tels que l'Argentine, l'Australie et l'Afrique du Sud sont devenus des producteurs émergents car ils font la promotion de la culture intensive de l'olivier (Roig et *al.*, 2006).

L'Algérie, pays comptant environ 21 millions d'oliviers répartis sur une superficie de 288 442 ha compte parmi les pays du bassin méditerranéen où l'olivier trouve son aire d'extension. Il représente l'activité arboricole la plus dominante du point de vue superficie (Moussaoui, 2007).

De nos jours, avec la promotion des vertus bénéfiques pour la santé de l'huile d'olive, la demande ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment (Benyahia et Zein, 2003).

Les procédés traditionnels et industriels de fabrication de l'huile d'olive (El Hadrami et *al.*, 2004), en plus de leur production principale qui est l'huile, laissent deux sous produits l'un solide appelé grignon et l'autre liquide appelé margine (Moussaoui, 2007). Le système de décantation à trois phases implique l'addition de grande quantité d'eau (jusqu'à 50 l/100 kg de pâte d'olive), entraînant une large production mondiale de margines, de plus de 30 millions m³/an (Borja et *al.*, 1997; Casa et *al.*, 2003). Ces dernières sont habituellement déchargées dans des canalisations non adaptées ou directement dans des terres agricoles (El Hadrami et *al.*, 2004), ce qui peut avoir un grand impact environnemental sur le sol et sur l'eau en raison de leur forte phytotoxicité (Roig et *al.*, 2006).

Plusieurs études ont prouvé les effets négatifs de ces déchets sur la population microbienne du sol (Paredes et *al.*, 1987 ; Colarieti et *al.*, 2006), sur les plantes durant la germination et la croissance des graines (Paixao et *al.*, 1999 ; El Hadrami et *al.*, 2004), sur l'écosystème aquatique (DellaGreca et *al.*, 2001) et même au milieu de l'air (Rana et *al.*, 2003). Leurs principaux composés organiques sont les sucres, les pectines, les acides organiques, les polyalcools, les lipides, les composés azotés, les polyphénols et les polymères catéchol mélaniniques (Colarieti et *al.*, 2006).

Il a été suggéré que les principaux composés phytotoxiques des margines sont les composés phénoliques (D'Annibale et *al.*, 2004 ; Casa et *al.*, 2003 ; El Hadrami et *al.*, 2004) dont la teneur est élevée (4.98 g/l d'après Morillo et *al.*, 2009), cependant, ils possèdent une forte activité antioxydante (Galli et Visioli, 1999 ; Fki et *al.*, 2005a; Obied et *al.*, 2005a) où ils attribuent une valeur précieuse aux co-produits rejetables (Ranalli et *al.*, 2003). Les propriétés antioxydantes des margines peuvent orienter, les résidus de l'huile d'olive en source d'antioxydants naturels à bas prix (Atanassova et *al.*, 2005).

L'olivier est très riche en composés phénoliques, mais uniquement 2% de la teneur en phénols totaux du fruit passent dans la phase huileuse, tandis que la quantité restante est perdue dans les margines (~ 53%) et dans les grignons (~ 45%) (Rodis et *al.*, 2002).

Le profil phénolique des margines identifié est représenté, principalement par l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide *para*-hydroxyphényl acétique, l'acide caféique, l'acide *para*-coumarique, l'acide férulique (Fki et *al.*, 2005a), l'acide vanillique, le verbascoside, la lutéoline-7-glucoside, l'acide élénolique, la forme dialdéhydrique de décarboxyméthyle oleuropéine aglycone, le ligstroside et la lutéoline (De Marco et *al.*, 2007). Outre les composés phénoliques déjà connus, des nouveaux polyphénols tels que l'hydroxytyrosol 4- β -D-glucoside et le 3,4-dihydroxyphénylglycol ont été isolés (Sayadi et *al.*, 2004).

Les huiles avec une teneur élevée en acides gras insaturés, particulièrement les acides gras polyinsaturés sont plus susceptibles à l'oxydation. Cela modifie leurs propriétés organoleptiques, et affecte leur durée de vie (Bouaziz et *al.*, 2008a), et aboutit à une perte de la valeur nutritionnelle des aliments ainsi que les changements de couleur, de texture, sensoriels et d'autres propriétés physiologiques (Iqbal et Bhangar, 2007). En raison de ces changements, les consommateurs tendent à rejeter les produits oxydés et les industries subissent des pertes économiques.

Afin de résoudre le problème de la stabilité des huiles et lipides, des antioxydants synthétiques, tels que butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), 2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone (TBHQ) ont été utilisés comme additifs alimentaires (Bouaziz et *al.*, 2008a). Ils sont ajoutés à des concentrations allant de 50 à 200 ppm aux huiles et graisses pour inhiber le développement des peroxydes durant le stockage de l'aliment (Loliger, 1991). Cependant il a été révélé que ces composés peuvent être impliqués dans beaucoup de risques sanitaires, y compris le cancer et la carcinogénèse (X Hou, 2003).

En conséquence, il y a un besoin urgent pour d'autres types de composés à utiliser comme antioxydants. Les olives, les feuilles de l'olivier et les margines représentent une source potentielle de plusieurs antioxydants naturels (Fki et *al.*, 2005a), d'où l'intérêt de les extraire à partir des margines afin de résoudre un problème environnemental d'un côté, et de les valoriser pour une application ultérieure en agroalimentaire, pharmacie, cosmétique... etc, d'un autre côté.

Ce présent travail expérimental est composé de deux parties :

La 1^{ère} partie porte sur:

- L'extraction des composés phénoliques à haute valeur ajoutée à partir des margines en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant extracteur, et la détermination du profil phénolique par HPLC ainsi que le taux des polyphénols totaux et des *o*-diphénols.
- La détermination de l'activité antioxydante de ces composés (activité antiradicalaire, le pouvoir réducteur du fer).

La 2^{ème} partie consiste à :

- Etudier l'effet de l'addition de l'extrait phénolique sur la stabilité de deux huiles alimentaires raffinées et une huile d'olive, à une température de 63°C, à différentes doses et de durées de stockage.
- L'évaluation de la stabilité oxydative des huiles déterminée par l'indice de peroxyde, de l'absorbance en ultraviolet à 232 nm et à 270 nm, ainsi que la détermination du profil en acides gras notamment les acides gras monoinsaturés et les acides gras polyinsaturés avant et après stockage par CPG.
- Evaluer l'efficacité antioxydante des extraits naturels des margines dans la diminution de l'oxydation.

L'objectif est de valoriser les composés phénoliques naturels extraits des margines en les comparant avec un antioxydant phénolique de synthèse, le BHT en les incorporant dans

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

trois huiles végétales alimentaires, et par conséquent réduire le problème environnemental causé par les margines.

Partie I. Etude bibliographique

1^{er} Chapitre : I. Données générales sur l'olivier, la production et la technologie oléicole

I.1. Historique

Selon les études archéologiques et paléobotaniques, la domestication de l'olivier avait pris naissance au Proche Orient au quatrième millénaire avant notre ère. L'olivier a pour origine, la région syro-iranienne (Argenson et *al.*, 1999). La culture de l'olivier serait ensuite étendue à un peu partout dans le monde, mais elle se trouve concentrée dans le bassin méditerranéen qui représente environ 95 % du patrimoine oléicole mondial (François, 1974 ; Cuellar, 2000).

Les dernières recherches génétiques montrent que l'origine de l'olivier cultivé, n'est peut être pas orientale. Selon les résultats de recherches d'une équipe de l'INRA Montpellier, cette origine pourrait être simultanée à l'Est et à l'Ouest du bassin méditerranéen.

Toujours est-il, l'oléastre véritable aurait existé en ALGERIE depuis le 12^e Millénaire avant notre ère. De ce point de départ jusqu'aux phéniciens (4000 à 3000 Av J. C), aucune indication ne permet d'en comprendre l'évolution. A partir de la période phénicienne, le commerce de l'huile d'olive a permis le développement de l'oléiculture au niveau de tout le bassin méditerranéen. A l'époque romaine l'oléiculture marchande s'est développée dans les régions sous-occupation pour permettre l'approvisionnement de ROME en huile d'olive. Cela est attesté par l'évolution dans les techniques de broyage et l'extraction d'huile (Mendil et Sebai, 2006).

I.2. Distribution géographique

L'aire d'extension de la culture de l'olivier (Figure 1) définit l'aire biogéographique de la sphère méditerranéenne et du climat méditerranéen.



Figure 1. Aire d'extension de l'olivier (d'après Ghedira, 2008)

I.3. Nom vernaculaire

Noms vernaculaires de l'olivier
Français : olivier (olive)
Anglais : olivetree (olive)
Allemand: olbaum (Olive)
Italien: ulivo (olivo)
Espagnol : olivo (aceituna)
Portugais : oliveira (azeitona)
Arabe : chajaret azzeitoun (zeitouna)

Tableau 1. Noms vernaculaires de l'olivier (Ghedira, 2008)

I.4. Origine botanique de l'espèce *Olea europea* L

Origine botanique de l'espèce <i>Olea europea</i> L.	
Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement :	<i>Magnoliophytina</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe :	<i>Dialypétales</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Oleaceae</i>
Genre :	<i>Olea</i>
Espèce :	<i>Olea europea</i> L.
Sous-espèce :	<i>O. europea</i> subsp. <i>europea</i> var. <i>sylvestris</i> <i>O. europea</i> subsp. <i>europea</i> var. <i>europea</i>

Tableau 2. Origine botanique de l'*Olea europea* L. (Ghedira, 2008)

I.5. Description botanique de l'olivier

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 mètres de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre, crevassée. Les feuilles, blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées. Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (Bruneton, 1999).

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa très grande longévité et également par sa grande rusticité lui permettant de se développer sous des conditions de climat subaride et sur des sols parfois très pauvres (Moussaoui, 2007) et infertiles (Huang, 2008). Selon ce dernier, l'olivier a une capacité inhabituelle de développer des racines à partir des bourgeons temporaires à l'extrémité inférieure de leur tronc. Il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir de boutures et il n'est pas rare de voir des vieux oliviers dépasser 15 à 20 m de hauteur, avec un tronc de 1.50 à 2 m de diamètre (Moussaoui, 2007).

Le rendement en fruits est soumis au rythme physiologique de l'alternance qui est une des caractéristiques de l'olivier. L'espèce la plus répandue de l'olivier est l'*Olea europaea* et son genre comprend 35 espèces d'arbustes et arbres persistants (Boskou, 1996).

La maturation des olives s'étend sur plusieurs mois, son goût et sa composition chimique dépendent des conditions de croissance (la latitude, la disponibilité de l'eau, et la température). La maturation, la récolte et le processus de développement des olives et l'huile d'olive dépendent fortement des techniques régionales (Huang, 2008).

I.6. Composition physicochimique du fruit et des feuilles

I.6.1. Composition physique

Selon Nerfaoui (1983), l'olive est constituée de l'épicarpe (2-2.5 % de poids de l'olive), de mésocarpe ou pulpe (71.5-80.5 %), de l'endocarpe (17.3 à 23.0 %) et d'amandon (2.0-5.5 %).

I.6.2. Composition chimique

L'olivier est riche en eau (40-45 %), en glucides (10-20 %) et en lipides qui représentent environ 30 % du fruit mûr. Les constituants chimiques du fruit et des feuilles de l'olivier résumés par Ghedira (2008) sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau 3. Principaux constituants chimiques du fruit et des feuilles

Parties utilisées	Fraction ou famille chimique	Constituants chimiques
<i>Fruit</i>	Fraction saponifiable Fraction insaponifiable (teneur /100 g)	Acide palmitique 7.5-20 % Acide palmitoléique 0.3-3.5 % Acide stéarique 0.5-5.0 % Acide oléique 55-83 % Acide linoléique 3.5-21.0 % Acide α -linoléique > 0.9 % Hydrocarbures dont le squalène : 300-700 mg Stérols dont le β -sitostérol : 70-90 mg Alcools triterpéniques : 100-300 mg α -tocophérol : 4-13 mg β -tocophérol : 1-2 mg composés phénoliques : 50 mg dont l'hydroxytyrosol 0.01-1 mg et tyrosol
<i>Feuilles</i>	Triterpènes Flavonoïdes Séco-iridoïdiques Acides phénols	Acide oléique, acide maslinique, acide hydroxy-oléanolique. Lutéoline, Kampférol, myricétine, quercétine, apigénine. Rutoside, quercitrine et des glucosides de l'apigénine et de la rutéoline. Oleuropéoside, II-déméthyl-oleuropéoside, oléoside, diméthylester oléoside, ligustroside, et des aldéhydes séco-iridoïdique non hétérosidiques (oléacéine) Acides caféique, acide caféoyquinique (acide chlorogénique), acide p-coumarique, verbascoside.

1.7. L'oléiculture dans le monde

1.7.1. Verger oléicole mondial

Le patrimoine oléicole mondial est constitué de 850 millions d'arbustes qui occupent une superficie d'environ 8.7 millions d'hectares (Cuéllar, 2000). La production est environ 10

millions de tonnes d'olives dont 90 % sont destinés à la production d'huile et les 10 % restants à la préparation d'olive de table (Moussaoui, 2007).

Tableau 4. Répartition géographique de la production de l'olivier dans le Monde (millier de tonnes) (FAOSTAT, 2003)

	89-91	2000	2001	2002	2003
Monde	10 785	15 359	15 244	15 724	17 169
Algérie	119	217	200	300	300
Maroc	532	400	420	470	470
Tunisie	933	550	150	500	500
Grèce	1560	2274	2249	2574	2400
Italie	2638	2821	2894	3231	3150
Espagne	3099	4944	6763	4278	6997
Portugal	2638	2821	2894	3231	280

I.7.2. Production mondiale d'huile d'olive

La répartition géographique de la production mondiale d'huile d'olive est représentée dans le tableau 5 (COI).

pays	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6	2006/7	2007/8	2008/9 (prov)	2009/10 (prév)
Algérie	33.5	26.5	25.5	15.0	69.5	33.5	32.0	21.5	24.0	59.0	50.0
UE	1878.5	1940.5	2463.5	1942.5	2448.0	2357.0	1928.5	2031.0	2118.5	1933.0	2148.5
Jordanie	6.5	27.0	14.0	28.0	25.0	29.0	22.0	37.0	21.5	18.5	27.5
Maroc	40.0	35.0	60.0	45.0	100.0	50.0	75.0	75.0	85.0	85.0	95.0
Syrie	81.0	165.0	92.0	165.0	110.0	175.0	100.0	154.0	100.0	130.0	150.0
Tunisie	210.0	130.0	35.0	72.0	280.0	130.0	220.0	160.0	170.0	150.0	140.0
Turquie	70.0	175.0	65.0	140.0	79.0	145.0	112.0	165.0	72.0	130.0	147.0
Autres pays producteurs	6.5	7.5	7.5	7.5	7.0	7.0	8.0	15.0	15.0	18.0	18.0
Totale dans le Monde	2374.5	2565.5	2825.5	2495.5	3174.0	3013.0	2572.5	2767.0	2713.0	2665.5	2881.5

Tableau 5. Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (1000 tonnes)

La production d'huile d'olive se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, Syrie, Tunisie, Maroc et Algérie. La production de ces pays représente 94 % de la production mondiale. En 2001, la production mondiale atteignait les 2.5 millions de tonnes (COI).

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAOSTAT, 2006), 2.7 millions de tonnes de l'huile d'olive sont produites annuellement dans le monde entier, dont 76 % sont produites en Europe, avec 35.2 % en Espagne, 23.1 % en Italie 16.1 % en Grèce, étant les plus grands producteurs de l'huile d'olive. Autres producteurs de l'huile d'olive sont l'Afrique (12.5 %), l'Asie (10.5 %) et l'Amérique (0.9 %).

Selon le COI, les pays de l'union européenne ont produit eux mêmes 2 148 500 tonnes durant la campagne 2009/10. Une quantité de 2 136 000 tonnes à savoir 75,8 % de la production mondiale d'huile d'olive est produite entre la campagne 2003/4 et 2008/9 par ces pays.

Durant la campagne 2008/9, la production mondiale d'huile d'olive atteignait 2 467 500 tonnes, et elle est de 2 817 500 tonnes entre la campagne 2003/4 et 2008/9 (COI). Selon les prévisions de ce même conseil, la production est de 2 881 500 tonnes durant la campagne 2009/10.

1.7.3. Consommation mondiale d'huile d'olive

La consommation mondiale d'huile d'olive (**Figure 2**) est passée de 1.6 millions de tonnes en 1990 à 2.8 millions en 2005. Cette croissance est due principalement à l'augmentation de la consommation dans les pays non traditionnellement producteurs et/ou consommateurs (COI).

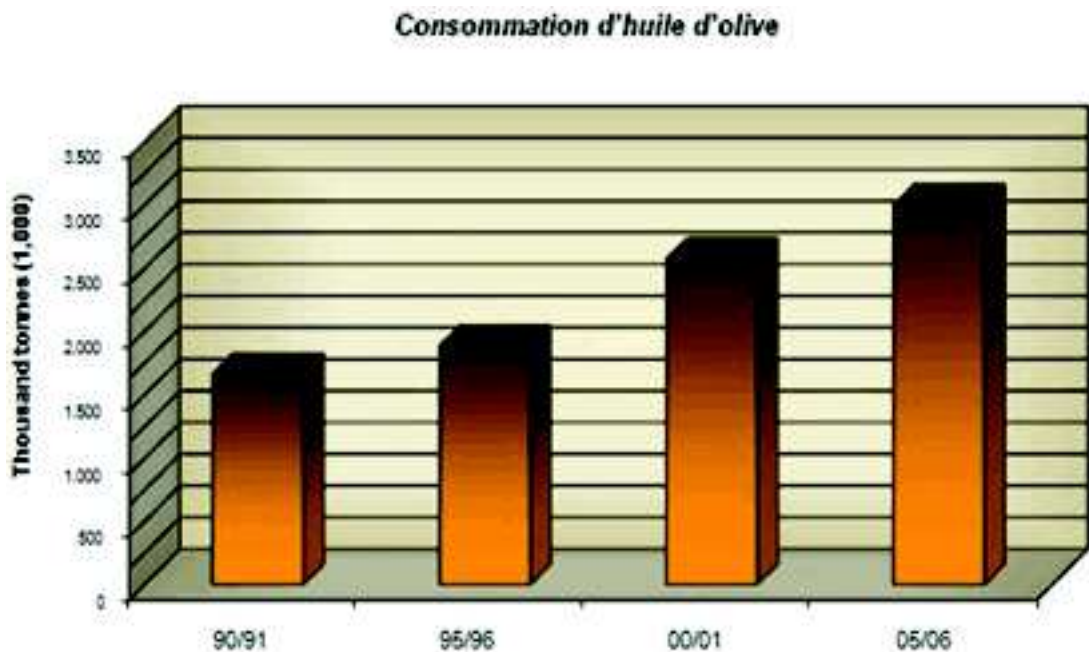


Figure 2. Evolution de la consommation mondiale de l'huile d'olive

I.8. L'oléiculture en Algérie

I.8.1. Verger oléicole

La superficie oléicole est passée de 165 600 ha en 1999 à 288 442 ha en 2004, avec un nombre de 25 500 000 arbres environ dont plus de 16 millions en production. Cette superficie est répartie dans un espace géographique divisé en régions (centre, Est, Ouest, Sud).

La plupart des oliveraies (83 % environ), sont plantées dans des zones de montagne, sur des terres accidentées, caractérisées par une pluviométrie annuelle moyenne comprise entre 400 et 900 mm. Les autres oliveraies, 17 % environ de la superficie oléicole nationale sont situées dans les plaines de l'Ouest, wilaya de Mascara, Rélizane et Oran. Elles reçoivent une pluviométrie annuelle moyenne entre 300 et 400 mm et font l'objet d'irrigation d'appoint en particulier pendant l'été et le mois de septembre (Saraoui).

La plantation des oliveraies est localisée à 83 % au niveau des zones de montagne et de piémonts, ce qui donne un caractère spécifique à la conduite de notre oliveraie, c'est-à-dire plantation en extensif avec une moyenne de 100 arbres par hectare et en isolé parfois

avec moins de 70 arbres à l'hectare. D'autres plantations conduites en intensif, sont situées dans les plaines de l'Ouest avec 200 arbres à l'hectare. Ces plantations anciennes, de la variété sigoise, destinées essentiellement pour la production d'olives de table, reçoivent des irrigations d'appoint pour assurer une bonne production d'olive de qualité reconnue (Saraoui).

I.8.1.1. Production d'olivier

Le tableau suivant représente les superficies totales cultivées d'olivier en hectare durant les onze dernières années (D.S.A.S.I, 2010).

Années	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Superficies (ha)	165600	168080	177220	190550	209730	226337	239352	263352	276253	282460	288442

Tableau 6. Superficies cultivées d'olivier en Algérie

Les productions végétales (années 2000/2006) sont indiquées dans le tableau 7 (D.S.A.S.I, 2006).

Tableau 7. Production d'olive

Années	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Olive de table (QI)	346730	335460	477690	634740	587980	857035	684750
Olive à huile (QI)	1824390	1667930	1441570	1041530	4100020	2307855	1962580
Production totale d'olive (QI)	2171120	2003390	1919260	1676270	4688000	3164890	2647330

Les oliviers comptés et rendements d'olive sont représentés dans le tableau 8 (D.S.A.S.I, 2003).

Tableau 8. Oliviers comptés et rendements par campagne

Campagnes	1999-2000	2000-2001	2001-2002	2002-2003
Oliviers comptés arbres	16 702 610	17 388 980	19 008 590	21 583 240
Rendement d'olive (kg/arbre)	14	13	13	10,8

I.8.1.2. Description des principales variétés d'olivier

Au début de 21^{ème} siècle, l'olivier tend à se développer dans des zones qui ne lui sont pas étrangères ; la steppe et les zones sahariennes. De par leur plasticité, Chemlal et Sigoise sont les variétés qui se développent le plus (Mendil et Sebai, 2006; Cuéllar, 2000).

Chemlal : Synonyme : Achamlal, Achamli, Achemlal.

Variété typique de la région de Grande Kabylie, elle occupe 40 % du verger oléicole algérien, c'est une variété rustique et tardive, avec un faible taux d'enracinement, elle est autostérile, et est toujours associée à d'autres variétés qui assurent sa pollinisation comme les variétés Azeradj et Sigoise. Le cultivar le plus utilisé à cet effet est l'Azeradj, car sa floraison coïncide avec celle de cette variété. Sa productivité est élevée et peu alternante, et est destinée à la production d'huile. L'huile produite est d'excellente qualité d'où un rendement de 18-22%. Elle résiste bien au froid et à la sécheresse et moyennement à l'œil de paon. Elle est susceptible à la tuberculose et à la verticilliose. Trop souvent confondu avec la variété Chemali de Tunisie.

Sigoise : Synonyme : Olive de Tlemcen, Olive du Tell, Olive du pays.

Originaire des plaines de Sig (Mascara), elle est cultivée principalement dans les plaines d'Oran et, dans une moindre mesure, dans la zone orientale (Constantine). Elle occupe 25 % du verger oléicole algérien, et est destinée principalement à la production d'olive de table. Elle a une double aptitude (huile dont le rendement est de 18-22 % et olives de table).

Azeradj : Synonyme : Aradj, Adjeraz.

Originaire de la Kabylie (région de Sedouk- wilaya de Bejaïa). C'est une variété rustique qui occupe 10 % de la superficie oléicole nationale, souvent en association avec la variété Chemlal, dont elle est le pollinisateur. Elle possède une double aptitude (huile et olive de table), le rendement en huile est de 24-28 %.

Limli : Synonyme : Imeli, Limeli

Originaire de Sidi Aïch (Béjaïa), localisée sur les versants montagneux de la basse vallée de la Soummam jusqu'au littoral et elle occupe 8 % du verger oléicole algérien. La production est destinée à l'extraction d'huile (Rdt : 20-24 %).

En plus des variétés citées précédemment, Mendil et Sebai (2006) définissent d'autres variétés d'origine algérienne

Abani, Aberkane, Aeleh, Aghchren d'El Ousseur, Aghchren de Titest, Aghenfas, Agrarez, Aguenau, Aharoun, Aimel, Akerma, Blanquette de Guelma, Bouchouk Guergour, Bouchouk Lafayette, Bouchouk Soummam, Boughenfous, Bouichret, Boukaila, Bouricha, Ferkani, Grosse du Hamma, Hamra, Longue de Miliana, Mekki, Neb Djemel, Ronde de Miliana, Rougette de Mitidja, Souidi, Tabelout, Tefah, Takesrit, Zeletni.

On peut trouver aussi d'autres variétés étrangères combinées aux variétés algériennes telles que : Verdale, Lucques d'origine française, Cornicabra, Gordale, Sévillane d'origine espagnole (Mendil et Sebai, 2006), Leccino, Moraiolo, Pendorino et Coratine d'origine italienne (Talentikite et *al.*, 1993).

1.8.2. L'industrie oléicole

1.8.2.1. Production d'huile d'olive en Algérie

La production de la campagne 2003-2004, est exceptionnelle (76 000 T) et le tableau 9 représente la production d'huile d'olive en hl (D.S.A.S.I, 2006).

Tableau 9. Production d'huile d'olive

Années	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Production d'huile d'olive (hl)	333 200	263 880	256 000	165 780	757 070	379170	349 920

Le rendement moyen en huile par quintal est de 17 l.

1.8.2.2. Consommation d'huile d'olive en Algérie

L'huile d'olive est consommée pratiquement dans sa totalité dans les zones de production. La consommation par habitant est passée d'une moyenne de 0.85 kg au cours des années 80 et 90 à 1.43 kg en 2000 et 1.53 kg en 2004, soit une augmentation de 80 %. La moyenne

de consommation des campagnes (2000/1-2003/4) est de 33 000 T avec un maximum en 2003/4, grâce à une excellente récolte.

I.8.2.3. Les huileries et processus technologiques d'élaboration de l'huile d'olive

Selon Kerboua (2003), l'appareil de transformation pour la production de l'huile d'olives est composé dans sa majorité des huileries traditionnelles (1460), 85 huileries avec superpresse, 201 huileries modernes à système de centrifugation.

Les confiseries sont localisées, en majeure partie dans la wilaya de Mascara, Rélizane, terroir de production des olives de table de la variété Sigoise. Elles sont au nombre de 211 petites unités, dont 41 confiseries réalisées dans le cadre de PNDAR (2000/3) (Saraoui)

Trois systèmes sont utilisés à travers le monde pour l'extraction de l'huile d'olives à l'échelle industrielle, à savoir le système traditionnel par presse, le système de décantation à trois phases, le système moderne de centrifugation à deux phases. Actuellement les systèmes avec centrifugation à deux et à trois phases sont les plus couramment utilisés (Morillo et al., 2009) dans le monde.

Le système à trois phases, introduit en 1970 pour améliorer le rendement d'extraction, produit trois effluents : l'huile d'olive pure, les margines et un sous-produit solide (tourteaux) appelé grignons (Morillo et al., 2009).

I.8.2.3.1. Système d'extraction de l'huile d'olive

Il y a deux moyens de l'extraction d'huile d'olive : le pressage traditionnel, utilisé depuis des siècles avec quelques modifications mineures, et centrifugation, que l'industrie d'huile d'olive a pris en charge dans les dernières décennies. On a deux procédés de centrifugation, appelés le système de centrifugation à trois phases et le système de centrifugation à deux phases, qui sont décrits dans la (Figure 3).

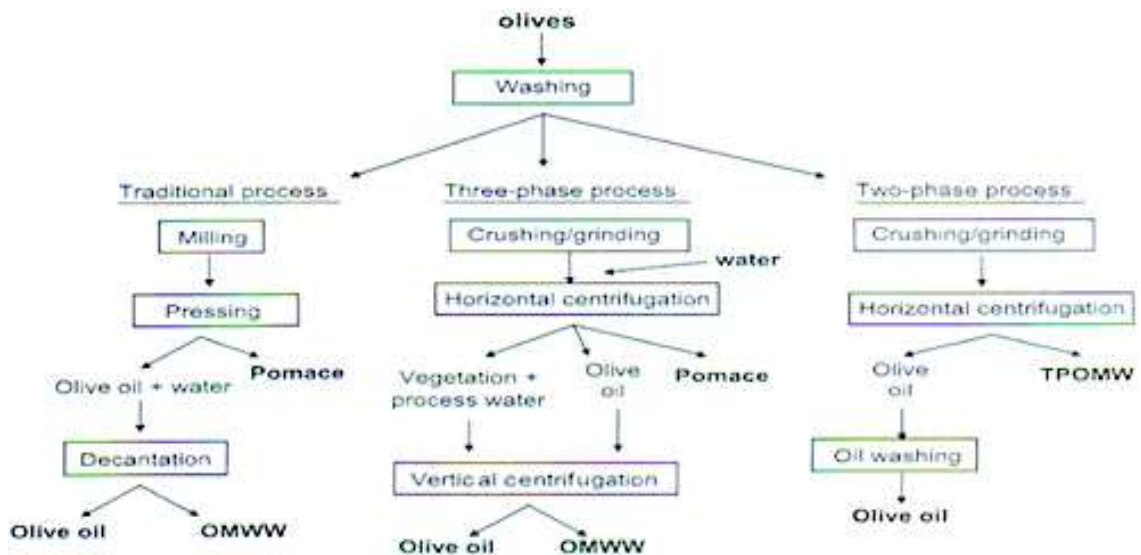


Figure 3. Organigramme simplifié des procédés d'extraction : système de presse traditionnel, système de décantation à trois phases et système de centrifugation à deux phases (d'après Morillo et al., 2009)

Après la récolte des olives, et leur stockage qui doivent se faire dans de bonnes conditions, et avant de procéder à l'extraction, les olives doivent être lavées, broyées à l'aide d'un broyeur métallique et malaxées afin de réunir en une phase continue les gouttes d'huiles dispersées dans la pâte.

Les procédés d'extraction de l'huile d'olive existants sont de trois types :

- Système discontinu d'extraction par presse

Les unités de trituration équipées en presses, et qui sont classées selon la pression exercée ; unités traditionnelles Maâsras dont la pression est de l'ordre de 100 kg/cm^2 , unités semi-modernes dont la pression est aux environs de 200 kg/cm^2 et les unités modernes équipées en super-presses pouvant développer une pression de 400 kg/cm^2 (Chimi, 2006).

La pâte est répartie en couche sur des scourtins (disques en fibres naturelles ou synthétiques), à raison de 5 à 10 kg/scourtin, et permettant la filtration lors de la pression. Ces disques sont empilés les uns sur les autres pour être ensuite pressés d'une manière progressive (Chimi, 2006 ; Benyahia et Zein, 2003). On obtient deux phases, une, liquide l'huile et l'eau de végétation et l'autre solide, les grignons (pulpe et noyaux) qui reste entre les scourtins.

Le moût obtenu (huile et eau de végétation) est séparé soit par décantation naturelle (huile remonte à la surface des margines, puis récupérée) vu les densités différentes de ces deux liquides, soit par centrifugation (Benyahia et Zein, 2003).

- Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases

Ce sont les unités de trituration équipées en chaînes continues à trois phases avec deux centrifugations, la première pour séparer les grignons et les huiles plus margines, et la deuxième pour séparer les huiles et les margines (les trois phases sont les grignons, les margines et les huiles).

Ces installations traitent jusqu'à 100 tonnes d'olives/jour, et elles nécessitent l'addition d'eau tiède ($20\text{-}25^\circ\text{C}$), ce qui est à l'origine d'un certain nombre d'inconvénients telle que l'obtention d'une huile d'olive appauvrie en polyphénols totaux et en *o*-diphénols responsables de l'activité antioxydante, en raison du passage partiel de ces derniers dans les margines. Ce système génère un volume considérable de margines et consomme des grandes quantités d'eau et d'énergie avec des installations très coûteuses (Roig et *al.*, 2006).

- Système continu d'extraction avec centrifugation à deux phases

Ce sont les unités de trituration équipées en chaînes continues à deux phases avec une centrifugation, permettant de séparer l'huile et les grignons humidifiés par les eaux de végétation provenant de l'olive (les deux phases sont les huiles et les grignons). Ce procédé technologique ne nécessite pas d'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides contenant les grignons et les margines. Il a une capacité de traitement élevée (jusqu'à 100 tonnes/jour). Le décanteur à deux phases permet d'obtenir des huiles d'olives plus riches en polyphénols totaux et en *o*-diphénols (et donc plus stables) que les huiles obtenues avec le décanteur conventionnel à 3 phases et le système d'extraction par des presses (Chimi, 2006).

En Espagne, ce système (1991/1992) a remplacé rapidement le système d'extraction à trois phases, pour des raisons écologiques, il réduit les déchets des moulins de 75 %, en raison de la réduction de la consommation d'eau (Roig et *al.*, 2006).

Le rendement industriel en huile est légèrement amélioré, passant de 84.5 % (système presse) à 85.5 % (décanteur à 3 phases) à 86.1 % (décanteur à 2 phases) (Chimi, 2006) (Tableau 10)

Tableau 10. Rendement en huile et caractéristiques des sous-produits obtenus avec les différents systèmes d'extraction d'huile

Déterminations	Décanteur à deux phases				Décanteur à trois phases				Système super-presses									
Rendement (%) <i>Grignons</i> Quantité (kg/100 kg d'olives) Humidité (%) Huile (%) Huile (kg/100 kg d'olives) <i>Margines</i> Volume (litres/100 kg d'olives) Huile (kg/100 kg d'olives)	86.1	75.5	57.3	3.5	2.7	3.5	6.7	6	55.4	3.6	28.4	15	10.5	35.5	6.8	5.4	75	2.4
Huile totale dans les sous-produits (kg/100 kg d'olives)	2.8				3.1				7.8									

1.8.2.3.2. Impact des procédés d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive

- Impact du procédé d'extraction par les super-presses

L'huile extraite par les presses est caractérisée par un degré d'oxydation et une acidité élevés, des défauts organoleptiques, une durée de conservation réduite. Le système de presse peut donner une huile riche en polyphénols permettant de la conserver convenablement (Chimi, 2006).

- Impact du procédé d'extraction par centrifugation à trois phases

L'extraction de l'huile d'olive dans les unités équipées de centrifugation à 3 phases nécessite l'ajout de l'eau pour séparer les trois phases précitées. L'huile produite se trouve appauvrie en polyphénols naturels considérés comme antioxydants, et par conséquent ne résiste pas à l'oxydation car le taux de dégradation des polyphénols reste élevé.

- Impact du procédé d'extraction par centrifugation à deux phases

L'extraction de l'huile d'olive dans les unités équipées de centrifugation à 2 phases n'altère pas la qualité de l'huile produite. Les opérations de transformations se passent en clos et sont optimisées. L'huile ainsi extraite se trouve riche en conservateurs naturels (polyphénols totaux et *ortho*-diphénols), par conséquent elle serait caractérisée par une durée de conservation élevée.

2^{ème} Chapitre : II. Les sous-produits de l'huilerie d'olive

II.1. Introduction

De la mise en œuvre de 1000 kg d'olive, on obtient en moyenne 200 kg d'huile et, en fonction des procédés d'extraction, le tableau 11 indique les proportions générées (Azbar et al., 2004)

Tableau 11. Données entrant et sortant des trois procédés de production d'huile d'olive

Procédés de production	Entrée	Quantité apportée	Sortie	Quantité produite (kg)
Procédé par presse traditionnel	Olives Eau de lavage Energie	1 tonne 0.1-0.12 m ³ 40-63 kWh 1	Huile Déchets solides Margine	~ 200 ~ 400 ~
Procédé à trois phases	Eau de lavage Eau fraîche pour la décantation Energie	0.1-0.12 tonne 0.5-1 m ³ 90-117 kWh 1	Huile Déchets solides Margine + eaux usées	600 200 500-600 1000-1200
Procédé à deux phases	Olives Eau de lavage Energie	0.1-0.12 tonne 0.5-1 m ³ <90-117 kWh	Huile Solide	

Pour la production d'un kg d'huile d'olive, il y a une production de 7.5 kg de margines contenant 0.7 kg de DCO, 0.08 kg de composés phénoliques toxiques, 1.26 kg de déchets solides (Vlyssides et al., 2004).

En raison de leur instabilité, les phénols des margines ont tendance à se polymériser durant le stockage en des molécules à hauts poids moléculaires condensées, qui sont particulièrement difficiles à dégrader (Ayed et al., 2005 ; Crognale et al., 2006). Pour ces raisons, l'élimination non contrôlée des margines est devenue un grand problème dans les pays méditerranéens en raison des effets de pollution du sol et de l'eau (Sierra et al., 2001).

L'industrie oléicole en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux sous produits, l'un liquide appelé margine et l'autre solide appelé grignon.

II.2. Margines

Les margines (*aqua reflue* en Italie ; *alpechin* en Espagne ; *katsigaros* en Grèce ; *zebar* dans les pays arabes) sont de couleur rouge foncé à noire, liquide faiblement acides avec une conductivité élevée, obtenues par la transformation mécanique des olives durant la production d'huile d'olive (Kapellakis et al., 2008). Sa couleur sombre dépend de l'âge et le type des olives transformées ainsi que la technologie utilisée (Yeşilada et al., 1999).

Les quantités produites sont abondantes dans l'extraction à 3 phases car elle nécessite une injection d'eau à la pâte avant centrifugation (Benyahia et Zein, 2003). De nouveaux systèmes de centrifugation ont été développés qui exigent soit moins de 10-20 l ou aucun ajout d'eau durant la séparation d'huile (D'Annibale et al., 2003).

Il est très difficile de calculer le volume des margines produites à travers le monde, car cela dépend de plusieurs paramètres, telles que la variété, la maturité du fruit, techniques culturales, et les conditions géologiques et climatiques. Cependant, il est fortement dépendant du système de transformation (Kapellakis et al., 2008).

II.2.1. Composition et caractéristiques physicochimiques

Les caractéristiques physicochimiques des margines sont assez variables, en fonction des conditions climatiques, de la variété d'olivier, de degré de maturité du fruit, du temps de stockage, et de procédé d'extraction (Fiorentino et al., 2003).

Les margines contiennent la majorité des espèces chimiques solubles dans l'eau présentes dans l'olive, une forte charge organique et rapport C/N élevé, la valeur de la demande chimique en oxygène (DCO) dépasse 200 g/l, et ont un pH acide entre 4 et 6 (Morillo et al., 2009). Elles sont composées d'eau (83-92 % en poids), des sucres, et d'autres substances organiques, y compris les protéines facilement fermentescibles, les acides organiques (acides acétique, fumarique, glycérique et oxalique), des petites quantités d'huile d'olive émulsionnées, des phénols, des substances cireuses et résineuses, des vitamines et des traces de pesticides (Kapellakis et al., 2008) et présentent des concentrations élevées de matière solide totale (ST) 20 g/l (Rivas et al., 2000).

Les données sur la composition chimique calculées par Morillo et al. (2009) à partir de huit études citées par Roig et al. (2006) sont représentées dans le tableau 12.

Tableau 12. Composition chimique des margines

Paramètres	Moyenne	Variation (Ecart)
Matière sèche (%)	6.72	4.84 - 8.36
pH	4.84	8.36 - 55.80
CE (dS/m)	55.80	0.63 - 390.09
Matière organique (g/l)	390.09	6.25 - 3270.57
TOC (g/l)	3270.57	128.46 - 52620.35
TN (g/l)	52620.35	12.32 - 81629.23
C/N	81629.23	2.03 - 115231.15
N (g/l)	115231.15	
P ₂ O ₅ (g/l)		
K ₂ O (g/l)		
Na (g/l)		
Ca (g/l)		
Mg (mg/l)		
Fe (mg/l)		
Cu (mg/l)		
Mn (mg/l)		
Zn (mg/l)		
Densité (g/cm ³)		
Lipides (g/l)		
Phénols (g/l)		
Hydrates de carbone (g/l)		
DCO (g/l)		
DBO (g/l)		

II.2.2. Impact des margines sur l'environnement

L'élimination et le traitement des margines sont les principaux problèmes de l'industrie de l'huile d'olive en raison de leurs fortes charges organiques et leur teneur en substances phénoliques phytotoxiques et antimicrobiennes (Aktas et al., 2001 ; Vlyssides et al., 2004 ; Capasso et al., 1995 ; Ramos-Cormenzana et al., 1996 ; Casa et al., 2003 ; Cereti et al., 2004) qui résistent à la dégradation biologique

La toxicité des effluents a été attribuée à leurs constituants phénoliques, qui constituent 1.5 à 8 g/l. Les margines deviennent de plus en plus noires durant le stockage, à cause de l'auto-oxydation et de la polymérisation ultérieure des tannins, donnant une couleur sombre aux composés phénoliques. Les études de toxicité et de la biodégradabilité des margines, dans des conditions anaérobiques montrent que les composés phénoliques avec haut poids moléculaires sont responsables de la couleur noire des margines, ne sont pas facilement biodégradables, et présentent une faible toxicité. En revanche, les simples composés phénoliques et les tannins sont hautement toxiques mais biodégradables (Hamdi, 1992 ; Paixão et Anselmo, 2002).

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques simples à faible poids moléculaire sont responsables des effets toxiques sur la germination des graines (Aliotta et al., 2002).

C'est parce que les phénols d'huile d'olive sont amphiphiles et essentiellement hydrophiles (Léger, 1999), seulement une fraction des composés phénoliques entre dans la phase huile, et une large proportion (> 98 %) est perdue avec le flux des déchets durant la transformation (Rodis et al., 2002). Il a été estimé que la charge toxique des margines en terme de composés phénoliques est jusqu'à 1000 fois plus grande que celle des eaux usées domestiques (Niaounakis et Halvadakis, 2004). Un seul mètre cube de margine est équivalent aux déchets domestiques de 1000 habitants.

L'absence des méthodes de traitement adaptées poussent les propriétaires des moulins à huiles à rejeter les margines dans la nature sans aucun contrôle, ce qui peut causer :

- La pollution des eaux

Elles sont le plus souvent rejetées dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun traitement préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces. La très forte charge en matière organique empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances.

Les margines rejetées par épandage sur les sols peuvent polluer les eaux souterraines et les nappes phréatiques elles-mêmes (Mechichi et Sayadi, 2005) ce qui affecte la qualité de l'eau potable. L'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage (Benyahia et Zein, 2003). La pollution par les margines diminue aussi la population des poissons et les organismes aquatiques (Cabrera et al., 1984 ; Fiorentino et al., 2003).

De plus, la margine contient des quantités élevées de sucres et de lipides. Les sucres provoquent une augmentation de la population microbienne, par conséquent une augmentation de la consommation d'oxygène dissout, donc une réduction de sa disponibilité pour d'autres organismes vivants entraînant un déséquilibre de l'écosystème aquatique. Les lipides forment un film imperméable, ce qui empêche la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène (Lacomelli, 2000). De même que l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux et favorise la multiplication des pathogènes.

- La pollution des sols

De nombreux auteurs ont observé les effets négatifs sur les propriétés des plantes et du sol quand les margines sont utilisées directement comme un engrais organique (Sierra et al., 2001).

Les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances tels que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne du sol, d'autres, des résidus de pesticides notamment, sont nocifs aux plantes (Benyahia et Zein, 2003).

Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par suite, une réduction de la fertilité (Lacomelli, 2000).

L'utilisation des margines peut causer une immobilisation temporaire de l'azote minéral du sol, et par conséquent, la réduction de rendement des cultures due à la déficience en azote des plantes (Tejada et Gonzales, 2003), et une absorption d'azote plus faible, principalement en présence des concentrations élevées en carbone soluble (Rees et al., 2002). Comme elles peuvent causer une toxicité aux plantes (Mechichi et Sayadi, 2005).

- La pollution de l'air

Les mauvaises odeurs posent des problèmes de pollution de l'air par le taux élevé d'ammoniacque et d'autres gaz produits lors du traitement de ces effluents (Mechichi et Sayadi, 2005; Lacomelli, 2000). La pollution atmosphérique considérable serait induite en raison de la fermentation anaérobie et de la production de gaz (méthane) (Fung, 1997).

II.2.2.1. Impact des margines sur l'environnement en Algérie

En Algérie, à Tazmalt cinq huileries modernes installées ne sont toujours pas équipées de stations de filtration. Elles rejettent à proximité des puits individuels des volumes de margines importants qui viennent se mélanger aux eaux pluviales, aux eaux usées et inonder les fermes environnantes et les protestataires soulignent que l'activité des cinq huileries génère pas moins de 200 m³/jour (Alilat, 2008).

148 huileries ont été fermées en 2009 à travers la wilaya de Tizi Ouzou par arrêtés du wali à cause de la non-conformité aux normes environnementales. Cette mesure a été prise, pour la protection du bassin versant du barrage de Taksebt (175 millions de m³) contre les risques de pollution que fait peser sur lui la margine, rejetée à l'état brut dans les cours d'eau par des huileries situées en amont de cet ouvrage hydraulique destiné à l'alimentation en AEP des wilayas de Tizi Ouzou, Boumerdès et Alger (R, 2009).

La remise en exploitation des huileries en question est tributaire de la réalisation par les concernés de bassins de décantation pour le traitement des margines. 61 unités sur les 148 fermées ont été réouvertes pour cette campagne oléicole pour avoir satisfait aux conditions énoncées (R, 2009).

II.2.3. Traitement des margines et méthodes de valorisation proposées

Afin d'éviter les impacts environnementaux, les moulins à huiles ont été forcés pour traiter ou éliminer leurs déchets. L'une des options de gestion les plus acceptées est l'utilisation des bassins de stockage qui a permis l'évaporation naturelle de l'eau des margines et, plus récemment, des stations d'épuration spécifiques sont développées.

II.2.3.1. Evaporation

La méthode d'élimination la plus connue est celle qui repose sur l'évaporation dans des bassins de stockage à l'air libre en raison des faibles coûts demandés et des conditions climatiques favorables dans les pays méditerranéens. Cependant, cette méthode nécessite des grandes surfaces et génère de nombreux problèmes telles que les mauvaises odeurs, l'infiltration et la prolifération des insectes (Roig et al., 2006).

L'évaporation de l'eau des margines engendre des boues, que l'on peut réutiliser soit dans l'agriculture soit comme source de chaleur en raison de leur teneur en huile, ou même en compostage.

II.2.3.2. Application directe dans le sol

Plusieurs recherches ont été menées sur l'application directe des margines dans le sol et ont testé leurs effets négatifs et positifs comme un engrais organique. Les effets bénéfiques sont liés à la concentration élevée en nutriments, en particulier le potassium (K), et son potentiel pour la mobilisation des ions du sol, alors que les effets négatifs sont associés avec leur teneur élevée en sels minéraux, pH faible et la présence des composés phytotoxiques, particulièrement les polyphénols (Paredes et al., 1999) cité par (Roig et al., 2006).

Les margines ont aussi une concentration élevée en potassium et des niveaux notables d'azote, de phosphore, de calcium, de magnésium, et de fer (Roig et *al.*, 2006), facteurs importants de la fertilité du sol. Comme elles peuvent être considérées comme une source d'eau et des nutriments (Zenjari et Nejmeddine, 2001).

II.2.3.3. Méthodes biotechnologiques ou biologiques

Parmi les différentes options envisageables, les traitements biologiques sont considérés les plus compatibles du point de vue environnemental, et les moins coûteux des méthodes de traitements des margines (Mantzavinos et Kalogerakis, 2005). Ils utilisent des microorganismes pour décomposer les produits chimiques présents dans les déchets de transformation des olives et/ou pour valoriser les résidus par la production des composés à valeur ajoutée telles que les substances dérivées de microbes y compris les biopolymères et les biocarburants (Morillo et *al.*, 2009).

Les méthodes biologiques sont basées sur la production des protéines, poly-hydroxy- β -butyrates, poly-hydroxy-alcanoates et exopolysaccharides, la digestion anaérobie et le compostage (Ramos-Cormenzana et *al.*, 1995; Vlyssides et *al.*, 1996; Paredes et *al.*, 2000).

II.2.3.3.1. Biodégradation aérobie

Elle repose sur l'utilisation des espèces bactériennes spécifiques pour réduire la toxicité des margines. En général, les bactéries aérobies apparaissent être très efficaces contre certains composés phénoliques de faibles poids moléculaires, mais sont relativement inefficaces contre les composés phénoliques les plus complexes (McNamara et *al.*, 2008).

En général, les informations scientifiques disponibles montrent que les champignons sont plus efficaces que les bactéries à dégrader à la fois les phénols simples et les composés phénoliques les plus complexes présents dans les déchets des moulins, et seulement peu de microorganismes, principalement les champignons lignivores (pourriture du bois), sont capables de dégrader efficacement la lignine par la production des enzymes ligninolytiques telles que la lignine peroxydase, manganèse peroxydase et les laccases (Hattaka, 1994).

II.2.3.3.2. Biodégradation anaérobie

Le principal intérêt dans la digestion anaérobie est la production d'énergie (biogaz) et la réutilisation de l'effluent en irrigation (Marques, 2001). La restriction majeure de ce traitement est l'inhibition des bactéries méthanogènes par les composés phénoliques et les acides organiques présents dans les margines (Hamdi, 1996), d'où la nécessité d'une étape de prétraitement des margines afin d'éliminer les composés indésirables. Le prétraitement proposé par Filidei et *al.* (2003) est la filtration-sédimentation.

Un prétraitement par lagunage peut être réalisé avant le rejet d'eau dans le milieu naturel. Le principe est basé sur la biodégradation des composés contenus dans les margines. Les effluents sont collectés temporairement dans un bassin en aval des sites polluants. Un milieu riche en matières organiques est créé dans le bassin et des conditions anaérobies s'y développent. Les matières organiques sont ainsi dégradées sous l'action de microorganismes et l'on peut aussi obtenir une dénitrification des eaux (Benyahia et Zein, 2003). L'eau obtenue est de qualité physicochimique acceptable et peut être rejetée dans le milieu naturel.

Aujourd'hui, les études sont portées sur la dégradation des composés phénoliques, le principal responsable de phytotoxicité. Plusieurs microorganismes ont été testés : les

champignons *Pleurotus ostreatus*, *Bacillus pumilus*, des levures : *Yarrowia Lipolytica*, etc. (Tomati et al., 1991 ; Ramos-Cormenzana et al., 1996 ; Scioli et Vollaro, 1997).

L'utilisation des margines comme substrats pour la croissance de l'*Azotobacter vinelandii* et l'application de l'effluent traité aux sols cultivés comme fertilisants a été proposé récemment par plusieurs auteurs.

II.2.3.3.3. Le compostage

Il est l'une des principales technologies pour recycler les margines, et les transformer en fertilisants. Ce processus permet le retour des éléments nutritifs aux terres agricoles. Par ailleurs, le compostage évite les effets négatifs souvent observés quand ces déchets sont directement appliqués aux sols (Roig et al., 2006).

En raison de la charge organique élevée et des quantités importantes en éléments nutritifs des plantes (N, P, K, Ca, Mg et le Fe) dans les boues de margines, le traitement par compostage pour obtenir des engrais organiques est très approprié.

Durant le compostage, les microorganismes dégradent en aérobiose les composés de carbone organique, tels que les protéines, les acides aminés et les peptides en dioxyde de carbone, eau, sels minéraux, et des matières organiques stables contenant des substances de type humique (Senesi et al., 1989). Plusieurs études ont montré qu'un fertilisant avec un niveau élevé d'humification et pas d'effet phytotoxique est obtenu par le compostage des margines.

La quantité importante des matières organiques (30-200 kg DCO m⁻³), y compris les composés aromatiques qui, en association au rapport élevé C/N et un faible pH, compromet la dégradation biologique (Marques, 2000).

II.2.3.4. Traitements physicochimiques

Les méthodes physicochimiques sont basées sur la floculation-coagulation (Achak et al., 2008; Jaouani et al., 2005), cryogenèse, ultrafiltration, osmose inverse, concentration thermique, évaporation dans des bassins. Ces méthodes sont généralement très coûteuses et/ou incapables de résoudre le problème complètement (Martinez et al., 1994).

Le traitement physicochimique consiste en l'addition des substances chimiques qui produisent la coagulation, la précipitation ou la destruction des composés organiques dissouts (Roig et al., 2006). Un prétraitement à l'aide de la chaux, permet de réduire l'effet de la pollution des margines (Aktas et al., 2001). Une nouvelle technologie est développée et consiste en la floculation des matières organiques des margines avec un polyélectrolyte commercial. Ce processus produit de l'eau destinée à l'irrigation et les boues destinées au compostage avec d'autres sous-produits (García-Gómez et al., 2003).

La détoxification physicochimique des margines est basée sur d'autres méthodes proposées, telles que la destruction photo-catalytique des composés organiques et inorganiques utilisant les radiations UV du spectre solaire (Marques et al., 1997), et le processus d'oxydation avancée par le moyen de radiation d'ozone plus UV (Benitez et al., 1997a). Cependant, ces systèmes ne sont pas souvent faisables et ont été utilisés uniquement comme prétraitement (Israilides et al., 1997) pour réduire la toxicité des margines et permettent en outre une purification biologique.

L'électrocoagulation (Inan et al., 2004 ; Khoufi et al., 2008) est un procédé d'électrolyse qui permet la séparation des margines en boues et en liquides biodégradables. Par

ailleurs, les polyphénols et certains autres produits toxiques (métaux lourds) sont éliminés. Les boues sont extraites et vont au compostage. Les liquides sont acheminés vers un biométhaniseur, et vont subir une biométhanisation, dont elle permet la transformation de la matière organique en substances chimiques diverses en condition d'anaérobiose et sous l'action des bactéries présentes dans le milieu (Benyahia et Zein, 2003). Ce procédé permet la formation de biogaz (Figure 4).

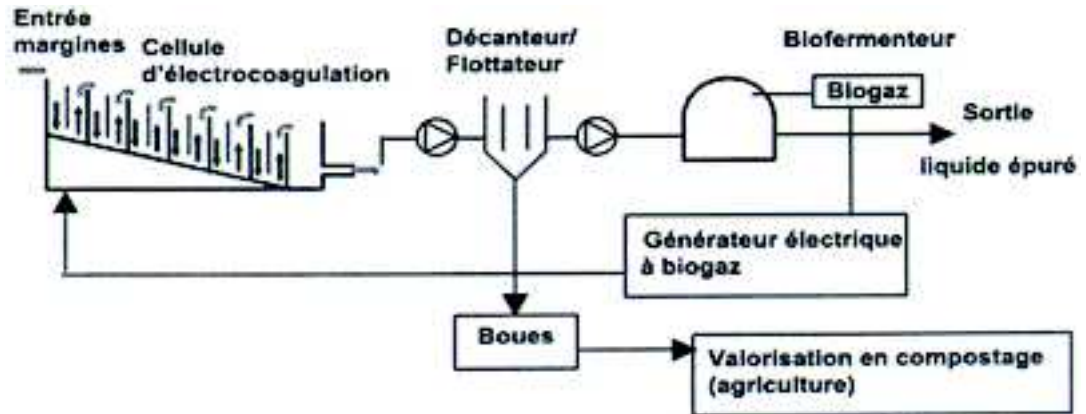


Figure 4. Schéma général de principe de l'électrocoagulation et biométhanisation pour le traitement des margines (d'après Benyahia et Zein, 2003)

II.2.3.5. Extraction des produits de valeur

Les margines sont riches en composés de valeur, telles que les substances antioxydantes, qui peuvent être utilisées en industries pharmaceutique et en cosmétique. Les plus importants antioxydants commercialisables trouvés dans la pulpe d'olive sont le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine (Roig et al., 2006).

Les composés antioxydants sont les substances phénoliques ayant une capacité de blocage et de lutte contre les attaques chimiques de l'ADN cellulaire par les radicaux oxydants. Par la suite, ils peuvent être utilisés en industrie pharmaceutique (Vlyssides et al., 2004).

II.3. Grignons

II.3.1. Introduction

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de grignons d'olive après extraction chimique (CNUCED)

Il existe différents types de grignons :

Grignon brut : qui est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive. Les grignons contiennent 4 à 5 % d'huile quand ils sont bien épuisés dans le cas d'une extraction à double pression.

Grignon épuisé : c'est le grignon brut à partir duquel, l'huile est extraite par solvant. Ce type de grignon est caractérisé par une faible teneur en matière grasse et une faible teneur en eau (Moussaoui, 2007).

Grignon tamisé : il résulte de la séparation partielle entre les débris des noyaux concassés et la pulpe par tamisage. Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par solvant, si non délipidé et dégraissé (Moussaoui, 2007).

II.3.2. Composition et caractéristiques physicochimiques

Les caractéristiques des grignons (tourteaux) sont présentées dans le tableau 13 (Vlyssides et *al.*, 2004)

Tableau 13. Caractéristiques des déchets solides (grignons) de transformation d'huile d'olive

Paramètres	Procédé par presse	Procédé à 3- phases	Procédé à 2-phases
Humidité % Huiles et graisses	27.2 ± 1.048 8.72	50.23 ± 1.935 3.89	56.80 ± 2.188 4.65
% Protéines Sucres totaux	± 3.254 4.77	± 1.449 3.43	± 1.736 2.87
% Cellulose % Hémicellulose	± 0.024 1.38	± 0.017 0.99 ±	± 0.014 0.83
% Cendres % Lignines % Azote (Kjendahl) % Phosphore sous forme P ₂ O ₅ % Composés	± 0.016 24.1	0.012 17.37 ±	± 0.010 14.54
Phénoliques % Potassium sous forme K ₂ O % Calcium sous forme de CaO % Carbone total	± 0.283 11.0	0.203 7.92 ± 0.438	± 0.170 6.63
% Rapport C/N Rapport C/P	± 0.608 2.36	1.70 ± 0.105 10.21	± 0.366 1.42
	± 0.145 14.1	± 0.209 0.51	± 0.088 8.54
	± 0.291 0.71	± 0.007 0.05	± 0.175 0.43
	± 0.010 0.07	± 0.004 0.326	± 0.006 0.04
	± 0.005 1.14	± 0.035 0.39 ±	± 0.003 2.43
	± 0.06 0.54 ±	0.033 0.44 ±	± 0.15 0.32 ±
	0.045 0.61 ±	0.043 29.03 ±	0.027 0.37 ±
	0.059 42.9 ±	2.317 57.17 ±	0.036 25.37 ±
	3.424 60.7 ±	5.033 552.9 ± 48.20	2.025 59.68 ±
	5.352 588.7 ± 51.25		5.254 577.2 ± 50.31

II.3.3. Impact environnemental

Les grignons sont un facteur de pollution liée à l'activité des huileries. Cette matière organique imprégnée d'huile lampante représente dans le cas de son rejet aux abords des oueds, une réelle menace pour la nappe phréatique.

L'industrie oléicole algérienne rejette annuellement des grandes quantités de grignons dans la nature (Moussaoui, 2007).

II.3.4. Traitement des grignons et valorisation

Après la récupération des huiles résiduelles par extraction au solvant, les grignons issus du procédé traditionnel peuvent se trouver valables pour l'utilisation en alimentation animale ou comme combustibles alternatifs et dans la préparation du composte (D'Annibale et *al.*, 2003). L'utilisation des grignons comme combustible représente dans la majorité des pays, l'application la plus courante.

Ce sous-produit de l'huilerie, mis à part son utilisation comme combustible est peu valorisé. L'extraction des huiles de grignon permet de donner une certaine valeur ajoutée à la production d'huile d'olive mais aussi et surtout d'éliminer les importantes quantités de grignons produites qui ne feraient que polluer l'environnement à chaque campagne oléicole (Moussaoui, 2007).

Plusieurs méthodes d'élimination ont été proposées pour ce déchet, tels que le traitement physicochimique (décantation avec ou sans oxydation chimique et l'osmose

inverse) agronomique (aquaculture, épandage), méthodes d'élevage des animaux (utilisation directe comme aliments ou après enrichissement protéique), et les méthodes biotechnologiques (fermentation, traitements biologiques) (D'Annibale et *al.*, 2003).

Après séparation, la coque peut être utilisée comme combustible ou comme matière première pour la fabrication du furfural. Elle peut aussi être utilisée dans l'industrie du bois (fabrication des panneaux de particules).

En Algérie, pour la récupération et la transformation des grignons produits en grandes quantités par un parc oléicole avoisinant 500 huileries, la direction de l'environnement fait état de l'agrément par le Calpi d'un projet initié par un particulier dans la zone d'activité de Boghni pour la fabrication de briques de chauffage à l'aide de particules solides, alors que les résidus d'huile récupérés serviront à la fabrication de savons et des shampooings (R, 2009).

3^{ème} Chapitre : III. Les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques

III.1. Généralités

Les composés phénoliques, sont synthétisés par les plantes en réponse au stress de l'environnement, particulièrement provoqué par un climat chaud et l'exposition prolongée des cultures aux rayonnements solaires qui est une caractéristique du bassin méditerranéen. Ce sont les produits du métabolisme secondaire des plantes, ils fournissent des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance des plantes, agissant dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, parasites et les prédateurs, de même ils contribuent à la coloration des plantes.

En plus de leurs rôles dans les plantes, les polyphénols suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies chroniques (Liu, 2007) et des maladies liées au vieillissement : Infarctus du myocarde, cancers, maladies neurodégénératives (Hennebelle et *al.*, 2004).

Des milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux : ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La désignation polyphénols est consacrée par l'usage et, alors qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs hydroxyles phénoliques dans la molécule, elle est très fréquemment utilisée pour désigner l'ensemble de ces composés (Macheix et *al.*, 2006). Ils sont classés généralement en acides phénoliques, flavonoïdes, stilbènes, coumarines et tannins (Liu, 2004).

III.2. Définition

Il est convenable de définir les composés phénoliques des plantes en termes d'origine métabolique que ceux des substances qui dérivent de la voie shikimique et le métabolisme de phénylpropanoïde (Ryan et Robards, 1998).

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et *al.*, 2004).

Les composés phénoliques sont classés comme métabolites secondaires plutôt que métabolites primaires. Les métabolites secondaires sont les composés qui ont une distribution restreinte (qui est presque spécifique de l'espèce) et qu'aucune fonction n'est évidente dans le métabolisme général (Haslam et *al.*, 1993).

III.3. La structure

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Macheix et *al.*, 1990) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (Macheix et *al.*, 2006). Ces derniers auteurs divisent les composés phénoliques selon leur forme :

III.3.1. Les formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches. Sauf exceptions, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole

III.3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques peuvent être subdivisés en deux grands groupes, les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Figures 5a et 5b).

Les dérivés de l'acide benzoïque ont une formule de base de type C6-C1, ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tannins (Macheix et *al.*, 2006 ; Liu, 2007) et des lignines (Liu, 2007).

Les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxybenzoïques) comportent les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, syringique, et l'acide gallique.

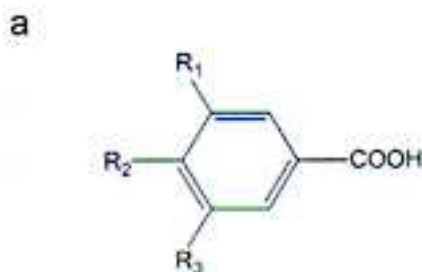


Figure 5a. Structure des dérivés de l'acide benzoïque (Liu, 2007)

Dérivés de l'acide benzoïque	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide benzoïque	H	H	H
Acides <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH
Acide vanillique	CH ₃ O	OH	H
Acide syringique	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Acide gallique	OH	OH	OH

Les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxycinnamiques), représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Ils comprennent les acides *p*-coumariques (et ses isomères les acides *o*- et *m*-coumariques) (Macheix et al., 2006 ; Liu, 2007), caféique, férulique, et l'acide sinapique. Ils sont principalement présents sous forme liée à des composants structurels de la paroi cellulaire telle que la cellulose, la lignine, et les protéines par le biais des liaisons esters (Liu, 2007).

Les acides phénoliques sont connus pour réguler la croissance dans de nombreuses plantes, en contrôlant la biosynthèse de l'auxine et le métabolisme en agissant comme des inhibiteurs oxydases ou des promoteurs.

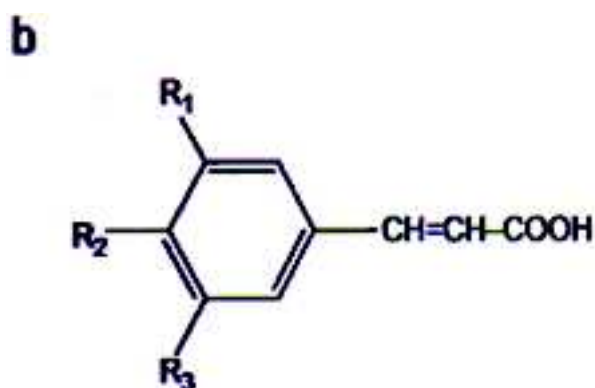


Figure 5b. Structure des dérivés de l'acide cinnamique

Dérivés de l'acide cinnamique	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide cinnamique	H	H	H
Acide <i>p</i> -coumarique	H	OH	H
Acides caféique	OH	OH	H
Acides férulique	CH ₃ O	OH	H
Acide sinapique	CH ₃ O	OH	OH ₃ O

III.3.1.2. Ensemble des flavonoïdes

De structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆), il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes, dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique comme les anthocyanes, pigments rouges ou bleus des fleurs et des fruits, les flavonols (ex : le kaempférol et la quercétine dont la répartition est très large) et les flavanes qui sont à l'origine des tannins condensés.

III.3.1.3. Autres phénols simples

Parmi les phénols simples on peut citer le catéchol, pyrogallol, un aldéhyde comme la vanilline, constituant majeur de l'arôme de la vanille, l'oleuropéine responsable de l'amertume de l'olive, certains terpènes (thymol, gossypol...), des alcaloïdes (morphine, papavérine...), les tocophérols et les tocotriénols et, les quinones.

III.3.2. Les formes condensées

Ces composés résultent principalement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées :

- **Tannins** : sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter.
- **Lignines** : résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique, dérivant respectivement des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique.
- **Formes liées à des macromolécules non phénoliques** : Certains acides hydroxycinnamiques peuvent être liés à des macromolécules non phénoliques telles que les composants glucidiques de la paroi pectocellulosique comme les hémicelluloses ou les composés pectiques, liés à la cutine, revêtement des feuilles et des fruits, liés à la subérine, l'un des constituants principaux du liège.

III.4. Fonction biologique

Les bienfaits des polyphénols alimentaires suggèrent un rôle protecteur à l'encontre des cancers et les maladies chroniques. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. On en consomme en moyenne 1 g par jour (Basdevant et *al.*, 2001).

III.5. Biosynthèse

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés, à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie bien connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine qui, par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique (Macheix et *al.*, 2006 ; Ryan et *al.*, 2002).

La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence de phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques, généralement présents dans le matériel végétal sous forme d'esters ou de glucosides. Ces esters (acides hydroxycinnamiques CoA), permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques (Figure 6)

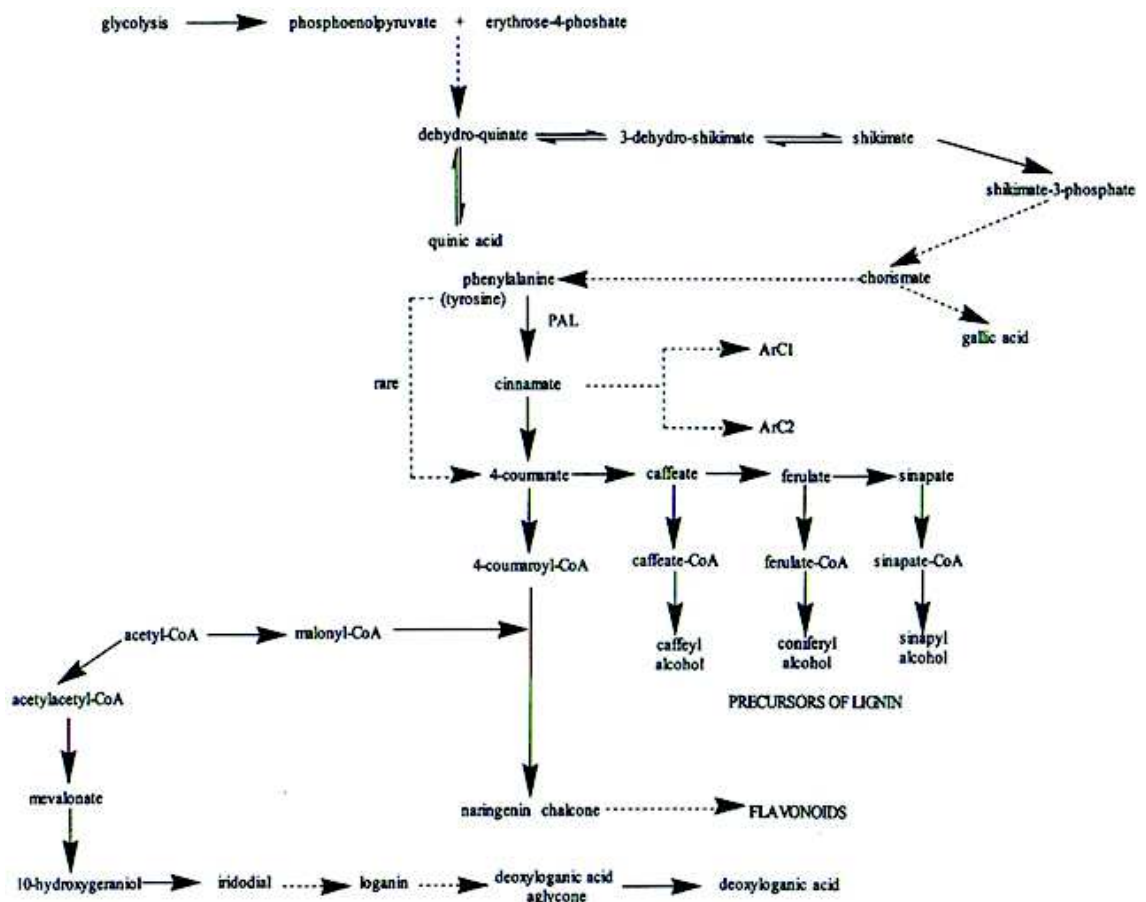


Figure 6. Voie de biosynthèse des composés phénoliques (d'après Ryan et al., 2002)

Le phosphoenolpyruvate, et l'érythrose-4-phosphate issus de la glycolyse non-oxydative du glucose servent comme des réactifs de départ de ce qui est connu sous le nom de l'acide shikimique ou la voie shikimique (Ryan et al., 2002).

III.6. Biodisponibilité des composés phénoliques

La plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères qui ne peuvent souvent pas être absorbés tels quels. Ces composés vont être hydrolysés en aglycones par des enzymes intestinales ou par la microflore avant d'être absorbés. Dans les entérocytes et ensuite au niveau du foie, les polyphénols sont conjugués avec des acides glucuroniques et des sulfates. Les métabolites circulants au niveau du sang sont des dérivés conjugués fortement liés à l'albumine (Manach et al., 2006). Ensuite les polyphénols peuvent pénétrer dans les tissus (Figure 7).

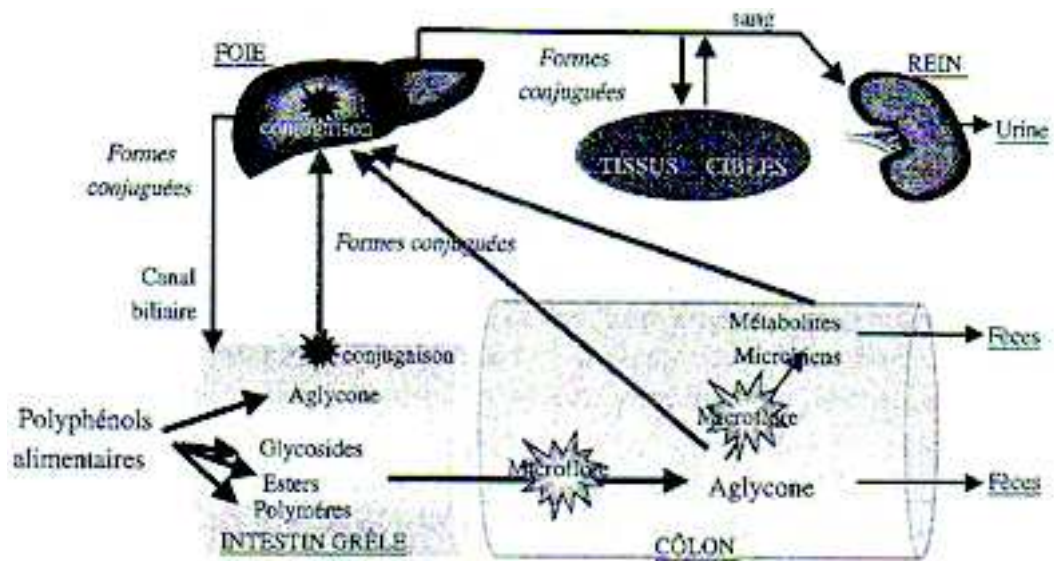


Figure 7. Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols

(d'après Manach et al., 2006)

Les polyphénols et leurs conjugués sont éliminés dans la bile et dans les urines. Par la voie biliaire, ils sont sécrétés au niveau du duodénum et soumis à l'action des enzymes bactériennes, notamment des β -glucuronidases dans les parties distales de l'intestin. Les aglycones libérés peuvent alors être réabsorbés, et il s'ensuit un cycle entéro-hépatique qui permet de prolonger la présence des polyphénols dans l'organisme.

III.7. Procédés d'extraction

L'extraction des polyphénols s'effectue généralement au moyen des solvants appropriés tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le N,N-diméthylformamide (Turkmen et al., 2007), l'éther diéthylique (Moussaoui, 2007 ; El Hadrami et al., 2004), l'acétate d'éthyle (Nassif, 2004 ; Ghattas, 2004 ; Kosar et al., 2003 ; De Leonardis et al., 2008 ; De Marco et al., 2007 ; Fki et al., 2005a). l'éther de pétrole, le n-butanol, l'eau (Kosar et al., 2003), le méthyléthylcétone, méthylisobutylcétone (Fki et al., 2005a) et l'acétonitrile, soit à partir d'un solide (ex : matière première végétale) dont l'objectif est de libérer les polyphénols présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion, ou à partir d'un liquide tel que le plasma, les urines, les eaux usées, les margines. Ces dernières subissent une délipidation préalable, pour éliminer la totalité des lipides et faciliter l'extraction.

L'efficacité de l'extraction au solvant est influencée par la nature du solvant, le pH du milieu d'extraction qui détermine le degré de solubilité des substances solubles, la température (25-55°C), le nombre d'extraction et le volume du solvant utilisé ainsi que la taille et la forme des particules.

Les différents types d'extraction des composés phénoliques à partir des margines et de l'huile d'olive sont :

- Extraction liquide-liquide (LEL) au solvant, généralement l'acétate d'éthyle.
- Extraction phase-solide (SPE) : c'est une technique pour fractionner/purifier ou encore pour pré-concentrer des composés présents dans des matrices liquides. Elle se fait généralement par élution avec un solvant approprié sur cartouche C₁₈, C₈

(Bendini *et al.*, 2003), sur l'amberlite (échangeuse d'ions), et sur résine adsorbante (Yangui *et al.*, 2009).

- Extraction supercritique (SFE) : le CO₂ supercritique est très utilisé comme solvant d'extraction (Le Floch *et al.*, 1998).
- Technique de filtration membranaire : MicroF, UF et NanoF utilisées pour fractionner et concentrer les composés phénoliques.

III.8. Analyse des phénols totaux

III.8.1. Folin-Ciocalteu (FC)

L'analyse des polyphénols se fait généralement par la méthode de Folin-Ciocalteu à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu, mais il est admis qu'il contient le complexe acide phosphomolybrique/phosphotungstique (Singleton et Rossi, 1965) cité par (Magalhães *et al.*, 2008). L'essai FC repose sur le transfert d'électrons dans un milieu alcalin à partir des composés phénoliques et autres espèces réductrices au molybdène, formant des complexes bleus qui peuvent être détectés par spectrophotométrie à 750-765 nm (Magalhães *et al.*, 2008).

Généralement, l'acide gallique est utilisé comme composé de référence standard et les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (mg/l). Il convient de souligner que, les complexes bleus formés sont indépendants de la structure des composés phénoliques, éloignant ainsi la possibilité de coordination des complexes formés entre le métal et les composés phénoliques (Magalhães *et al.*, 2008).

Le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux composés phénoliques, comme il peut être réduit par de nombreux composés non phénoliques (les amines aromatiques, le dioxyde de soufre, l'acide ascorbique, Cu(I), Fe(II), etc.) et c'est pour cette raison qu'il n'est pas souhaitable pour la détermination de la teneur totale des composés phénoliques (Prior *et al.*, 2005).

III.8.2. Identification et quantification par HPLC et GC

Le tableau suivant montre quelques exemples d'identification et de quantification des composés phénoliques dans quelques plantes et dérivés :

Tableau 14. Identification et quantification des composés phénoliques

Matières végétales	Quantification par HPLC	Quantification et dérivatisation par GC	Références
Margines Grignons semi-solide	HPLC-UV, LC-MS HPLC-UV HPLC-UV HPLC-DAD, HPLC-MS	GC-MS	De Marco et <i>al.</i> (2007); Yangui et <i>al.</i> (2009) Garcia et <i>al.</i> (2001) Fki et <i>al.</i> (2005a) Knupp et <i>al.</i> (1996) Obied et <i>al.</i> (2008)
Huile d'olive	HPLC-DAD, HPLC-MS, HPLC-CZE. HPLC-DAD, HPLC-MS HPLC-UV HPLC-DAD, HPLC-MS	HRGC GC, GC-MS	Bendini et <i>al.</i> (2003) Murkovic et <i>al.</i> (2004) Garcia et <i>al.</i> (2001) Romani et <i>al.</i> (2001) Liberator et <i>al.</i> (2001)
Les feuilles de l'olivier L'olive	HPLC-UV, LC-MS/MS HPLC-UV spectrométrie	GC	Bouaziz et <i>al.</i> (2008b) De Leonardis et <i>al.</i> (2008) Briante et <i>al.</i> (2002)
Plantes médicinales Extrait de romarin	HPLC-UV HPLC-DAD, HPLC-MS		Djeridane et <i>al.</i> (2007) Almela et <i>al.</i> (2006)

Les composés phénoliques des margines ont été aussi identifiés et caractérisés par Capasso et *al.* (1992) en utilisant la méthode NMR (résonance nucléaire magnétique).

III.9. Les composés phénoliques des olives et des sous-produits

III.9.1. Fruit

L'olive présente à l'état naturel une intense amertume ce qui limite sa consommation. Ce caractère est essentiellement lié à la présence d'oléuropéine, ester hétérosidique de l'acide élénolique et du dihydroxyphényléthanol (Macheix et *al.*, 2006).

La désamérisation progressive observée au cours de la maturation de l'olive est liée à la dégradation enzymatique de l'oléuropéine, vraisemblablement sous l'action d'estérases. En effet, cette évolution gustative est concomitante à une baisse de la teneur en oleuropéine et à une accumulation du glucoside d'acide élénolique (Amiot et *al.*, 1986).

L'oléuropéine et le ligstroside, les oléosides les plus importants dans le fruit de l'olive, sont des esters de l'acide élénolique avec 2-(3,4-dihydroxyphényl) éthanol (3,4-DHPEA) et (2-(4-hydroxyphényl) éthanol (*p*- HPEA), respectivement.

L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) natif, se trouve rarement sous forme libre dans la nature, à l'exception dans les olives mûres, où il est produit par l'hydrolyse de l'oléuropéine. La production de l'hydroxytyrosol nécessite une hydrolyse enzymatique ou chimique du complexe phénolique qui l'en contient. Le mécanisme naturel qui se produit quand l'olivier forme l'hydroxytyrosol libre est l'hydrolyse enzymatique, et la β -glycosidase native spécifique et l'estérase sont impliquées. Cependant, l'hydrolyse acide est le mécanisme le plus utilisé dans les laboratoires et dans les procédés industriels (De Leonardis et *al.*, 2008).

La Figure suivante montre l'hydrolyse enzymatique et acide de l'oléuropéine:

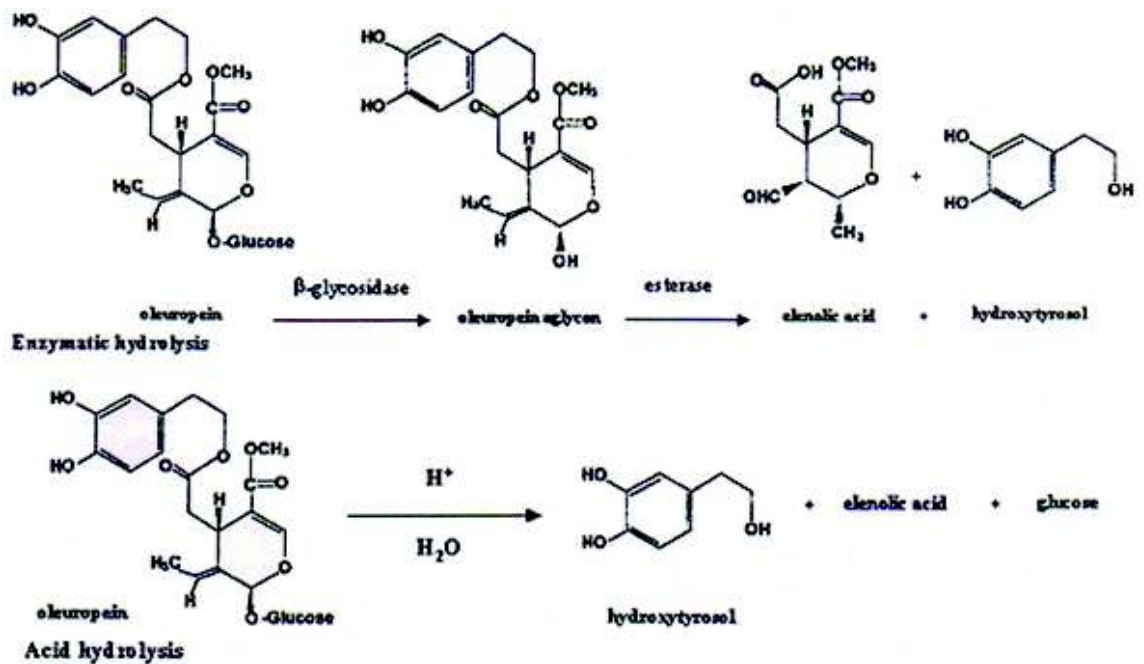


Figure 8. Hydrolyse enzymatique et acide de l'oleuropéine et production de l'hydroxytyrosol

(d'après De Leonardis et al., 2008)

Dans *Olea europaea*, l'oleuropéine, déméthyloleuropéine, ligstroside, et l'oléoside représentent les oléosides phénoliques prédominants (Soler-Rivas et al., 2000) (Figure 9), cependant, le verbascoside est le principal dérivé hydroxycinnamique du fruit d'olive (Servili et al., 1999).

L'oleuropéine est généralement le composé phénolique prédominant dans les variétés d'olive et sa concentration peut atteindre jusqu'à 140 mg/g de matière sèche dans les olives jeunes (Amiot et al., 1986) et 60-90 mg/g de matière sèche dans les feuilles (Le Tutour et Guedon, 1992).

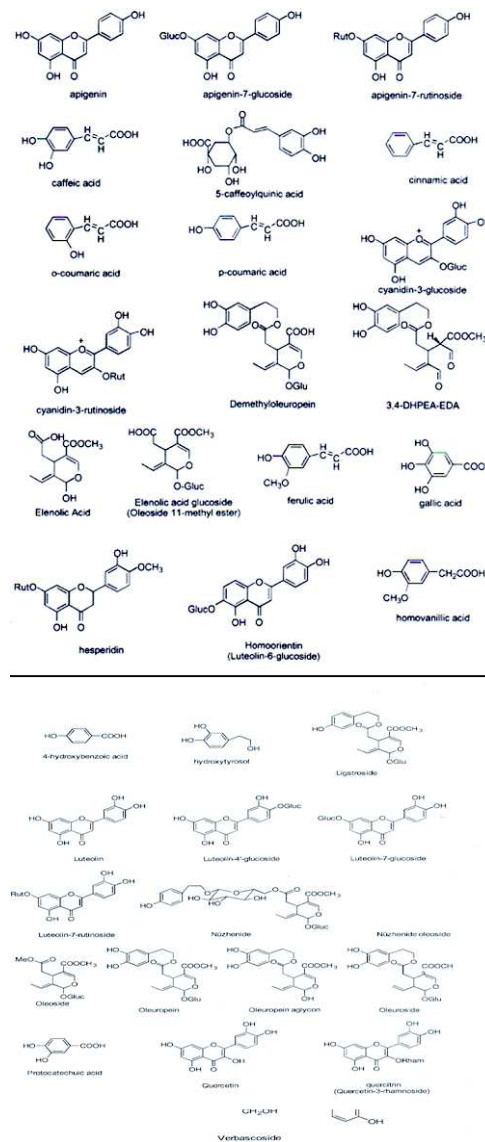


Figure 9. Liste alphabétique des structures des composés phénoliques

(Ryan et al., 2002)

III.9.2. Margines

Servili et al. (1999), cité par De Marco et al. (2007) ont montré que la composition phénolique des margines est très différente que celle des olives : où les olives sont très riches en sécoiridoïdes glucosides, et les margines montrent une concentration élevée des dérivés de sécoiridoïdes, tels que l'hydroxytyrosol et les formes dialdéhydiques de l'aglycone oleuropéine dicarboxyméthyle (Tableau 15).

Tableau 15. Composés phénoliques des margines

Composés phénoliques des margines	Références
Hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) Tyrosol (4-hydroxyphényl)éthanol Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside 3,4-dihydroxyphénylglycol OHTy-	(60), (74), (193), (210), (11), (72), (176), (67), (29), (184), (25), (185), (55) (60), (74), (193), (210), (11), (72), (176), (87), (38),

DEDA Acide caféique Acide vanillique Acide élénolique Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique Acide p-coumarique Acide férulique Acide p-hydroxyphénylacétique Acide protocatéchique Acide homovanillique Acide 4-hydroxybenzoïque Acide p-hydroxybenzoïque Acide 3,4-dihydroxybenzoïque Acide syringique Acide gallique Acide o-coumarique Acide vétratrique Acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque Acide 3-hydroxyphénylpropionique Acide trans-cinnamique Verbascoside Lutéoline-7-glucoside Ligstroside Lutéoline Hydroxytyrosol-DEDA Oleuropéine Dérivés de l'oleuropéine Dérivés de l'hydroxytyrosol Catéchol Vanilline Quercétine Dérivés de l'acide cinnamique Rutine Epicatéchine 4,méthylcatéchol Méthoxyphényl	(29), (184), (25), (55) (193), (184) (193), (184), (25), (185) (60) (60), (74), (193), (176), (38), (29), (184) (60), (11), (72), (176) (60), (210) (74), (55) (74), (193), (176), (87), (38), (29), (55) (74), (29) (74) (193), (72), (176), (87), (29) (11) (72), (38), (55) (176) (38) (176), (67), (87), (38) (87) (87) (38) (38) (55) (38) (60) (60), (210) (60) (60), (87) (60) (87), (25) (210) (210) (72), (67), (38), (55) (11) (210) (210) (87) (87) (38) (55)
--	--

4^{ème} Chapitre : IV. Altération lipidique

IV.1. Introduction

Il existe plusieurs types d'altération qui mettent en œuvre des mécanismes réactionnels très différents, aboutissant au rancissement oxydatif ou hydrolytique.

Les matières grasses s'altèrent essentiellement par oxydation. D'après Rahmani (2007) les altérations conduisant au rancissement oxydatif sont :

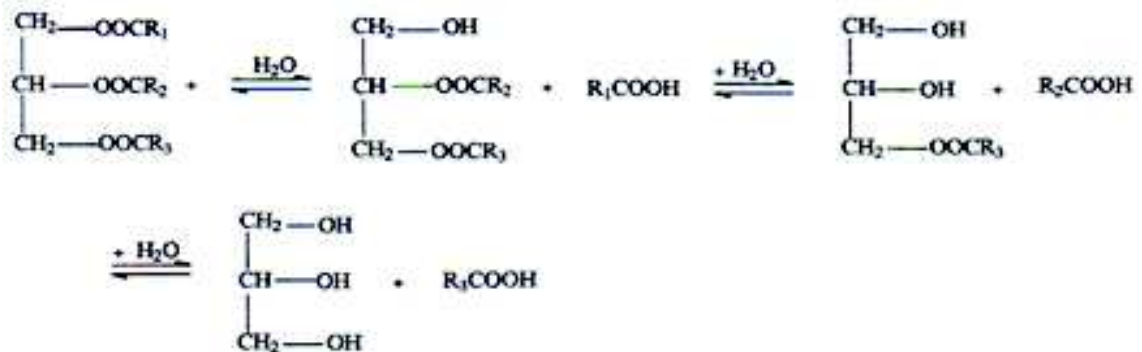
- L'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ;
- La photo-oxydation initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs, qui sont de deux types, les photosensibilisateurs de type I, telles que la riboflavine, agissant comme les radicaux libres initiateurs, et les molécules photosensibles type II, telles que la chlorophylle, et l'érythrosine, qui réagissent dans leur état excité avec l'oxygène triplet ($3O_2$) pour donner de l'oxygène singulet (1O_2) qui est très électrophile et peut réagir directement sur des acides gras insaturés (RH) formant ainsi des hydroperoxydes ROOH, ces derniers sont différents de ceux formés par autoxydation (Frankel, 1998) cité par (Chikhounne, 2007).
- L'oxydation enzymatique catalysée par la lipoxygénase et la cycloxygénase.
- Les produits primaires générés par ces réactions sont les hydroperoxydes qui se dégradent en composés de faible poids moléculaire (carbonyles, alcools, acides...), dont certains sont très olfactifs, et c'est à ce stade que se développe la flaveur de rance dans les lipides altérés (Rahmani, 2007).

Les altérations conduisant au rancissement hydrolytique sont la lipolyse enzymatique, qui n'affecte que les huiles brutes, car le raffinage a tendance à dénaturer les enzymes, et l'hydrolyse spontanée des lipides qui a lieu au cours du stockage et du traitement thermique. Ce mode d'hydrolyse conduit à une forte augmentation de l'acidité des produits altérés, et une stagnation ou une faible augmentation de l'indice de peroxyde.

IV.2. L'hydrolyse

L'hydrolyse est une réaction au cours de laquelle un triglycéride peut être décomposé par l'eau en donnant du glycérol et des acides gras libres. Elle peut avoir lieu en milieu acide, basique et neutre. En milieu basique la réaction est totale et est appelée saponification et, en milieu acide ou neutre, la réaction est réversible (Moussaoui, 2007).

Elle peut se dérouler en trois étapes, donnant successivement un diglycéride, un monoglycéride et un glycérol selon les réactions données ci après :



Ces réactions s'accompagnent généralement d'une oxydation car les acides gras libres s'oxydent plus lorsqu'ils font partie de molécules de triglycérides ou de phospholipides.

IV.3. Les mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

L'oxydation est une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Elles sont également mises en cause dans le vieillissement des tissus biologiques et des organismes ainsi que de nombreuses pathologies (Berset, 2006).

L'autoxydation est prise comme exemple pour illustrer un cas de rancissement oxydatif :

IV.3.1. Autoxydation

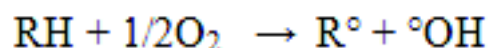
On sait depuis longtemps que les acides gras, surtout lorsqu'ils sont polyinsaturés, ont beaucoup à craindre de l'oxygène, en présence duquel ils se dégradent et prennent une odeur très désagréable.

IV.3.1.1. Mécanismes réactionnels d'autoxydation

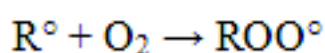
L'autoxydation des acides gras insaturés (RH) procède par un ensemble de réactions en chaîne auxquelles participent surtout des radicaux libres (R°). On distingue les stades d'initiation, de propagation et de terminaison.

Selon Hennebelle et *al.* (2004) et Rahmani (2007), cette réaction radicalaire se déroule en trois phases que nous rappelons ici :

- **Initiation ou induction** : elle consiste en la rupture homolytique, occasionnée par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H de la chaîne d'un acide gras (RH), ce qui donne en fait un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxyde ;

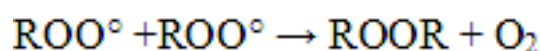
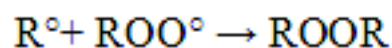
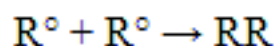


- **La propagation** : au cours de laquelle le radical peroxyde (ROO°) va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxyde. Ce dernier finira par se dégrader en aldéhydes volatiles expliquant l'odeur nauséabonde ;



ROOH = hydroperoxyde (produits secondaires)

- **La terminaison** : elle est entraînée par la réaction de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire ou par intervention d'un composé antioxydant, dit « briseur de chaîne ».



Ces trois réactions sont influencées par les facteurs prooxygènes (lumière, température, traces de métaux, etc.) et antioxygènes (BHA, BHT, polyphénols, tocophérols, etc.).

IV.4. Initiateurs radicalaires de l'oxydation des lipides

Les principaux facteurs favorisant l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation et de conservation des produits alimentaires sont : la température, l'oxygène, la lumière et les ions métalliques (Chikhoun, 2007 ; Moussaoui, 2007), le pH, l'activité de l'eau et les formes activées de l'oxygène (Chikhoun, 2007).

Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène ($\text{O}_2^{\cdot -}$, O_2 , OH^\cdot , H_2O_2 , NO^\cdot), des enzymes (lipoxygénase, peroxydase), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres, ceci attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, les vitamines ou d'autres constituants (Berset, 2006).

En plus des initiateurs radicalaires cités, Hennebelle et *al.* (2004) ajoutent les radiations ionisantes et ultraviolettes, les agents chimiques, et d'autres espèces non radicalaires qui peuvent entraîner des lésions oxydatives : oxygène singulet, hypochlorite, peroxydite.

Toutes les espèces réactives de l'oxygène décrites précédemment sont produites physiologiquement, certaines contribuent d'ailleurs à la régulation de fonctions biologiques (NO \cdot), et participent à la réponse au stress, notamment d'origine infectieuse (hypochlorite, superoxyde, peroxyde), mais leur production excessive (c'est-à-dire dépassant les mécanismes physiologiques de leur inactivation) entraîne des lésions qui s'accumulent au cours de la vie et contribuent au vieillissement (Cohen, 2002).

5^{ème} Chapitre : V. Les antioxydants et activité antioxydante

Le terme antioxydant désigne toute molécule capable de stabiliser ou de désactiver les radicaux libres avant, qu'ils n'attaquent les cellules. Ce sont des molécules qui sont désignées comme antioxydant, puisqu'ils agissent comme des agents chélateurs par fixation des ions métalliques (activité rédox) (Kalióra et *al.*, 2006).

V.1. Définition

Un antioxydant peut être défini comme une substance, que si elle se présente à des faibles concentrations comparées à celles d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1990). Les substrats oxydables incluent les hydrates de carbone, l'ADN, les protéines et les lipides.

Un antioxydant est une substance qui peut réduire efficacement le pro-oxydant avec formation concomitante des produits qui ne sont pas ou peu toxiques (Magalhães et *al.*, 2008).

V.2. Mode d'action

Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, et empêchant la formation des hydroperoxydes et des peroxydes, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur.

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction la plupart de temps, parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Mohammedi, 2006).

D'après Berset (2006), il y a 5 modes d'intervention des antioxydants :

- Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires.
- Chélation des métaux de transition.
- Désactivation des espèces oxygénées réactives.

- Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- Abaissement de la pression partielle en oxygène.

La figure ci-après illustre les différents niveaux d'action

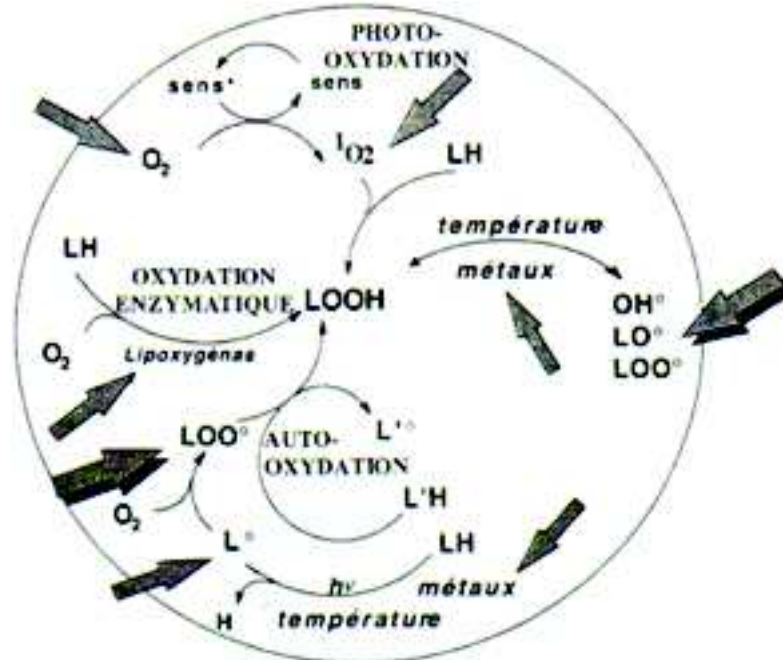


Figure 10. Schéma général de l'oxydation des acides gras et niveaux d'action des antioxydants

(d'après Berset, 2006)

V.3. Classement des antioxydants

On peut classer les antioxydants selon leurs origines en deux classes :

V.3.1. Les antioxydants naturels

Dans la nature et en particulier dans le monde végétal, outre les tocophérols de certaines graines et plantes, de nombreuses autres substances présentent des propriétés antioxydantes : polyphénols de l'olivier, du chêne, sésamol des graines de sésame, flavonoïdes des plantes (quercétine, myricétine, etc.), huiles essentielles extraites d'épices et d'herbes ; thym, carvi, cumin, clou de girofle, romarin, sauge (Helme et al., 1999).

Les fruits et légumes qui caractérisent l'alimentation méditerranéenne, représentent la source majeure d'antioxydants naturels (vitamines, minéraux et les composés phytochimiques principalement les polyphénols). Visioli et Galli (2001) les classent en deux subclasses (antioxydants vitaminiques et non vitaminiques) (Tableau 16)

Tableau 16. Antioxydants naturels et principales sources alimentaires [Visioli et Galli, 2001; Kaliora et al. (2006)]

Subclasses	Antioxydants	Sources alimentaires
Antioxydants vitaminiques	<i>Tocophérols</i> notamment (α - et γ -tocophérols) et tocotriénols (α , β , γ et δ) <i>Caroténoïdes</i> (précurseurs de la vitamine A) <i>Vitamine C</i> (acide ascorbique) : principale antioxydant du plasma	Noix, germe de blé, huiles végétales (huile de tournesol), les amandes, margarine, mayonnaise, le beurre et les œufs. Fruits et légumes pigmentés : carottes, brocolis, tomates, poivron rouge, citrouille, pêche, abricot, épinard, oranges. Les agrumes (orange, mandarine, le citron), le raisin et des légumes-feuilles
Antioxydants non vitaminiques (phytochimiques)	<i>Les polyphénols</i> : phénols simples, acides phénoliques, benzoquinones, flavonoïdes hydroxycinnamates.	Fruits et légumes, abondants dans les olives, raisins, l'huile d'olive, café, thé noir et le vin rouge.

V.3.2. Les antioxydants synthétiques

Parmi ces antioxydants :

Le butylhydroxytoluène ou BHT (E 321), le butylhydroxyanisole ou BHA (E 320) et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle (E 310), gallate d'octyle (E 311), et de dodécyle (E 312) (Johnson et Gu, 1988).

Le BHT (2,6-ditertiobutyl 4-méthyl phénol) est un solide blanc, soluble dans les graisses et insoluble dans l'eau. C'est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position, le 2-tertiobutyl 4-hydroxyanisole et le 3-tertiobutyl 4-hydroxyanisole, dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT. L'association du BHT et du BHA serait synergique (Helme et al., 1999).

Les deux additifs alimentaires les plus utilisés industriellement comme antioxydants appartiennent au groupe des monophénols. Il s'agit de molécules de synthèse : le BHA et le BHT (Figure 11), longtemps suspectées d'effets toxiques, ces deux composés sont désormais réputés sans effet aux doses habituelles ingérées (Cuvelier et Martel, 2002). Ils sont utilisés seuls ou en synergie. La dose autorisée varie est de 0.01 à 0.02 % du poids de la matière grasse contenue dans l'aliment.

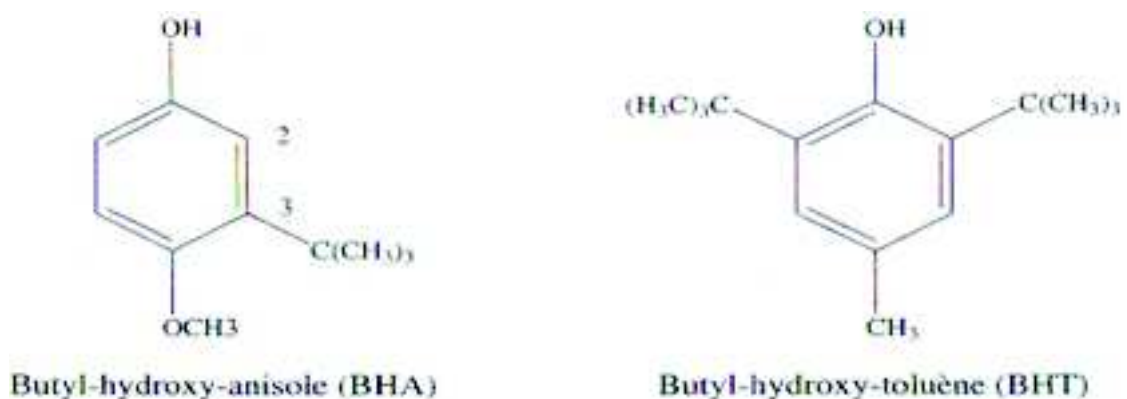


Figure 11. Structure du BHA et du BHT (d'après Berset, 2006)

On peut citer aussi la 2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone ou TBHQ, c'est un paradiphénol de synthèse, et est considéré comme le meilleur protecteur des huiles de friture. Elle doit son activité élevée à sa nature diphénolique (Berset, 2006). Elle est légèrement soluble dans les graisses et utilisée aux Etats-Unis pour la conservation des huiles brutes à environ 0.05 g/kg (50 ppm).

La TBHQ est un antioxydant cinq à sept fois plus puissant que le BHA et le BHT, ainsi qu'il prolonge la durée d'utilisation du produit (Lolos et al., 1999) cité par (Nassif, 2004). Elle est interdite au sein de l'union européenne (Helme et al., 1999) car suspecté de génotoxicité (Chevolleau et al., 1992).

V.3.2.1. Effets indésirables

Dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées avec les gallates (surtout le gallate d'octyle), le BHA et le BHT et d'éthoxyquine. Le BHT et le BHA présentent des effets biologiques sur le métabolisme énergétique de la cellule au niveau du foie, où ils provoquent une hypertrophie à faible dose chez le rat qui s'accompagne de modifications biochimiques, au niveau des poumons chez la souris. Ces actions seraient dues non pas au BHT, mais à ses métabolites (Helme et al., 1999). Ces antioxydants se sont révélés à l'expérimentation tératogènes, mutagènes, cancérigènes (foie, estomac, poumons), anticoagulants, hypertrophiants (thyroïde, foie), allergogènes (Chavéron, 1999). De plus, ces antioxydants sont exceptionnellement sensibilisants et provoquent quelques cas d'eczémas, d'urticaire, d'asthme (Nassif, 2004).

L'administration alimentaire du BHT aux rats, cause des hémorragies fatales dans les cavités pleurale et péritonéale et dans les organes tels que l'épididyme, testicules et le pancréas (Hirose et al., 1987). Aussi, le BHT a provoqué la stimulation de synthèse des ADN et l'induction des enzymes (Thamavit et al., 1985). Le BHA a des effets toxiques et carcinogéniques (Ito et al., 1986).

V.3.2.2. Caractéristiques structurales

Il est reconnu que l'addition d'un second hydroxyle en *ortho* (structure type catéchol) ou *para*, sur le cycle benzénique, améliore fortement l'efficacité antioxydante des phénols (Pokorny., 1987). D'après ces derniers auteurs, on a dans l'ordre d'efficacité décroissante : pyrocatechol (di-OH *ortho*) > hydroquinone (di-OH *para*) > résorcinol (di-OH *méta*) > phénol (mono-OH). De même le 3,4 dihydroxyphényléthanol ou hydroxytyrosol se montre toujours nettement plus efficace que le tyrosol, son homologue monohydroxylé. Une étude sur l'huile d'olive chauffée à 50°C donne : hydroxytyrosol >> BHT > oléuropéine > tyrosol (Chimi et al., 1988).

On explique la bonne efficacité des *ortho*-diphénols par la stabilisation du radical phénoxy (AO[•]) au moyen de la formation d'un pont intramoléculaire (Berset, 2006) (Figure 12).

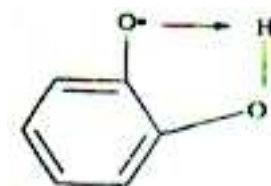


Figure 12. Stabilisation des radicaux *ortho*-diphénoliques (Pokorny, 1987)

Deux radicaux phénoliques peuvent également réagir entre eux pour former une quinone d'une part et régénérer un *ortho*-diphénol d'autre part (Figure 13).

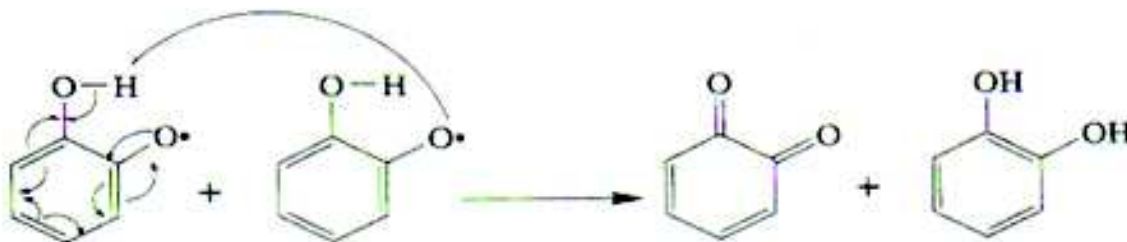


Figure 13. Schéma de régénération d'un *ortho*-diphénol (d'après Gordon, 1990)

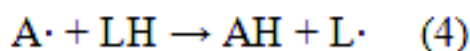
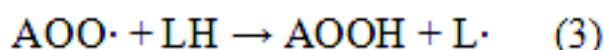
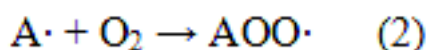
La présence d'un troisième hydroxyle sur le cycle benzénique peut encore améliorer l'activité, mais ceci constitue une limite au-delà de laquelle les substituants OH n'augmentent plus l'effet antioxydant et peuvent même le diminuer (Berset, 2006).

V.4. Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

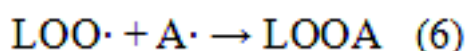
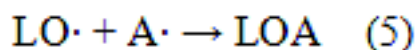
Les phénols perdent facilement les protons H^+ , pour former les ions phénoxy. La perte d'un hydrogène : proton + électron engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. C'est cette réactivité chimique qui confère aux composés phénoliques leur caractère antioxydant. En cédant un hydrogène aux peroxydes lipidiques $LOO\cdot$, ils les stabilisent sous forme d'hydroperoxydes $LOOH$ et bloquent les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation. Ce type de mécanisme s'applique aux antioxydants primaires ou antiradicalaires (Berset, 2006).



La réaction (1) est exothermique, son énergie d'activation augmente avec l'énergie de rupture de la liaison A-H. La délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle aromatique et l'absence de site d'attaque de l'oxygène empêchent la propagation de nouvelles réactions radicalaires car les étapes suivantes ne sont pas favorisées :



Les antioxydants sous forme $A\cdot$ peuvent également freiner la phase de propagation en formant un produit d'addition chimiquement stable (adduit) avec les radicaux lipidiques formés.



L'action de l'antioxydant se traduit par un allongement de la phase d'initiation et un retard du démarrage de l'oxydation. Cet effet est limité dans le temps puisque l'antioxydant est progressivement consommé. Les réactions d'oxydation reprennent ensuite, souvent avec la même vitesse qu'en absence d'antioxydant.

L'oxydation des lipides est un phénomène irréversible et l'ajout *a posteriori* d'antioxydant ne permet pas de revenir à l'état non oxydé.

Les polyphénols peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singulet, oxydant très puissant des acides gras insaturés, ou en chélatant les métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+) qui accélèrent fortement l'autoxydation des lipides. Certains enfin sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier de la lipoxygénase ou de la cyclooxygénase.

Pour répondre aux exigences à la fois de la technologie industrielle et de la santé publique, un bon antioxydant alimentaire doit être efficace à faible concentration, facile à incorporer dans le produit, résistant aux traitements thermiques, ne pas modifier sensoriellement l'aliment et ne présenter aucun risque toxique pour le consommateur (Cuvelier et Martel, 2002).

V.5. Propriétés biologiques des antioxydants phénoliques des olives et dérivés

Le rôle des composés phénoliques des olives et ses dérivés en particulier les margines et l'huile d'olive sont identifiés dans le tableau 17.

Tableau 17. Propriétés biologiques des composés phénoliques des olives et ses dérivés

Composés phénoliques	Propriétés biologiques	Références
<p>Toute la famille séparément ou en mélange naturel : margine. <i>Acides phénols</i> : <i>P</i>-coumarique, acide caféique Extraits riches en phénols d'une variété d'olive (Chemlali) <i>Alcools phénols</i> : <i>Hydroxytyrosol</i> de l'<i>hydroxytyrosol</i> : 1. <i>Oleuropéine</i> 2. <i>Verbascoside</i> <i>Oleuropéine</i> et <i>hydroxytyrosol</i> <i>Flavones</i>, <i>flavonoles</i> : Tous <i>Rutine</i>, <i>lutéoline</i>, <i>kaempférol</i></p>	<p>Antioxydants Radical scavenger Protection contre la cytotoxicité des LDL Anti-5-LIPOX Effets hypocholestérolémiques Anti-agrégation plaquettaire Inhibition de la synthèse de TXB2 Eboueur puissant des radicaux libres (O[·]₂) Chélateur des métaux (Fe), diminution des EOR Capacité antiathérogénique (réduction et prévention de l'oxydation des lipoprotéines LDL) Effets cardioprotectifs et anti-inflammatoires Activités antimicrobienne Effet anti-tumeur : par l'inhibition de la prolifération et la promotion de l'apoptose dans plusieurs cellules tumorales Action cytoprotective contre des dommages induits par le stress oxydant Protection contre le stress oxydatif induit par le tert-butylhydroperoxide sur les cellules HepG2 (human hepatoma) Prévention de l'activation des macrophages : stimulées par la lipopolysaccharide et donc prévient l'élévation de l'ARNm des iNOS et COX-2, et des protéines ainsi que la génération des EOR Régulation de l'expression des gènes des iNOS et COX-2 Inhibition de la peroxydation lipidique non-enzymatique induite par l'ascorbate-Fe⁺² dans les microsomes des cellules hépatiques des rats. Inhibe l'infection aiguë, anti-HIV-1 Inhibition de la transmission du HIV-1 d'une cellule à l'autre. Inhibition de la réplication du HIV-1 Hypotenseur, antiproliférateur, immunomodulateur Anti-cancer : - Antiproliférative : inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du sein (MCF-7) - Apoptose : induction de l'apoptose des cellules cancéreuses du sein (MCF-7) Effets antioxydants sur l'oxydation des LDL induite par le Cu⁺² à des concentrations plus grande que 23 et 18,2 µg/mg LDL respectivement. A des concentrations plus faibles que celles citées, l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol exercent un effet pro-oxydant sur les LDL. Antiviraux, inhibent la dé-iodination de T4 (surtout lutéoline), immunostimulants chez irradiés et brûlés Anti-5-lipoxygénase, anti-hypertensif, anti-PKC</p>	<p>(128) (128) (128) (128) (7) (89) (128) (89) (89) (89) (89) (89)</p>

Partie II. Matériel et méthodes

1^{er} Chapitre : I. Extraction, dosage et activité antioxydante des polyphénols

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Margines

Deux types de margines sont utilisées dans cette étude:

margine (1) : elle issue d'une unité industrielle de trituration équipée en chaînes continues à trois phases, avec deux centrifugations, la première est horizontale pour séparer les grignons (résidus solides des olives), les huiles et margines. La deuxième est verticale pour séparer les huiles et les margines.

Lors de l'étape de la première centrifugation l'eau (25-30°C) est ajoutée, et c'est à ce moment là que l'huile perd la caractéristique d'une huile d'olive vierge car elle n'a pas subi l'extraction ou centrifugation à froid sans addition d'eau, et elle prend la dénomination d'huile d'olive courante.

Ces margines sont obtenues à partir des olives de la variété Chemlal, noires, mûres et fraîchement cueillies à la fin de la saison, au mois de février 2009, à AZAZGA (37 km de Tizi-Ouzou ville). Elles sont de couleur marron foncé.

margine (2) : issue d'une unité traditionnelle de trituration équipée en presse. Elle est obtenue à partir des olives noires mûres de la variété Chemlal, cueillies à la fin de la saison, au mois de février 2009, à Aïn El Hammam (Iferhounen) à Tizi-Ouzou. Elles sont de couleur marron.

Les margines fraîches sont stockées à -18°C, pour éviter l'auto-oxydation et la polymérisation ultérieure des composés phénoliques et les tannins, qui donnent lieu à des margines sombres, qui ne sont pas facilement biodégradables (Assas et *al.*, 2002).

I.1.2. Les huiles végétales utilisées

Les trois huiles végétales utilisées pour le test de la stabilité oxydative, sont deux huiles raffinées commerciales et une huile d'olive :

a. L'huile d'olive est issue du procédé industriel d'extraction à trois phases avec deux centrifugations des mêmes olives de la variété Chemlal dont elle est issue la margine (1). Elle prend l'appellation d'huile d'olive courante (non raffinée).

b. L'huile de tournesol raffinée commerciale (Fleuriol) caractérisée par sa richesse en alpha-tocophérol (Vit E).

c. L'huile de soja raffinée commerciale (Safia) caractérisée par sa richesse en alpha-tocophérol.

Les caractéristiques des huiles étudiées sont données dans le tableau suivant :

Tableau 18. Caractéristiques des huiles étudiées

Huiles	Indice de peroxyde (még O ₂ /kg)	L'acidité (% acide oléique)	Diènes conjugués K ₂₃₂	Triènes conjugués K ₂₇₀
Soja	1.845 ± 0.162	0.225 ± 0.0007	0.581 ± 0.018	0.306 ± 0.027
Tournesol	6.11 ± 0.197	0.042 ± 0.019	0.365 ± 0.008	0.263 ± 0.011
Olive	9.805 ± 0.205	4.81 ± 0.042	0.358 ± 0.004	0.032 ± 0.001

I.2. Produits chimiques et réactifs

Méthanol (Biochem Chemopharma, USA), acide acétique (Prolabo, Paris), Acétate d'éthyle (Merck, darmstadt), Hexane (Biochem Chemopharma, UK), Chloroforme (Prolabo, EEC), Cyclohexane (Sigma-Aldrich), Ethanol 95 % (Biochem Chemopharma, Quebec), Ethanol absolu (Sigma- Aldrich, Germany), Folin-Ciocalteu, acide L(+)-ascorbique (Merck, Allemagne), DL- α -tocophérol (Danimex-Food, Danemark), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Germany), Acide gallique (Sigma-Aldrich, Allemagne), Acide caféique (Aldrich, Allemagne), Acide vanillique (Fluka, Allemagne), Tyrosol (Aldrich, USA), Hydroxytyrosol (Sigma-Aldrich, USA), NaOH, Hexacyanoferrate de potassium anhydre, Phosphate Monosodique dihydraté, BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) (Sigma-Aldrich, Espagne), Iodure de potassium, Phénolphthaléine, Amidon soluble, Thiosulfate de sodium, Carbonate de sodium, Trichlorure de fer, Acide trichloracétique.

I.3. Caractéristiques physicochimiques des margines

I.3.1. Teneur en eau

L'humidité des échantillons des margines est déterminée par un séchage à l'étuve. Environ 10 g de margine sont pesés, puis séchés à 103°C pendant 24 heures (Gortzi et *al.*, 2008), refroidis ensuite pendant 30 min dans un dessiccateur, puis repesés une deuxième fois. La perte en eau est calculée par la différence de poids des échantillons humides et secs.

I.3.2. Teneur en solide total (matière sèche)

Le solide total (ST %) est défini comme étant le résidu restant après élimination de l'eau d'un aliment dans des conditions expérimentales données (Salghi). Le taux de la matière sèche est déterminé par la différence de poids entre la margine (100 %) et la teneur en eau (% H₂O).

$$ST \% = 100 \% - \% H_2O$$

I.3.3. Solide total en suspension

Les solides totaux suspendus (STS %) sont obtenus par centrifugation des margines fraîches à 4000 g durant 15 min, le résidu solide est séché une nuit à 105°C (Assas et *al.*, 2000).

I.3.4. Teneur en lipides

20 ml de margine sont mélangés avec 30 ml de n-hexane (3 × 30 ml), le mélange est mixé vigoureusement dans une ampoule à décanter de 100 ml (Gortzi et *al.*, 2008), puis centrifugé pendant 5 min à 3000 t/min (De Marco et *al.*, 2007). Les trois phases d'hexane sont combinées et le solvant est évaporé à 79°C dans un évaporateur rotatif (Heidolph, Laborota 4000), séchés à 100°C dans une étuve puis refroidis dans un dessiccateur pendant 30 min. Le séchage est répété jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en lipide est mesurée par gravimétrie.

1.3.5. Teneur en azote total

Le dosage de l'azote a été effectué par la méthode de Kjeldahl (Standard methods of examination of water and wastewater, 1992) avec quelques modifications.

Introduire 5 ml de margine avec 7.5 g du catalyseur (CuSO₄ + K₂SO₄) et un peu du sélénium dans un matras. Ajouter 10 ml de H₂SO₄ et 10 ml d'eau oxygénée 30 % (H₂O₂) comme anti-moussant.

Mettre quelques billes de verre comme antichoc.

Chauffer à une température de 100°C quelques temps pour éviter le débordement de la mousse et continuer à chauffer jusqu'à sa disparition et la carbonisation du contenu. Ensuite augmenter la température de minéralisation (Gerhardt, scrubber unit, Turbosog) à 400°C jusqu'à l'apparition d'une coloration verte claire et limpide, poursuivre le chauffage pendant 30 min puis laisser refroidir.

La distillation est faite à l'aide de la soude (32 %) et de l'eau distillée dans un appareil de distillation automatique (Gerhardt, vapodest).

L'ammoniac distillé a été piégé dans un erlenmeyer contenant 20 ml d'acide borique 4 % puis titré rapidement à l'aide de l'acide sulfurique (H₂SO₄) (N/50) jusqu'au pH initial de l'acide borique.

Le taux d'azote a été calculé selon la formule suivante :

$$\% N_2 (g) = (V_1 \times 0.014 \times 100 \times N) / V_0$$

N : la normalité de la solution d'acide sulfurique N/50.

V₀ : volume de l'échantillon en ml (5 ml).

V₁ : volume en ml de la solution d'acide sulfurique utilisée pour le titrage.

1.3.6. Extraction et dosage des polyphénols des margines

Le traitement des margines et l'extraction liquide-liquide des phénols ont été faits selon la méthode décrite par De Marco et *al.* (2007) avec quelques modifications.

1.3.6.1. Traitement des margines

Avant de procéder à l'extraction, il est souhaitable de faire une acidification, puis une délipidation des margines à l'aide d'un solvant extracteur.

L'acidification consiste à favoriser la précipitation des protéines, la libération des biophénols liés aux composants de la paroi cellulaire, et l'élévation de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques (Obied et *al.*, 2005a). Elle provoque une hydrolyse du complexe des composés phénoliques, et en conséquence, la libération

des monomères phénoliques, et donc une augmentation de la concentration des phénols totaux trouvés dans un extrait de margine acidifiée par rapport à un extrait de margine fraîche (sans acide) (De Marco et *al.*, 2007).

Selon Greco et *al.*(1999) les acides ont le pouvoir de flocculer les espèces à haut poids moléculaire des margines.

20 ml des margines sont acidifiées à pH 2 avec quelques gouttes de l'acide chlorhydrique (6N) et mélangées avec 30 ml d'hexane, le mélange est mixé vigoureusement dans une ampoule à décanter et centrifugé à 3000 t/min pendant 5 min dans le but d'enlever la fraction lipidique. La phase hexanique est séparée et la délipidation est répétée deux fois successivement.

I.3.6.2. Extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle :

Les margines préalablement délipidées sont mixées avec 20 ml d'acétate d'éthyle, le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15 min) puis centrifugé à 3200 t/min pendant 10 min dans des conditions réfrigérées (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 3K30/Z, Laboratory centrifuges, Allemagne). Les phases sont séparées et l'extraction est répétée quatre fois successivement. Les 5 phases d'acétate d'éthyle contenant les composés phénoliques sont collectées, combinées, et l'eau dissoute est enlevée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrées, puis le solvant est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu sec est conservé dans 6 ml du méthanol à -18°C et cette solution est utilisée pour le dosage, la quantification et la détermination de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

L'acétate d'éthyle est fréquemment utilisé pour l'extraction des biophénols des matrices aqueuses telles que les margines (Della Greca et *al.*, 2004 ; Lesage-Meessen et *al.*, 2001).

Allouche et *al.*(2004), ont démontré que l'acétate d'éthyle possède un pouvoir extracteur élevé par rapport à d'autres solvants tels que méthylisobutylcétone, méthyléthylcétone, et l'éther diéthylique, même s'il est assez sélectif à l'égard des composés phénoliques de faible (180 Da) et de moyenne (environ 13 kDa) masse (Visioli et *al.*, 1999). L'acétate d'éthyle n'extrait pas les molécules de haut poids moléculaire qui restent dans la phase aqueuse (Visioli et *al.*, 1999) et il extrait les composés phénoliques hydrosolubles des margines (El Hadrami et *al.*, 2004).

I.3.6.3. Dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

I.3.6.3.1. Principe

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin Ciocalteu, qui se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée (Catalano et *al.* , 1999).

La lecture de la densité optique à 725 nm permet de déterminer la concentration des polyphénols, en se référant à une courbe étalon établie à partir d'une série de solutions standards de l'acide gallique traitées au réactif Folin-Ciocalteu ayant les concentrations suivantes : 0.6, 1.2, 1.8, 3, 6 mg/l (Tableau A, Annexe I).

I.3.6.3.2. Mode opératoire

- Préparation des concentrations d'acide gallique utilisées pour la gamme étalon

La solution mère de l'acide gallique: dans une fiole de 100 ml, dissoudre 0.5 g de l'acide gallique sec dans 10 ml de l'éthanol et diluer avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Les concentrations de l'acide gallique: mettre 1, 2, 3, 5 et 10 ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml et puis les diluer au volume avec de l'eau distillée. Ces solutions auront des concentrations en phénols (acide gallique) de 50, 100, 150, 250 et 500 mg/l (Anonyme).

- Dosage des polyphénols totaux

Les phénols totaux des margines sont déterminés par colorimétrie à 725 nm, selon la méthode de Gutfinger (1981) modifiée par Lafka et *al.* (2007).

- Diluer 0.5 ml des extraits méthanoliques concentrés dans 20 ml d'eau distillée.
- Introduire 0.3 ml des extraits méthanoliques dilués, 20 ml d'eau distillée et 0.625 ml de réactif Folin-Ciocalteu dans des fioles de 25 ml.
- Après 3 min, ajouter 2.5 ml de la solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 35%.
- Agiter le contenu et diluer le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Préparer un blanc, dans les mêmes conditions, en éliminant l'extrait.
- Maintenir les fioles préparées à l'obscurité pendant 1 heure.

Lire les densités optiques à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (marque UNICAM Helios y).

- Trois lectures ont été prises pour chaque extrait, et l'analyse est répétée trois fois pour les deux extraits phénoliques.

La gamme étalon a été préparée suivant les mêmes étapes citées précédemment, dans les mêmes conditions et en même temps que les extraits phénoliques.

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par litre de margine (mg Ac Gal/l).

Toutes les étapes d'extraction et du dosage des phénols totaux sont résumées dans le diagramme illustré par la figure 14.

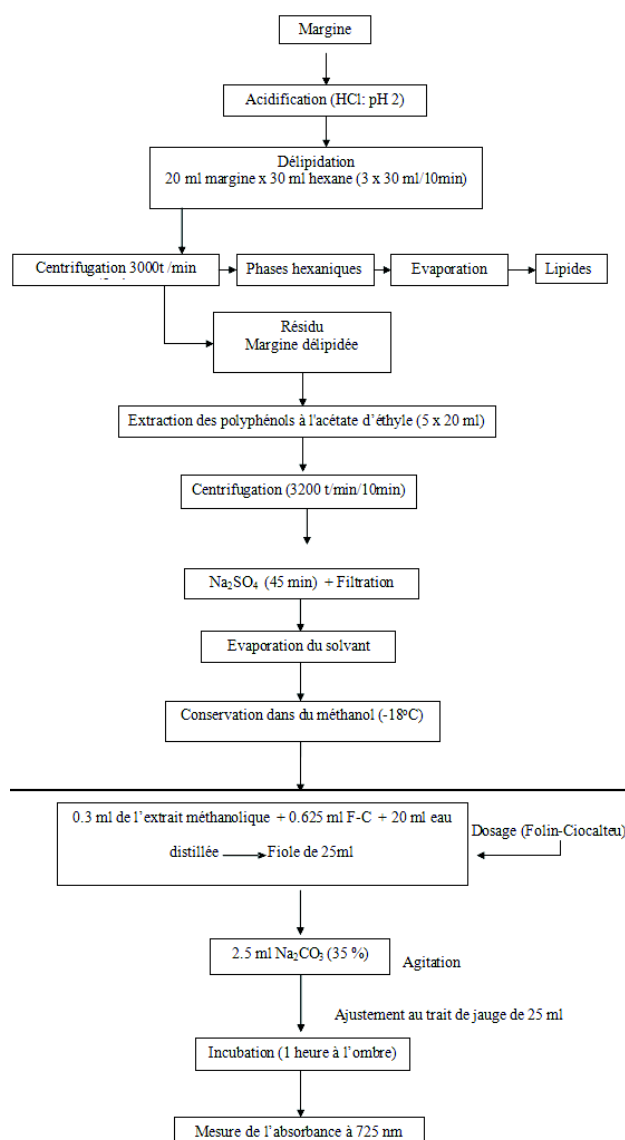


Figure 14. Diagramme représentant l'extraction et dosage des polyphénols totaux des margines

I.3.6.4. Teneur en *ortho*-diphénols

Les concentrations des *ortho*-diphénols des extraits de margines sont déterminées avec du molybdate de sodium di-hydraté.

- 0.3 ml des extraits phénoliques concentrés obtenus sont dilués dans des fioles de 20 ml avec du méthanol-eau (CH₃OH-H₂O) (1:1, V/V).
- Selon Mateos et al. (2001), mélanger 4 ml des solutions diluées avec 1 ml d'une solution de molybdate de sodium dihydraté (Na₂MoO₄ 2H₂O) 5 % préparé dans de l'éthanol-eau (CH₃CH₂OH- H₂O) (1:1, V/V).
- Agiter vigoureusement.
- Les absorbances sont mesurées à 370 nm dans 15 min.
- Une courbe étalon est tracée en prenant l'acide gallique comme référence dans l'intervalle 0-80 mg/l (Tableau B, Annexe I).

- Trois lectures ont été déterminées pour chaque extrait.

I.3.6.5. L'identification des composés phénoliques par HPLC

L'identification des composés phénoliques des margines par HPLC a été réalisée uniquement pour la margine (1).

- Une fraction de margine acide (pH 2) et une seconde fraction fraîche ont été centrifugées afin d'éliminer les résidus solides et puis délipidées.
- 5 ml de margine de chaque fraction a subi une extraction à l'acétate d'éthyle. Les traces d'eau sont éliminées au moyen de Na_2CO_3 et le solvant est évaporé à 35°C.
- Les extraits sont conservés dans 1 ml du méthanol à -18°C et puis analysés par HPLC.
- La quantification des composés phénoliques de margine a été effectuée par la technique chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse développée par Veillet et *al.* (2009), dont les caractéristiques sont les suivantes:
 - Pompe modèle 600;
 - contrôleur de gradient modèle 600;
 - détecteur à barrette de photodiode modèle 996,
 - Colonne de séparation: C_{18} 250×4.6 mm de 5µm de symétrie.
- Le système de solvant utilisé est un gradient de A ($\text{H}_2\text{O}/0.05\% \text{HCO}_2\text{H}$) et B (MeCN). La phase mobile est: gradient: à 0 min 80% A/20% B; à 5 min 60% A/40% B; à 40 min 20% A/80% B; à 45 min 0% A/100 %B.
- La température est fixée à 30°C.
- Le débit de solvant est de 1 ml/min.
- Le volume injecté est de 20 µl.
- La détection a été réalisée à 280 nm.
- L'identification des pics des biophénols a été effectuée en se référant à des étalons: hydroxytyrosol, tyrosol, acides caféique et vanillique.

I.3.7. Extraction et dosage des polyphénols de l'huile d'olive

L'extraction des polyphénols de l'huile d'olive a été faite selon la méthode décrite par Vazquez Roncero et *al.*(1973). 10 g d'huile sont dilués dans 50 ml d'hexane, et la solution est extraite successivement avec (3 × 20 ml) de méthanol aqueux 60 %. Le mélange est agité chaque fois pendant 2 min. Les extraits méthanoliques sont combinés et séchés sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C.

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode Folin-Ciocalteu décrite précédemment.

I.3.8. Détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines

Le pouvoir antioxydant des phénols testés a été estimé par comparaison avec des antioxydants de référence (BHT, DL- α -Tocophérol et l'acide ascorbique).

L'activité antioxydante des extraits phénoliques *in vitro* a été évaluée par deux méthodes:

I.3.8.1. Détermination du pouvoir de piégeage du radical DPPH

I.3.8.1.1. Principe

L'activité du piégeage des radicaux libres, utilise la solution de radical libre DPPH (Figure 15), non biologique comme réactif. L'aptitude des extraits et de certains composés purs à donner un hydrogène ou un électron est mesurée par la décoloration de la solution méthanolique violette (pourpre) de DPPH. Ce radical libre stable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.

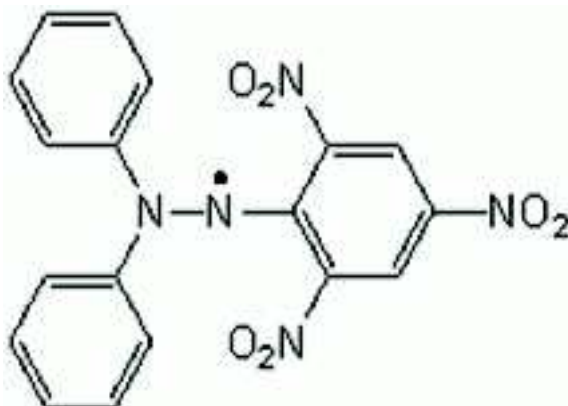
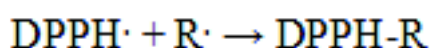


Figure 15. Structure de radical libre 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

Le radical chromogène pourpre 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), est réduit par l'antioxydant/composé réducteur en hydrazine jaune pâle (Blois, 1958). La capacité du piégeage de radical est évaluée généralement dans un milieu organique par la mesure de la diminution de l'absorbance à 515-528 nm jusqu'à ce que l'absorbance reste constante. Dans sa forme radicalaire, le DPPH absorbe à 515 nm, mais par une réduction avec un antioxydant (AH) ou des espèces radicalaires (R^\cdot), l'absorbance disparaît (Brand-Williams et al., 1995).



I.3.8.1.2. Mode opératoire

L'activité antioxydante des extraits phénoliques est évaluée par l'utilisation du radical stable DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; $M = 394.33$) selon la méthode de Schereret Godoy, (2009) avec quelques modifications :

- Des aliquotes de 0.1 ml de solutions méthanoliques des extraits et des standards à différentes concentrations (50-200 ppm), sont additionnées chacune à 3.9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.0025 g/100 ml CH_3OH), puis agitées.
- La solution au DPPH testée (6×10^{-5} M) est préparée par la dissolution de 0.0025 g de DPPH dans 100 ml de méthanol selon Bandoniene et al. (2002) modifié par Lafka et al. (2007).
- Après 60 min d'incubation à l'obscurité et à la température de laboratoire, l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (marque UNICAM Helios y). Pour chaque concentration le test a été répété 3 fois.

- L'essai à blanc consiste à l'ajout de 0.1 ml de méthanol à 3.9 ml de DPPH, et le méthanol est pris comme zéro.

L'activité du piégeage de radical DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition (I %), et est calculée selon la formule proposée par Yen et Duh, (1994) et Guerrero et *al.* (2006).

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times (A_0 - A) / A_0$$

Où :

A_0 : est l'absorbance à 517 nm de l'essai à blanc à temps $t=0$.

A : est l'absorbance finale des échantillons testés à 517 nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

- Le IC_{50} représente la concentration de l'antioxydant efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 %, et les valeurs IC_{50} moyennes ont été calculées graphiquement par la régression linéaire de trois mesures séparées où l'abscisse est représenté par les concentrations des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage d'inhibition (I %).
- Le pouvoir antiradicalaire est aussi mesuré selon Rodríguez et *al.* (2007) comme suit:

$$PAR = (1/IC_{50}) \times 100$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

- La cinétique de piégeage du radical DPPH par les extraits phénoliques, le BHT, l'acide ascorbique et la DL- α -Tocophérol, à une concentration de 200 ppm a été déterminée selon la méthode décrite par (Von Gadow et *al.*, 1997):
 - Dans une cuve de spectrophotomètre, une aliquote de 50 μ l (200 ppm) des échantillons testés et des composés de référence est additionnée à 2 ml de la solution méthanolique contenant le DPPH (6×10^{-5} M).
 - La mesure de l'absorbance commence immédiatement. La diminution de l'absorbance à 517 nm est déterminée durant 60 min suivant le tableau C (Annexe I). Le méthanol est utilisé comme zéro.

I.3.8.2. Mesure du pouvoir réducteur

L'aptitude des phénols totaux à réduire le fer ferrique Fe (III) en Fe (II) est évaluée par la méthode décrite par (Oyaizu, 1986).

I.3.8.2.1. Mode opératoire

- Des concentrations différentes des extraits méthanoliques (25-200 ppm) de 1 ml, sont mixées avec 2.5 ml de tampon phosphate 0.2 mol/l (pH= 6.6), et 2.5 ml de hexacyanoferrate de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] 1 %.
- Le mélange est incubé à 50°C pour 20 min, puis 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est ajouté où il va être centrifugé à 3000 t/m pendant 10 min.
- La phase supérieure de la solution (2.5 ml) est mélangée avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de la solution 0.1 % de chlorure de fer (III) ($FeCl_3$).

- Les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm (une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé).
- Les concentrations des antioxydants assurant 0.5 d'absorbance (EC₅₀) sont calculées à partir du graphe des absorbances contre les concentrations des antioxydants dans la solution (Sousa et al., 2008).

Le BHT, l'acide ascorbique, la DL- α -tocophérol, sont utilisés comme composés de référence (antioxydants standards).

Toutes les analyses précédentes ont été réalisées dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des polyphénols naturels extraits des margines et de faire une comparaison entre les deux types de margines (industrielle et traditionnelle) issues de la même variété Chemlal de deux régions de la même wilaya (effet de procédé d'extraction, de la variété et de la région).

2^{ème} Chapitre: II. Valorisation de l'extrait phénolique

Une quantité importante des polyphénols a été extraite à partir de la margine (1) selon le même protocole décrit précédemment dans le but de les valoriser. La valorisation de l'extrait phénolique (extrait 1) a été faite à des doses différentes en comparaison avec un antioxydant phénolique synthétique qui est le BHT.

Dans une perspective d'évaluer l'effet antioxydant de l'extrait phénolique, les huiles utilisées comme support des polyphénols et du BHT sont soumises à une altération thermooxydative.

II.1. Préparation des doses

Trois concentrations de l'extrait phénolique 1 (200, 400 et 800 ppm) et une concentration (200 ppm) de BHT ont été respectivement ajoutées aux trois huiles végétales (huile de soja, huile de tournesol, huile d'olive). Des essais témoins sont réalisés dans le but d'évaluer et de comparer leurs effets antioxydants :

- On ajoute à chaque type d'huile une quantité bien déterminée, en millilitres, de l'extrait phénolique (solution méthanolique) afin d'obtenir les concentrations finales désirées (200, 400 et 800 ppm) mesurées en équivalent acide gallique.
- Une concentration connue du BHT a été préparée dans du méthanol, à partir de laquelle une quantité bien définie a été ajoutée à chaque type d'huile afin d'obtenir la concentration 200 ppm choisie.
- On procède à une homogénéisation par une agitation magnétique durant 30 min à 50°C. Le solvant est évaporé par incubation des huiles pour 60 min à l'étuve.
- Après refroidissement, les huiles ont été pesées, dans des tubes à essai à raison de 7 g par tube et réparties en 5 séries de 15 tubes, où chaque série correspond à un prélèvement.
- Les tubes en verre, transparents et ouverts, ont été stockés dans une étuve éclairée (Haier, HRDH-71, Heating Oven) et thermorégulée à 63°C, pour une durée de 20 jours afin d'étudier la stabilité des huiles choisies (HS, HT, HO) dans les conditions de stockage décrites.

- Les prélèvements ont été faits au bout de 3, 6, 10, 15 et 20 jours, comptés à partir du premier jour de stockage.

II.1.1. Le choix de la dose 200 ppm du BHT (E321) ou butylhydroxytoluène

Selon Berset (2006), en agroalimentaire, la dose utilisée de BHT varie de 0.01 et 0.02 % du poids de la matière grasse contenue dans l'aliment. C'est pour cette raison qu'on a choisi la dose de 200 ppm (0.02 %) qui est considérée comme maximale.

II.2. Test de la stabilité oxydative

Le processus d'oxydation des huiles étudiées a été suivi par les déterminations de l'indice de peroxyde (IP), du coefficient d'extinction spécifique des diènes conjugués à 232 nm (K_{232}), et des produits secondaires (triènes conjugués) dans l'ultraviolet à 270 nm (K_{270}) à l'aide d'un spectrophotomètre (1240 SHIMADZU U.V.- Vis), ainsi que la détermination du profil d'acide gras par chromatographie phase gazeuse avant et après étuvage.

II.2.1. Détermination des extinctions spécifiques NF ISO 3656

C'est une norme française homologuée ISO 3656: 1991, qui remplace la norme homologuée NF T60-223 : 1978.

Tous les corps gras naturels contenant au moins une faible quantité de l'acide linoléique, l'oxydation d'un corps gras conduit à la formation d'hydroperoxyde linoléique, diène conjugué qui absorbe au voisinage de 232 nm. Si l'oxydation poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation, en particulier des dicétones α et des cétones α insaturées qui absorbent vers 270 nm. L'extinction à 232 nm et à 270 nm d'un corps gras peut donc être considérée comme une image de son état d'oxydation :

- Plus l'extinction à 232 nm est forte, plus l'huile est peroxydée.
- Plus l'extinction à 270 nm est forte, plus l'huile est riche en produits secondaires d'oxydation.

Cette méthode est couramment réalisée avec de l'hexane, cyclohexane ou des alcools tels que l'éthanol, le méthanol ou l'isopropanol.

II.2.1.1. Mode opératoire

Dissoudre 100 mg d'huile dans 10 ml de cyclohexane. Diluer 10 fois cette solution, et mesurer sur la solution à 0.1 %, obtenue l'absorbance à 232 nm et à 270 nm (Wolff, 1968).

II.2.2. Détermination de l'indice de peroxyde (IP) NF T60-220

La vitesse d'oxydation d'une huile se traduit par une augmentation de son indice de peroxyde. La détermination de cet indice est la méthode incontournable, mais elle est imparfaite puisqu'elle a un lien avec la peroxydation et non avec le rancissement.

L'indice de peroxyde est toujours utilisé dans le contrôle de la qualité des huiles raffinées et des huiles vierges. Des valeurs limites existent pour les différents corps gras au-delà desquelles ils ne peuvent plus être considérés comme alimentaires. Il représente le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras, et il rend compte de la formation de composés primaires d'oxydation.

Dans une molécule de peroxyde il y a une molécule d'oxygène fixé. Mais sur les deux atomes d'oxygène, un seul est actif, c'est-à-dire sur le plan analytique, capable d'oxyder par exemple des iodures en iode.

II.2.2.1. Principe

Consiste en l'oxydation des iodures en iodes par l'oxygène actif du peroxyde.

On entend par l'indice de peroxyde d'un corps gras le nombre de microgrammes actif du peroxyde contenu dans un gramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode dans les conditions de la méthode décrite.

La méthode employée est celle normalisée NF T 60-220: 1995 qui remplace la norme homologuée NF T 60-220: 1968.

II.2.2.2. Mode opératoire

2 g d'huile sont mis en solution avec 10 ml de chloroforme. Dissoudre rapidement le corps gras en agitant. Ajouter 15 ml d'acide acétique, puis 1 ml d'iodure de potassium. Boucher aussitôt le flacon, l'agiter pendant une minute et l'abandonner 5 min à l'abri de la lumière. Au bout de ce temps, ajouter 75 ml d'eau distillée, titrer l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium (0.01 N) en agitant vigoureusement en présence d'empois d'amidon.

Un essai à blanc a été effectué dans les mêmes conditions. Deux déterminations ont été réalisées sur le même échantillon.

L'indice de peroxyde est déterminé selon la formule suivante :

$$IP = 80 \times V/E \times 1/8$$

IP : indice de peroxyde exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme d'huile (méqO₂/kg).

V : est le volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai, corrigé compte tenu de l'essai à blanc, exprimé en millilitres de solution 0.01 N.

E : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

II.2.3. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

La teneur en acide gras a été réalisée avant et après stockage (étuvage) à 63°C durant 20 jours par chromatographie phase gazeuse (CPG). L'injection en CPG d'un corps gras est précédée d'une méthylation des acides gras, présents sous forme libre ou estérifiée dans le mélange, afin de les rendre plus volatils.

II.2.3.1. Principe

Le corps gras est estérifié en présence de méthanol, les esters méthyliques d'acides gras sont séparés sur une colonne polaire en fonction de leur poids moléculaire. La surface correspondant à chacun d'eux est calculée et rapportée à la surface totale des différents acides gras pour obtenir un pourcentage.

II.2.3.2. Mode opératoire

La méthylation a été faite selon la méthode décrite par Patumi et *al.* (2003). C'est une méthode simple, rapide et ne demande qu'une petite quantité de matière grasse. Elle fait appel à un traitement par l'hydroxyde de potassium (KOH) méthanolique 2M et de l'hexane.

- 0.3 g d'huile est ajouté à 4 ml d'hexane et 400 µl de la solution KOH méthanolique 2M.
- Agiter vigoureusement pendant une minute et laisser décanter.
- La phase hexanique contenant les acides gras méthylés est séparée puis analysée par chromatographie phase gazeuse (CPG), selon les conditions opératoires suivantes :

Conditions opératoires pour les esters méthyliques des huiles alimentaires	
Chromatographe Détecteur	Chrompack CP 9002 FID
Injecteur	SPLIT 1/100
Colonne capillaire Longueur Diamètre intérieur	DB 23 30 m 0.32 mm
Epaisseur	0.25 µm
Gaz vecteur	Azote
Température de l'injecteur Température de détecteur Température du Four	250°C 250°C 190°C
Quantité injectée	0.2 µl
Vitesse du papier	0.5 cm/min

II.3. Analyses statistiques des données

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques, et lors du test de la stabilité oxydative des huiles étudiées ont fait l'objet d'une analyse de la variance à intervalle de confiance de 95 % à l'aide de logiciel XL. STAT version 6.0-ANOVA, dans le but de donner une signification statistique aux résultats trouvés.

II.4. Caractérisation des huiles étudiées

Les huiles étudiées (huile de soja, huile de tournesol et l'huile d'olive) ont été caractérisées chimiquement avant de procéder au test de la stabilité oxydatif par la mesure de l'indice de peroxyde, des diènes (K₂₃₂) et triènes (K₂₇₀) conjugués, ainsi que les acides gras suivant les mêmes méthodes décrites précédemment. L'acidité est déterminée selon la méthode décrite ci-après:

II.4.1. Détermination de l'acidité

L'acidité rend compte de l'altération hydrolytique des corps gras. Elle représente la teneur en acides gras libres déterminée conformément à la méthode prescrite dans la présente norme internationale. Elle est exprimée en pourcentage en masse.

La méthode utilisée est la méthode de référence décrite dans l'article 4 de la norme internationale ISO 660: 1999 qui remplace la norme ISO 660: 1996.

II.4.1.1 Principe

Mise en solution d'une prise d'essai dans de l'éthanol chaud, puis titrage avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou de potassium.

II.4.1.2. Mode opératoire

- Peser 5 g d'huile dans un erlenmeyer.
- Dans un deuxième erlenmeyer, porter à ébullition 50 ml d'éthanol 95 %, contenant 0.5 ml de solution indicatrice de phénolphaléine.
- Neutraliser avec précaution à l'aide de la solution de KOH.
- Ajouter l'éthanol neutralisé à la prise d'essai dans le premier erlenmeyer et mélanger soigneusement, porter le contenu à ébullition et titrer avec du KOH en agitant vigoureusement.
- Un essai à blanc a été exécuté dans les mêmes conditions.
- L'acidité désignée par le pourcentage en acide oléique, est déterminée selon la formule suivante :

$$A \% = \frac{V \cdot c \cdot M}{10 \cdot m}$$

V : est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée.

c : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée (0.1 mol/l).

M : est la masse molaire, en grammes par mole, de l'acide oléique ; M = 282 g/mol.

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

Partie III. Résultats et discussions

1^{er} Chapitre : I. Extraction, dosage et activité antioxydante des polyphénols

Dans le but de faire une comparaison entre deux procédés d'extraction d'huile existants en ALGERIE, l'un industriel utilisant le système d'extraction en continu avec centrifugation à trois phases, l'autre est traditionnel utilisant un système d'extraction par presse. Deux types de margines de la même variété Chemlal, issus de deux régions différentes de Tizi-Ouzou ont été étudiés.

I.1. Résultats de l'étude physico-chimique des margines

Les principaux résultats physico-chimiques des deux types de margines sont consignés dans le tableau 19:

Tableau 19. Caractéristiques physicochimiques des margines

Margine (2)	Margine (1)	Paramètres
Marron-rouge	Marron foncé-noir	Couleur
4.92	4.63	PH
89.46 ± 0.44	93 ± 0	Humidité (%)
4.60 ± 2.24	2.6 ± 0.48	Lipides (%)
0.364 ± 0	1.139 ± 0.026	Azote total (g/l)
0.5 ± 0.015	0.8 ± 0.0057	Phénols totaux (g/l)
0.44 ± 0.023	0.6 ± 0.026	o-diphénols (g/l)
10.53 ± 0.44	7 ± 00	Solide total (%)
0.98 ± 0	3.625 ± 0.134	STS (%)

- Margine (1)- Procédé industriel.
- Margine (2)- Procédé traditionnel.

Le tableau 19 montre que les margines sont des effluents moyennement acides (4.63-4.92). Ces résultats sont relativement identiques à ceux trouvés par Vlyssides et *al.* (2004); El Hadrami et *al.* (2004) qui sont de l'ordre de (4.8-4.5) et de (4.10-4.5) respectivement, et même à ceux cités par Kapellakis et *al.* (2008) (4.5-5).

La teneur en eau est importante aussi bien dans la margine (1) que dans la margine (2) avec une variation de 4 %. La teneur en eau des margines citée par Kapellakis et *al.* (2008) se situe au voisinage de (83-92 %), et elle est de (82.4-94.15) d'après Lopez et Ramos-Cormenzana, (1996).

La margine (2) est plus riche en lipides, presque deux fois plus que la margine (1). Les résultats de Vlyssides et *al.* (2004) montrent que les margines issues de presse sont plus riches

en lipides (2.8 ± 1.03 g/l) que celles issues de procédé à trois phases (1.64 ± 0.64 g/l). La teneur en lipides de 2.6 % est légèrement plus importante à celle citée par Kapellakis et al. (2008) (0.5-2.3 %), alors que la valeur 4.60 % est plus importante à celle trouvée dans la littérature.

Le taux d'azote est beaucoup plus important (trois fois plus) dans la margine (1) que dans la margine (2). La valeur trouvée (≈ 1.14 g/l) pour la margine (1) se situe dans l'intervalle cité par Kapellakis et al. (2008) (1-3 g/l). 0.364 g/l est une valeur faible par rapport à celle trouvée dans la littérature, notamment celle citée par Lopez et Ramos-Cormenzana, (1996) qui est au minimum de 0.6 g/l.

Le solide total (ST %) est plus élevé dans la margine (2) que dans la margine (1). Ces valeurs sont en accord avec celles citées par Kapellakis et al. (2008) (6-12 %).

Le solide total en suspension (STS %) est beaucoup plus important dans la margine (1) que dans la margine (2), il est presque 10 fois plus élevé. La valeur 3.625 % se situe dans l'intervalle (2.5-3.75 %) trouvé par El Hadrami et al. (2004), alors que la valeur 0.98 % se situe dans l'intervalle (0.04-1.04 %) cité par D'Annibale et al. (2003).

Pour les polyphénols et les o-diphénols, la composition phénolique de l'huile et des margines dépend non seulement de la variété, de la maturité du fruit et des conditions climatiques, mais aussi des procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse de la phase huileuse (Moussaoui et al., 2007).

La détermination de la concentration phénolique des margines (en équivalent acide gallique) a été effectuée par la mesure de l'absorbance selon le tableau A (Annexe 1) et à partir de la courbe illustrée ci après:

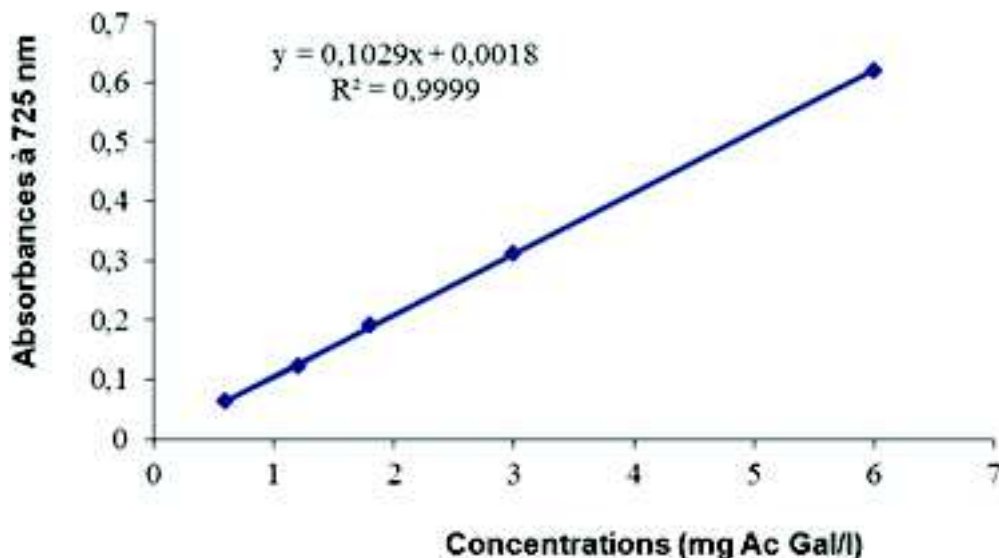


Figure 16. Courbe de référence exprimant les absorbances à 725 nm en fonction des concentrations de l'acide gallique (mg/l)

Les phénols totaux (0.8 g/l) de la margine (1) issue de procédé industriel, sont presque deux fois plus élevés que ceux (0.5 g/l) démontrés dans la margine (2) issue de procédé traditionnel par presse.

Le taux de polyphénols a été déterminé par de nombreux chercheurs: des valeurs de 4 g/l quantifiées par Fki et al. (2005a); 7 g/l trouvées par Fezzani et Ben Cheikh (2007); 1.1 g/l (margine fraîche) et 2.5 g/l (margine acide) mesurées par De Marco et al. (2007). Ces

valeurs sont plus élevées par rapport à celles enregistrées dans notre étude (0.8, 0.5 g/l), par contre elles sont plus élevées par rapport à celle déterminée (0.215 g/l) par Moussaoui (2007).

La détermination de la concentration en *o*-diphénols des margines (en équivalent acide gallique) a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 370 nm selon le tableau B (Annexe I) et à partir de la courbe illustrée ci après:

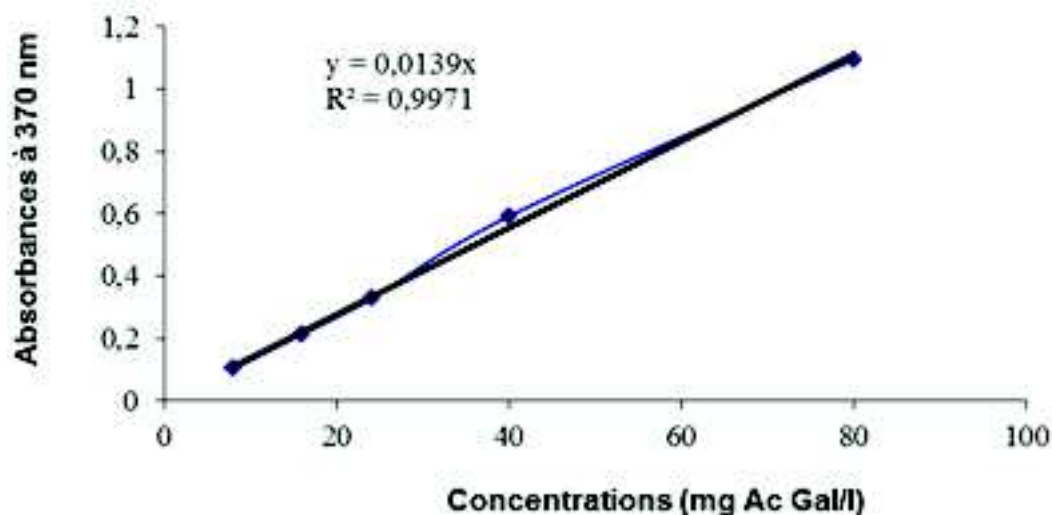


Figure 17. Courbe de référence exprimant les absorbances à 370 nm en fonction des concentrations de l'acide gallique (mg/l)

Le taux des *o*-diphénols est plus important dans la margine industrielle (0.6 g Ac Gal/l) que dans la margine traditionnelle (0.44 g/l), mais par rapport aux phénols totaux, les *o*-diphénols de la margine (2) représentent 88 % des polyphénols totaux, alors qu'ils représentent 75 % des polyphénols totaux pour la margine (1).

Les valeurs d'*ortho*-diphénols enregistrées (0.6 g/l, 0.44 g/l) sont plus faibles par rapport à la quantité (1.2 g/l) trouvée par Casa et al. (2003).

Les *o*-diphénols sont considérés les meilleurs antioxydants. L'insertion d'un second ou un troisième groupement hydroxyle dans le cycle aromatique de phénol augmente l'activité antioxydante (Gutfinger, 1981).

Parmi les différentes méthodes d'extraction, chacune avec une efficacité et de complexité différentes, l'extraction liquide-liquide est préférable pour sa simplicité et sa commodité (Obied et al., 2005a).

En vue de développer une extraction efficace (qualitativement et quantitativement), différents paramètres sont optimisés: la nature du solvant, le pH des margines, le rapport volumétrique entre le solvant et les margines et le nombre d'étapes d'extraction:

- L'acétate d'éthyle est responsable d'un pouvoir extracteur élevé par rapport à d'autres solvants. Parmi plusieurs solvants polaires, tels que méthylisobutylcétone, méthyléthylecétone et l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle s'avère un extracteur de la fraction monomérique entière des margines. Les teneurs en composés phénoliques (0.8-0.5 g/l) extraits à l'acétate d'éthyle sont élevées par rapport à la valeur 0.215 g/l de margine extraits à l'éther diéthylique par Moussaoui (2007).
- L'acidification des margines est responsable de l'hydrolyse du complexe des composés phénoliques avec libération des monomères (De Marco et al., 2007), et

l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans le solvant organique (Obied *et al.*, 2005a; Fki *et al.*, 2005a). Ces effets sont confirmés par la teneur en polyphénols totaux; 0.8 g acide gallique/l de margine (1), et de 0.5 g d'acide gallique/l de margine (2), contre 0.215 g/l de margine fraîche de la même variété Chemlal trouvée par Moussaoui (2007). Selon Lafka *et al.* (2007), la teneur maximale en phénols a été obtenue à pH acide 1.5. De plus, la réduction de pH entraîne une difficulté d'évaporation, sans augmentation significative de rendement d'extraction et conduit à une diminution de l'activité antiradicalaire des phénols extraits.

- Le rapport solvant/margine (1:1; v/v) est utilisé selon (De Marco *et al.*, 2007; DellaGreca *et al.*, 2004; lesage-Meessen *et al.*, 2001), et le nombre d'étapes d'extraction est optimisé. Il est équivalent à 5, prouvé être adéquat pour obtenir le maximum de biophénols des margines dans ces conditions d'extraction. Fki *et al.* (2005a) observent que le pourcentage de chaque monomère et particulièrement de l'hydroxytyrosol, dans l'extrait est maximal pour un rapport de solvant et un nombre d'étape d'extraction théorique égal à 2 et 3 respectivement.
- L'augmentation de temps d'extraction augmente la quantité des phénols extraits. Une augmentation supplémentaire de la période d'extraction consomme beaucoup de temps et n'est pas économique. Lafka *et al.* (2007) ne signalent aucune augmentation significative de la quantité d'extrait phénolique suite à l'augmentation de la période d'extraction, qui conduit à une diminution de leur activité antioxydante en raison de sa longue exposition aux facteurs environnementaux (température, lumière, oxygène), qui ont un effet négatif sur l'activité antioxydante.

I.2. Activité antioxydante des extraits phénoliques

L'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines a été déterminée en utilisant deux méthodes basées sur différents mécanismes. Une est l'essai de piégeage du radical DPPH, la plus utilisée pour étudier les polyphénols des plantes, y compris ceux des margines, et l'autre est l'essai du pouvoir réducteur qui est choisi en raison du fait que le complexe Fe-polyphénols a été manifesté comme inhibiteur de la formation des radicaux oxygénés associés à des nombreuses pathologies, et probablement aussi de la croissance de certains microorganismes pathogènes (Turkmen *et al.*, 2007).

L'action antioxydante des composés phénoliques dépend de leur capacité à piéger les radicaux libres et de leur aptitude à réduire le fer (Turkmen *et al.*, 2007).

L'activité antioxydante d'un composé antioxydant a été attribuée à divers mécanismes, parmi lesquels (Gülçin *et al.*, 2004):

- La prévention de la chaîne d'initiation;
- La fixation des ions métalliques catalyseurs;
- La décomposition des peroxydes;
- La prévention de l'abstraction continuée de l'hydrogène, capacité réductrice et piégeage des radicaux.

En général, l'augmentation de l'activité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait, mais la concentration conduisant à une activité antioxydante maximale dépend étroitement des extraits et, pour le même extrait, elle est dépendante de test de l'activité antioxydante (Lafka *et al.*, 2007).

I.2.1. Détermination du pouvoir de piégeage du radical DPPH

Le DPPH est relativement stable comparé aux espèces hautement réactives, superoxyde et l'hydroxyle qui sont principalement responsables des dommages oxydatifs dans les systèmes biologiques, et est largement utilisé pour tester la capacité des composés d'agir comme éboueurs des radicaux libres ou donneur d'hydrogène (Ku et Mun, 2008).

Le radical libre DPPH présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire (Mohammedi, 2006).

Les extraits phénoliques sont utilisés contre le radical DPPH pour déterminer leurs propriétés de piégeage des radicaux libres. Dans cet essai le radical libre DPPH sert comme un substrat oxydant, qui peut être réduit par un composé phénolique en son dérivé hydrazine via la donation d'un hydrogène.

La capacité de piégeage du radical DPPH des extraits phénoliques des margines existe, puisqu'ils sont capables de réduire la forme stable de ce radical vers la forme Diphényl picrylhydrazine de couleur jaune (Figure 18).

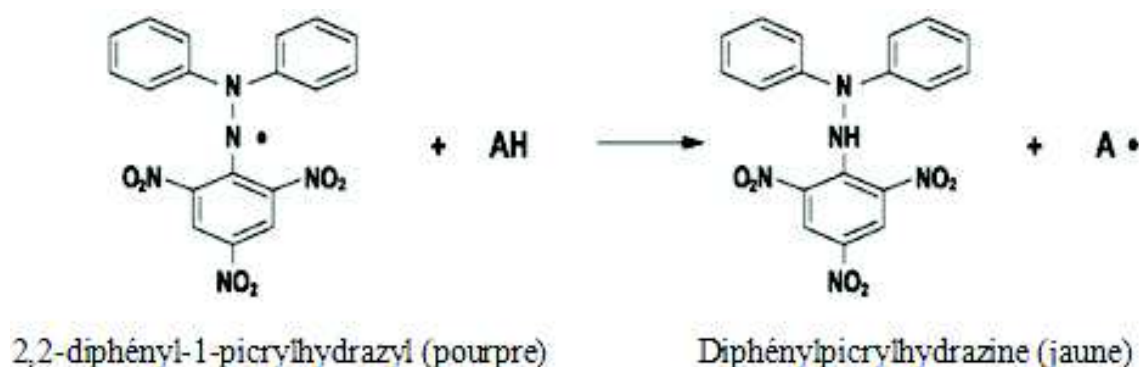


Figure 18. Forme libre stable et réduite de radical DPPH

Une décoloration de la solution du violet au jaune est visuellement perceptible. La solution de DPPH fraîchement préparée présente une couleur pourpre intense avec une absorption maximale à 517 nm. Cette couleur généralement disparaît lorsqu'un antioxydant est présent dans le milieu, ainsi les molécules antioxydantes peuvent attaquer les radicaux DPPH libres (en fournissant les atomes d'hydrogène, ou par la donation d'électron, convenablement via une attaque de radical libre sur la molécule DPPH) et les convertir en un liquide incolore (2,2-diphényl-1-hydrazine) entraînant une diminution de l'absorbance à 517 nm. Par conséquent, l'activité antioxydante des extraits est puissante. Le piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes les plus connus, par lesquels les antioxydants inhibent l'oxydation lipidique (Ferreira et al., 2007).

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl sont représentés dans les tableaux 20 et 21 et les figures 19 et 20.

Tableau 20. Moyennes des absorbances à 517 nm en fonction des concentrations (ppm)

Concentration ppm	Absorbance (DO ^a) à 517 nm				
	25	50	100	150	200
Ext 1	0.571 ± 0.036	0.519 ± 0.026	0.419 ± 0.007	0.295 ± 0.006	0.208 ± 0.005
Ext 2	0.632 ± 0.004	0.503 ± 0.047	0.369 ± 0.093	0.204 ± 0.096	0.206 ± 0.007
BHT	0.597 ± 0.049	0.485 ± 0.079	0.426 ± 0.025	0.337 ± 0.029	0.278 ± 0.003
Ac Asc	0.616 ± 0.022	0.528 ± 0.055	0.475 ± 0.042	0.275 ± 0.028	0.105 ± 0.022
DL- α -Toc	0.689 ± 0.065	0.634 ± 0.052	0.613 ± 0.037	0.514 ± 0.02	0.381 ± 0.028

^a: valeurs exprimées en moyenne \pm écart type

Ext 1: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé industriel; Ext 2: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé traditionnel; BHT: Butylhydroxytoluène; Ac Asc: acide ascorbique; DL- α -Toc: DL- α -tocophérol; AH: antioxydant.

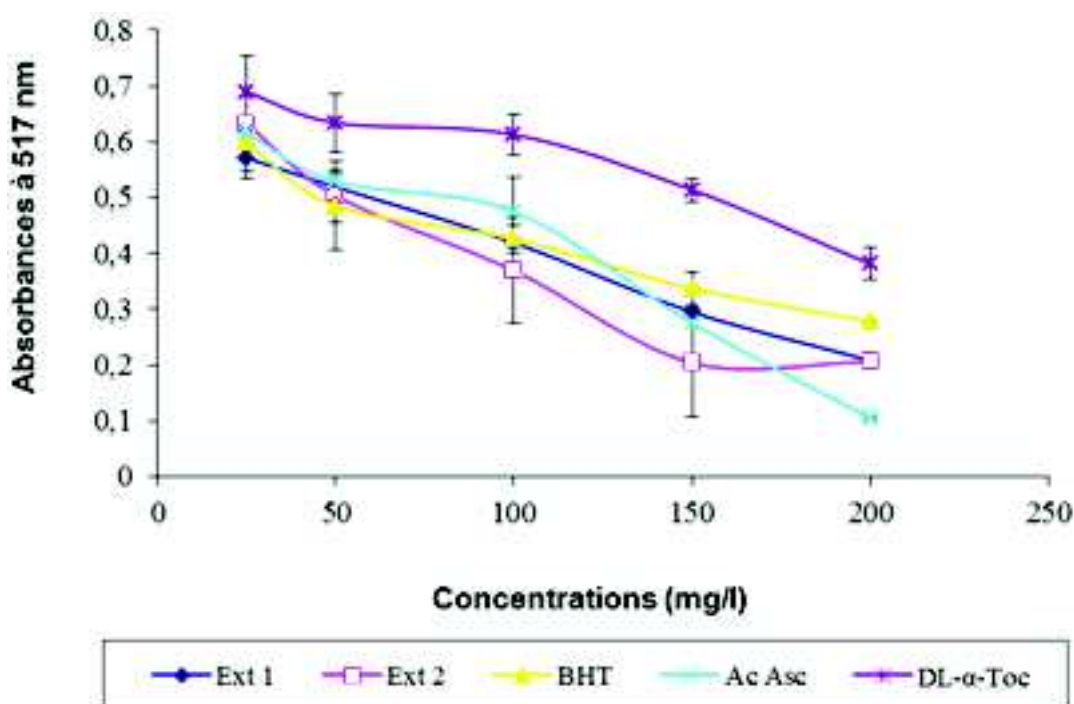


Figure 19. Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques et des standards

La capacité réductrice de radical DPPH est déterminée par la diminution de l'absorbance à 517 nm induite par les antioxydants. L'absorbance présente une chute en fonction de l'augmentation des doses de l'antioxydant (Figure 19). Cette dernière montre une diminution hautement significative des absorbances à différentes doses pour tous les antioxydants naturels et standards ($p < 0.0001$ pour l'Ext 1, BHT, Ac Asc, et α -Toc; $p = 0.004$ pour l'Ext 2). Les pentes des 5 régressions linéaires indiquent qu'elles sont significativement différentes ($p < 0.0001$).

Selon Amarowicz et al. (2000), la diminution de l'absorbance dépend des concentrations de l'antioxydant et du radical, de la structure moléculaire de l'antioxydant et de leur comportement cinétique.

Les extraits phénoliques des margines présentent un bon pouvoir antioxydant (Tableau 21), ce qui est confirmé par plusieurs chercheurs que les polyphénols naturels sont des

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

capteurs ou "éboueurs" puissants des radicaux libres (Fki et *al.*, 2005a; De Marco et *al.*, 2007).

Le DPPH est un radical libre stable, il accepte un électron ou un radical hydrogène pour devenir une molécule stable diamagnétique (Gülçin et *al.*, 2004).

Tableau 21. Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'antioxydant

Activité de piégeage du radical DPPH ^a (%)					
Concentration ppm	25	50	100	150	200
AH					
Ext 1	21.2 ± 4.98	28.43 ± 3.60	42.23 ± 1.10	59.33 ± 0.83	71.3 ± 0.69
Ext 2	17.95 ± 0.63	34.73 ± 6.20	52.1 ± 12.16	73.4 ± 12.58	73.23 ± 1.02
BHT	17.73 ± 6.85	33.16 ± 10.95	41.3 ± 3.5	53.53 ± 4.06	61.66 ± 0.45
Ac Asc	16.16 ± 3.0	28.23 ± 7.5	35.3 ± 5.82	62.5 ± 3.84	85.63 ± 2.96
DL- α -Toc	15.35 ± 7.99	22.03 ± 6.42	24.55 ± 4.59	36.7 ± 2.55	53.1 ± 3.55

^a: valeurs exprimées en moyenne \pm écart type

Ext 1: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé industriel; Ext 2: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé traditionnel; BHT: Butylhydroxytoluène; Ac Asc: acide ascorbique; DL- α -Toc: DL- α -tocophérol; AH: antioxydant.

L'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines, du BHT, de l'acide ascorbique et de l' α -tocophérol augmente au fur et à mesure que la concentration de l'antioxydant augmente (Tableau 21). Elle atteint 71.3 % pour l'extrait 1 et 73.23 % pour l'extrait 2. Ces pourcentages sont plus élevés que ceux du BHT et de l' α -tocophérol qui sont de l'ordre de 61.66 et de 53.1 % respectivement. L'acide ascorbique présente le meilleur pourcentage à 200 ppm (85.63 %).

Les extraits phénoliques 1 et 2, montrent une activité antioxydante plus importante que celle de l' α -tocophérol. Les antioxydants de synthèse manifestent des activités antioxydantes comparables à celles des extraits phénoliques.

Le tableau 21 montre une augmentation hautement significative de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines en fonction de la concentration ($p < 0.0001$ pour l'extrait 1 et $p = 0.005$ pour l'extrait 2).

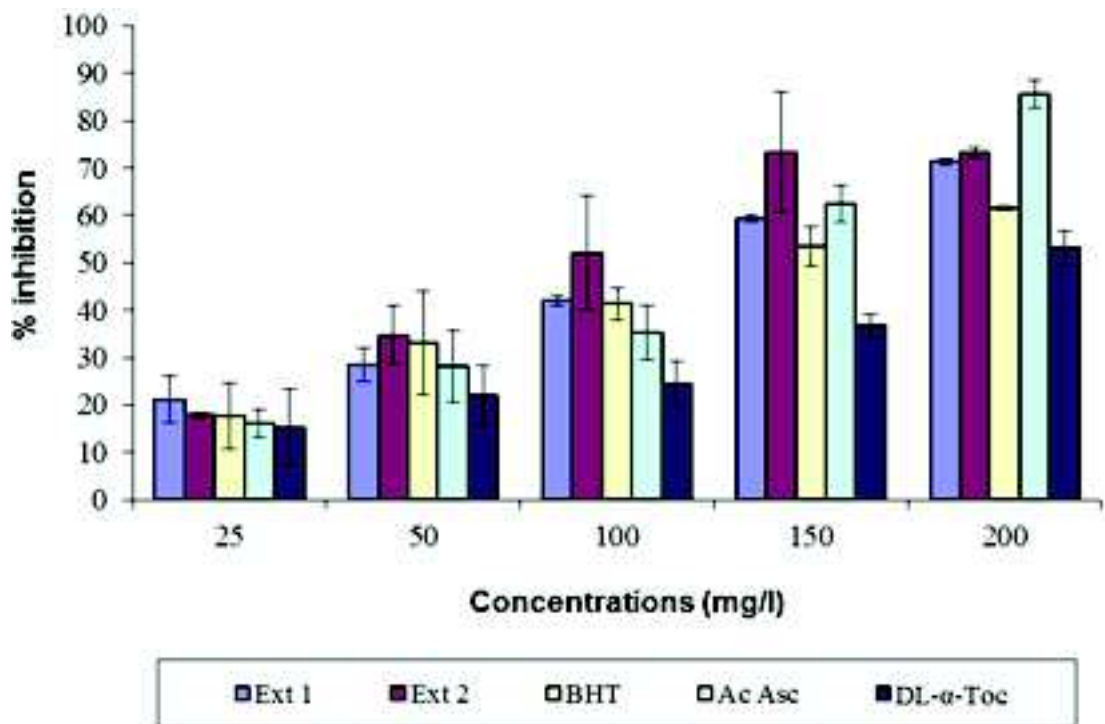


Figure 20. Activité de piégeage du radical DPPH des différentes concentrations des extraits phénoliques, BHT, acide ascorbique et du tocophérol

Pour la concentration 25 mg/l, l'extrait 1 enregistre un pourcentage d'inhibition supérieur à celui de l'extrait 2. Ce dernier exerce une meilleure activité antioxydante que celle de l'extrait 1 pour les concentrations 50, 100 et 150 ppm. Ceci peut être expliqué par le taux en *o*-diphénols présents qui est plus important dans l'extrait 2 (87.87 %) que dans l'extrait 1 (72.7 %).

D'après Lafka et al. (2007), il n'existe pas de corrélation entre la teneur en phénols et l'activité antioxydante des extraits phénoliques.

Nos résultats de l'activité du piégeage des radicaux libres par les extraits phénoliques des margines (issus de la même variété d'olive "Chemlal") viennent renforcer ceux trouvés par Fki et al. (2005a); Bouaziz et al. (2008a); Mansouri et al. (2005); Przybylski et al. (1998), Conde et al. (2008); Sousa et al. (2008). Tous ces auteurs ont montré l'effet antioxydant puissant des extraits phénoliques. Les résultats de piégeage du radical DPPH rapportés par Sousa et al. (2008) sont comparables à l'effet de piégeage obtenu par les standards BHA et α -tocophérol.

Dans le but d'étudier la vitesse de réduction du radical DPPH et la puissance de nos antioxydants naturels, nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par la mesure de l'abaissement des absorbances à 517 nm en fonction du temps (Figure 21).

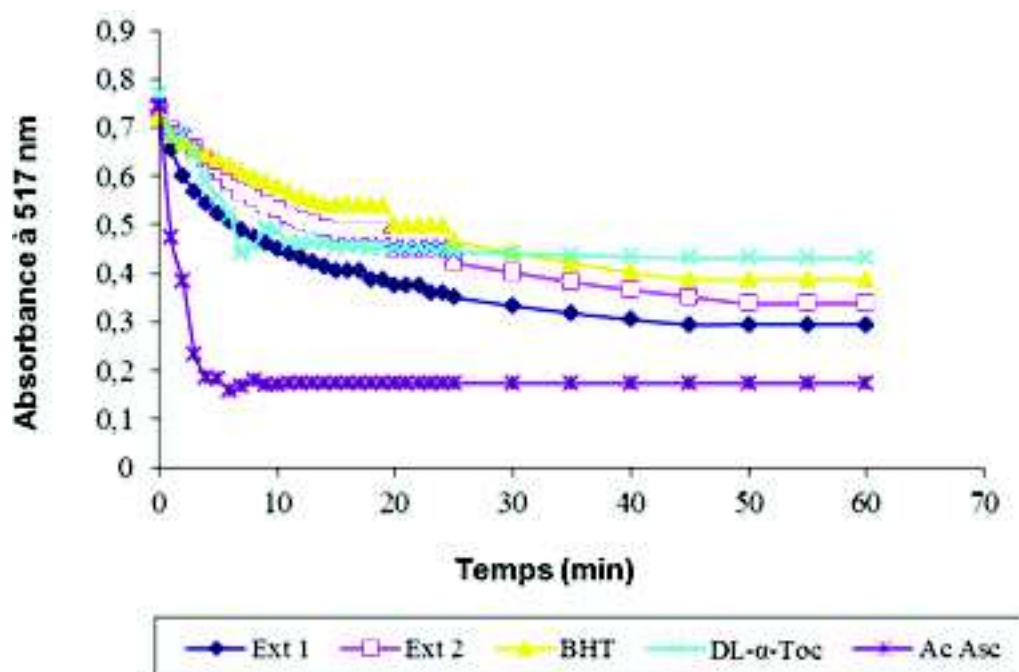


Figure 21. Cinétique de piégeage du radical DPPH par les extraits phénoliques, le BHT, l'acide ascorbique et le tocophérol à une concentration de 200 ppm

Au cours de ce test, on a noté la diminution des absorbances suite à l'addition d'une quantité déterminée des extraits phénoliques naturels à un volume connu de la solution méthanolique contenant le DPPH. Les absorbances diminuent rapidement, puis se stabilisent. La réduction des absorbances des extraits phénoliques naturels et des standards est moins rapide par rapport à celle de l'antioxydant; acide ascorbique.

Comme suggéré par Bondet et *al.* (1997) cité par Nenadis et *al.* (2003), certains composés réagissent très rapidement avec le DPPH, ce qui réduit un certain nombre de molécules égal au nombre des groupements hydroxyles disponibles de l'antioxydant.

Selon Nenadis et *al.* (2003), il semble que pour la majorité d'antioxydants phénoliques, la réaction est lente et le mécanisme est plus complexe, par exemple l'acide caféique piège moins de moles de DPPH que l'acide dihydrocaféique, mais celui-ci exige une période plus longue pour atteindre l'état stationnaire.

Pour la cinétique de piégeage du radical DPPH par les extraits phénoliques des margines étudiés, le BHT, l'acide ascorbique et l' α -tocophérol, plusieurs zones peuvent être distinguées:

- Zone à cinétique de piégeage modérée du radical DPPH avant les 25 minutes pour les antioxydants naturels et les BHT,
- Zone à cinétique un peu plus rapide pour l' α -tocophérol avant les 7 min,
- Zone à forte vitesse de piégeage de l'acide ascorbique avant les 4 minutes (diminution rapide de l'absorbance à 517 nm).
- Zone de faible cinétique de piégeage du radical DPPH et cela après 25 minutes de mise en contact de celui-ci avec tous les antioxydants testés à l'exception de l' α -tocophérol et de l'acide ascorbique qui montrent une faible cinétique après 7 et 4 minutes respectivement (saturation des sites actifs du radical DPPH).

On a remarqué aussi un changement de couleur avec le temps, passage de violet (pourpre) foncé vers le jaune pâle.

- L'activité antioxydante des extraits phénoliques des margines est exprimée en IC_{50} (Tableau 22). Ce paramètre a été introduit par Brand-williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH (couleur) (Molyneux, 2004) cité par Mohammadi (2006).

Les IC_{50} sont déterminées graphiquement à partir des trois tests séparés dont les abscisses représentent les concentrations des extraits phénoliques des margines et des standards, et les ordonnées l'activité antioxydante en pourcentage (% d'inhibition). Les valeurs IC_{50} expriment les concentrations des extraits phénoliques et des standards nécessaires pour réduire le DPPH en solution de 50 %.

D'après le tableau 22, l'activité antioxydante la plus importante est observée chez l'extrait 2, suivi de l'extrait 1 (104.13 et 123.83 mg/l respectivement).

Tableau 22. IC_{50} et puissance antiradicalaire (PAR) des antioxydants naturels et des standards

Antioxydants	IC_{50}^a (mg/l)	PAR ^a
Ext 1	123.83 ± 2.56	0.80 ± 0.02
Ext 2	104.13 ± 13.84	0.97 ± 0.13
BHT	139.9 ± 12.64	0.71 ± 0.06
Ac Asc	116.24 ± 11.47	0.86 ± 0.087
DL- α -Toc	199.83 ± 3.09	0.49 ± 0.0057

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

IC_{50} : concentration pour 50 % d'inhibition; PAR: pouvoir antiradicalaire.

Ext 1: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé industriel; Ext 2: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé traditionnel; BHT: Butylhydroxytoluène; Ac Asc: acide ascorbique; DL- α -Toc: DL- α -tocophérol; AH: antioxydant.

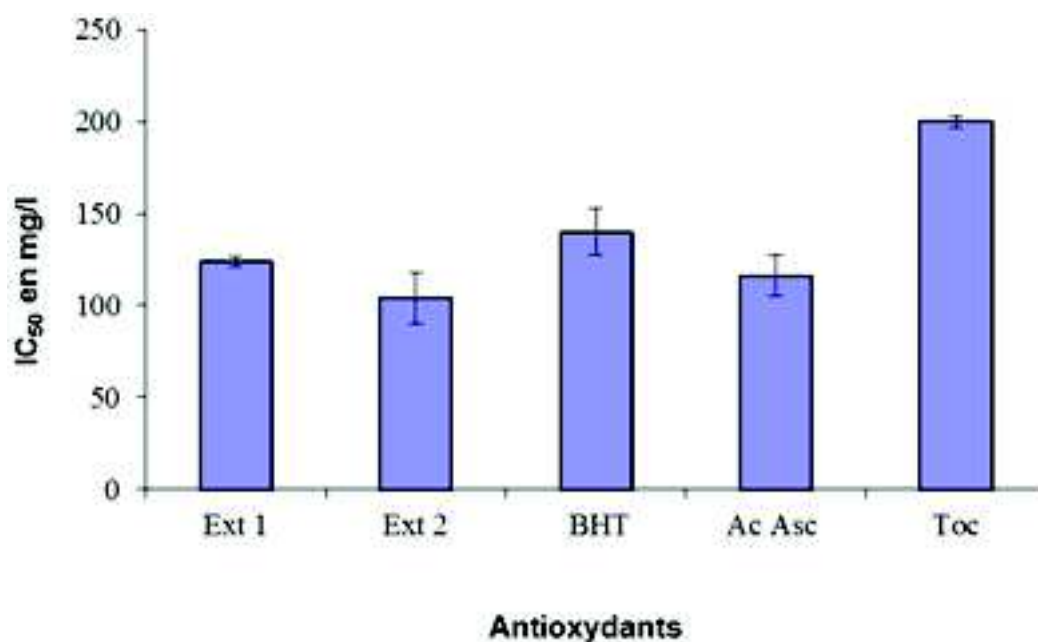


Figure 22. IC₅₀ des extraits naturels, du BHT et des standards

L'activité de piégeage du radical DPPH des extraits phénoliques des margines est mesurée et comparée au BHT (IC₅₀=139.9 mg/l), à l'acide ascorbique (IC₅₀=116.24 mg/l) et à l'α-tocophérol (IC₅₀=199.83 mg/l). L'extrait 1 (IC₅₀=123.83 mg/l) montre un potentiel antioxydant plus élevé que celui du BHT mais plus faible que celui de l'acide ascorbique.

L'extrait 2 montre la plus forte activité antioxydante et, il est plus efficace avec une valeur d'IC₅₀ de 104.13 mg/l, mais pour une concentration de 200 ppm, l'activité du piégeage des radicaux des deux extraits phénoliques 1 et 2 sont très proches soit 71.3 et 73.23 mg/l.

Le tableau 22 montre que les extraits phénoliques des margines extraits à l'acétate d'éthyle après acidification, sont des excellents antioxydants naturels. Ils possèdent une capacité puissante de neutralisation du radical libre stable DPPH, puisqu'ils agissent à des doses comparables à celles des antioxydants de références (BHT, acide ascorbique, α-tocophérol). Ils sont plus puissants que le BHT et l'α-tocophérol.

L'abaissement de la valeur IC₅₀, indique une activité de piégeage des radicaux libres élevée. Ces derniers sont impliqués dans le processus de la peroxydation lipidique et jouent un rôle majeure dans de nombreuses pathologies chroniques, tels que le cancer et les maladies cardiovasculaires, et sont impliqués dans le processus de vieillissement (Kosar et al., 2003).

$$PAR = (1/IC_{50}) \times 100$$

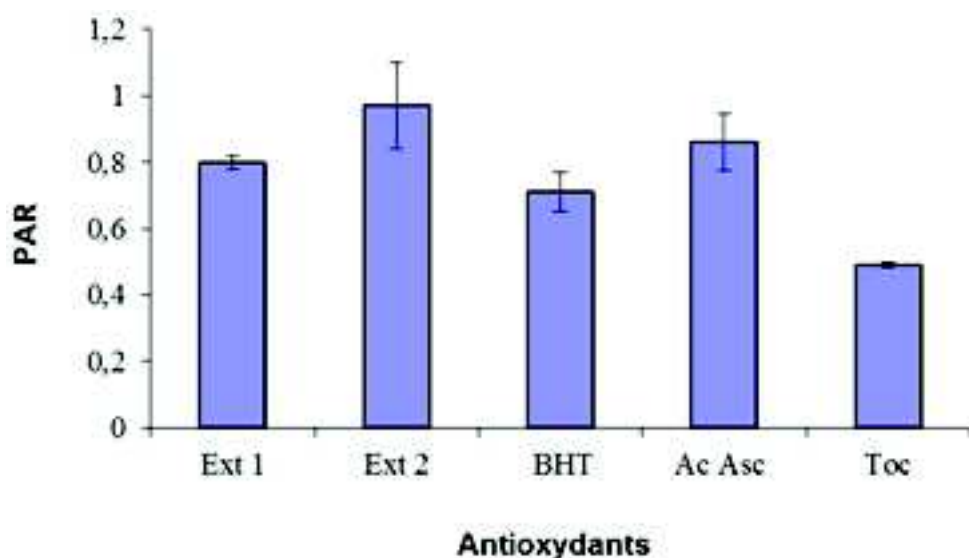


Figure 23. Pouvoir antiradicalaire des extraits naturels, du BHT et des standards

Les valeurs du PAR des extraits phénoliques des margines et des références sont très hautement significativement différentes ($p=0.000$) (Tableau 22).

L'analyse statistique indique que les PAR de l'extrait 1 et de l'extrait 2, et de l'extrait 1 et du BHT ne sont pas significativement différents ($p= 0.093$; $p= 0.089$), alors que les PAR de l'extrait 2 et du BHT sont significativement différents ($p= 0.038$).

Il n'y a pas une différence significative entre l'extrait 1 et l'extrait 2 et entre l'extrait 1 et le BHT concernant l'effet antiradicalaire vis-à-vis du DPPH, alors que l'extrait 2 présente un pouvoir antiradicalaire plus important que celui du BHT.

Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente (Mohammedi, 2006).

D'après les figures 22 et 23, et en comparant les résultats obtenus des extraits phénoliques avec ceux des standards, le pouvoir antiradicalaire des antioxydants testés suit l'enchaînement suivant:

$$\text{Ext 2} > \text{Ac Asc} > \text{Ext 1} > \text{BHT} > \alpha\text{-Toc}$$

Dans ce cas, on peut dire que les extraits phénoliques des margines présentent une activité antioxydante, et que la faculté de piéger le radical libre DPPH est puissante en comparaison avec les antioxydants de référence.

La puissance antiradicalaires des extraits phénoliques peut être expliquée par la teneur en phénols simples, en acides phénoliques et en particulier les *o*-diphénols (hydroxytyrosol, acide 3,4-dihydroxyphényl acétique, l'acide caféique...etc.).

Bouaziz et *al.* (2008a), ont montré que l' IC_{50} de l'extrait phénolique des feuilles de l'olivier hydrolysées (acide) ($IC_{50}= 0.65$ mg/l) est due à sa teneur élevée en hydroxytyrosol ($IC_{50}= 0.58$ mg/l) qui est plus importante que celle de l'oleuropéine ($IC_{50}= 1.19$ mg/l).

Les valeurs d' IC_{50} des deux extraits suggèrent qu'ils contiennent des concentrations en hydroxytyrosol qui résultent de l'hydrolyse de l'oleuropéine.

Les études menées par de nombreux auteurs, en particulier celles réalisées par Bouaziz et *al.* (2008a) ont montré que les hydrolysats des feuilles de l'olivier riches en composés phénoliques, notamment l'hydroxytyrosol, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'acide caféique, sont dotés d'un bon pouvoir antiradicalaire. Ces composants aromatiques *ortho*-dihydroxylés exercent une forte activité de piégeage de DPPH, Cependant, le tyrosol et l'acide *p*-hydroxyphénylacétique qui possèdent uniquement une fonction hydroxyle (OH), ne montrent pas d'activité (Fki et *al.*, 2005a).

Ces derniers suggèrent que l'activité antioxydante de l'hydroxytyrosol et de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique aussi bien que l'acide caféique est élevée que celle du BHA et du BHT. Par conséquent, l'effet de piégeage des radicaux de l'extrait phénolique des margines qui est partiellement lié à leur teneur en composés cités précédemment est comparable à celui des antioxydants synthétiques BHA et BHT (Fki et *al.*, 2005a).

Selon Bouaziz et *al.* (2008b), l'hydroxytyrosol exerce une forte activité antioxydante, plus importante que celle du BHT. Cependant, l'extrait phénolique à l'acétate d'éthyle des margines issues du processus de désamérisation des olives de table, est aussi efficace et montre une activité antioxydante comparable que celle du BHT. Ces mêmes auteurs suggèrent que la structure *ortho*-diphénolique de l'hydroxytyrosol est particulièrement cruciale pour son activité antioxydante.

L'hydroxytyrosol, résulte de l'hydrolyse de l'oleuropéine, qui est le composé phénolique majeure dans le fruit de l'olive fraîche. L'oleuropéine est responsable du goût amer des fruits d'olivier et, pour devenir comestible, les fruits auront besoin de perdre, au moins partiellement, leur amertume naturelle qui est immédiatement hydrolysée par la forte alcalinité des margines. En conséquence, l'oleuropéine ne peut pas être trouvé dans les margines de l'extraction des fruits (Bouaziz et *al.*, 2008b).

Selon l'étude menée par De Marco et *al.* (2007), l'hydroxytyrosol est le plus efficace dans le piégeage des radicaux libres parmi les biophénols identifiés dans les margines. Ce composé présente des propriétés antioxydantes élevées, une activité de piégeage des radicaux libres et joue un rôle fondamental dans la prévention d'huile d'olive des dommages oxydatifs (Visioli et *al.*, 1999). La lutéoline-7-glucoside présente une faible activité de piégeage des radicaux libres que plusieurs autres flavonoïdes, tels que la quercétine et la lutéoline, et les phénols simples.

Cité par De Marco et *al.* (2007), Bouaziz et *al.* (2005) ont mesuré la capacité du piégeage des radicaux libres des flavonoïdes purs et des phénols simples, et ont remarqué une forte activité d'hydroxytyrosol, suivi par l'acide caféique et la quercétine, qui montrent un pouvoir antioxydant comparable à celui du BHT, composé synthétique utilisé comme antioxydant dans de nombreux aliments.

L'hydrolyse acide favorise la dégradation de l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol étant le principal produit. L'hydrolysats d'extrait des feuilles de l'olivier contient une quantité relativement élevée d'hydroxytyrosol et est aussi plus efficace que l'hydroxytyrosol pur et le BHT comme piègeurs des radicaux libres (Bouaziz et Sayadi, 2005) cité par Conde et *al.* (2008). Une action synergique entre les flavonoïdes, les oleuropéosides et les phénols présents dans l'extrait des feuilles d'olivier est signalée (Benavente-Garcia et *al.*, 2000) cité par Conde et *al.* (2008). Les standards biophénoliques examinés dans l'étude réalisée par Obied et *al.* (2008), montrent qu'ils sont des piègeurs très efficaces du radical DPPH, comparés aux fractions phénoliques extraites à partir des effluents d'une variété d'olive, et leur activité (standards) suit l'ordre suivant: acide caféique > hydroxytyrosol > oleuropéine.

Les extraits phénoliques à l'acétate d'éthyle montrent un potentiel sur l'élimination des radicaux DPPH comparable à celui des antioxydants synthétiques. Néanmoins, les extraits des feuilles obtenus avec des solutions alcooliques aqueuses montrent un effet élevé de piégeage des radicaux libres (Bouaziz et Sayadi., 2005; Marwah et al., 2007) cité par Condes et al. (2008), probablement en raison d'une plus grande concentration d'oleuropéine et d'hydroxytyrosol dans ces extraits.

L'activité de piégeage du radical DPPH peut être expliquée par la présence des concentrations élevées en composés phénoliques (hydroxytyrosol, acides caféique, ...), et de l'existence d'une corrélation entre la teneur en phénols totaux, et l'activité antioxydante de certains aliments d'origine végétale. Les polyphénols naturels sont capables d'éliminer les radicaux libres, chélater les catalyseurs métalliques, activer les enzymes antioxydantes, de réduire les radicaux α -tocophérols et d'inhiber les oxydases (Oboh, 2006).

Le principal mécanisme d'action des antioxydants (AH) phénoliques est le piégeage des radicaux libres, bien que d'autres mécanismes puissent être impliqués. Cette activité des composés phénoliques dépend des caractéristiques structurelles qui favorisent la donation de l'hydrogène phénolique, et la stabilité des radicaux phénoxyls résultants (A^\cdot) (Nenadis et al., 2003).

Les études de relation structure-activité ont souligné l'importance de groupement catéchol sur le cycle B (B-ring), à l'efficacité des dérivés de l'acide *p*-hydroxycinnamique à piéger les radicaux libres (Nenadis et al., 2003; Ku et Mun, 2008). Toutefois, la contribution de la chaîne latérale en ce qui concerne des propriétés antiradicalaires reste controversée. Ce n'est que lorsqu'au moins un second groupe phénol est attaché à cette chaîne que sa contribution devienne significative (Nenadis et al., 2003). Le mécanisme complexe de la réaction des *ortho*-diphénols peut être attribué à la capacité de diphénol de se régénérer grâce à l'interaction de deux radicaux phénoxyls ou à des réactions de polymérisation qui peuvent avoir lieu, conduisant à la reproduction des groupements hydroxyles qui augmentent l'activité du piégeage des radicaux libres (Nenadis et al., 2003).

L'hydroxylation de noyau aromatique exerce une influence fondamentale sur le pouvoir antioxydant. La présence de deux groupements hydroxyles en position *ortho* (tels que l'hydroxytyrosol et l'acide caféique) confère une activité antioxydante élevée, alors que les composés phénoliques avec un seul groupement hydroxyle tels que le tyrosol, l'acide *p*-coumarique et l'acide *p*-hydroxyphénylacétique, montrent une faible activité antioxydante (Fki et al., 2005a).

Parmi les flavonoïdes, une activité antioxydante élevée est montrée par deux *o*-diphénols (la quercétine et la lutéoline), tandis qu'elle est faible par le composé monohydroxylé (apigénine), ainsi confirmant l'importance de groupement *ortho* hydroxyle.

L'environnement de la réaction est supposé affecter le transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant vers le radical libre. Le solvant utilisé semble avoir un effet sur l'aptitude des antioxydants phénoliques sur le piégeage de radical DPPH. Nenadis et Tsimidou (2002) ont montré que la période de la réaction (DPPH) et la concentration relative de l'antioxydant, jouent un rôle important sur l'aptitude des antioxydants phénoliques à piéger le radical DPPH.

Cette méthode qui est considérée comme étant très rapide, simple à mettre en œuvre, très sensible, très reproductible et ne nécessitant pas de matériels spécifiques, ne peut pas être utilisée pour évaluer de manière objective le pouvoir antioxydant de certaines huiles et extraits (Koleva et al., 2002) cité par Chikhouné (2007).

1.2.2. Mesure du pouvoir réducteur

Nous avons étudié la transformation de Fe^{3+} - Fe^{2+} en présence des extraits phénoliques des margines en utilisant la méthode d'Oyaizu (1986). L'aptitude à réduire le Fe (III) en Fe (II) est utilisée comme mesure de la capacité réductrice des extraits phénoliques et des antioxydants de référence. Cette capacité sert comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits phénoliques étudiés et des antioxydants de référence BHT, acide ascorbique, l' α -tocophérol exprimé par l'absorbance à 700 nm sont résumés dans le tableau 23 et la figure 24

Tableau 23. Test du pouvoir réducteur des extraits phénoliques et des antioxydants de synthèse

Absorbances ^a à 700 nm					
Concentration ppm AH	25	50	100	150	200
Ext 1	0.293 ± 0.011	0.469 ± 0.019	0.805 ± 0.116	1.334 ± 0.096	1.697 ± 0.054
Ext 2	0.295 ± 0.053	0.63 ± 0.096	1.111 ± 0.02	1.570 ± 0.012	1.844 ± 0.05
BHT	0.258 ± 0.014	0.432 ± 0.01	0.767 ± 0.034	0.994 ± 0.021	1.078 ± 0.011
Ac Asc	0.415 ± 0.032	0.775 ± 0.017	1.299 ± 0.025	1.374 ± 0.016	1.504 ± 0.043
DL- α -Toc	0.352 ± 0.037	0.477 ± 0.057	0.488 ± 0.018	0.527 ± 0.033	0.663 ± 0.059

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

Ext 1: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé industriel; Ext 2: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé traditionnel; BHT: Butylhydroxytoluène; Ac Asc: acide ascorbique; DL- α -Toc: DL- α -tocophérol; AH: antioxydants.

Une forte absorbance à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé (Oboh, 2006).

La valeur maximale est significativement enregistrée chez l'extrait phénolique 2 (1.844) où son pouvoir réducteur a dépassé celui de l'extrait 1 (1.697) et de l'acide ascorbique (1.504) et la plus faible valeur est signalée chez l' α -tocophérol (0.663). Les extraits phénoliques des margines étudiées enregistrent un pouvoir réducteur plus important où il a largement dépassé celui du BHT (1.078) et de l' α -tocophérol pour la concentration 200 ppm.

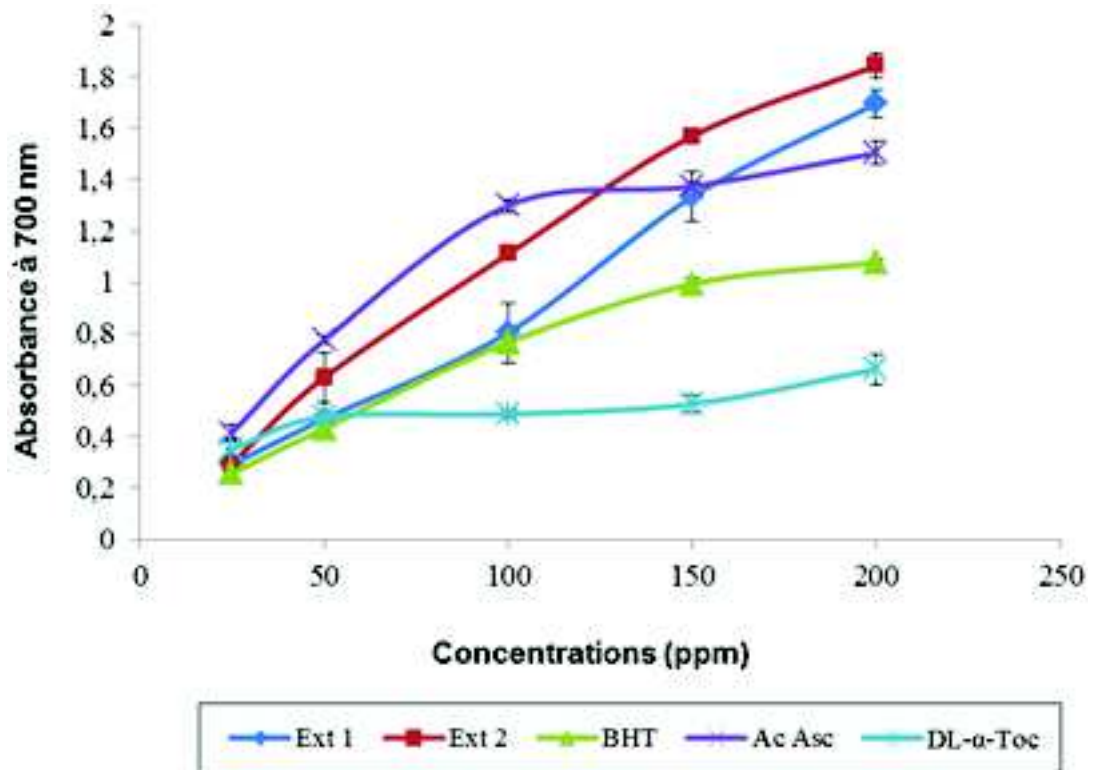


Figure 24. Pouvoir réducteur des extraits phénoliques et des standards: l'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur

L'analyse statistique révèle que les pentes des cinq régressions linéaires (Figure 24) sont significativement différentes ($p < 0.0001$).

L'activité réductrice augmente significativement avec la concentration des extraits phénoliques ($p < 0.0001$) et des antioxydants synthétiques ($p < 0.0001$ pour le BHT et l'AcAsc; $p = 0.005$ pour l' α -Toc). Cité par Turkmen et al. (2007), Satoh et al. (2005) ont observé une forte corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux des différents extraits de thé.

A des concentrations de 25, 50 et 100 mg/l, l'extrait 1 et le BHT suivent la même allure (Figure 24), au-delà de 100 mg/l, l'extrait 1 montre un pouvoir réducteur largement significatif ($p < 0.05$) et plus prononcé que celui du BHT. Ce résultat est comparable à celui trouvé pour l'essai de piégeage de DPPH où à partir de la concentration 100 mg/l, l'extrait 1 présente une activité antioxydante plus élevée que celle du BHT.

A partir de 100 mg/l, l'absorbance augmente faiblement pour l'acide ascorbique et le BHT, alors qu'elle augmente fortement pour les deux extraits phénoliques. L' α -tocophérol, enregistre le plus faible pouvoir réducteur.

Pour la concentration 150 mg/l, l'extrait 1 et l'acide ascorbique présentent la même absorbance, et par conséquent un pouvoir réducteur similaire, où les deux droites se croisent à une absorbance de 1.3.

Les composés phénoliques présents dans les deux extraits de margines, sont des bons donneurs d'électron et peuvent terminer la réaction de la chaîne radicalaire par la conversion des radicaux libres en produits plus stables.

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

Le pouvoir réducteur du fer, Fe (III) en Fe (II) des antioxydants a été déterminé par la mesure des concentrations correspondantes à 0.5 d'absorbance (Tableau 24).

Tableau 24. EC₅₀ des extraits naturels, du BHT et des standards

AH	EC ₅₀ ^a
Extrait 1	53.71 ± 4.79
Extrait 2	38.48 ± 4.74
BHT	62.25 ± 2.62
Ac Asc	8.67 ± 6.72
DL-α-Toc	99.75 ± 19.25

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

Ext 1: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé industriel; Ext 2: extrait phénolique à partir des margines issues du procédé traditionnel; BHT: Butylhydroxytoluène; Ac Asc: acide ascorbique; DL-α-Toc: DL-α-tocophérol; AH: antioxydants. EC₅₀: Concentrations correspondantes à 0.5 d'absorbance.

Les EC₅₀ de l'extrait 1 et de l'extrait 2 sont significativement différentes ($p = 0.04$). $P = 0.042$ pour l'extrait 1- BHT et $p = 0.002$ pour l'extrait 2- BHT. Ceci indique que les deux extraits phénoliques possèdent un pouvoir réducteur plus important que celui du BHT.

Le pouvoir réducteur des extraits phénoliques et des standards suit l'ordre suivant:

Ac Asc > Ext 2 > Ext 1 > BHT > DL-α-Toc

L'activité antioxydante significativement élevée des extraits phénoliques ($p < 0.0001$), comparée à celle des antioxydants de synthèse le BHT et l'α-tocophérol peut être due:

- i- A la teneur en composés phénoliques totaux et en *o*-diphénols.
- ii- A la diversité des caractéristiques structurales des antioxydants phénoliques potentiels présents dans les extraits.
- iii- Au synergisme des composés phénoliques l'un avec l'autre et/ou avec d'autres composés présents dans chaque extrait.
- iv- Aux différents comportements cinétiques des antioxydants potentiels comme indiqué par Brand-Williams et *al.* (1995) et Amarowicz et *al.* (2000).

Cité par Chikhoun (2007), Shimada et *al.* (1992) expliquent le pouvoir réducteur par une réaction de substitution de groupements mono et dihydroxyles à l'intérieur du noyau aromatique qui possèdent une bonne habilité donatrice des groupements hydrogènes.

Cité par Oboh (2006), Allhorn et *al.* (2005) ont récemment indiqué que les propriétés réductrices peuvent être un nouveau mécanisme de défense antioxydant, grâce à la capacité des composés antioxydants à réduire les métaux de transition. Les métaux réduits tels que Fe (II) ou Cu (I) réagissent rapidement avec les hydroperoxydes lipidiques conduisant à la formation des radicaux lipidiques réactifs et la conversion des métaux réduits en leur forme oxydée (Oboh, 2006). Les phénols qui réagissent avec Fe³⁺ donnent lieu à Fe²⁺, qui est plus pro-oxydant que le premier (Nenadis et *al.*, 2003).

Cité par Chikhouné (2007), selon Pin-Der-Duh (1998), l'expression de l'activité antioxydante va de soit avec le développement de groupements *réductones*. Ces derniers sont connus comme étant des *terminators* vis-à-vis des réactions en chaînes des radicaux libres.

Ces composés sont capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}), céder des électrons et transformer les radicaux libres actifs en des produits stables (Dorman et al., 2004; Singh et al., 2006) cité par Chikhouné (2007).

Il a été noté que la liaison du fer aux composés phénoliques du thé dépend de leur structure moléculaire. Par exemple un grand nombre de groupements OH améliorent l'efficacité de la fixation du fer (Turkmen et al., 2007).

Les deux extraits phénoliques des margines présentent une activité antioxydante comparable à celle du BHT et des autres standards.

Sousa et al. (2008) ont montré que les extraits phénoliques des olives dénoyautées présentent un pouvoir réducteur plus élevé que celui du BHA et l' α -tocophérol.

La forte interférence couleur du complexe biophénols/Fe (II) décourage l'utilisation de ce test pour déterminer les propriétés chélateurs des biophénols (Turkmen et al., 2007).

Généralement, l'activité antioxydante est affectée par plusieurs facteurs (Pokorny, 2007) (Tableau 25)

Tableau 25. Facteurs affectant l'activité antioxydante

Facteurs dépendants de l'antioxydant	Facteurs dépendants de l'aliment à stabiliser	Facteurs dépendants des conditions de stockage ou de chauffage
Structure chimique Potentiel rédox Polarité Solubilité	Distribution dans la phase lipidique et aqueuse Présence de pro-oxydants Présence d'autres antioxydants Présence de synergistes	Température de stockage Temps de stockage Température de chauffage Temps de chauffage Accès à l'oxygène

I.3. Profil phénolique par HPLC

L'identification des composés phénoliques dans les extraits de margines est déterminée par HPLC-UV, en comparaison des temps de rétention relatifs et les spectres UV avec ceux des solutions standards.

L'effet de l'acidification des margines sur l'extraction des biophénols est testé. Les extraits de margines fraîches et acidifiées sont qualitativement et quantitativement comparés. Dans la figure 25, les chromatogrammes des extraits à l'acétate d'éthyle à partir des margines fraîches et acides (pH 2 avec l'HCl) sont montrés.

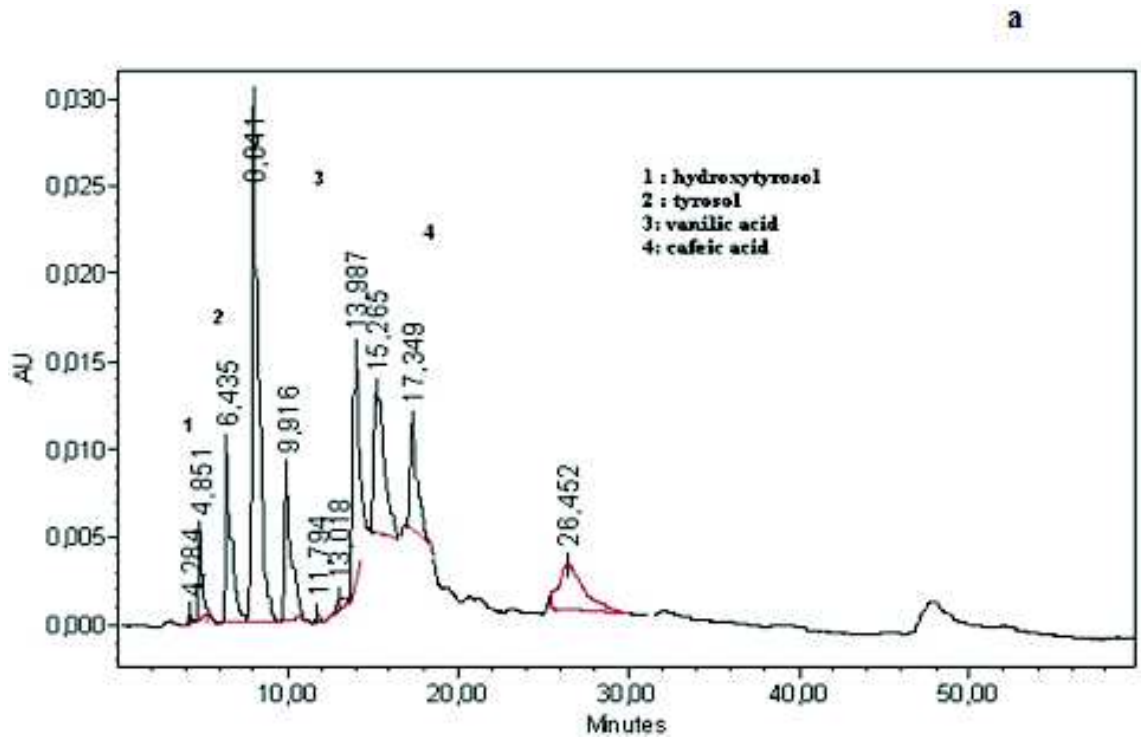
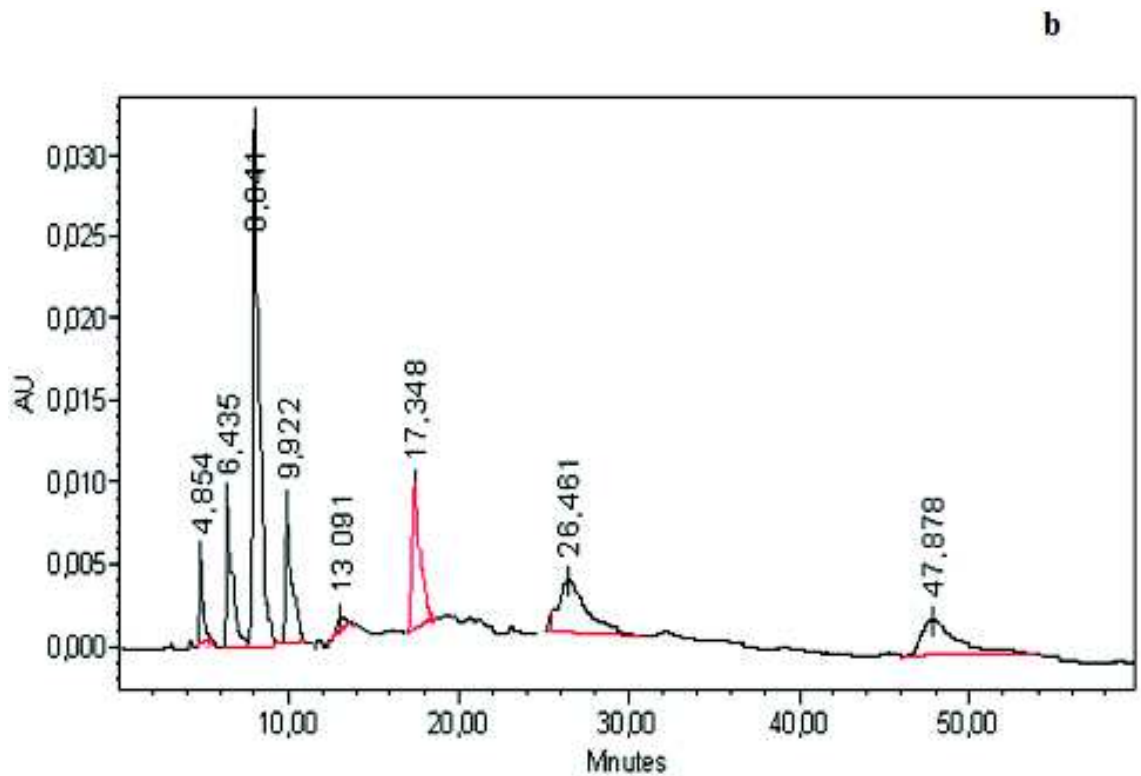


Figure 25. Profils chromatographiques des extraits phénoliques des margines fraîches (a) et acidifiées (b) issues du procédé industriel d'extraction, en utilisant le gradient d'éluion. Les pics correspondants à 1- Hydroxytyrosol, 2- Tyrosol, 3- acide vanillique, 4-acide caféique, mesurés à 280 nm



Un chromatogramme représentatif de l'extrait phénolique de margine est reporté dans la figure (25b). Le profil phénolique montre plusieurs pics correspondant aux différents biophénols, parmi lesquels quatre composés sont identifiés: les acides phénoliques; un acide hydroxycinnamique (acide caféique), un acide hydroxybenzoïque (acide vanillique), les alcools phénoliques (hydroxytyrosol, tyrosol). Les dérivés sécoiridoïdes et les flavonoïdes n'ont pas été identifiés en raison de l'absence de standards.

L'analyse chromatographique par HPLC, révèle que l'extrait phénolique (1) des margines issues du procédé industriel d'extraction, et utilisé comme additif naturel dans les trois huiles alimentaires choisies, indique qu'il est constitué de deux *o*-diphénols: hydroxytyrosol et l'acide caféique et d'autres composés phénoliques tels que le tyrosol et l'acide vanillique.

La concentration des composés phénoliques dans l'extrait est calculée (les valeurs obtenues pour les principaux composés phénoliques dans l'extrait à partir des margines fraîche et acide sont représentées dans le tableau 26)

Tableau 26. Evaluation des composés phénoliques majeures identifiés dans l'extrait de margine (1) acidifiée et non acidifiée

	Les monomères phénoliques	Extrait de margine fraîche (a)			Extrait de margine acide (b)		
		Temps de rétention (min)	Aire %	Concentration (mg/l)	Temps de rétention (min)	Aire %	Concentration (mg/l)
1	Hydroxytyrosol	4.851	2.90	23.2	4.854	3.66	29.28
2	Tyrosol	6.435	8.08	64.64	6.435	8.72	69.76
3	Acide Vanillique	13.018	0.77	6.16	13.090	0.86	6.88
4	Acide caféique	17.349	8.73	69.84	17.347	12.18	97.44
	Total	-	20.48	163.84	-	25.42	203.36
	<i>Ortho</i> -diphénols	-	11.63	93.04	-	15.84	126.72

Un litre de margine acide contient 0.8 g d'extrait phénolique renfermant 29.28 mg/l d'hydroxytyrosol, 69.76 mg/l de tyrosol, 97.44 mg/l d'acide caféique et 6.88 mg/l d'acide vanillique. Ce dernier est présent en faible concentration.

Nos résultats montrent que l'acide caféique est le principal composé biophénolique présent dans les deux extraits des margines (fraîche et acide) et ils suivent l'ordre croissant selon leur concentration suivant:

Acide caféique > Tyrosol > Hydroxytyrosol > Acide vanillique.

Les seuls antioxydants *ortho*-diphénoliques identifiés par l'analyse chromatographique sont l'acide caféique et l'hydroxytyrosol.

La teneur en hydroxytyrosol est dans l'intervalle de 23.2-29.28 mg/l d'extrait de margine. Cet important composé antioxydant vient principalement de l'hydrolyse de verbascoside, ester caféique présent dans les fruits, et de la dégradation de l'oleuropéine tant au cours de la maturation des fruits et la transformation et le stockage de l'huile (Romani et al., 2001).

Les margines acides révèlent des concentrations plus élevées en hydroxytyrosol, acide caféique, tyrosol ainsi qu'en acide vanillique par rapport à la margine fraîche.

Nos résultats sont en accord et en désaccord avec d'autres résultats trouvés par plusieurs chercheurs:

La concentration d'hydroxytyrosol (29.28 mg/l) est faible par rapport à celle trouvée par Fki et *al.* (2005a) et De Marco et *al.* (2007) qui enregistrent des valeurs de 1225 mg/l et 1224 mg/l respectivement, alors que la valeur 23.2 mg/l d'hydroxytyrosol identifiée dans la margine fraîche est un peu plus importante à celle rapportée (20 mg/l) par ces derniers.

L'acide caféique enregistre des valeurs (69.84, 97.44 mg/l) plus faibles que celle trouvée par Fki et *al.* (2005a) (256.7 mg/l) et plus proches que celles montrées par De Marco et *al.* (2007) (72, 97 mg/l) dans les margines fraîche et acide respectivement. Les concentrations d'acide vanillique (6.16, 6.88 mg/l) sont plus faibles que celles signalées par ces derniers (198, 174 mg/l).

Les taux de tyrosol (64.64, 69.76 mg/l) sont plus faibles que ceux (145 et 208 mg/l) révélés par De Marco et *al.* (2007) dans les margines fraîche et acide.

L'analyse du profil phénolique de l'extrait de margine acidifiée à pH 2 par Fki et *al.* (2005a) a révélé les composants suivants déterminés par ordre croissant:

Hydroxytyrosol> Tyrosol> acide caféique> acide *p*-hydroxyphénylacétique> acide *p*-coumarique> acide férulique> acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. L'hydroxytyrosol est le principal composé biophénolique des margines.

Selon De Marco et *al.* (2007), les composés phénoliques les plus abondants présents dans les extraits de margines est l'hydroxytyrosol, qui est formé de l'hydrolyse de l'oleuropéine durant l'extraction d'huile et l'hydrolyse acide des dérivés sécoiridoïdes causée par l'addition de l'HCl aux margines. Ces biophénols présentent une activité antioxydante, cardio-protective, anti-athérogénique (Visioli et *al.*, 1999), chimio-protective, antimicrobienne et anti-inflammatoire.

Les extraits biophénoliques à l'acétate d'éthyle des margines sont constitués non seulement d'hydroxytyrosol, mais aussi d'autres composés à des teneurs moins importantes: tyrosol, acide caféique, acide vanillique, verbascoside, la forme dialdéhydrique de décarboxyméthyloléuropéine aglycone(OHTy-DEDA), ligstroside, lutéolin, lutéolin-7-glucoside (De Marco et *al.*, 2007). Ce dernier composé n'existe pas dans les margines fraîches, et il apparaît dans les margines acidifiées comme un produit d'hydrolyse provoqué par l'HCl sur les polyphénols.

Le verbascoside est un complexe biophénolique caractérisé par des propriétés bénéfiques pour la santé (Liu et *al.*, 2003). Les petites quantités des flavonoïdes révélées (lutéoline et lutéoline-7-glucoside) représentent le groupe des substances naturelles possédant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales, et anti-carcinogéniques (Pietta, 2000) cité par De Marco et *al.* (2007).

Les biophénols identifiés et quantifiés dans nos extraits phénoliques (le tyrosol, l'acide caféique, l'acide vanillique) ont fait preuve d'une activité antioxydante, anti-athérogénique, et anti-inflammatoire (De La Puerta et *al.*, 1999; Giovannini et *al.*, 1999).

Parmi les sécoiridoïdes identifiés par De Marco et *al.* (2007), la forme dialdéhydrique de décarboxyméthyloléuropéine aglycone (OHTy-DEDA) et le ligstroside. Le premier composé dérive de l'hydrolyse et de la décarboxylation successive de l'oleuropéine, l'un des deux biophénols majeurs de l'olive (ensemble avec le ligstroside), et à son tour subit une hydrolyse acide avec libération des monomères, tels que l'hydroxytyrosol et l'acide élénolique.

Les eaux de lavage issues de la centrifugation verticale de système d'extraction à deux phases ont été analysées par HPLC par Garcia et *al.* (2001). Le profil phénolique a montré les composants suivants:

Hydroxytyrosol, tyrosol, acide vanillique, vanilline, 4-(acetoxyethyl)-1,2-dihydroxybenzene, acide *p*-coumarique, la forme dialdéhydrique de l'acide élénolique lié à l'hydroxytyrosol, la forme dialdéhydrique de l'acide élénolique lié au tyrosol, 1-acetoxypinoresinol, pinoresinol, isomères de l'oleuropéine aglycone.

D'après Garcia et *al.*, (2001), l'hydroxytyrosol, le tyrosol, la forme dialdéhydrique de l'acide élénolique lié à l'hydroxytyrosol sont les phénols les plus représentatifs dans ces eaux.

La comparaison de la charge phénolique des margines met en évidence des différences quantitative et qualitative importantes en fonction notamment des procédures d'extraction, la variété des olives, et le degré de maturité des olives aussi bien que le stade physiologique (Hanafi et El Hadrami, 2009).

L'analyse chromatographique par HPLC (à 280, 320, 350 nm) des composés phénoliques des échantillons de margines du Maroc, Italie, Tunisie, et l'Espagne (Hanafi et El Hadrami, 2009) révèle la complexité et la variabilité des composés phénoliques d'une margine à une autre, d'un pays à un autre selon les résultats suivants:

a- Margine marocaine est composée de tyrosol, catéchol, dérivés de l'oleuropéine (280 nm); acide caféique, acide *p*-coumarique (320 nm); dérivés de lutéoline et des flavonoïdes (350 nm).

b- Margine tunisienne est composée de tyrosol, dérivés de l'acide protocatéchique, dérivés de l'oleuropéine (280 nm); acide *p*-coumarique, acide férulique (320 nm); dérivés de lutéoline et des flavonoïdes (350 nm).

c- Margine italienne est composée de tyrosol, dérivés de l'acide protocatéchique, dérivés de tyrosol et des flavanols (280 nm); acide *p*-coumarique (320 nm).

d- Margine espagnole est composée de acide hydroxybenzoïque, dérivés de l'oleuropéine (280 nm); acide *p*-coumarique (320 nm); dérivés de lutéoline et des flavonoïdes (350 nm).

De nombreux autres composés phénoliques ont été trouvés dans les extraits phénoliques, mais pas tous identifiés, en raison de la nature complexe de la fraction phénolique des margines, qui n'a pas été complètement élucidée. Cette complexité est due au nombre élevé de facteurs qui influent sur l'apparition des biophénols spécifiques dans ces effluents, tels que le cultivar d'olive, degré de maturation des fruits, les conditions climatiques et agronomiques, les conditions de stockage avant l'extraction, traitement technique (Lesage-Meessen et *al.*, 2001; Obied et *al.*, 2005a).

Les résultats de l'activité antioxydante inexplicée peuvent être attribués à la présence des biophénols non identifiés caractérisés par une forte activité antioxydante ou à l'effet synergétique entre les composés phénoliques.

En plus des composés phénoliques cités précédemment, identifiés et non dans notre étude, parmi les composés phénoliques à forte activité antioxydante identifiés dans les effluents d'olive (semi-solide et eau de végétation) et en faible quantité dans l'huile vierge et les olives de table par Rodríguez et *al.* (2009); Bianchi et *al.* (1994), on peut citer le 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG). Ce dernier, prouvé être puissant et même plus puissant que l'hydroxytyrosol. C'est un simple phénol à structure similaire de l'hydroxytyrosol mais avec un groupement hydroxyle en plus. Son efficacité antioxydante dans l'eau est 2-3 fois plus élevée que celle de l'acide ascorbique ou l'hydroxytyrosol, tandis que dans un milieu lipidique elle est comparable à celle de la vitamine E (Rodríguez et *al.*, 2009).

Une étude plus approfondie est nécessaire pour mieux comprendre la composition phénolique des margines, en ce qui concerne en particulier les composés complexes, qui sont signalés d'être aglycones, glycosides ou autres dérivés des phénols simples (De Marco et al., 2007).

L'identification des composés inconnus est actuellement en progression par d'analyse complète de spectre MS et par comparaison des temps de rétention et les spectres UV avec ceux des standards.

1.3.1. Effet de l'acidification des margines sur le profil phénolique

L'acidification des margines favorise la libération des biophénols liés aux composants des membranes cellulaires et l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques; ces effets sont confirmés par la teneur élevée en phénols totaux déterminés (à l'aide de spectrophotomètre par la méthode Folin-Ciocalteu) par De Marco et al. (2007), qui sont de l'ordre de 2.5 g tyrosol/l margines dans l'extrait de margine acidifiée, contre 1.1 g tyrosol/l de margine dans l'extrait de margine fraîche. Ces chercheurs observent une augmentation de l'hydroxytyrosol, tyrosol, acide caféique et le verbascoside et une réduction de OHTy-DEDA dans l'extrait de margine acidifiée, ce qui est le résultat de l'hydrolyse acide du complexe des composés phénoliques avec la libération des monomères. Le ligstroside diminue en raison de l'hydrolyse acide.

Cité par yangui et al. (2009), Bilter et al. (2005) et Crea et Mateo (2008) ont aussi démontré que par l'addition de l'acide aux margines pour produire un pH entre 2 et 4, et l'incubation des margines pour une période de 6 à 12 mois, jusqu'à au moins 75-90 % de l'oleuropéine présents dans les margines ont été convertis en hydroxytyrosol.

L'étude du profil phénolique par HPLC réalisée par Yangui et al. (2009), montre l'effet d'hydrolyse des complexes phénoliques, tels que l'oleuropéine, en phénols simples tels que l'hydroxytyrosol, qui est observé par la réduction de la hauteur de pic correspondant à l'oleuropéine et l'amplification de pic de l'hydroxytyrosol, ainsi qu'une augmentation significative de la teneur en hydroxytyrosol, des phénols totaux, des flavonoïdes et flavonols.

1.4. Le choix de la margine (1) pour l'essai de la stabilité oxydative

L'extrait phénolique de la margine (1) issue du procédé de trituration industrielle a été choisi pour l'essai de la stabilité oxydative pour les raisons suivantes:

- La richesse de la margine (1) en polyphénols et en o-diphénols;
- La richesse de la margine (2) en lipides, qui empêchent ou réduisent le processus d'extraction des polyphénols;
- La valorisation des margines issues des unités de trituration industrielles en raison des quantités énormes générées par ces unités;
- La ressemblance de l'activité antioxydante de l'extrait phénolique de la margine industrielle avec l'antioxydant synthétique "BHT" choisi comme référence, notamment dans le cas de l'activité de piégeage du radical DPPH où la différence entre les PAR n'est pas significative ($p= 0.089$). Cette différence est aussi non significative ($p> 0.05$) entre l'extrait 1 et l'extrait 2 ($p= 0.093$).
- A 200 mg/l, les deux extraits phénoliques présentent des activités antioxydantes presque identiques (71.3, 73.23 %).

2^{ème} Chapitre: II. Valorisation de l'extrait phénolique

Le présent travail détermine l'effet de l'extrait phénolique sur l'oxydation des huiles de soja et de tournesol raffinées, et d'huile d'olive, à 200, 400 et 800 ppm. L'oxydation lipidique est évaluée par la mesure de l'indice de peroxyde (IP), et la formation des diènes (K_{232}) et des triènes conjugués (K_{270}). Les deux paramètres IP et K_{232} mesurent les produits primaires de l'oxydation lipidique.

II.1. Détermination de la stabilité oxydative

II.1.1. Indice de peroxyde (IP)

L'évolution de l'indice de peroxyde (IP) des huiles étudiées (HS, HT, HO) sera détaillée ci-dessous en fonction des facteurs temps et doses utilisées.

Les résultats de l'IP des trois huiles témoins (huile de soja, de tournesol et d'olive) au cours de 20 jours de stockage à 63°C sont représentés dans la figure suivante:

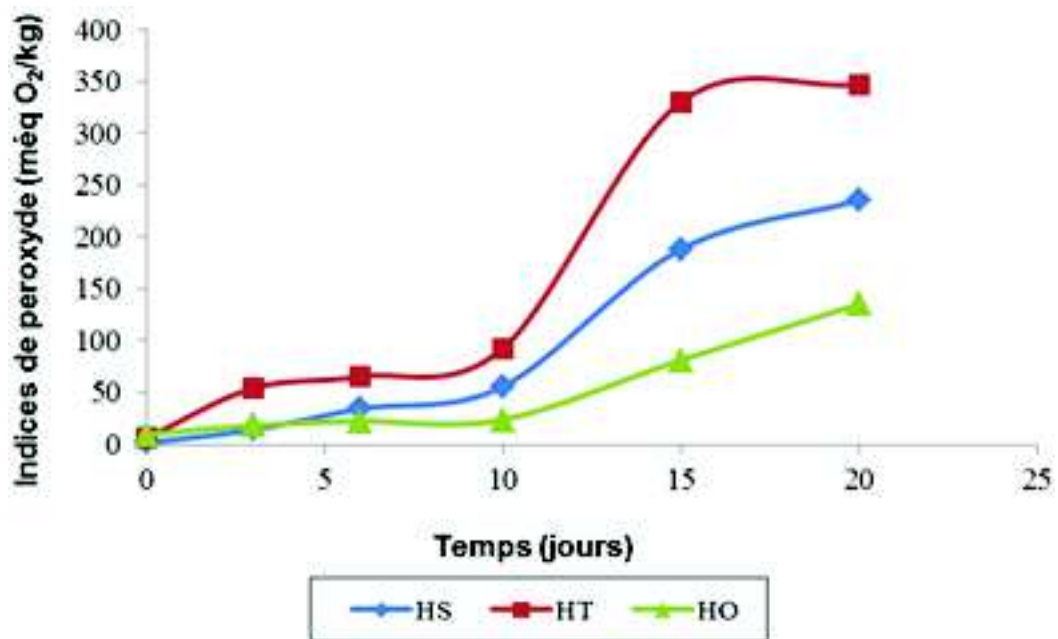


Figure 26. Comparaison des indices de peroxyde des huiles témoins étuvées à 63°C/20 jours

La figure 26 illustre l'évolution des IP des trois huiles témoins en fonction du temps. Ces huiles montrent une évolution de son IP durant toute la période de stockage à 63°C. L'analyse de la variance révèle une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre les IP des trois huiles témoins.

Au temps zéro, l'HO présente l'IP le plus élevé (9.8 mEqO₂/kg), en comparaison avec l'huile de soja et de tournesol qui présentent les IP initiaux 1.84 et 6.11 mEqO₂/kg respectivement.

Au 3^{ème} jour d'étuvage à 63°C, l'huile de soja présente l'IP le plus faible 14.17 méqO₂/kg, et il est plus élevé pour l'huile de tournesol 54.37 méqO₂/kg (9 fois par rapport à son IP initial). L'évolution de l'indice de peroxyde est très faible durant les 10 premiers jours de stockage notamment pour l'huile d'olive témoin (23.88 méqO₂/kg). A partir du dixième jour, l'IP évolue significativement avec le temps. Cette évolution s'exprime par une phase ascendante ayant une pente atténuée surtout pour l'HO et l'HS s'étalant sur les 10 premiers jours d'étuvage (phase d'induction), et une phase ascendante montrant une pente très accentuée, notamment pour l'huile de tournesol jusqu'au 15^{ème} jour (phase de propagation), puis augmente faiblement les 5 derniers jours (phase de terminaison). Ceci explique l'influence significative de la durée de stockage sur les résultats obtenus.

L'huile d'olive note une augmentation rapide de son IP les dix derniers jours de stockage à 63°C, mais d'une façon moins accentuée que l'HS où son IP croît de 128 fois de son IP initial.

L'huile de soja et de tournesol montrent une oxydation très rapide. Elles sont les plus susceptibles à la peroxydation lipidiques en raison de leur richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI) et au raffinage. Les chaînes grasses insaturées fixent l'oxygène et forment des peroxydes instables, qui évoluent spontanément en des produits d'oxydation, de dégradation et de polymérisation (Nassif, 2004).

L'oxydation rapide de l'huile de tournesol est aussi due à sa pauvreté en antioxydants naturels contrairement à l'huile d'olive. Parmi les composés naturels, les composés phénoliques, α -tocophérols et la β -carotène, jouent un rôle clé dans la prévention de l'oxydation.

Le raffinage de l'huile de soja et de tournesol favorise la détérioration des antioxydants naturellement présents, ce qui réduit leur stabilité.

Les propriétés biologiques de l'huile d'olive sont reliées à la présence des composés mineurs, tels que le squalène et les phytostérols, les composés antioxydants, tels que les tocophérols et particulièrement les phénols.

Cité par Nassif (2004), Gamel et Kiritsakis (1999) ont trouvé que l'augmentation de l'IP de l'huile d'olive était plus faible que celle de l'huile de tournesol après 12 jours d'étuvage à 63°C en raison de la richesse de l'huile d'olive en composés phénoliques antioxydants.

Les valeurs de l'IP des huiles étudiées en fonction de l'addition des composés phénoliques extraits à partir des margines et du BHT sont rapportées dans les tableaux 27, 28, 29 et figurées dans les figures 27, 28, 29.

La vitesse de formation des hydroperoxydes augmente rapidement au niveau de tous les échantillons après une période d'incubation de 3 jours à 63°C (Tableaux 27, 28, 29)

		Indice de peroxyde ^a (mégO ₂ /kg)					
Echantillons	Temps (jours)	0	3	6	10	15	20
	HS témoin (0 ppm)		1.84±0.16	14.17±0.3	34.52±0.2	55.93±0.3	188.30±0.2
HS + 200 ppm BHT		1.84±0.16	19.37±0.8	40.67±0.8	62.06±0.4	117.76±0.6	138.99±0.1
HS + 200 ppm EP		1.84±0.16	14.77±0.7	39.47±0.1	66.95±0.1	159.11±0.2	185.5±0.39
HS + 400 ppm EP		1.84±0.16	13.55±0.0	33.70±0.2	39.16±0.4	69.77±0.52	80.29±0.35
HS + 800 ppm EP		1.84±0.16	11.44±0.2	23.15±0.0	38.60±0.7	61.41±0.74	66.54±0.05

Tableau 27. Evolution de l'indice de peroxyde (mégO₂/kg) des échantillons de l'huile de soja en fonction de la durée de stockage

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HS: huile de soja; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

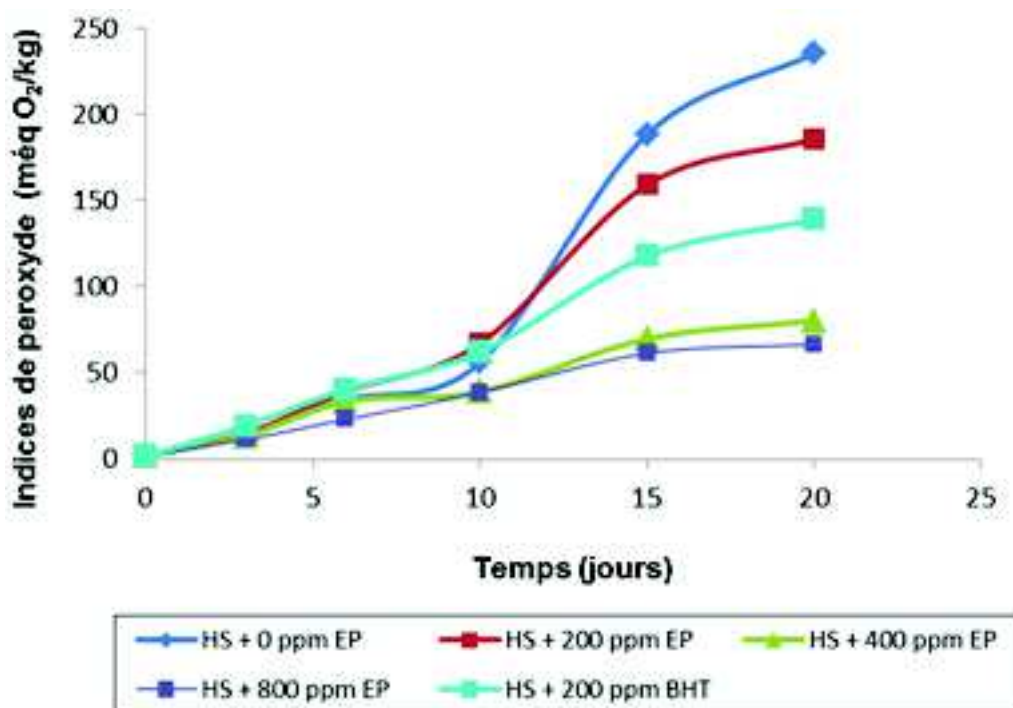


Figure 27. Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de soja au cours de stockage à 63°C

L'huile de soja sans additifs, présente l'indice de peroxyde le plus élevé. Son IP est de 1.84 méqO₂/kg avant d'être soumis à la température de l'étuve (63°C) et dans 20 jours, il atteint 235.35 méqO₂/kg. Une augmentation rapide et accentuée est constatée à la fin d'étuvage.

L'évolution de l'IP de l'huile de soja contenant les différentes doses d'antioxydants phénoliques naturels et du BHT suit presque le même rythme que celui du témoin durant les 10 premiers jours, et un rythme moins accentué que celui du témoin durant les dix derniers jours.

Les pentes des 5 régressions linéaires (Figure 27) sont significativement différentes ($p < 0.0001$).

L'analyse de la variance révèle une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre les IP de l'HS témoin et ceux de l'HS additionnée de 200 ppm BHT et les différentes doses d'EP. Ceci indique que toutes ces concentrations ont une activité antioxydante

Le BHT inhibe mieux la formation des hydroperoxydes que 200 ppm d'extrait phénolique, la différence entre les deux droites est hautement significative ($p < 0.0001$).

Le pouvoir antioxydant des différents additifs ajoutés à l'huile de soja varie selon l'ordre significatif suivant:

800 ppm EP > 400 ppm EP > 200 ppm BHT > 200 ppm EP

Les indices de peroxyde des essais additionnés 400 et 800 ppm d'extrait phénolique se superposent aux 10^{ème} et aux 15^{ème} jours de stockage, et ayant des IP quasiment similaires, et il apparaît qu'au 20^{ème} jour, l'addition de 800 ppm d'extrait phénolique induit un IP final plus bas (66.54 méqO₂/kg) que les autres ajouts, et l'huile de soja subit donc une augmentation de 36 fois son IP initial alors qu'il est d'environ 44 fois son IP initial pour l'essai additionné de 400 ppm EP. L'indice de peroxyde augmente de 75 fois l'IP initial pour l'essai 200 ppm BHT, et il est de 100 fois plus élevé pour l'essai à 200 ppm EP.

L'évolution de l'IP de l'huile de soja ayant reçu des teneurs croissantes en EP et une teneur de 200 ppm BHT (Figure 27) montre deux phases distinctes:

1) Une première phase ascendante ayant une pente atténuée s'étalant sur environ 10 jours d'étuvage;

2) Une deuxième phase ascendante montrant une pente beaucoup plus accentuée notamment pour l'HS additionnée de 200 ppm EP et de 200 ppm BHT.

Entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour de stockage à 63°C, les essais à 200 ppm BHT et à 200 ppm EP, montrent un effet prooxydant sur l'huile de soja où les IP montrent des valeurs remarquablement élevées par rapport à celles de l'huile témoin.

Une meilleure activité antioxydante est enregistrée avec l'extrait phénolique pour une concentration de 800 ppm (66.54 méqO₂/kg).

Les composés phénoliques peuvent se combiner avec les hydroperoxydes pour donner des composés plus stables facilement dégradables au cours du temps (Chikhoun, 2007).

		Indice de peroxyde ^a (mégO ₂ /kg)					
Echantillons	Temps (jours)	0	3	6	10	15	20
	HT témoin (0 ppm)		6.11±0.19	54.37±1.2	65.54±0.6	92.67±0.5	330.39±2.0
			3	4	5	7	2
HT + 200 ppm BHT		6.11±0.19	34.82±0.60	65.43±0.7	97.89±0.5	137.74±0.1	341.70±3.9
				9	0	7	5
HT + 200 ppm EP		6.11±0.19	37.59±0.3	66.25±0.3	97.13±0.8	139.33±0.6	147.30±0.2
			9	5	9	6	8
HT + 400 ppm EP		6.11±0.19	35.61±2.7	60.88±0.1	75.98±0.1	118.52±0.6	130.12±0.4
			5	9	6	7	5
HT + 800 ppm EP		6.11±0.19	33.91±0.9	50.12±0.5	78.45±2.4	106.7±0.16	121.44±1.3
			3	3	6		6

Tableau 28. Evolution de l'indice de peroxyde (mégO₂/kg) des échantillons de l'huile de tournesol en fonction de la durée de stockage

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HT: huile de tournesol; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

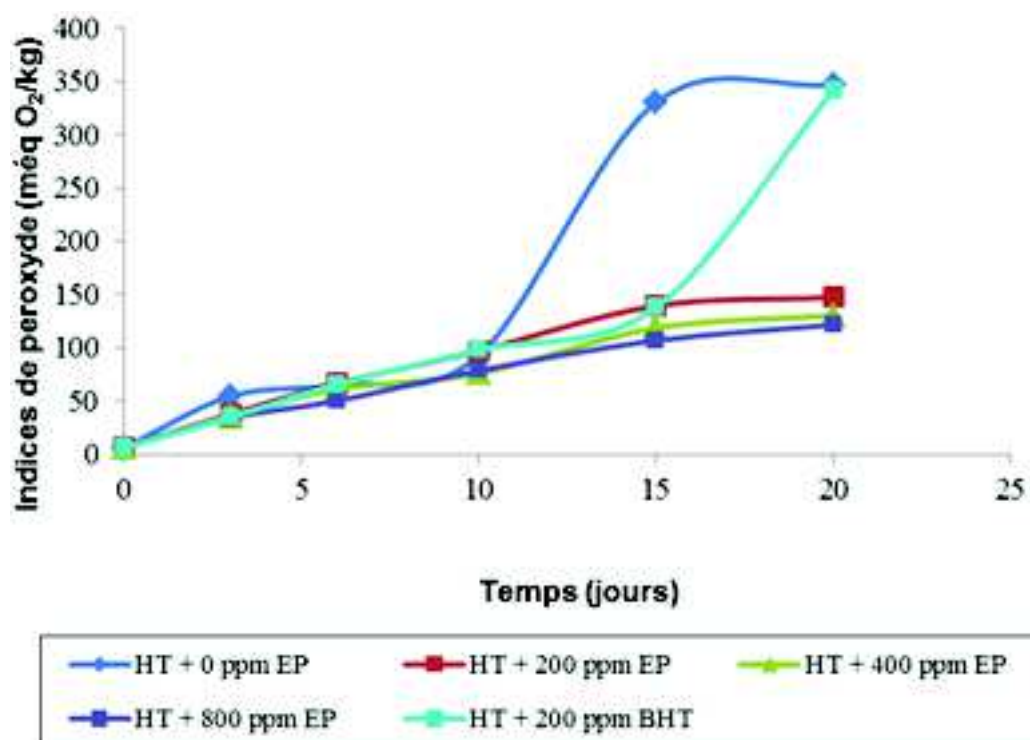


Figure 28. Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de tournesol au cours de stockage à 63°C

L'huile de tournesol témoin présente l'indice de peroxyde le plus élevé parmi les IP des huiles témoins étudiées. Son IP est le plus élevé par rapport aux IP des échantillons d'HT ayant subi l'addition d'antioxydants à différentes doses. Il est de 6.11 méqO₂/kg au temps zéro et est de 347.25 méqO₂/kg à la fin de l'étuvage. Une augmentation assez importante soit 57 fois environ son IP est atteinte à la fin d'étuvage à 63°C.

Au 3^{ème} jour d'étuvage, l'IP des échantillons d'HT contenant du BHT et les différentes doses d'EP sont similaires et plus faibles que celui du témoin.

Durant les six premiers jours de stockage, l'évolution de l'indice de peroxyde des échantillons d'huile de tournesol suit pratiquement la même allure. Au 10^{ème} jour, les IP sont presque similaires pour le témoin, HT additionnée de 200 ppm BHT et de 200 ppm EP (Tableau 28). Ces deux derniers montrent le même effet antioxydant et sont quasiment similaires.

A partir de 10^{ème} jour, l'IP d'HT contenant les différentes doses d'extrait phénolique naturel et du BHT, suit un rythme moins accentué que celui du témoin.

A partir de 15^{ème} jour d'étuvage, l'IP de l'huile contenant 200 ppm BHT augmente significativement et atteint 56 fois son IP initial à 20 jours et devient similaire (341.70 méqO₂/kg) et même confondu avec l'IP du témoin (347.25 méqO₂/kg).

Aux 6^{ème}, 10^{ème} et 15^{ème} jours de stockage, les indices de peroxyde des échantillons contenant 200 ppm EP, 200 ppm BHT sont relativement égaux.

Les IP des échantillons contenant 200 ppm de BHT, 200 et 400 ppm d'EP et du témoin sont égaux au 6^{ème} jour.

Une augmentation de l'IP de 24 fois est notée pour l'HT contenant 200 ppm EP, de 21 fois pour l'HT additionnée de 400 ppm d'EP et elle est de 20 fois pour l'HT additionnée de 800 ppm EP.

L'HT additionnée de 200 ppm EP et de 200 ppm BHT montre un effet prooxydant au 10^{ème} jour d'étuvage.

L'essai à 200 ppm EP protège mieux l'huile de tournesol contre l'oxydation que celui à 200 ppm BHT, et la différence entre les deux droites est hautement significative ($p < 0.0001$) (Figure 28).

L'effet antioxydant des différentes doses d'EP et du BHT sur l'huile de tournesol varie selon l'ordre suivant:

800 ppm EP > 400 ppm EP > 200 ppm EP > 200 ppm BHT

Une meilleure activité antioxydante est enregistrée avec l'extrait phénolique pour une concentration de 800 ppm (121.44 méqO₂/kg).

L'huile de tournesol se dégrade rapidement à 63 °C pendant 20 jours de stockage.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Farag et *al.* (2003), qui indiquent que des concentrations de 200 et 400 ppm des phénols totaux enregistrent un indice de peroxyde supérieur à celui de 200 ppm BHT dans l'huile de tournesol.

Cité par Nassif (2004), Perrin (1992b) confirme que le BHT a un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide caféique et de 2 à 3 fois plus faible que celui de l'hydroxytyrosol. Ce dernier a permis une augmentation du temps de stockage par un facteur 15 ou 10 selon l'IP à atteindre.

Temps (jours) Echantillons		Indice de peroxyde ^a (méq O ₂ /kg)					
		0	3	6	10	15	20
HO témoin (0 ppm)	0	9.80±0.20	18.4±0.00	22.43±0.3 4	23.88±0.1 8	81.31±1.08	135.27±0.5 2
HO + 200 ppm BHT		9.80±0.20	14.75±0.0 7	16.46±0.7 5	17.53±0.1 7	18.02±0.18	23.11±0.25
HO + 200 ppm EP		9.80±0.20	15.58±0.4 7	15.75±0.1 2	16.29±0.1 6	19.79±0.34	25.43±1.31
HO + 400 ppm EP		9.80±0.20	12.53±0.0 4	11.75±0.2 6	15.96±0.7 6	15.89±0.07	19.64±1.61
HO + 800 ppm EP		9.80±0.20	11.38±0.4 3	11.08±0.0 0	14.46±0.2 9	13.13± 0.28	17.32±0.35

Tableau 29. Evolution de l'indice de peroxyde (méqO₂/kg) des échantillons de l'huile d'olive en fonction de la durée de stockage

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HO: huile d'olive; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

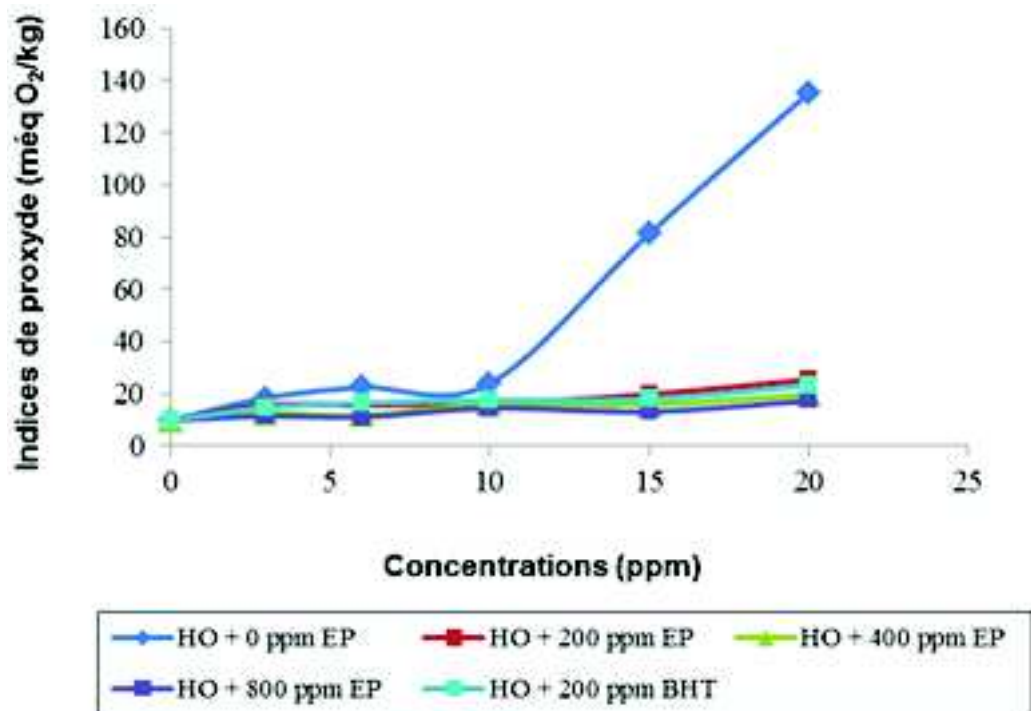


Figure 29. Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile d'olive au cours de stockage à 63°C

L'huile d'olive témoin présente l'indice de peroxyde le plus élevé par rapport à l'huile d'olive additionnée d'antioxydants naturels et synthétiques. Son IP est de 9.8 méqO₂/kg au temps zéro, alors qu'au 20^{ème} jour de stockage, il atteint 135.3 méqO₂/kg, soit une augmentation remarquable de 14 fois environ son IP initial.

Au cours de 10 jours de stockage à 63°C, les IP de l'HO traitée avec du BHT et des différentes doses d'EP augmentent faiblement à un rythme similaire à celui du témoin. A partir du 10^{ème} jour d'étuvage, ces IP continuent à évoluer lentement, alors que le témoin évolue d'une manière très rapide et significative.

La figure 29 montre que les échantillons de la même concentration de polyphénols et du BHT, évoluent de la même manière jusqu'au 20^{ème} jour.

Les IP des échantillons contenant 400 et 800 ppm d'EP évoluent également de la même manière avec un IP supérieur pour l'échantillon d'huile d'olive additionnée de 400 ppm EP au 15^{ème} et au 20^{ème} jour.

L'ajout de 400 et de 800 ppm EP à l'huile d'olive a permis d'atteindre des IP finaux de 19.6 et de 17.3 méqO₂/kg respectivement (< 20 méqO₂/kg). Ces valeurs sont inférieures à celles des autres traitements à la fin de stockage. Ces échantillons subissent ainsi une augmentation d'environ deux fois leurs indices de peroxydes initiaux (9.8 méqO₂/kg).

L'évolution de l'IP de l'HO ayant reçu des teneurs croissantes en extrait phénolique et de 200 ppm BHT, montre selon la figure 29 une seule phase ascendante ayant une pente très atténuée s'étalant sur toute la durée de stockage à 63°C (10 jours pour l'échantillon témoin).

L'analyse statistique indique que les pentes des 5 régressions linéaires (Figure 29) sont significativement différentes ($p < 0.0001$). De plus, l'analyse de la variance révèle une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre les IP de l'HO additionnée du BHT et ceux de l'HO à laquelle est ajoutée les différentes doses d'EP (200, 400 et 800 ppm). L'essai à 200 ppm BHT protège mieux l'huile d'olive que celui à 200 ppm EP.

La droite qui correspond à l'huile d'olive témoin est aussi différente des autres ($p = 0.002$ pour HO+200 ppm EP et $p = 0.003$ pour HO+BHT, 400 et 800 ppm EP). Ceci indique que toutes les doses choisies ont une activité antioxydante.

D'ailleurs, le pouvoir antioxydant des différentes doses d'EP et de BHT dans l'huile d'olive suit l'ordre suivant:

800 ppm EP > 400 ppm EP > 200 ppm BHT > 200 ppm EP

Une meilleure activité antioxydante est enregistrée avec l'extrait phénolique pour toutes les concentrations, notamment pour 800 ppm (17.32mécO₂/kg).

L'huile d'olive résiste mieux à l'oxydation par rapport aux autres huiles végétales raffinées.

D'après les résultats obtenus précédemment on peut suggérer les points suivants:

- La dose de 200 ppm de BHT inhibe mieux la formation des hydroperoxydes que celle à 200 ppm EP dans l'huile de soja et l'huile d'olive, alors que 400 et 800 ppm EP inhibent mieux la formation des hydroperoxydes que 200 ppm BHT dans l'huile de soja, l'huile d'olive et l'huile de tournesol. D'après Pokorny (2007), les antioxydants phénoliques naturels ne sont pas des substances pures de sorte que la fraction active est généralement beaucoup plus faible que celle réellement additionnée, tandis que les antioxydants synthétiques sont presque 100 % purs. Pour cela, on peut dire que 200 ppm BHT est très pure que 200 ppm EP, ce qui explique la forte activité antioxydante de la première fraction.
- Les doses 400 et 800 ppm EP, montrent une activité antioxydante après 3 jours d'oxydation d'huile et sont plus actives que 200 ppm BHT et 200 ppm EP sur l'oxydation d'huile de soja et d'huile d'olive à 63°C.
- L'huile de tournesol se détériore plus rapidement à 63°C pendant 20 jours d'étuvage, alors que l'huile d'olive se dégrade plus lentement, et cela en raison de la présence d'une certaine teneur de polyphénols (17.5 ppm) et sa richesse en acide oléique. La dose de 200 ppm EP empêche mieux la formation des hydroperoxydes que 200 ppm BHT chez l'HT.

Les antioxydants sont les ingrédients majeurs qui protègent la qualité des aliments par le ralentissement de l'oxydation, et les margines sont une source naturelle de ces substances utiles.

L'addition des antioxydants naturels (phénols) et synthétique (BHT) diminuent la vitesse d'oxydation des huiles.

En comparaison aux valeurs enregistrées avec les témoins, l'antioxydant naturel employé et le BHT ont pu ralentir l'apparition des hydroperoxydes tout au long du stockage (20 jours), particulièrement avec les échantillons:

- Huile de soja additionnée de 400 et 800 ppm d'extrait phénolique.
- Huile de tournesol additionnée de 200, 400 et 800 ppm d'extrait phénolique durant toute la période d'étuvage et pendant 15 jours pour l'HT additionnée de 200 ppm BHT.

- Tous les échantillons d'HO additionnée d'antioxydant naturel et du BHT.

Ces résultats montrent que la stabilité des huiles est influencée positivement par l'addition des composés phénoliques obtenus à partir des margines.

Les deux antioxydants, naturel et synthétique présentent un effet conservateur sur l'huile d'olive. Moussaoui (2007) a signalé qu'une concentration de 187.5 ppm d'EP des margines est efficace dans la prévention de l'oxydation de l'huile d'olive vierge étuvée à 60°C.

Les antioxydants retardent la formation des peroxydes et limitent le rancissement des huiles par la consommation préférentielle d'oxygène. Les antioxydants phénoliques cèdent des atomes d'hydrogène aux radicaux libres, et arrêtent ainsi la propagation de la chaîne lors de l'oxydation lipidique, d'où l'appellation "d'éboueur" des radicaux libres (Nassif, 2004).

La faible augmentation des IP des huiles étudiées les 10 premiers jours représente la phase d'induction, alors que la phase de propagation a été marquée à partir du 10^{ème} jour. Ce niveau de protection est dû vraisemblablement aux antioxydants endogènes tels que les tocophérols, β -carotène, et les composés phénoliques déjà présents dans les huiles.

L'effet pro-oxydant de l'EP 200 ppm sur l'HS et sur l'HT au 6^{ème} et 10^{ème} jour d'étuvage et de 200 ppm BHT sur l'HS aux 3^{èmes}, 6^{ème} et 10^{ème} jours ainsi que sur l'HT au 10^{ème} jour est manifesté par des indices de peroxyde supérieurs à ceux des témoins (effet légèrement pro-oxydant). Ce cas du témoin peut être expliqué par deux phénomènes possibles selon Chikhoun (2007):

- Protection de l'huile contre toute oxydation poussée par l' α -tocophérol naturellement présent dans ces corps gras d'origine végétale.
- Conversion des hydroperoxydes formés au cours des premiers stades de l'oxydation en composés plus stables: aldéhydes, cétones.....

L'extrait phénolique des margines et le BHT ont un effet positif sur la stabilité des huiles raffinées. Cet effet est beaucoup plus important sur la stabilité de l'huile d'olive. Le taux de formation de l'IP diminue avec l'addition de l'extrait phénolique, et plus la concentration de l'extrait phénolique augmente, plus l'effet antioxydant augmente. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par Fki et *al.* (2005a), qui montrent un effet positif de l'extrait phénolique des margines (200 et 500 ppm) sur l'indice de peroxyde des huiles d'olive et de grignon raffinées durant le stockage à 50°C. Les IP augmentent lentement avec le temps par rapport aux témoins, et la concentration 500 ppm est plus efficace que 200 ppm puisqu'elle présente les IP les plus bas.

La concentration 800 ppm EP présente le meilleur effet antioxydant suivi de 400 ppm.

Selon Bouaziz et *al.* (2008a), l'ajout de 400 ppm de l'extrait phénolique hydrolysé des feuilles de l'olivier présente un effet antioxydant sur l'huile d'olive et l'huile de grignon raffinées stockées à 50°C, et la stabilité élevée de ces huiles peut être expliquée par sa richesse en hydroxytyrosol. Cela confirme nos résultats en ce qui concerne l'effet antioxydant de l'extrait phénolique sur la formation des hydroperoxydes lipidiques où ils présentent un effet réducteur en comparaison avec les huiles témoins.

La concentration 400 ppm d'extrait phénolique hydrolysé des feuilles de l'olivier est capable de diminuer la formation des hydroperoxydes, des diènes et des triènes conjugués

comparée aux témoins et à 400 ppm d'extrait phénolique (non hydrolysé) des feuilles de l'olivier des huiles d'olive et de grignon raffinées stockées à 50°C (Bouaziz et *al.*, 2008a).

Les différentes doses d'extrait phénolique et le BHT affectent beaucoup plus la durée de vie de l'huile d'olive. La stabilité élevée de l'huile d'olive témoin durant les dix premiers jours, est certainement due à la faible teneur en acides gras polyinsaturés (C18:2 ω 6, C18:3 ω 3) et à la présence des polyphénols et de la vitamine E comme antioxydants. Après cette période, la stabilité des huiles, notamment celle de l'huile d'olive est due à l'addition des antioxydants.

D'après Sahari et *al.* (2004), la durée de vie de l'huile de tournesol et de l'huile d'olive déterminée par un test à l'étuve à 63°C est de 9 et 15 jours respectivement.

L'extrait de margines à l'acétate d'éthyle contient des antioxydants potentiels.

L'hydroxytyrosol et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique sont les composés les plus actifs isolés à partir des margines. D'après Fki et *al.* (2005a), parmi les composés phénoliques extraits à partir des margines, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'hydroxytyrosol apparaissent comme alternatifs réels pour abaisser la formation des peroxydes dans les échantillons d'huile stockée. L'addition de 200 ppm de ces deux composés aux huiles raffinées a montré un retard significatif de taux d'oxydation comparable et même supérieur à celui du BHT.

La stabilité élevée des huiles raffinées et de l'huile d'olive additionnées d'extrait phénolique pourrait être expliquée par leur richesse en *ortho*-diphénols (hydroxytyrosol, acide caféique, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique....etc.). L'activité antioxydante d'extrait de margine pourrait être l'effet synergique de tous ces composés.

Selon Fki et *al.* (2005a), l'efficacité anti-oxydative des extraits de margines est directement liée à leurs teneurs en *ortho*-diphénols. L'addition de 500 ppm d'extrait phénolique et de 200 ppm d'hydroxytyrosol a des effets similaires pour retarder l'oxydation de l'huile de grignon raffinée.

D'après Bouaziz et *al.* (2008a), la stabilité élevée des huiles raffinées enrichies d'extrait phénolique hydrolysé est due à leur richesse en hydroxytyrosol et, l'activité antioxydante de ce dernier est attribuée à la donation d'hydrogène et à leur capacité à piéger les radicaux libres par la formation d'une liaison d'hydrogène intra-moléculaire entre l'hydrogène libre de leur groupement hydroxyle et leur radical phénoxy (Figure 30).

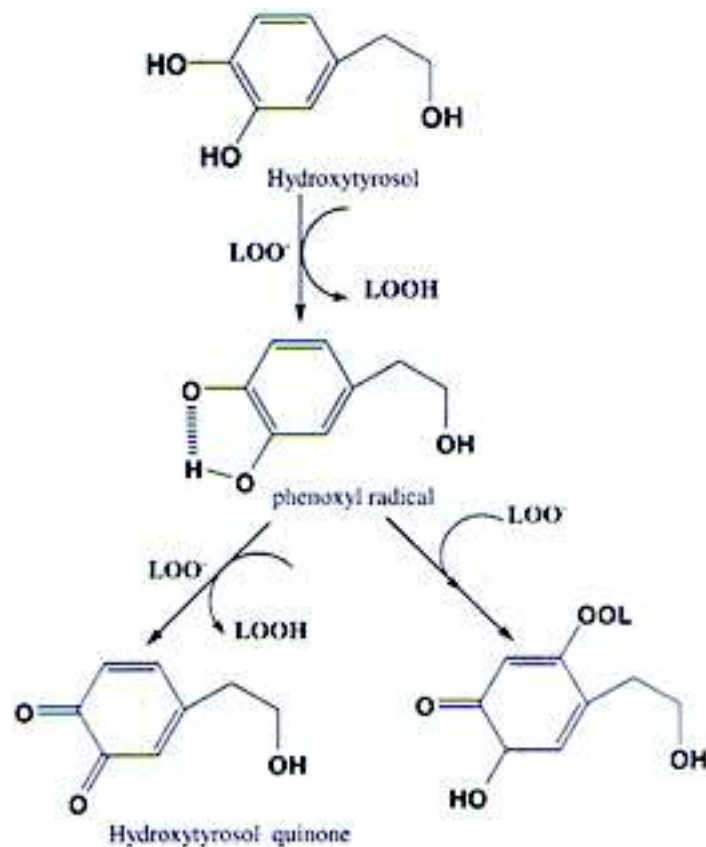


Figure 30. Mécanisme antioxydant de l'hydroxytyrosol (d'après Bouaziz et al., 2008a)

Il génère un nouveau radical qui est stabilisé par l'effet de résonance de la structure aromatique, la phase de propagation est par conséquent bloquée et le développement de l'oxydation est retardé (Chimi, Cillard, Cillard et Rahamani, 1991) cité par Bouaziz et al. (2008a).

Plusieurs études ont montré que ce phénol est le principal composé antioxydant dans la variété tunisienne Chemlali (huile d'olive et sous produits). Cette variété est souvent confondue avec la variété Chemlal algérienne.

Ben tekaya et Hassouna (2007), ont montré un effet antioxydant positif de tyrosol sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive purifiée et l'huile d'olive vierge extra étuvées à 40°C à l'obscurité, et leur effet positif est beaucoup plus marqué que celui de l' α -tocophérol. Les effets de synergie et d'antagonisme varient en fonction des rapports molaires entre les différents composés.

Selon Sahari et al. (2004), la stabilité au stockage de l'huile d'olive additionnée 5 à 10 % d'huile de graines de thé est plus élevée que celle d'huile de tournesol mélangée avec les mêmes proportions de même huile.

II.2. Extinctions spécifiques

II.2.1. La formation des diènes conjugués

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé résultant du départ d'un hydrogène

sur un acide gras possédant au moins deux doubles liaisons en position 1,4-pentadiène (Eymard, 2003) cité par Chikhoun (2007).

L'évolution de l'extinction spécifique à 232 nm au cours du stockage nous renseigne sur l'accumulation des produits primaires d'oxydation, et plus l'extinction à 232 nm est importante plus l'huile est peroxydée (Moussaoui, 2007).

La mesure des diènes conjugués des trois huiles choisies a été réalisée durant toute la période de stockage.

L'évolution des diènes conjugués des huiles témoins (HS, HT, HO) au cours du temps est illustrée dans la figure suivante:

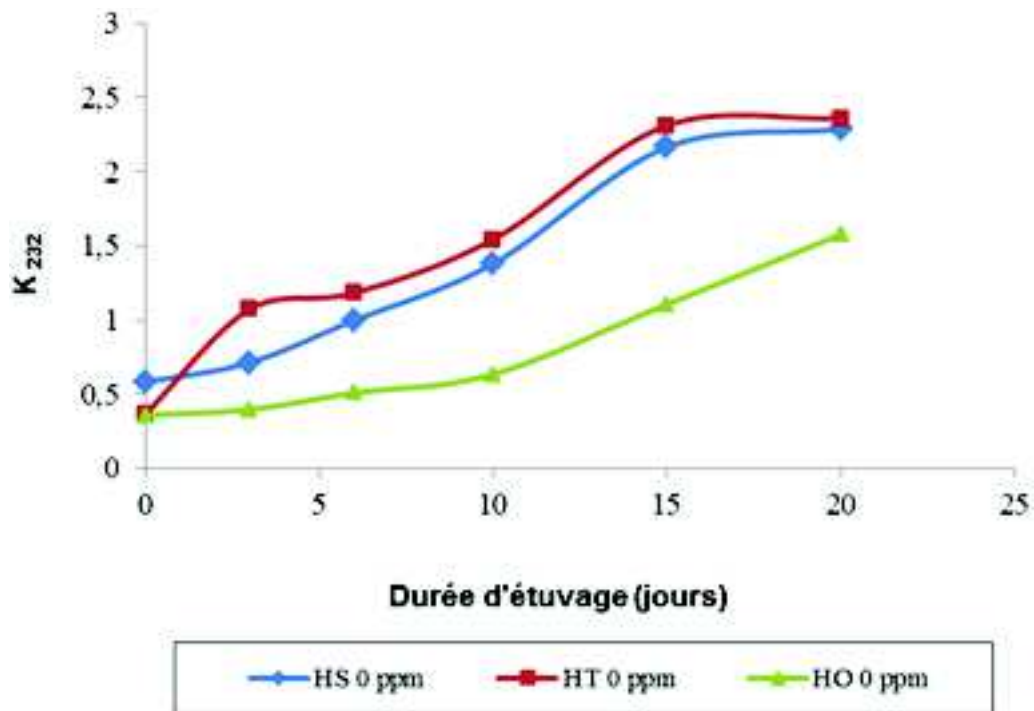


Figure 31. Comparaison des diènes conjugués des huiles témoins étuvées à 63°C/20 jours

Au début d'étuvage, les extinctions spécifiques K_{232} de l'huile d'olive et de tournesol avaient les plus faibles densités optiques (0.358, 0.365) alors que l'huile de soja présente la densité optique la plus élevée 0.581.

Les extinctions spécifiques évoluent avec le temps et avec la température d'étuvage à 63°C, notamment pour l'huile de soja et de tournesol, qui augmentent rapidement en suivant la même allure alors que celles de l'huile d'olive augmentent d'une manière moins accentuée.

Les K_{232} d'HT augmentent plus rapidement que celles de l'HS, et elles se superposent à la fin de stockage (2.359, 2.285). Ces résultats montrent que l'huile de tournesol s'oxyde plus rapidement que l'huile de soja et l'huile d'olive.

Les 5 derniers jours de stockage, l'HT et l'HS présentent une phase de stabilité où les extinctions spécifiques augmentent très lentement.

Les extinctions spécifiques de l'huile d'olive augmentent faiblement les 10 premiers jours d'étuvage (pente atténuée), puis s'élèvent plus rapidement après (pente accentuée).

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

L'HO présente une bonne résistance à l'oxydation que les huiles raffinées (HT, HS). Ces dernières notamment l'HT s'oxydent plus rapidement en formant des diènes conjugués, à cause de leur richesse en acides gras polyinsaturés, particulièrement l'acide linoléique, alors que l'HO résiste mieux à l'oxydation, grâce à sa richesse en acides gras monoinsaturés notamment l'acide oléique.

Les valeurs obtenues des diènes conjugués de l'huile de soja sont représentées dans le tableau 30 et la figure 32:

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{232}^a					
	0	3	6	10	15	20
HS témoin (0 ppm)	0.581±0.0 18	0.712±0.0 02	0.997±0.0 08	1.378±0.0 08	2.164±0.00 4	2.285±0.00 1
HS + 200 ppm BHT	0.581±0.0 18	0.902±0.0 08	1.268±0.0 16	1.245±0.0 1	1.825±0.01	2.077±0.00 07
HS + 200 ppm EP	0.581±0.0 18	0.739±0.0 02	1.296±0.0 12	1.475±0.0 13	2.186±0.00 9	2.176±0.00 8
HS + 400 ppm EP	0.581±0.0 18	0.750±0.0 03	1.021±0.0 11	1.078±0.0 1	1.622±0.00 8	1.660±0.01
HS + 800 ppm EP	0.581±0.0 18	0.684±0.0 04	0.964±0.0 04	1.097±0.0 04	1.459±0.00 9	1.462±0.00 9

Tableau 30. Absorbance à 232 nm (K_{232}) de l'huile de soja

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HS: huile de soja; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

Les absorbances évoluent significativement avec le temps et avec la température de stockage. L'analyse statistique révèle que les pentes des 5 régressions linéaires sont significativement différentes ($p < 0.0001$), ce qui prouve que toutes doses choisies ont des effets antioxydants différents.

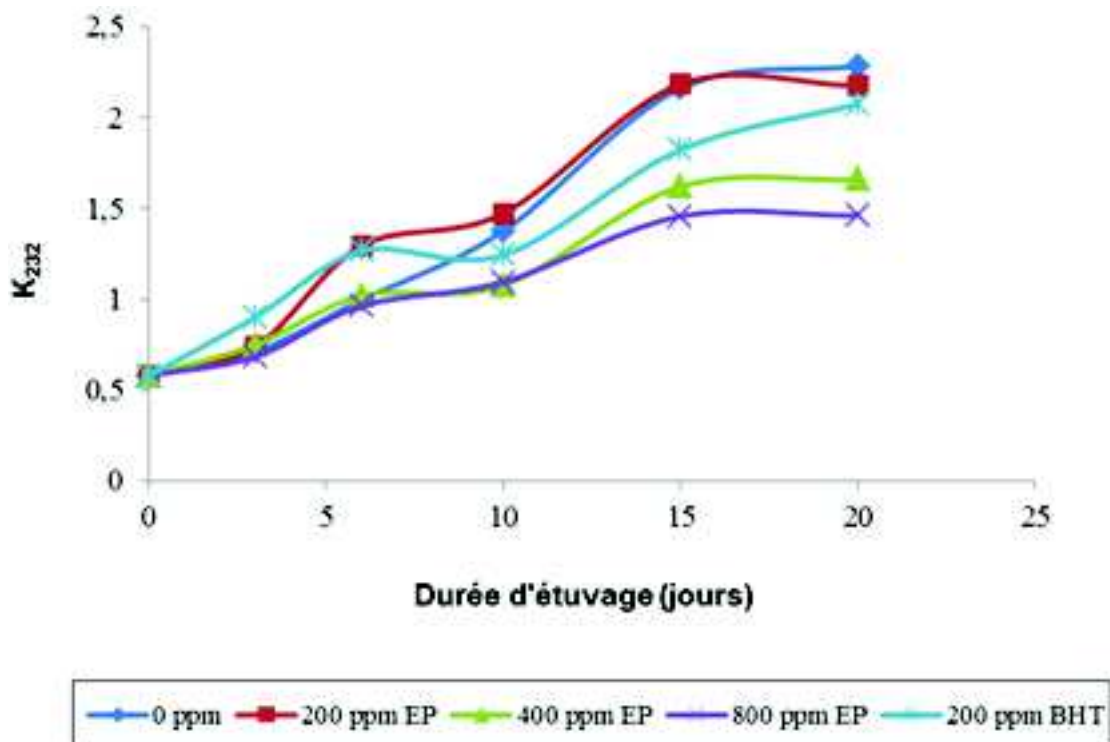


Figure 32. Evolution des diènes conjugués de l'huile de soja au cours de stockage à 63°C

Le BHT présente un effet pro-oxydant durant les 6 premiers jours d'étuvage, les K_{232} d'HS additionnée du BHT sont supérieures aux K_{232} du témoin. La concentration 200 ppm d'EP présente un effet pro-oxydant sur l'HS de 3^{ème} au 15^{ème} jour. Au 6^{ème} jour, 200 ppm BHT et 200 ppm EP ont un effet similaire sur l'huile de soja.

Les doses 400 et 800 ppm d'EP ont un effet semblable avec le témoin sur la stabilité de l'huile de soja durant les 6 premiers jours (Figure 32). C'est au-delà de 6^{ème} jour que l'effet de 400 et 800 ppm EP apparaît. La dose 800 ppm d'EP semble avoir un effet plus bénéfique que 400 ppm sur la stabilité oxydative de l'huile de soja.

Les valeurs des diènes conjugués obtenus confirment les résultats rapportés lors du test de l'IP, notamment pour l'HS additionnée 800 ppm d'antioxydant naturel. Ce dernier a enregistré d'une manière significative la plus faible valeur d'absorbance à 232 nm (1.46), suivie par les valeurs 1.66 et 2.07 enregistrées pour 400 ppm EP et 200 ppm BHT respectivement. Cependant, le témoin a révélé la plus grande valeur par rapport aux autres échantillons (2.28). Ceci peut être expliqué par l'absence d'antioxydant permettant d'assurer une protection de cette huile contre l'oxydation. L'HS additionnée 800 ppm d'EP suivie de celle additionnée 400 ppm d'EP sont celles qui résistent le mieux à l'oxydation.

Les valeurs élevées des diènes conjugués enregistrés peuvent être liées à la forte concentration en acides gras polyinsaturés qui caractérise l'huile de soja.

Les valeurs obtenues des diènes conjugués de l'huile de tournesol sont représentées dans le tableau 31 et la figure 33:

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{232}^a					
	0	3	6	10	15	20
HT témoin (0 ppm)	0.365±0.008	1.071±0.003	1.181±0.014	1.542±0.014	2.31±0.001	2.359±0.002
HT + 200 ppm BHT	0.365±0.008	0.961±0.001	1.305±0.017	1.361±0.011	1.909±0.007	2.336±0.005
HT + 200 ppm EP	0.365±0.008	0.654±0.007	1.114±0.007	1.490±0.004	2.033±0.008	2.081±0.002
HT + 400 ppm EP	0.365±0.008	0.635±0.002	1.043±0.008	1.39±0.001	1.843±0.004	2.023±0.001
HT + 800 ppm EP	0.365±0.008	0.688±0.003	0.978±0.008	1.367±0.004	1.907±0.008	1.919±0.001

Tableau 31. Absorbance à 232 nm (K_{232}) de l'huile de tournesol

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HT: huile de tournesol; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

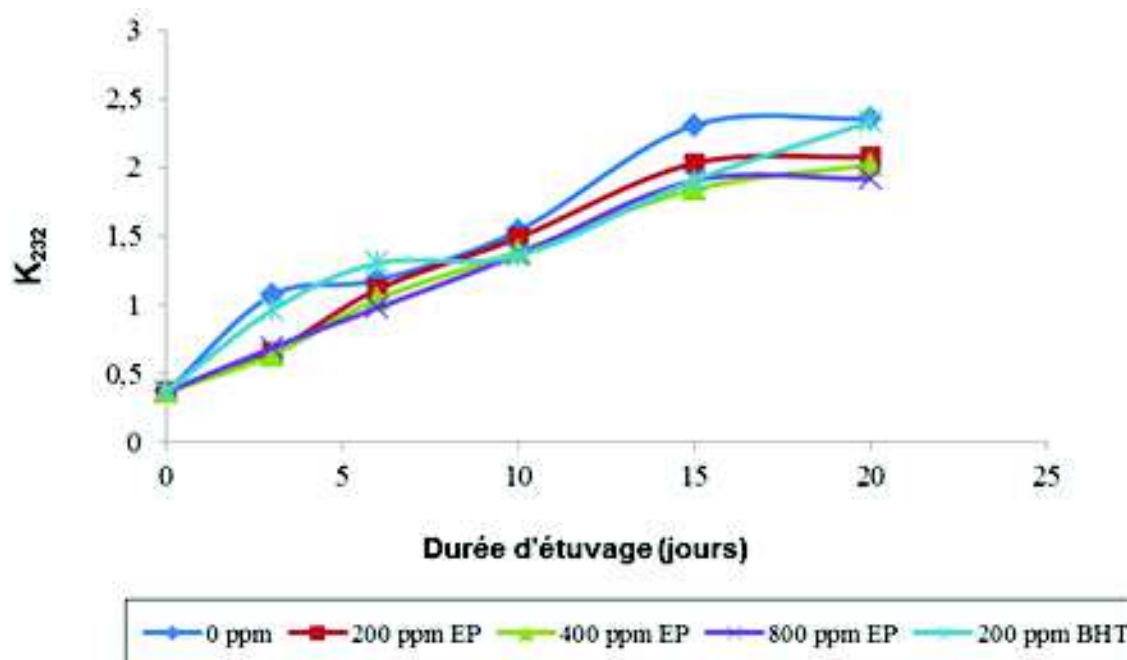


Figure 33. Evolution des diènes conjugués (K_{232}) de l'huile de tournesol au cours de stockage à 63°C

Au 6^{ème} jour, le BHT présente un effet légèrement pro-oxydant sur l'HT.

Au dernier jour d'étuvage, le BHT n'a pas d'effet sur l'HT, où il présente une extinction spécifique (2.336) proche de celle de témoin (2.359).

Tous les échantillons d'HT additionnée de différentes doses d'EP et 200 ppm BHT montrent une augmentation de l'absorbance à 232 nm avec la période d'étuvage à 63°C. Cette élévation est moins accentuée par rapport au témoin, notamment pour les échantillons d'HT additionnée 400 et 800 ppm d'EP. Les composés phénoliques des margines diminuent la formation des composés primaires d'oxydation.

Le 10^{ème} jour de stockage note un point d'intersection des diènes conjugués des échantillons additionnés d'antioxydants naturels (400 et 800 ppm) et synthétique.

Les valeurs élevées des diènes conjugués enregistrés, semblent être liées à la forte concentration des acides gras polyinsaturés contenus dans l'HT (Iqbal et Bhangar, 2007).

Les valeurs obtenues des diènes conjugués de l'huile d'olive sont représentées dans le tableau 32 et la figure 34:

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{232}^a					
	0	3	6	10	15	20
HO témoin (0 ppm)	0.358±0.0 04	0.396±0.0 03	0.508±0.0 05	0.633±0.0 04	1.105±0.00 9	1.575±0.00 8
HO + 200 ppm BHT	0.358±0.0 04	0.417±0.0 07	0.458±0.0 06	0.463±0.0 03	0.538±0.00 5	0.654±0.00 9
HO + 200 ppm EP	0.358±0.0 04	0.364±0.0 03	0.382±0.0 02	0.520±0.0 05	0.521±0.04 2	0.641±0.00 6
HO + 400 ppm EP	0.358±0.0 04	0.385±0.0 04	0.379±0.0 04	0.469±0.0 08	0.538±0.00 1	0.516±0.00 3
HO + 800 ppm EP	0.358±0.0 04	0.437±0.0 04	0.349±0.0 03	0.435±0.0 04	0.514±0.00 3	0.517±0.00 4

Tableau 32. Absorbance à 232 nm (K_{232}) de l'huile d'olive

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HO: huile d'olive; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

Les extinctions spécifiques des différents échantillons additionnés d'EP et du BHT augmentent avec la durée de stockage à 63°C.

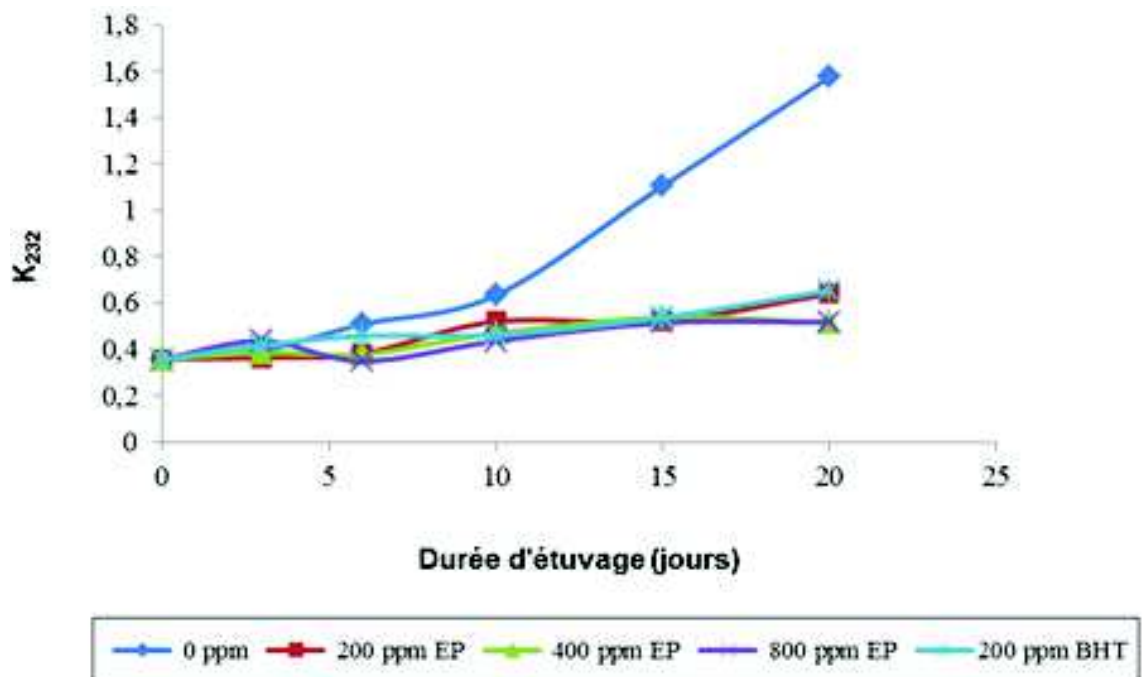


Figure 34. Evolution des diènes conjugués (k_{232}) de l'huile d'olive au cours de stockage à 63°C

La protection de l'HO témoin contre l'oxydation durant les dix premiers jours d'étuvage serait probablement due aux antioxydants naturellement présents (polyphénols, α -tocophérols (251-369 mg/kg), chlorophylles et caroténoïdes) selon Cheikhousman et al. (2005). Le témoin a révélé les valeurs les plus élevées par rapport aux autres échantillons d'HO ajoutés d'EP et du BHT à partir du 10^{ème} jour d'étuvage, ceci peut être expliqué par la dégradation des antioxydants permettant d'assurer la protection des huiles contre l'oxydation.

D'après Moussaoui (2007), les extraits phénoliques des margines exercent une influence beaucoup plus importante sur la protection de l'huile d'olive que les extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier. La différence est liée à l'activité antioxydante des composés phénoliques qui dépend de leur structure.

L'indice de peroxyde et les diènes conjugués indiquent que l'huile d'olive a une stabilité oxydative élevée de tous les échantillons d'huile. Ces résultats pourraient être dus à la composition en acides gras de l'huile d'olive, qui contient une quantité élevée d'acide oléique que l'huile de soja et l'huile de tournesol.

D'une manière générale, l'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les diènes conjugués de trois huiles témoins et ceux des huiles auxquelles sont ajoutées les différentes concentrations d'EP et du BHT (200 ppm). Ceci indique que toutes ces doses et antioxydants ralentissent la formation des diènes conjugués.

Les concentrations 800 et 400 ppm semblent les plus efficaces dans la prévention de l'oxydation des huiles raffinées (HS, HT), alors que pour l'huile d'olive, toutes les concentrations d'extrait phénolique y compris le BHT ont un effet antioxydant préventif.

La faible progression des extinctions spécifiques, indique l'inhibition de la formation des diènes conjugués par les antioxydants naturels (extraits phénoliques). Cet effet est plus visible sur l'huile d'olive que sur l'HT et l'HS. Cette dernière résiste mieux à l'oxydation que l'HT.

Les résultats des extinctions spécifiques des trois huiles étudiées, confirment ceux de l'IP. Par rapport aux échantillons témoins, ceux additionnés d'EP et du BHT (à part quelques exceptions) présentent des valeurs d'extinctions spécifiques plus faibles. Ils indiquent une influence positive des composés phénoliques, comparable à celle du BHT (contrôle positif) sur l'inhibition de la formation des diènes conjugués et donc la conservation des huiles, particulièrement l'huile d'olive.

Il ressort que les concentrations en extraits phénoliques des margines qui présentent le pouvoir antioxydant le plus élevé sont 800 ppm suivie de 400 ppm. Ces résultats confirment ceux trouvés lors de l'analyse de l'IP des huiles choisies.

Fki et *al.* (2005a) ont montré après la détermination des diènes conjugués de l'huile de grignon raffinée, l'effet protecteur élevé de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et de l'hydroxytyrosol contre l'oxydation. Les échantillons traités avec ces composés montrent une faible absorbance à 232 nm que ceux traités avec d'autres composés BHT, BHA, tyrosol et l'acide *p*-hydroxyphénylacétique. L'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'hydroxytyrosol, composés des margines ont un effet marqué sur la prévention de l'auto-oxydation des huiles raffinées.

La méthode de détermination des diènes conjugués est très facile à mettre en œuvre, mais elle présente l'inconvénient d'être moins sensible et de ne pas être liée à des valeurs de référence, donc difficile d'interprétation dans l'absolu (Chikhouné. 2007). Mais selon Judde (2004) cité par Chikhouné (2007), ce type de suivi présente un intérêt dans le cadre d'un contrôle de qualité pour une source de corps gras donnée.

II.2.2. La formation des triènes conjugués

L'évolution de l'extinction spécifique à 270 nm au cours du stockage nous renseigne sur l'accumulation des produits secondaires d'oxydation, et plus l'extinction à 270 nm est élevée plus l'huile est oxydée.

L'évolution des triènes conjugués des huiles témoins (HS, HT, HO) au cours du temps est illustrée dans la figure suivante:

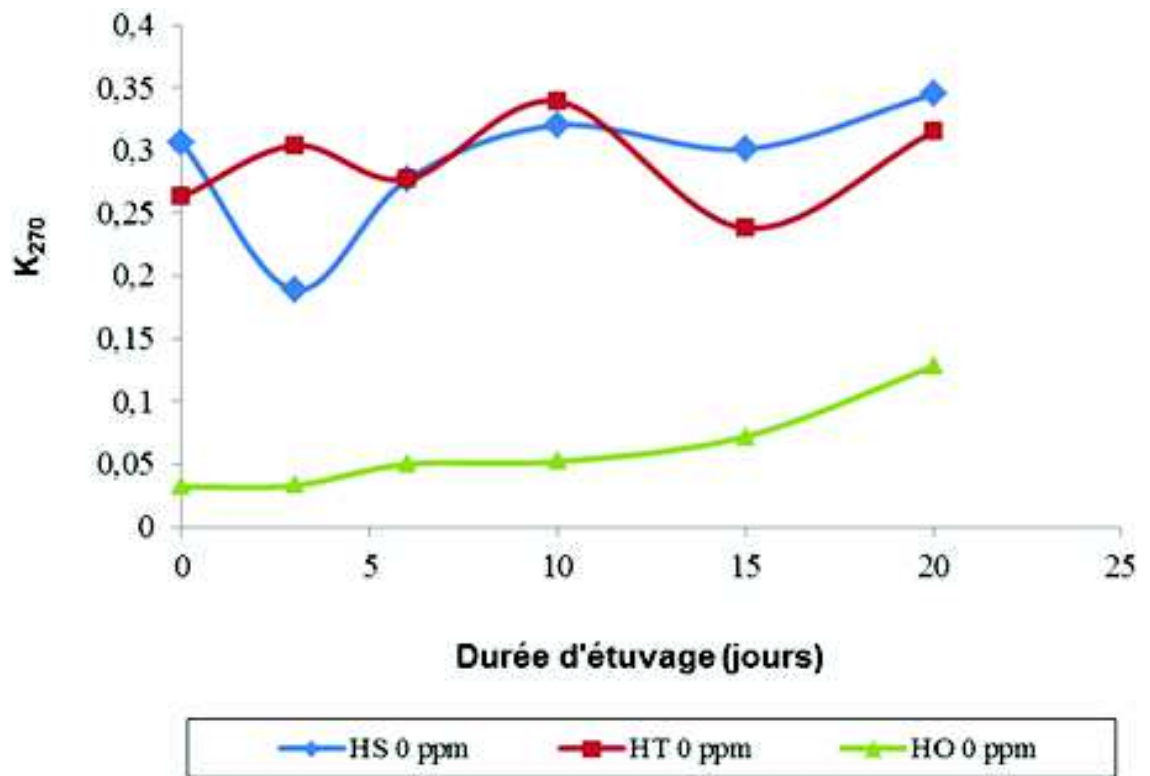


Figure 35. Comparaison des triènes conjugués des huiles témoins étuvées à 63°C/20 jours

Au temps 0, l'HS montre l'extinction spécifique la plus importante à 270 nm, de l'ordre de 0.306 par rapport aux huiles de tournesol et d'olive. Cette dernière présente l'extinction spécifique la plus faible (0.032).

Les extinctions spécifiques de l'huile d'olive témoin sont les plus faibles en comparaison avec celles des huiles raffinées. Elles augmentent faiblement avec le temps les dix premiers jours (pente atténuée). Cette élévation est accentuée par la suite.

Les extinctions spécifiques des huiles raffinées augmentent faiblement avec le temps et elles se superposent au 6^{ème} jour d'étuvage pour une valeur de 0.277.

Au 3^{ème} jour de stockage, l'extinction spécifique de l'HT augmente alors qu'elle diminue pour l'HS. De 6 à 10 jours d'étuvage à 63°C, les extinctions spécifiques suivent la même allure et sont superposables. Généralement, elles varient et augmentent très peu chez les huiles raffinées.

Les valeurs obtenues des triènes conjugués (k_{270}) de l'huile soja sont représentées dans le tableau 33 et la figure 36:

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{270}^a					
	0	3	6	10	15	20
HS témoin (0 ppm)	0.306±0.0 27	0.189±0.0 02	0.277±0.0 07	0.320±0.0 03	0.301±0.00 2	0.345±0.00 4
HS + 200 ppm BHT	0.306±0.0 27	0.210±0.0 02	0.331±0.0 07	0.240±0.0 01	0.261±0.00 3	0.296±0.00 1
HS + 200 ppm EP	0.306±0.0 27	0.242±0.0 01	0.403±0.0 05	0.276±0.0 00	0.295±0.00 32	0.304±0.00 5
HS + 400 ppm EP	0.306±0.0 27	0.244±0.0 02	0.262±0.0 01	0.263±0.0 04	0.306±0.00 2	0.294±0.00 3
HS + 800 ppm EP	0.306±0.0 27	0.219±0.0 00	0.268±0.0 00	0.263±0.0 01	0.269±0.00 3	0.295±0.00 2

Tableau 33. Absorbance à 270 nm (K_{270}) de l'huile de soja

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HS: huile de soja; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

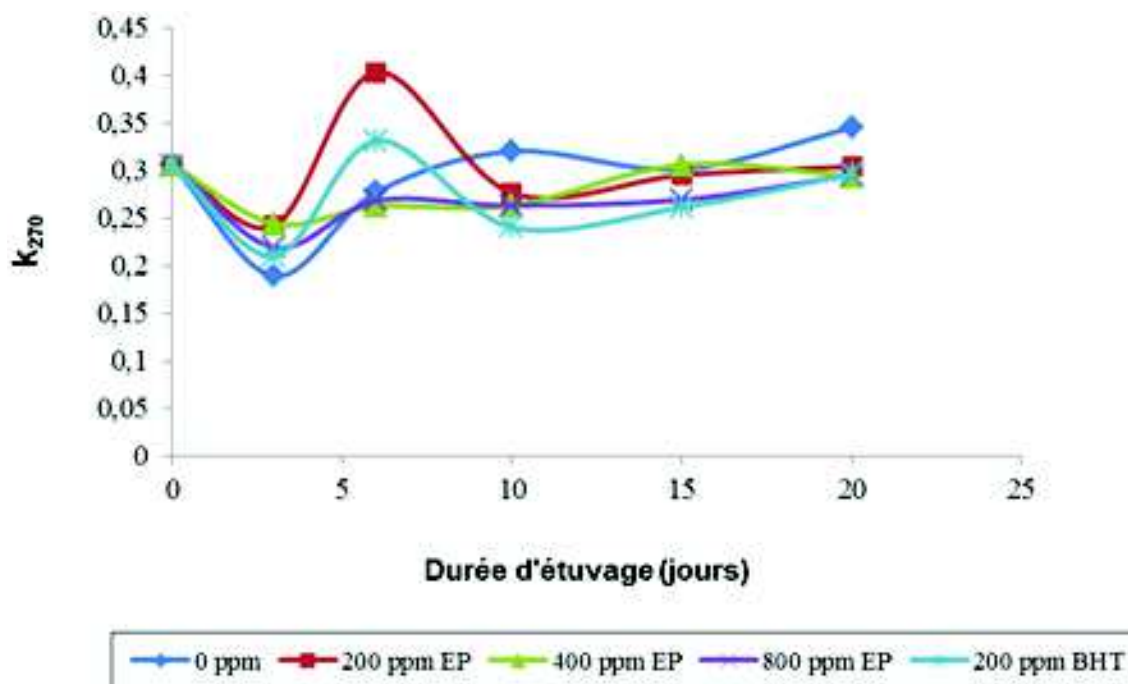


Figure 36. Evolution des triènes conjugués (K_{270}) de l'huile de soja au cours de stockage à 63°C

Les valeurs obtenues des triènes conjugués (K_{270}) de l'huile de tournesol sont représentées dans le tableau 34 et la figure 37:

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{270}^a					
	0	3	6	10	15	20
HT témoin (0 ppm)	0.263±0.0 11	0.304±0.0 01	0.277±0.0 03	0.339±0.0 05	0.238±0.0 1	0.315±0.0 1
HT + 200 ppm BHT	0.263±0.0 11	0.198±0.0 02	0.298±0.0 03	0.246±0.0 02	0.279±0.0 3	0.308±0.0 3
HT + 200 ppm EP	0.263±0.0 11	0.251±0.0 03	0.256±0.0 02	0.265±0.0 01	0.273±0.0 2	0.286±0.0 2
HT + 400 ppm EP	0.263±0.0 11	0.237±0.0 02	0.239±0.0 01	0.277±0.0 02	0.296±0.0 2	0.300±0.0 1
HT + 800 ppm EP	0.263±0.0 11	0.230±0.0 02	0.283±0.0 01	0.293±0.0 03	0.316±0.0 5	0.297±0.0 5

Tableau 34. Absorbance à 270 nm (K_{270}) de l'huile de tournesol

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HT: huile de tournesol; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

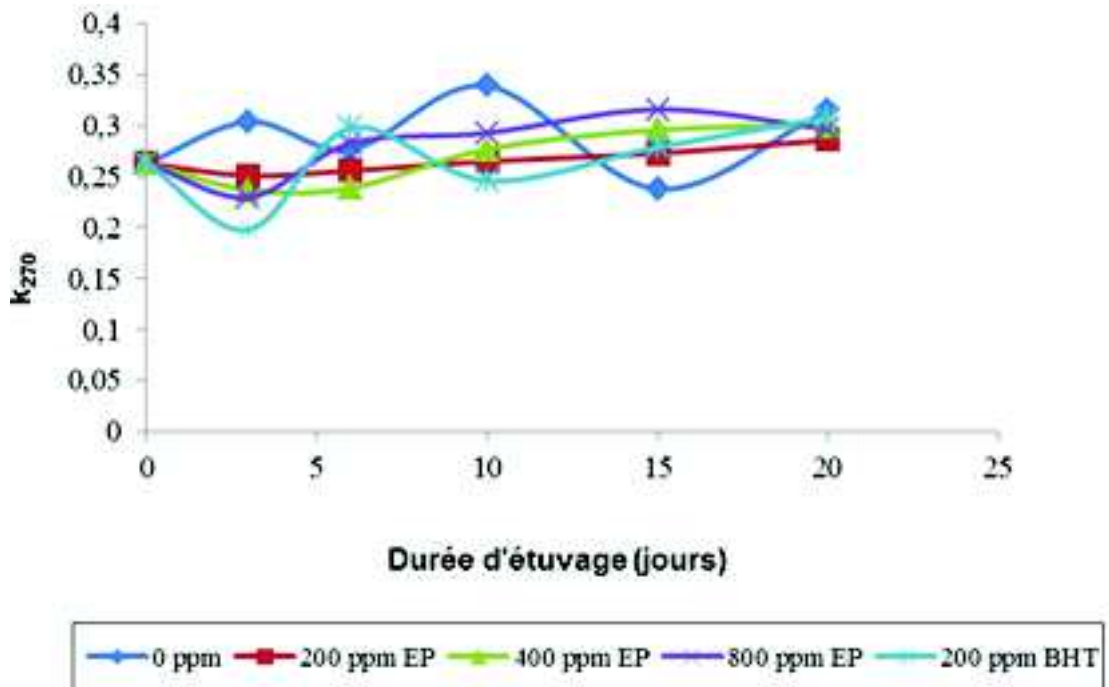


Figure 37. Evolution des triènes conjugués (k_{270}) de l'huile de tournesol au cours de stockage à 63°C

Les extinctions spécifiques (K_{270}) varient légèrement en fonction du temps et la température de stockage pour tous les échantillons des huiles raffinées (HT, HS) additionnées ou non d'antioxydants naturels et synthétiques.

Les résultats montrent une faible formation des triènes conjugués (produits secondaires d'oxydation).

Les huiles raffinées stockées à 63°C pendant 20 jours subissent une faible oxydation secondaire et donc la formation des triènes conjugués est ralentie.

Les valeurs obtenues des triènes conjugués (k_{270}) de l'huile d'olive sont représentées dans le tableau 35 et la figure 38:

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

Durée d'étuvage (jours) Echantillons	K_{270}^a					
	0	3	6	10	15	20
HO témoin (0 ppm)	0.032±0.001	0.033±0.004	0.05±0.000	0.052±0.002	0.072±0.002	0.128±0.004
HO + 200 ppm BHT	0.032±0.001	0.027±0.004	0.036±0.001	0.044±0.004	0.035±0.000	0.058±0.000
HO + 200 ppm EP	0.032±0.001	0.029±0.000	0.022±0.003	0.045±0.002	0.025±0.000	0.047±0.002
HO + 400 ppm EP	0.032±0.001	0.038±0.003	0.026±0.000	0.051±0.002	0.05±0.001	0.054±0.002
HO + 800 ppm EP	0.032±0.001	0.038±0.001	0.04±0.001	0.043±0.000	0.053±0.003	0.056±0.003

Tableau 35. Absorbance à 270 nm (K_{270}) de l'huile de d'olive

^a: valeurs exprimées en moyenne ± écart type

HO: huile d'olive; BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique.

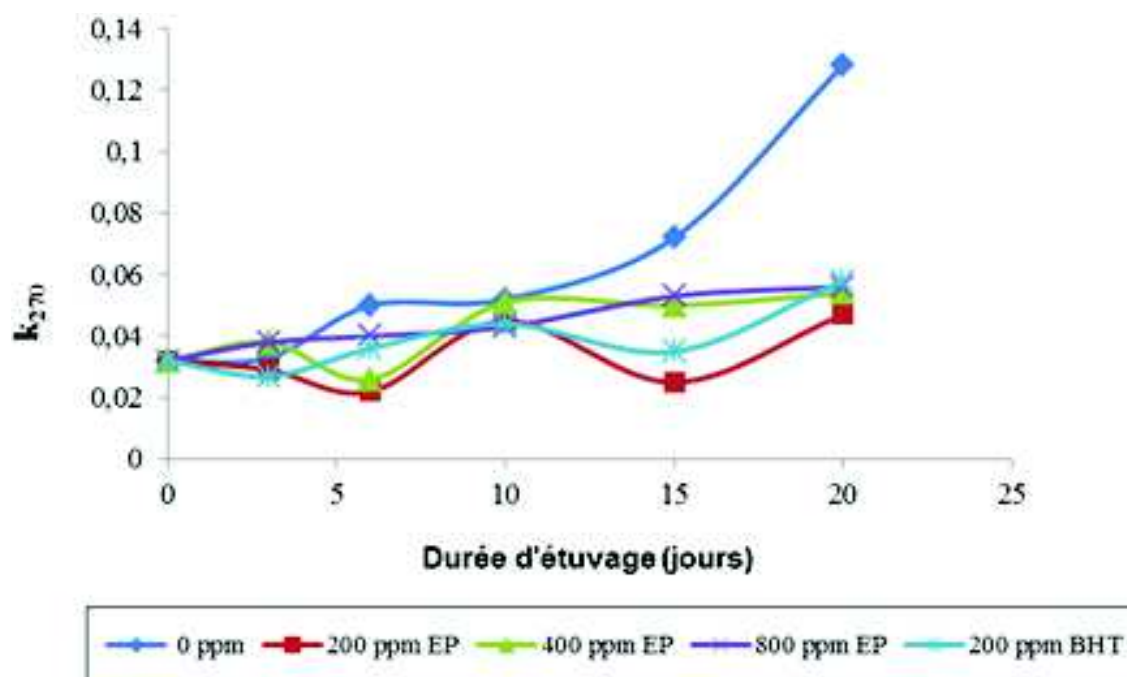


Figure 38. Evolution des triènes conjugués (k_{270}) de l'huile d'olive au cours de stockage à 63°C

Les échantillons d'huile d'olive montrent une augmentation des extinctions spécifiques, mais moins accentuée par rapport au témoin, particulièrement les dix derniers jours d'étuvage. Il semble pour cela que l'oxydation secondaire se déroule beaucoup plus à partir de 10^{ème} jour d'étuvage pour le témoin.

Les différentes doses des composés phénoliques ralentissent la formation des triènes conjugués durant toute la période expérimentale.

L'analyse statistique indique une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre les triènes conjugués des trois huiles témoins (Figures 36, 37, 38) et ceux des huiles additionnées les différentes concentrations d'EP et du BHT. Ceci montre que toutes ces doses et antioxydants inhibent la formation des triènes conjugués, et par conséquent ralentissent l'oxydation secondaire.

Les données représentées dans cette étude montrent que les composés phénoliques des margines sont capables de diminuer la formation des hydroperoxydes, des diènes et triènes conjugués comparés aux témoins.

II.3. Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

Le développement de la rancidité oxydative est reconnu comme la cause prédominante de la détérioration de l'huile durant le stockage. Il s'agit d'une réaction entre les acides gras polyinsaturés, quelque soit leur état libre ou estérifié en tant que molécule de triglycéride, et l'oxygène.

D'après Morelló et al. (2004), les deux facteurs qui déterminent la susceptibilité des huiles à l'oxydation sont la composition en acides gras et les composés antioxydants. Les types d'acides gras présents dans l'huile, et en particulier leur nombre de doubles liaisons, détermine le type des réactions chimiques qui se produisent durant la période de stockage.

L'analyse par CPG des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de soja, de tournesol et de l'huile d'olive a révélé la présence de six acides gras avec la prédominance de l'acide linoléique (C18:2 ω 6) dans l'huile de soja et de tournesol, avec des pourcentages de 52.8% et de 60.65% respectivement, et de l'acide oléique dans l'huile d'olive (67.14%). Le tableau 36 présente le profil en acides gras des huiles (témoins) étudiées.

Tableau 36. Composition en acides gras des huiles de soja, de tournesol et d'olive en % des acides gras totaux

Huiles	C16:0	C16:1 ω 7	C18:0	C18:1 ω 9	C18:2 ω 6	C18:3 ω 3
Soja	10.613	0.208	3.927	26.855	52.808	5.046
Tournesol	6.685	0.146	4.228	27.476	60.651	0.359
Olive	14.023	2.150	1.932	67.149	13.253	1.054

Le profil en acides gras des huiles avant et après étuvage à 63°C est représenté dans les tableaux 37, 38, 39.

Tableau 37. Composition en acides gras (%) de l'huile de soja à t_0 et après stockage

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

	C16:0	C16:1 ω 7	C18:0	C18:1 ω 9	C18:2 ω 6	C18:3 ω 3	AGPI (%)
0 ppm (t_0)	10,613	0.208	3.927	26.855	52.808	5.046	57.854
0 ppm (t_{20})	11.334	0.165	4.289	28.012	50.682	4.481	55.163
200 ppm BHT (t_{20})	10.618	0.169	4.129	26.705	51.5	5.049	56.549
200 ppm EP (t_{20})	10.981	0.191	4.189	26.877	50.027	4.661	54.688
400 ppm EP (t_{20})	10.905	0.151	4.106	26.562	51.694	5.086	56.78
800 ppm EP (t_{20})	11.759	0.117	4.104	26.711	50.982	4.813	55.795

t_0 : temps 0; t_{20} : temps correspond à 20 jours d'étuvage à 63°C.

BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique; AGPI: acide gras polyinsaturés.

Les acides gras majoritaires présents comme glycérides dans l'huile de soja sont l'acide linoléique (C18:2 ω 6), l'acide oléique (C18:1 ω 9), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide α -linoléique (C18:3 ω 3).

L'acide linoléique est le principal acide gras polyinsaturé présent dans l'huile de soja durant le stockage, il est présent en concentration importante par rapport aux autres acides gras (52.8-50.68 %) suivi de l'acide α -linoléique (5.04-4.48 %). Le C18:2 ω 6, diminue principalement au cours du stockage (2.1 %) et avec l'addition de 200 ppm d'EP (2.8 %) et 800 ppm d'EP (1.8%) et d'une manière moins accentuée avec l'addition de 400 ppm EP et du BHT. Les concentrations 200 et 800 ppm EP montrent un faible effet conservateur de l'acide linoléique. Une bonne protection vis-à-vis de l'oxydation de l'acide linoléique est enregistrée avec l'EP des margines pour une concentration de 400 ppm, suivi du BHT. Par contre une très forte perte est signalée avec 200 ppm EP.

L'acide α -linoléique (C18:3 ω 3) garde les mêmes valeurs avec l'addition du BHT et 400 ppm d'EP (effet positif), et note une légère réduction par l'addition de 200 et 800 ppm EP. La régression de C18:3 ω 3 est de l'ordre de 0.5 % à la fin du stockage.

Nos résultats montrent que les acides gras polyinsaturés diminuent durant les 20 jours de stockage. Cette réduction peut être due à la perméabilité des tubes à essai à l'oxygène et à la lumière du jour. Le pourcentage d'AGPI diminue même avec l'addition du BHT et des extraits phénoliques, plus particulièrement pour l'échantillon contenant 200 ppm EP.

D'après Yanishlieva et Marinova (2001), l'acide α -linoléique avec trois doubles liaisons s'oxyde beaucoup plus rapidement que l'acide linoléique et leurs hydroperoxydes sont peu stables.

L'acide oléique (C18:1 ω 9) est l'acide gras mono-insaturé le plus dominant (26.8 %), il évolue significativement avec la période et les conditions de stockage (28 %) chez le témoin, et il n'est plus influencé par l'addition des différentes doses d'extrait phénolique et de 200 ppm BHT (effet positif des EP et du BHT sur la conservation de l'acide oléique de l'huile de soja).

De ce qui précède on peut conclure que 200 ppm BHT et 400 ppm d'EP préservent mieux les acides gras insaturés de l'huile de soja.

L'acide palmitique (C16:0), le principal acide gras saturé montre une augmentation significative chez le témoin (11.3 %), et chez l'échantillon additionné de 800 ppm EP (11.75%).

Il a été suggéré que les acides gras polyinsaturés sont très importants pour la stabilité des huiles en raison des réactions chimiques survenant sur les doubles liaisons (Bouaziz

et *al.*, 2008a; Morelló et *al.*, 2004). Les taux de ces réactions d'oxydation dépendent du nombre de doubles liaisons sur la chaîne carbonique (Morelló et *al.*, 2004), et elles sont accélérées par l'exposition à la lumière, qui cause la formation de deux radicaux anioniques singulet et/ou superoxyde (Bouaziz et *al.*, 2008a).

L'auto-oxydation des huiles ne peut ni être prévenue par le maintien de stockage à froid, ni par l'élimination de la lumière.

Tableau 38. Composition en acides gras (%) de l'huile de tournesol à t_0 et après stockage

	C16:0	C16:1 ω 7	C18:0	C18:1 ω 9	C18:2 ω 6	C18:3 ω 3	AGPI (%)
0 ppm (t_0)	6.685	0.146	4.228	27.476	60.651	0.359	61.01
0 ppm (t_{20})	7.552	0.158	4.691	29.623	57.164	0.591	57.755
200 ppm BHT (t_{20})	7.264	0.175	4.615	29.171	57.789	0.641	59.071
200 ppm EP (t_{20})	7.099	0.159	4.412	28.421	59.087	0.631	59.718
400 ppm EP (t_{20})	6.854	0.181	4.364	28.018	59.485	0.667	60.152
800 ppm EP (t_{20})	7.111	0.158	4.443	28.437	58.836	0.639	59.475

t_0 : temps 0; t_{20} : temps correspond à 20 jours d'étuvage à 63°C.

BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique; AGPI: acide gras polyinsaturés.

Une diminution des AGPI est notée pour le témoin, et pour tous les échantillons additionnés d'antioxydants naturel et synthétique. Elle est moins prononcée pour l'échantillon additionné de 400 ppm EP.

La diminution de pourcentage des acides gras polyinsaturés de l'huile de tournesol témoin (61, 57.75 %) est notable avec la période de stockage à 63°C notamment pour l'acide linoléique (60.65, 57.16 %). La bonne protection vis-à-vis de l'oxydation de l'acide linoléique est enregistrée avec l'extrait phénolique des margines pour une concentration de 400 ppm suivi de 200 ppm. Par contre une perte est enregistrée en présence de BHT.

L'acide α -linoléique et l'acide oléique augmente remarquablement avec la durée et la température d'étuvage pour le témoin (0.35-0.59 % et 27.47-29.62 % respectivement), ainsi que pour tous les échantillons d'HT additionnés d'extrait phénolique et du BHT. Les acides gras saturés notent une augmentation pour le C16:0 et une stabilité pour le C18:0.

L'augmentation du pourcentage d'acide oléique est la conséquence de la stabilité de pourcentage des acides gras saturés en particulier l'acide stéarique (C18:0), et la réduction de l'acide linoléique (C18:2 ω 6).

Selon Yanishlieva et Marinova (2001), l'huile de tournesol riche en acide oléique est caractérisée par une stabilité oxydative élevée en comparaison avec l'huile riche en acide linoléique.

La variation des proportions d'AGPI est dans certains cas un marqueur de l'oxydation des lipides. Les AGPI à longue chaîne sont oxydés prioritairement et leur proportion diminue au cours de l'avancement des réactions d'oxydation (Chikhouné, 2007).

Nos résultats confirment une autre fois ceux obtenus lors des tests précédents. Une nette diminution de la teneur en AGPI, particulièrement l'acide linoléique est observée chez tous les échantillons des huiles raffinées.

Tableau 39. Composition en acides gras (%) de l'huile d'olive à t_0 et après stockage

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

	C16:0	C16:1 ω 7	C18:0	C18:1 ω 9	C18:2 ω 6	C18:3 ω 3	AGPI (%)
0 ppm (t_0)	14.023	2.150	1.932	67.149	13.253	1.054	14.307
0 ppm (t_{20})	14.138	2.213	1.991	68.630	11.696	0.862	12.558
200 ppm BHT (t_{20})	13.994	2.285	1.918	67.210	13.155	0.965	14.12
200 ppm EP (t_{20})	13.96	2.276	1.882	67.366	13.068	0.982	14.05
400 ppm EP (t_{20})	13.848	2.255	1.873	67.443	13.131	0.979	14.11
800 ppm EP (t_{20})	14.306	2.239	1.875	67.364	12.899	0.938	13.837

t_0 : temps 0; t_{20} : temps correspond à 20 jours d'étuvage à 63°C.

BHT: Butylhydroxytoluène; EP: extrait phénolique; AGPI: acide gras polyinsaturés.

L'huile d'olive se caractérise par la prédominance de l'acide oléique (67.14 %) (Tableau 39). L'abondance de ce dernier, allant de 56-84 % des acides gras totaux, est la caractéristique qui définit l'huile d'olive des autres huiles végétales (Morelló et al., 2004).

La composition en acides gras a subi un changement. Il s'agit d'une augmentation du pourcentage de l'acide oléique au cours de 20 jours de stockage à 63°C pour l'huile d'olive témoin (67.14 %, 68.63 %), c'est la conséquence de la maintenance du pourcentage des acides gras saturés et la réduction des AGPI %, l'acide linoléique et l'acide α -linoléique (Morelló et al., 2004).

Le BHT et les concentrations 200 et 400 ppm EP indiquent une bonne conservation des AGPI (acide linoléique, acide α -linoléique), alors que l'huile d'olive témoin montre une diminution des AGPI avec le temps à 63°C.

Les résultats obtenus confirment ceux obtenus lors de test de l'IP et des diènes et triènes conjugués. Une nette diminution de la teneur en acide linoléique est observée chez les échantillons d'huiles étudiées (HS, HT, HO) notamment pour les huiles témoins.

Une bonne protection contre l'oxydation de l'acide linoléique est enregistrée avec 400 ppm d'EP (51.69 %) et le BHT (51.5 %) pour l'huile de soja.

Une bonne protection contre l'oxydation de l'acide linoléique est enregistrée avec 400 ppm d'EP (59.48 %) et 200 ppm EP (59.08 %) pour l'huile de tournesol.

La résistance élevée à l'oxydation des huiles est probablement due à la concentration phénolique élevée, en particulier aux o-diphénols.

Kim et al. (2008); Kamal-Eldin (2006) ont signalé que la stabilité oxydative des huiles dépend principalement de leur degré d'insaturation. L'huile d'olive est plus stable que l'huile de soja (Kim et al., 2008) et de tournesol, qui sont composées principalement d'acides gras polyinsaturés (57.85 %, 61 %), alors que l'huile d'olive est composée principalement d'acide oléique (acide gras monoinsaturé) et elle contient une certaine quantité des polyphénols (100 ppm) naturellement présents.

Durant la cuisson, les huiles végétales subissent des réactions chimiques complexes, par exemple l'oxydation des acides gras polyinsaturés et la vitamine E, isomérisation *cis/trans*, scission en produits secondaires de peroxydation, et, finalement, cyclisation et polymérisation des lipides oxydées. Ces réactions affectent les propriétés organoleptiques, nutritionnelles, et la sécurité des huiles (Cheikhousman et al., 2005).

La stabilité de l'huile d'olive et sa conservation peuvent être expliquées par:

- La composition en acides gras, le taux élevé d'acide oléique (67.14 %), et une faible teneur en AGPI (14.3 %).
- La présence des composés mineurs à activité antioxydante puissante, qui sont constitués principalement par les polyphénols et les tocophérols, mais aussi par les chlorophylles et les caroténoïdes.

La teneur en antioxydants de l'huile d'olive dépend de plusieurs facteurs, tels que la variété d'olive, la maturité à la récolte, le processus d'extraction et les conditions de stockage.

L'huile d'olive et les autres huiles végétales, constituent une source riche en antioxydants naturels. Il s'agit des composés phénoliques, des caroténoïdes, et des tocophérols qui peuvent agir par différents mécanismes, de conférer un système de défense efficace contre les attaques des radicaux libres. Plusieurs auteurs ont estimé leur contribution à la stabilité de l'huile, de l'ordre de 30 % pour les composés phénoliques, 27 % pour les acides gras, 11 % pour l' α -tocophérols et de 6 % pour les caroténoïdes (Morelló et al., 2004).

II.4. Effet des composés phénoliques sur la stabilité des huiles

Les composés phénoliques sont considérés comme étant les principaux composés antioxydants dans l'huile d'olive vierge, ils sont en mesure de donner un atome d'hydrogène au radical lipidique formé durant la phase de propagation de l'oxydation lipidique (Morelló et al., 2004).

Cité par Yanishlieva et Marinova (2001), Nergiz (1991) a montré que l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique est un antioxydant plus efficace que le BHA et le BHT. Les acides protocatéchique et caféique aussi, montrent une meilleure activité antioxydante, suite à une étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques dans l'huile d'olive raffinée et étuvée à 97.8°C.

Selon l'étude faite par Cheikhousman et al. (2005), l'hydroxytyrosol semble être l'antioxydant majoritaire de l'huile d'olive vierge extra. Il protège le tyrosol et la vit E de l'oxydation et il exprime leur stabilité relative au cours d'un chauffage à 170°C/3h. L'hydroxytyrosol, le tyrosol et leurs formes dérivées, l'oleurpéine aglycone et ligstroside aglycone, inhibent principalement la production des hydroperoxydes des AGPI durant le stockage.

Les dérivés sécoiridoïdes jouent un rôle important dans la stabilité de l'huile, cela a été déjà évalué et montré comme étant capable de prolonger la durée de vie de l'huile d'olive.

Cette dernière a relativement une longue durée de vie, durant laquelle seulement un changement mineur des caractéristiques sensorielles peut avoir lieu.

Selon l'étude menée par Kiralan et al. (2009), une forte corrélation est observée entre la teneur en phénols totaux et en *o*-diphénols. La stabilité oxydative est positivement corrélée aux phénols totaux et aux *o*-diphénols. Dans notre cas on peut dire que plus on augmente la dose phénolique ajoutée aux huiles étudiées, plus le taux des *o*-diphénols augmente, et par conséquent les huiles préservent mieux leur stabilité oxydative.

L'huile perd sa fraîcheur, et se protège mal contre les dommages auto-oxydatifs, en présence d'une quantité élevée de tyrosol qui n'est pas un antioxydant aussi fort que l'hydroxytyrosol et les sécoiridoïdes avec le fragment hydroxytyrosol. Le taux de dégradation de l'hydroxytyrosol durant le chauffage de l'huile d'olive est élevé que celui de tyrosol, confirmant le pouvoir antioxydant élevé du premier (Bester et al., 2008).

II.5. Effets d'autres composés que les polyphénols sur la stabilité des huiles

- Le rapport vit E/AGPI dans l'huile d'olive (1.2) indique la bonne capacité protectrice des acides gras à doubles liaisons, sensibles à l'oxydation. Ce taux est plus élevé en comparaison avec d'autres huiles telles que l'huile de tournesol (0.912), huile de colza (0.588), et l'huile de soja raffinée (0.248), en outre, les composés phénoliques semblent plus efficaces que la vit E dans la protection d'huile d'olive contre l'oxydation (Cheikhousman et al., 2005). Les changements dans la teneur d' α -tocophérol et les phénols totaux des huiles ont été étudiés par Morelló et al. (2004). Le niveau d' α -tocophérol a diminué de 100 % dans toutes les huiles d'olive stockées durant 12 mois, à l'ombre et à une température ambiante, alors que les phénols totaux diminuent sensiblement. Cette diminution est le résultat du processus de décomposition qui se produit dans les formes les plus complexes, et l'activité d'oxydation. Ce fait suggère que l' α -tocophérol joue un rôle important comme antioxydant dans la période d'induction de l'oxydation, il est préférentiellement consommé pour protéger l'huile contre l'oxydation.
- Les caroténoïdes, et en particulier β -carotènes, sont des antioxydants efficaces en raison de leur capacité à piéger les espèces radicalaires oxygénées, et ils peuvent aussi agir comme des filtres de lumière (Van den Berg et al., 2000) cité par Morelló et al. (2004).
- Selon Gutfinger (1981), l'effet de la composition en acides gras sur le taux d'oxydation d'huile augmente en absence des polyphénols.

II.6. Différence entre l'activité antioxydante des antioxydants liposolubles synthétiques et naturels

D'après Pokorny (2007), tous les deux agissent par des mécanismes similaires de sorte que leur activité antioxydante ne dépende que de leur structure chimique et de leur polarité.

Les antioxydants synthétiques ont été développés pour la stabilisation des graisses et des huiles en vrac ou des aliments riches en lipides. Dans ces substrats, ils sont nettement plus efficaces que l' α -tocophérol et autres antioxydants naturels, qui sont habituellement moins liposolubles. La concentration la plus élevée autorisée par la loi (0.02 % dans le corps gras) est suffisante dans la plupart des cas des antioxydants synthétiques pour la stabilisation des aliments, sauf peut être pour le stockage extrêmement long ou friture.

Les antioxydants naturels, sont pour la plupart du temps beaucoup plus polaires que les antioxydants synthétiques, à l'exception des caroténoïdes, des tocophérols et leurs esters. Par conséquent, les antioxydants phénoliques naturels ne sont généralement pas suffisamment solubles dans la phase lipidique, ce qui limite leur efficacité dans les lipides (Pokorny, 2007). Il est nécessaire d'ajouter les antioxydants naturels à des concentrations élevées, tels que 0.1-0.5 % et même plus. Ce sont des substrats spécifiques, et leur activité antioxydante dépend beaucoup des synergistes présents tant dans les préparations antioxydantes que dans les aliments stabilisés.

Les antioxydants naturels et synthétiques possèdent une certaine toxicité (très faible) de sorte que des concentrations trop élevées sont indésirables, indépendamment de l'origine. Des apports importants des composés phénoliques pourraient donner lieu à des perturbations d'ordre nutritionnel et sanitaire par leur interaction avec les protéines. En

grande quantité, les antioxydants phénoliques réagissent avec les protéines et leur activité antioxydante diminue.

Ils peuvent aussi inactiver les enzymes (Pokorny, 2007). Des concentrations trop élevées peuvent être inefficaces et même indésirables, comme les radicaux libres ne devraient pas être complètement éliminés, mais uniquement leur concentration qui doit être réduite

conclusion générale

Les margines sont des effluents moyennement acides, riches en eau, en charge organique et particulièrement en polyphénols.

Avec le procédé d'extraction employé dans cette étude, à partir d'un litre de margine acide industrielle et traditionnelle, il est possible d'obtenir des extraits contenant 0.8 g et 0.5 g d'acide gallique.

Deux types de margines issues de la variété Chemlal montrent une différence de couleur et de composition, due en partie aux procédés d'extraction industriels et traditionnels utilisés et à la variabilité régionale.

Les extraits phénoliques des margines étudiées manifestent une forte activité antioxydante en comparaison avec le BHT, l'acide ascorbique et l' α -tocophérol. Le degré d'inhibition de l'oxydation lipidique varie en fonction de la concentration en composés phénoliques et de la méthode utilisée.

Dans les deux tests, l'extrait phénolique obtenu à partir de la margine traditionnelle (extrait 2) est l'antioxydant le plus actif suivi de l'extrait phénolique de la margine issue du procédé industriel (extrait 1). La capacité anti-oxydante (IC_{50}) et le pouvoir anti-radicalaire (PAR) les plus élevés sont observés chez l'extrait 2 (104.13 mg/l, 0.97) suivi de l'extrait 1 (123.83 mg/l, 0.80). Cependant, la différence entre les deux extraits phénoliques n'est pas significative. Nos résultats montrent aussi que les extraits phénoliques des margines présentent un pourcentage d'inhibition et un pouvoir réducteur plus importants que ceux du BHT.

La puissance anti-radicalaire et l'efficacité relative de ces extraits phénoliques des margines peuvent être attribuées à la présence des composés phénoliques, particulièrement les *ortho*-diphénols à savoir l'hydroxytyrosol, l'acide caféique, l'acide dihydroxyphénylacétique, ainsi que les flavonoïdes (quercétine, lutéoline). Ces composés sont dotés d'une forte activité de piégeage du radical DPPH.

L'analyse chromatographique par HPLC de l'extrait phénolique de la margine (1) acide et fraîche, utilisé comme additif antioxydant dans trois huiles végétales dans le but de valoriser les margines issues du procédé industriel d'extraction a révélé la présence de nombreux biophénols, parmi lesquels quatre composés sont identifiés et quantifiés: l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique et l'acide vanillique. La teneur en *o*-diphénols identifiés (hydroxytyrosol, acide caféique) est plus élevée chez l'extrait de margine acide (126.72 mg/l) que chez l'extrait de margine fraîche (93.04 mg/l).

L'acide caféique est le principal composé phénolique identifié dans les deux extraits phénoliques issus de margines acide et fraîche en suivant l'ordre suivant:

Acide caféique > Tyrosol > Hydroxytyrosol > Acide vanillique.

Ainsi, les margines acides montrent une concentration importante (203.36 mg/l) en ces composés que celle de la margine fraîche (163.84 mg/l), ce qui est probablement due à l'hydrolyse acide par l'HCl additionné aux margines.

Les composés ainsi identifiés au cours de cette étude ont fait preuve d'une activité antioxydante, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, cardio-protective, chimio-protective, antimicrobienne, anticancéreuse, antiproliférative et hypocholestérolémique selon plusieurs chercheurs (Léger (1999); Fki et al. (2005b); Granados-Pricipal et al. (2010); Briante et al. (2004); Han et al. (2009); Maiuri et al. (2005); Gutierrez et al. (2001); Goya et al. (2007)).

L'analyse de la variance révèle une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre les IP, K₂₃₂, K₂₇₀ des trois huiles témoins (HS, HT, HO) et ceux des huiles auxquelles sont ajoutées d'antioxydants naturels et synthétique. Ceci indique que toutes les doses choisies en polyphénols extraits des margines montrent une activité antioxydante.

On peut suggérer que pour le test de l'IP:

- La dose 200 ppm de BHT inhibe mieux la formation des hydroperoxydes que celle de 200 ppm d'extrait phénolique dans l'huile de soja et l'huile d'olive.
- La dose 200 ppm d'extrait phénolique empêche mieux la formation des hydroperoxydes que 200 ppm BHT dans l'huile de tournesol.
- L'antioxydant naturel employé a pu ralentir l'apparition des hydroperoxydes tout au long du stockage en comparaison avec le BHT.
- La stabilité des huiles est influencée positivement par l'addition des composés phénoliques obtenus à partir des margines.
- La concentration 800 ppm d'extrait phénolique présente le meilleur effet antioxydant suivie de 400 ppm EP pour toutes les huiles étudiées. Une meilleure activité antioxydante est enregistrée avec l'extrait phénolique pour une concentration de 800 ppm (66.54 méqO₂/kg) pour l'huile de soja, (121.44 méqO₂/kg) pour l'huile de tournesol et (17.32 méqO₂/kg) pour l'huile d'olive.
- L'huile d'olive résiste mieux à l'oxydation par rapport aux huiles végétales raffinées.
- En comparaison avec le BHT, l'extrait phénolique des margines montre un effet positif sur la stabilité des huiles raffinées. Cet effet est beaucoup plus marqué sur la stabilité de l'HO.
- La stabilité des huiles choisies additionnées d'extrait phénolique pourrait être expliquée par leur richesse en antioxydant phénolique, particulièrement en *ortho*-diphénols et leur effet de synergie.

D'après les résultats obtenus sur les diènes conjugués, on peut dire que la dose 800 ppm additionnée aux huiles enregistre la plus faible valeur suivie de 400 ppm d'EP, ce qui confirme les résultats du test de l'IP. La concentration 800 ppm d'EP présente le pouvoir antioxydant le plus élevé suivi de 400 ppm. En revanche, les triènes conjugués évoluent de manière assez faible pour toutes les huiles étudiées.

Les polyphénols extraits de margines peuvent diminuer la formation des produits primaires de l'oxydation lipidique, effet de protection dû aux composants *ortho*-diphénoliques identifiés (hydroxytyrosol, acide caféique).

L'analyse chromatographique par CPG a révélé une nette régression des acides gras polyinsaturés, notamment le C18:2 ω 6 chez les huiles raffinées additionnées d'extraits phénoliques. La meilleure protection des huiles contre l'oxydation des acides gras polyinsaturés est enregistrée en présence d'extrait phénolique des margines à une concentration de 400 ppm.

L'effet antioxydant des polyphénols n'est pas le même sur les huiles utilisées (huile de soja, de tournesol et d'olive). Le meilleur potentiel antioxydant des polyphénols est

signalé chez l'huile d'olive, alors que l'huile de tournesol montre une faible résistance à la peroxydation lipidique durant toute la période d'étuvage à 63°C. Cet effet peut être expliqué par la présence d'autres antioxydants que les composés phénoliques naturellement présents (l' α -tocophérol, caroténoïdes, β -carotène...etc.), ainsi qu'à la richesse de l'huile d'olive en acide oléique.

De ce présent travail on peut conclure que l'extrait phénolique des margines présente une forte capacité antioxydante qui peut stabiliser les huiles de soja et de tournesol raffinées, ainsi que l'huile d'olive par rapport à celle de l'antioxydant synthétique communément employé le BHT.

Nos résultats montrent par ailleurs, que les extraits polyphénoliques naturels à faible coût peuvent être produits à partir des margines disponibles pour une utilisation alternative aux antioxydants synthétiques, le BHT. De plus les dérivés de margines, l'hydroxytyrosol, l'acide caféique, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et d'autres *ortho*-diphénols peuvent potentiellement être utilisés comme antioxydants naturels alternatifs pour stabiliser les huiles comestibles à la place des antioxydants synthétiques.

Par conséquent, les margines peuvent être considérées comme une source potentielle d'antioxydants naturels. Ainsi, l'incorporation de tels extraits naturels en industries alimentaires pourrait contribuer significativement au bénéfice de la santé du consommateur et aussi prolonger la durée de stockage des produits alimentaires.

L'efficacité élevée des extraits phénoliques en tant qu'antioxydants est confirmée, ce qui encourage et favorise la perspective de leur commercialisation comme puissants antioxydants naturels des aliments en vue d'augmenter leur durée de stockage par la prévention de la peroxydation lipidique et la protection contre les dommages oxydatifs, mais il serait utile de veiller à préserver les antioxydants naturels au cours des procédés de transformation des aliments, à la fois pour allonger la durée de stockage du produit et, aussi pour leur permettre d'être présents dans l'organisme après absorption.

Eu terme de perspectives, il serait intéressant:

- d'étudier l'activité antimicrobienne des différents composants phénoliques des margines.
- d'étudier l'effet antioxydant des polyphénols sur l'organisme humain.
- d'étudier l'effet antioxydant des différentes molécules majeures des polyphénols isolées des margines (effet sélectif).
- d'étudier l'effet de synergie des composés phénoliques avec d'autres composés naturels; l' α -tocophérol, la chlorophylle, les caroténoïdes dans les huiles végétales.
- de tester d'autres méthodes d'extraction afin d'optimiser les rendements en polyphénols à haut pouvoir antioxydant.

Références bibliographiques

- Achak A., Ouazzani N., Yaacoubi A., Mandi L., 2008. Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Rev Sci. Eau*, **21**, 53-57.
- Aktas E. S., Imre S., Ersoym L., 2001. Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, **35** (9), 2336-2340.
- Alilat D., 2008. Tazmalt : Pollution par les margines. *El Watan* (Disponible sur: <http://www.la-kabylie.com/actu/dossiers/dossier-601-tazmalt-pollution-par-marges.html>), janvier 2009.
- Aliotta G., Fiorentino A., Oliva A., Temussi F., 2002. Olive oil mill wastewater: Isolation of polyphenols and their phytotoxicity in vitro. *Allelopathy J.* **9**, 9-17.
- Allouche N., Fki I., Sayadi S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 267-273.
- Almela L., Sánchez-Munoz B., Fernández-López J. A., Roca M. J., Rabe V., 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, **1120**, 221-229.
- Amarowicz R., Naczek M., Shahidi F., 2000. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *JAOCs*, **77**(9), 957-961.
- Amiot M. J., Fleuriet A., Macheix J-J., 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem*, **34**, 823-826.
- Anonyme., Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis, (Disponible sur <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro>). Janvier 2009.
- Argenson C., Régis C. S., Jourdain J. M., Vayesse P., 1999. L'olivier. Ed. Ctifl.
- Artajo L. S., Romero M-P., Suárez M., Motilva M-J., 2007. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*, **225**(5-6), 617-625.
- Assas N., Ayed L., Marouani L., Hamidi M., 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotricum candidum*. *Process Biochem*, **38**, 361-365.
- Assas N., Marouani L., Hamidi M., 2000. Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotricum candidum*. *Bioprocess Engineering*, **22**, 503-507.
- Atanassova D., Kefalas P., Psillakis E., 2005. Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environment International*, **31**, 275-280.
- Ayed L., Assas N., Sayadi S., Hamdi M., 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolorization of black olive mill wastewaters by *Geotricum candidum*. *Lett Appl Microbial*, **40**, 7-11.

- Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F., Ozer A., 2004. A review of waste management options in olive oil production. *Crit Rev Environ Sci Technol*, **34**, 209-247.
- Bandoniene D., Murkovic M., Pfannhauser W., Venskutonis P. R., Gruzdiene D., 2002. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research Technology*, **214**, 143 -147.
- Basdevant A., Laville M., Lerebours E., 2001. Traité de nutrition clinique de l'adulte. *Medecine-Sciences*. Flammarion. Paris.
- Ben tekaya I, Hassouna M., 2007. Effets des chlorophylles, du bêta-carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne. *OCL*, **14**(1), 60-67.
- Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Biguzzi B., Lercker G., Toschi., T. G., 2003. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, **985**, 425-433.
- Benitez F. J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J. L., 1997a. Treatments of wastewaters from olive oil mills by UV radiation and by combined ozone-UV radiation. *Toxicol Environ Chem*, **61**, 173-185.
- Benyahia N et Zein K., 2003. Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. *Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) (SBA) à Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II)*, 1-8
- Berset C., 2006. Antioxydants phénoliques-structure, propriétés et sources végétales, 265-290 in Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier (Paris), Editions Tec et Doc, 398.
- Bester E., Butinar B., Bucar-Miklavcic M., Golob T., 2008. Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry*, **108**, 446-454.
- Bianchi G., Nicoletta P., 1994. 3,4-Dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry*, **35**(5), 1335-1337.
- Blois M. S., 1958. *Nature*. **181**, 1199.
- Borja R., Alba J., Banks C. J., 1997. Impact of the main phenolic compounds of mill waste water (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochemistry*, **32**, 121-133.
- Boskou D., 1996. Olive oil: chemistry and technology. Champaign, IL: AOCS Press.
- Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S., 2008a. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, **108**, 253-262.
- Bouaziz M., Lassoued S., Bouallagui Z., Smaoui S., Gargoubi A., Dhouib A., Sayadi S., 2008b. Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**, 9238-9246.

- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u -Technol*, **28**, 25-30.
- Briante R., Febbraio F., Nucci R., 2004. Antioxidant/Prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu²⁺-induced oxidation of human Low-Density Lipoprotein (LDL). *Chemistry and Biodiversity*, **1**, 1716-1729.
- Briante R., Patumi M., Limongelli S., Febbraio F., Vaccaro C., Di Salle A., La Cara F., Nucci R., 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, **162**, 791-798.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales. 3^e édition. Technique et Documentation, Paris.
- Cabrera F., Toca G C., Diaz E., De Arambarri. P. 1984. Acid mine-water and agricultural pollution in a river skirting the Doñana National Park (Guadamar river, South West Spain). *Water Res*, **18**(12), 1469-1482.
- Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F., 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphénols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, **31**(12), 4125-4128.
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M. A., Cristinzio G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol*, **79**, 393-398.
- Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S. R., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B., 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, **50**, 959-966.
- Catalano L., Franco I., De Nobili M., Leita L. 1999. Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparaison of the Folin-Ciocalteau and HPLC methods. *Agrochimica*, **43**, 193-205.
- Cereti C. F., Rossini F., Federici F., Quaratino D., Vassilev N., Fenice M., 2004. Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertilizer for wheat (*Triticum durum* Desf). *Bioresour Technol*, **91**, 135-140.
- Chavéron H., 1999. Molécules toxiques dans « Introduction à la toxicologienutritionnelle ». Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 98.
- Cheikhousman R., Zude M., Bouveresse D. J-R., Léger C. L., Rutledge D. N., Birlouez-Aragon I., 2005. Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 1438-1443.
- Chevolleau S., Debal A., Ucciani E., 1992. *Revue Française des Corps Gras*, 1-2, 3-8.
- Chikhoun A., 2007. Huiles essentielles de thym et d'origan: Etude de la composition chimique, de l'activité antioxydante et antimicrobienne. Thèse magister, INA, El Harrach, Algérie, 155.
- Chimi H., 2006. Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Transfert de Technologie en Agriculture*, IAV Hassan II, Rabat, n°.141, 4.
- Chimi H., Sadik A., Le Tuour B., Rahmani M., 1988. Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oléuropéine et du BHT. *Rev Fr Corps Gras*, **35**, 339-344.

- CNUCED., Huile d'olive. (Disponible sur: <http://r0.unctad.org/infocomm/francais/olive/technologie.htm>). Mars 2010.
- Cohen M., 2002. Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. *La Phytothérapie Européenne*, **6**, 18-26.
- Colarieti M. L., Toscano G., Greco G. Jr., 2006. Toxicity attenuation of olive mill wastewater in soil slurries. *Environ Chem Lett*, **4**, 115-118.
- Conde E., Cara C., Moure A., Ruiz E., Castro E., Dominguez H., 2008. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, 1-7. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.017
- Conseil Oléicole International (COI). (Disponible sur <http://www.internationaloliveoil.org/>). Février 2011.
- Crognale S., D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Quarantino D., Petruccioli M., 2006. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *J Chem Technol Biotechnol*, **81**, 1547-1555.
- Cuéllar L. R., 2000. Catalogue mondial des variétés d'olivier. *Conseil Oléicole International*. Madrid (Espagne), 360.
- Cuvelier M-E., Martel P., 2002. Additifs antioxygènes *In: Multon J-L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 3e édition*. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 207-235.
- D'Annibale A., Crestini C., Viniciguerra V., Sermanni G. G., 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot-fungus. *Journal of Biotechnology*, **61**, 209-218.
- D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Sermanni G. G., Petruccioli M., Vassilev N., 2003. Residues of olive oil extraction process: possible biotechnological approach. *Science and technology*, **85**, 1-4.
- D'Annibale A., Casa R., Pieruccetti F., Ricci M., Marabottini R., 2004. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, **54**, 887-894.
- De La Puerta R., Gutierrez V. R., Hoult J. R. S., 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 445-449.
- De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V., Ranalli G., 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, **226**, 653-659.
- De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R., 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858-867.
- DellaGreca M., Previtera L., Temessi F., Carrelli A., 2004. Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*, **15**, 184-188.
- DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L., Temussi F., 2001. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wastewaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**, 352-359.

- Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Informations (D.S.A.S.I.), 2010. Ministère de l'agriculture et du développement rural, document interne. Algérie.
- Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Informations (D.S.A.S.I.), 2003. *Statistiques agricoles*, Ministère de l'agriculture et du développement rural, document interne. Algérie, 36.
- Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Informations (D.S.A.S.I.), 2006. Ministère de l'agriculture et du développement rural, document interne. Algérie.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F., Stocker P., 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, **224**, 801-809.
- El Hadrami A., Belaqqiz M., El Hassni M., Hanifi S., Abbad A., Capasso R., Gianfreda L., El Hadrami I., 2004. Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some Mediterranean crops. *Journal of Agronomy*, **3**(4), 247-254.
- Farag R., El-Baroty G., Basuny A., 2003. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 81-87.
- Ferreira I. C. F. R., Barros L., Soares M. E., Bastos M. L., Pereira J. A., 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, **103**, 188–195.
- Fezzani B., Ben Cheikh R., 2007. Anaerobic codigestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a tubular digester at mesophilic temperature. *Bioresource Technology*, **98**, 769-774.
- Filidei S., Masciandaro G., Ceccanti B., 2003. Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: evaluation of wastewater organic load and phytotoxicity reduction. *Water, Air and Soil Pollution*, **145**, 79-94.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Lavorgna M., parrella A., Temussi F., 2004. Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5151-5154.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A., Temussi F., 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *Journal of Agricultural Food Chem.*, **51**, 1005- 1009.
- Fki I., Allouche N., Sayadi S., 2005a. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils : a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, **93**, 197-204.
- Fki I., Bouaziz M., Sahnoun Z., Sayadi S., 2005b. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of *Chemlali* olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **13**, 5362-5370.
- Food and Agriculture Organisation., 2003. FAOSTAT database. Disponible sur <http://www.fao.org>. 2003, juin 2010.

- Food and Agriculture Organisation., 2006. FAOSTAT database. Disponible sur <http://faostat.fao.org/> juin 2010.
- François R., 1974. Les industries des corps gras. Techniques et Documentation.
- Fung D., 1997. Improlive 2000. Improvement of treatments and validation of the liquid solide waste water from the tow-phase olive oil extraction.(24/2/2004) (Disponible sur <http://www.ucm.es/info/improliv/index.htm>), Octobre 2010.
- Galli C., Visioli F., 1999. Antioxidant and other properties of phenolics in olives/olive oil, typical compounds of the Mediterranean diet. *Lipids*, **34**, S23-S26.
- Garcia A., Brenes M., Martínez F., Alba J., Garcia P., Garrido A., 2001. High-performance chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *JAOCS*, **78**(6), 625-629.
- García-Gómez A., Roig A., Bernal M. P., 2003. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, **86**, 59-64.
- Ghattas D., 2004. Valorisation des margines par digestion anaérobie. Mémoire DEA, IRAL (Liban), 39 p.
- Ghedira K., 2008. L'olivier. *Phytothérapie*, **6**, 83-89.
- Giovannini C., Straface E., Modesti D., Coni E., Cantafora A., De Vincenzi M., et al., 1999. Tyrosol, a major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, **129**, 1269-1277.
- Gordon., M. H., 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: Hudson B.J.F. *Food antioxidants*. Elsevier Applied Science, Londres, 1-18.
- Gortzi O., Lalas S., Chatzilazarou A., Katsoyannos E., Papaconstantinou S., Dourtoglou E., 2008. Recovery of Natural Antioxidants from olive mill wastewater using genapol-X080. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**(2), 133- 140.
- Goya L., Mateos R., Bravo L., 2007. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*, **46**(2), 70-78.
- Granados-Pricipal S., Quiles J. L., Ramirez-Tortosa C. L., Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M. C. 2010. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, **68**(4), 191-206.
- Greco G. J. R., Toscano G., Cioffi M., Gianfreda L., Sannino F., 1999. Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water. Research*, **33**, 3046-3050.
- Guerrero J. L. G., Guirado C. M., Fuentes M. M. R., Pérez A. C., 2006. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annum*) varieties. *European Food Research and Technology*, **224**, 1-9.
- Gülç#n I., Beydemir S, Alici H. A., Elmastas M., Büyükokuroglu M. E., 2004. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, **49**, 59–66.
- Gutfinger T., 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **58**, 966-968.
- Gutierrez V. R., De la Puerta R., Catalá A., 2001. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxydation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **217**, 35-41.

- Halliwell B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, **9**, 1-32.
- Hamdi M., 1992. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl Biochem Biotechnol*, **37**, 155.
- Hamdi M., 1996. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, **31**(2), 105-110.
- Han J., Tolarete T. P. N. Yamada P., Isoda H., 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, **59**, 45-53.
- Hanafi S., El Hadrami I., 2009. Olive mill wastewaters: Diversity of the fatal product in olive oil industry and its valorization as agronomical amendment of poor soils: A review. *Journal of Agronomy*, **8**(1), 1-13.
- Hashimoto T., Ibi M., Matsuno K., Nakashima S., Tanigawa T., Yoshikawa T., Yabe-Nishimura C., 2004. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(5), 555-564.
- Haslam E., 1993. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. *Wiley*, Chichester.
- Hattaka A., 1994. Lignin degrading enzymes from selected white-rot fungi. Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev*, **13**, 125-135.
- Helme J-P, Chazan J-B., Perrin J-L., 1999. Les antioxydants, 337-352 in Martini M-C et Seiller M., 1999. Actifs et additifs en cosmétologie. Edition Tec & Doc (Paris), 656 . Disponible sur: <http://www.scc-quebec.org/archives/AntiOxydant4textes.pdf>
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 3-6.
- Hirose M., Masuda A., Imaida K., Kagawa M., Ito N., 1987. Induction of forestomack lesions in rats by oral administration of naturally occurring antioxidants for 4 weeks. *Japan Journal of Cancer Research*, **78**, 317-321.
- Huang C. L., Sumpio B. E., 2008. Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J Am Coll Surg*, **3** (207), 407-416.
- Inan I., Diamoglo A., Simsek H., Karpuzcu M., 2004. Olive mill wastewater treatment by means of electro-coagulation, *Sep. Purif Technol*, **36**, 23-31.
- Iqbal S., Bhangar M. I., 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, **100**, 246-254.
- Israilides C. J., Vlyssides A. G., Mourafeti V. N., Karvouni G., 1997. Olive oil wastewater treatment with the use an electrolysis system; *Bioresource Technol*, **61**, 163-170.
- Ito N., Hirose M., Fukushima S., Tsuda H., Shirai T., Tatematsu M., 1986. Studies on antioxidants: their carcinogenesis and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 1099-1102.
- Jaouani A., Vanthourhout M., Penninckx M. J. 2005. Olive oil mill wastewater purification by combination of coagulation-flocculation and biological treatments. *Environ Technol*, **26**, 633-641.
- Johnson D. R., Gu L. C., 1988. In: Autoxidation and Antioxidants, John Wiley, New York, 433-448.

- Kaliora C.A., Dedoussis G. V. Z., Schmidt H., 2006. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, **187**, 1-17.
- Kamal-Eldin A., 2006. Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Technol*. **108**, 1051-1061.
- Kapellakis L. E., Tsagarakis K. P., Crowther J. C., 2008. Olive oil history, production and by-product management. *Review in environmental science biotechnology*, **7**(1), 1-26.
- Kerboua M., 2003. La production et la consommation d'huile d'olive à l'horizon 2010. *Olivæ*, **99**, 56-58.
- Khoufi S., Aloui F., Sayadi S., 2008. Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electrocoagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *J Hazard Mater*, **151**, 531-539.
- Kim H., Kim S-G., Choi Y., Jeon H-S., Lee J., 2008. Changes in tocopherols, tocotrienols, and fatty acid contents in grape seed oils during oxidation. *J Am Oil Chem Soc*, **85**, 487-489.
- Kiralan M., Bayrak A., Özkaya M. T., 2009. Oxidation stability of virgin olive oils from some important cultivars in east mediterranean area in Turkey. *J Am Oil Chem Soc*, **86**, 247-252.
- Knupp G., Rücker G., Ramos-Cormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M., Ossenkop T., 1996. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International biodeterioration and biodegradation*, **38**, 277-282.
- Kosar M., Altintas A., Kirimer N., Baser K. H. C., 2003. Determination of the free radical scavenging activity of Lycium Extracts. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**(6), 531-535.
- Ku C. S., Mun S. P., 2008. Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *pinus radiata* bark. *Wood Sci Technol*, **42**, 47-60.
- Lacomelli A., 2000. Olive mill waste water & SAP adopted by BACRON contracting parties. Work Shop on Agro-industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry. Beirut- Lebanon, 4-6 December.
- Lafka T-I., Sinanoglou V., Lazos E. S., 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, **104**, 1206-1214.
- Le Floch F., Tena M. T., Rios A, Valcarcel M., 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, **46**, 1123-1130.
- Le Tutour B., Guedon D., 1992. Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, **31**, 1173-1178.
- Lee-Huang S., Zhang L., Huang P. L., Chang Y-T., Huang P. L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 1029-1037.
- Léger C-L., 1999. Co-produits de l'huilerie d'olive : les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *Oléagineux, corps gras, lipides*, **6**(1), 60-63.

- Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M., 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, **75**, 501-507.
- Liberatore L., Procida G., d'Alessandro N., Cichelli A., 2001. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil, *Food Chemistry*, **73**, 119-124.
- Liu M. J., Li J. X., Guo H. Z., Lee K. M., Qin L., Chan K. M., 2003. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane and fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Science*, **73**, 883-892.
- Liu R. H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, **134**, 3479S-3485S.
- Liu R. H., 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, **46**, 207-219.
- Loliger J., 1991. Use of antioxidants in food. In Arouma O. I., Halliwell B (Eds). *Free radical and Food Additives*, London: Taylor Francis, 121-150.
- Lopez M. J., Ramos-Cormenzana A., 1996. Xanthan production from olive mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38**, 263-270.
- Macheix J-J., Fleuriet A., Billot J., 1990. Fruits phenolics. CRC Press, Boca Raton, Floride, 1-103.
- Macheix J-J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006. Composés phénoliques dans les plantes. Structure, biosynthèse, répartition et rôles, 1-28 in Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier (Paris), Editions Tec et Doc, 398.
- Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**, 1-19.
- Maiuri M. C., De Stefano D., Di Meglio P., Irace C., Savarese M., Sacchi R., Chinelli M. P., Carnuccio R., 2005. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **371**, 457-465.
- Manach C., Scalbert A., Remesy C., Morand C., 2006. Consummation et biodisponibilité des polyphénols, 361-380 in Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier (Paris), Editions Tec et Doc, 398.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P., 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, **89**, 411-420.
- Mantzavinos D., Kalogerakis N., 2005. Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes- an overview. *Environ Int*, **31**, 289-295.
- Marques I. P., 2000. Volorização de recursos poluidores por digestão anaeróbia. Água ruça e efluente suinicola. Doctoral thesis, Univ. Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.

- Marques I. P., 2001. Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, **137**, 233-239.
- Marques P., Rosa M. F., Mendes F., Collares P. M., Blanco J., Malato S., 1997. Wastewater detoxification of organic and inorganic toxic compounds with solar collectors. *Desalination*, **108**, 213-220.
- Martinez N. L., Garrido H. S. E., 1994. El Alpechin. Un problema medioambiental en vias de solución (I). *Quibal*, **41**, 755-765.
- Mateos R., Espartero J. L., Trujillo M., Rios J. J., León-Camacho M., Alcudia F., Cert A., 2001. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 2185-2192.
- McNamara C. J., Anastasiou C. C., O'Flaherty V., Mitchell R., 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodet Biodeg*, **61**, 127-134.
- Mechichi T., Sayadi S., 2005. Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Proc Biochem*, **40**, 139-145.
- Mendil M., Sebai A., 2006. Catalogue des variétés algériennes de l'olivier. Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la vigne (ITAF). *Dépôt légal*, n°. **1840**, 100.
- Mohammedi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Univ. Abou bakr belkaïd Tlemcen, Faculté des sciences, 155.
- Morelló J-R., Motilva M-J., Tovar M-J., Romero M-P., 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, **85**, 357-364.
- Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J., 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **82**, 25-39.
- Moussaoui R., 2007. Valorisation des sous produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammri, Tizi Ouzou, Algérie, 133 pp.
- Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M., Katzogiannos E., 2004. Analysis of minor components in olive oil. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **61**, 155-160.
- Nassif D., 2004. Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire DEA, IRAL (Liban), 40.
- Nefzaoui A., 1983. Utilisation des sous produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Division de la production et de la santé animale. F.A.O., Rome.
- Nenadis N., Boyle S., Bakalbassis E. G., Tsimidou M., 2003. An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic Acids and related monophenols. *JAOCS*, **80**, 451-458.
- Nenadis N., Tsimidou M., 2002. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *JAOCS*, **79**(12), 1191-1195.

- Niaounakis M., Halvadakis C. P., 2004. Olive-mill waste management: literature review and patent survey. 1st Ed, Typothito-George Dardanos Publications, Athens ISBN: 960-402-123-0.
- Obied H. K., Allen M. S., Bedgood D. R., Prenzler P. D., Robards K., Stockmann R., 2005a. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823-837.
- Obied H. K., Prenzler P. D., Robards K., 2008. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chemistry*, **111**, 171-178.
- Oboh G., 2006. Antioxidants properties of some commonly consumed and underutilized tropical legumes. *Eur Food Res Technol*, **224**, 61-65.
- Oyaizu M., 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan journal of nutrition*, **44**, 307-314.
- Paixão S. M., Anselmo A. M., 2002. Effect of olive mill wastewaters on the oxygen consumption by activated sludge microorganisms: An acute toxicity test method. *Journal of Applied Toxicology*, **22**, 173-176.
- Paixão S. M., Mendoca E., Picado A., anselmo A. M. 1999. Acute toxicity evaluation of olive mill wastewaters: A comparative study of three aquatic organisms. *Environ. Toxicol*, **14**, 263-269.
- Paredes C., Roig A., Bernal M. P., Sánchez-Monedero M. A., Cegarra J., 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils*, **32**, 222-227.
- Paredes M. J., Moreno E., Ramos-Cormenzana A., Martinez J., 1987. Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, **16**(7), 1557-1564.
- Patumi M., Terenziani S., Ridolfi M., Fontanazza G., 2003. Effect of fruit stoning on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**, 249-255.
- Pokorny J., 1987. Major factors affecting the autoxidation in lipids. In: Chan H. Autoxidation of unsaturated lipids. Academic Press, Londres, 141-206.
- Pokorny J., 2007. Are natural antioxidants better-and safer- than synthetic antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **109**, 629-642.
- Prior R. L., Wu X. L., Shaich K., 2005. *J. Agric. Food Chem*, **53**, 4290.
- Przybylski R., Lee Y.C., Eskin N.A.M., 1998. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. *JAOCS*, **75**(11), 1595-1601.
- R. R., 2009. Tizi-Ouzou: 148 huileries fermées. *L'Expression* (Disponible sur: <http://www.lexpressiondz.com/article/7/2009-11-25/70051.html>), Octobre 2010.
- Rahmani M., 2007. Méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. *Les Techniques de Laboratoire*, n°.2. 18-21.
- Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jiménez B., Garcia-Pareja M. P., 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int Biodet Biodeg*, **38**, 283-290.
- Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M., López M. J., 1995. Bioremediation of alpechin. *Int. Biodeter. Biodegr*, **35**, 245-268.

- Rana G., Rinaldi M., Introna M., 2003. Volatilization of substances after spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **96**, 49-58.
- Ranalli A., Lucera L., Contento S. 2003. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7636-7641.
- Recueil normes., 2000. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés. Tome (1): corps gras et produits dérivés. Ed. Afnor, Paris (<http://www.afnor.fr>).
- Rees R., Castle K., 2002. Nitrogen recovery in soils amended with organic manures combined with inorganic fertilisers. *Agronomie*, **22**, 739-746.
- Rivas J., Beltran F., Acedo B., Gimeno O., 2000. Two step waste water treatment: Sequential ozonation-Aerobic biodegradation. *Ozone Science and Engineering*, **22**, 617-636.
- Rodis P. S., Karathanos V. T., Mantzavinou A., 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.
- Rodríguez G., Lama A., Trujillo M., Espartero J., L., Fernández-Bolaños J., 2009. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Science and Technology*, **42**, 483-490.
- Rodríguez G., Rodríguez R., Fernández-Bolaños J., Guillén R., Jiménez A., 2007. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *Eur Food Res Technol*, **224**, 733-741.
- Roig A., Cayuela M. L., Sánchez-Monedero M. A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, **26**, 960-969.
- Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Galardi C., Vincieri F. F., Liberatore L., Cichelli A., 2001. HPLC and HRGC Analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia*, **53**(5/6), 279-284.
- Ryan D., Antolovich M., Robards K., Lavee S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.
- Ryan D., Robards K., 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123**, 31R-44R.
- Sahari M. A., Ataii D., Hamed M., 2004. Characteristics of tea seed oil in comparison with sunflower and olive oils and its effect as a natural antioxidant. *JAOCS*, **81**(6), 585-588.
- Salghi R., Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires, GPEE, 1ère année, ENSA Agadir, 1-33. (Disponible sur: <http://www.ensa-agadir.ac.ma/gpee/download/Analyse%20physico-Chimie.pdf>), Février 2009.
- Saraoui M., Ministère de l'agriculture et du développement rural, document interne, Algérie.
- Sayadi S., Fki I., Bouaziz M., Allouche N., 2004. Antioxidants from olives: Tunisia. *Examples of the Development of Pharmaceutical Products from Medicinal Plants*, **10**, 101-108.
- Scherer R., Godoy H. T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **112**, 654-658.

- Scioli C., Vollaro L., 1997. The use of *yarrowia lilyolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research*, **31**(10), 2520-2524.
- Senesi N., 1989. Composted materials as organic fertilizers. *Sci. Total. Environ*, **81/82**, 521-542.
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Macchioni A., Montedoro G., 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Food Chem*, **47**, 12-18.
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruañas R., Garan M. A., 2001. Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Sci Total Environ*, **279**, 207-214.
- Soler-Rivas C., Espin J. C., Wichers H. J., 2000. *J Sci Food Agric*, **80**, 1013-1023.
- Sousa A., Ferreira I. C. F. R., Barros L, Bento A, Pereira J. A., 2008. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”, *LWT*, **41**, 739–745
- Standard methods for the examination of water and wastewater., 1992. American Public Health Association 17th edition.
- Talantikite M., Talantikite S., Azzout B., 1993. Influence du traitement thermique sur l'huile d'olive. Comparaison avec les huiles polyinsaturées : le colza, primor et la soja. *Olivæ*. **46**, 26-29.
- Tejada M., Gonzales J. L., 2003. Application of a byproduct of the two steps olive mill process on rice yield. *Agronomica*, **47**, 94-102.
- Thamavit W., Tatematsus M., Ogiso T., Mera Y., Tsuda H., Ito N., 1985. Dose-dependant effects of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin in induction of foci of rat liver cells containing the placental form glutathione S-transferase. *Cancer Letters*, **45**, 93-101.
- Tomati U., Galli E., Di Lena G., Buffone R., 1991. Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil wastewaters. *Agrochimica*, **35**, 273-279.
- Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, **12**, 484-496.
- Vazquez Roncero A., Janer del Valle C., Janer del Valle M. L., 1973. Determinación de los polifenols del aceite de oliva, *Ibid* . *Grasas Aceites (Seville)*, **24**, 350-357.
- Veillet S., Tomao V., Bornard I., Ruiz K., Chemat F., 2009. Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. *Comptes rendus chimie*, **12**(8), 895-904.
- Visioli F., Galli C., 2001. The role of antioxidants in the Mediterranean diet. *Lipids*, **36**, 549-552.
- Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. F., Galli C., 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3397-3401.

- Vlyssides A. G., Bouranis D. L., Loizidou M., Karvouni G., 1996. Study of a demonstration plant for the co-composting of olive-oil-processing wastewater and solid residue. *Bioresource Technol*, **56**, 187-193.
- Vlyssides A. G., Loizides M., Karlis P. K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, **12**, 603-611.
- Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C. F., 1997. Comparison of antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibosed tea (*Aspalathon linearis*), #-tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 632-638.
- Wolff J. P., 1968. Manuel d'analyse des corps gras. Ed. Azoulay, Paris.
- X Hou D., 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, **3**(2), 149-159.
- Yangui T., Dhouib A., Rhouma A., Sayadi S., 2009. Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry*, **117**, 1-8.
- Yanishlieva N. V., Marinova E. M., 2001. Stabilisation of edible oils with natural antioxydants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 752-767.
- Yen G. C., Duh P. D., 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 629-632.
- Ye#ilada Ö., #ik S., #am M., 1999. Treatment of olive oil wastewater with fungi. *Tr. Journal of Biology*, **23**, 231-240.
- Zenjari B., Nejmeddine A., 2001. Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: Laboratory experiments. *Agronomie*, **21**, 749- 755.

Annexes

Annexe I

Tableau A. Les absorbances à 725 nm en fonction des concentrations d'acide gallique

Concentrations (mg Ac Gal/l)	0.6	1.2	1.8	3	6
Absorbances	0.064	0.122	0.19	0.311	0.619

Tableau B. Les absorbances à 370 nm en fonction des concentrations d'acide gallique

Concentrations (mg Ac Gal/l)	8	16	24	40	80
Absorbances	0.102	0.213	0.327	0.592	1.094

Tableau C. Réduction de l'absorbance du DPPH en solution en fonction du temps

Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales

Temps (min)	Ext 1	Ext 2	BHT	DL- α -Toc	Ac Asc
0	0.735	0.739	0.725	0.768	0.745
1	0.655	0.693	0.685	0.683	0.473
2	0.602	0.682	0.671	0.684	0.383
3	0.569	0.657	0.656	0.648	0.235
4	0.543	0.635	0.644	0.588	0.186
5	0.523	0.61	0.635	0.558	0.181
6	0.506	0.59	0.623	0.519	0.159
7	0.489	0.569	0.611	0.442	0.168
8	0.475	0.557	0.599	0.457	0.18
9	0.462	0.542	0.589	0.492	0.171
10	0.451	0.532	0.579	0.485	0.171
11	0.44	0.518	0.569	0.463	0.173
12	0.431	0.508	0.559	0.461	0.173
13	0.422	0.501	0.55	0.461	0.173
14	0.414	0.491	0.542	0.461	0.173
15	0.406	0.483	0.542	0.454	0.173
16	0.406	0.483	0.542	0.456	0.173
17	0.406	0.483	0.542	0.455	0.173
18	0.387	0.483	0.542	0.451	0.173
19	0.387	0.483	0.542	0.452	0.173
20	0.376	0.451	0.498	0.45	0.174
21	0.376	0.451	0.498	0.45	0.174
22	0.376	0.451	0.498	0.45	0.174
23	0.359	0.451	0.498	0.45	0.174
24	0.359	0.451	0.498	0.45	0.174
25	0.351	0.424	0.468	0.445	0.174
30	0.333	0.402	0.443	0.441	0.174
35	0.318	0.382	0.421	0.437	0.174
40	0.305	0.366	0.403	0.434	0.174
45	0.295	0.352	0.388	0.432	0.174
50	0.295	0.338	0.388	0.432	0.174
55	0.295	0.338	0.388	0.432	0.174
60	0.295	0.338	0.388	0.432	0.174

Tableau D. Résultat du test antioxydant exprimant l'IC₅₀ et le pouvoir antiradicalaire

Antioxydants	IC ₅₀ (mg/l)	PAR
Extrait 1	126.72 121.82 122.95	0.78 0.82 0.81
Extrait 2	118.5 90.88 103.01	0.84 1.10 0.97
BHT	145.1 149.12 139.9	0.68 0.67 0.79
Acide Ascorbique	103.76 118.65 126.32	0.96 0.84 0.79
DL- α -Tocophérol	196.43 200.6 200.47	0.50 0.49 0.49

Annexe II

Les chromatogrammes (CPG)

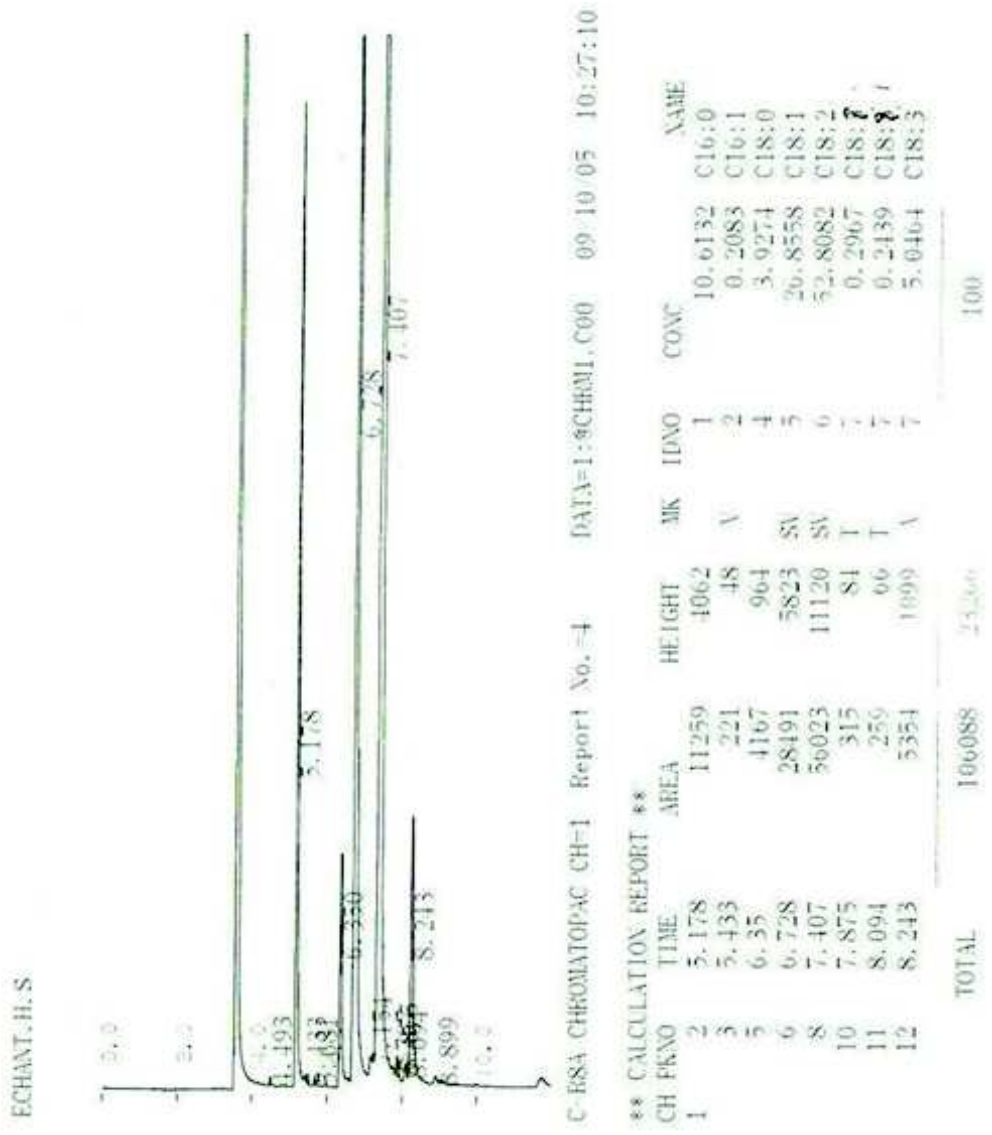


Figure 1. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja 0 ppm (0 jours).

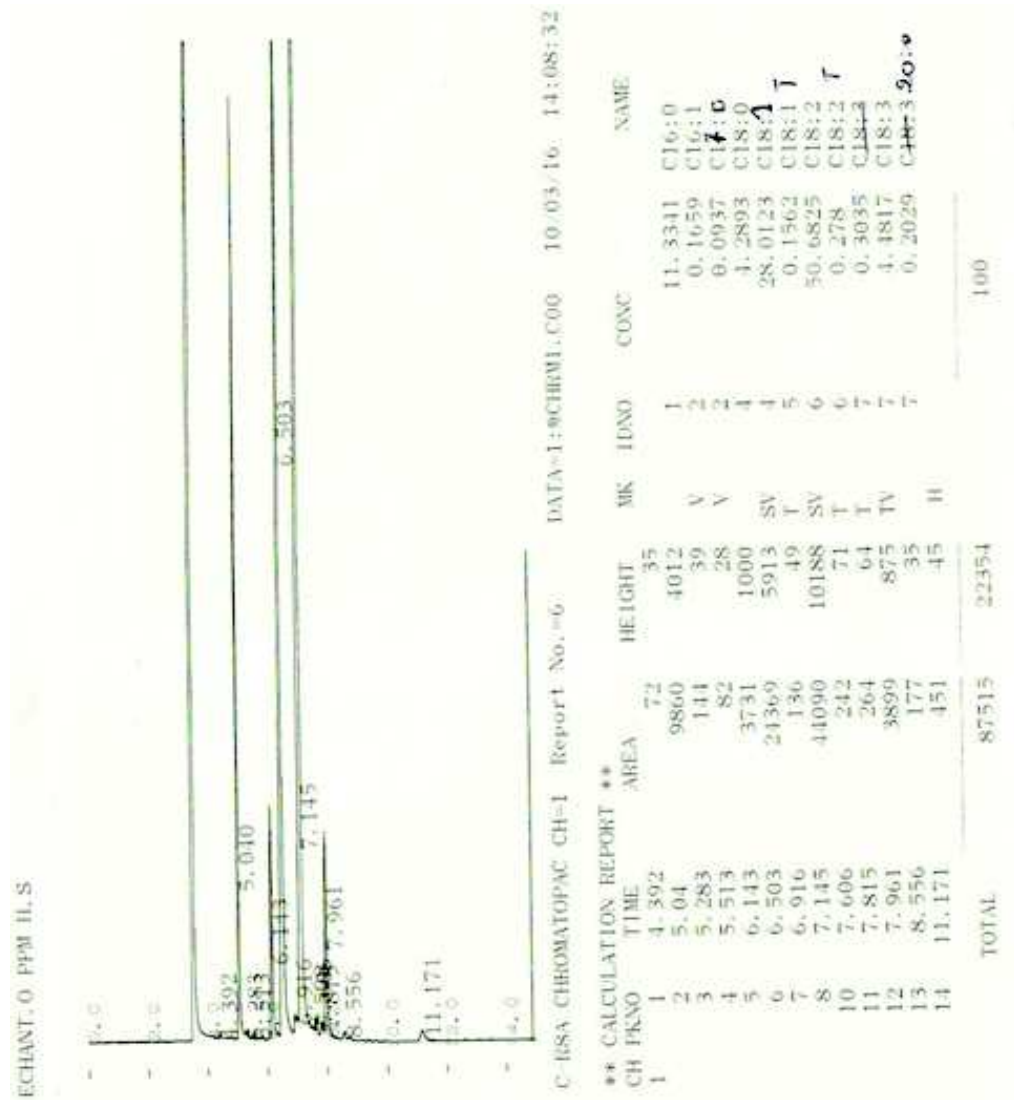


Figure 2. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja 0 ppm (20 jours).

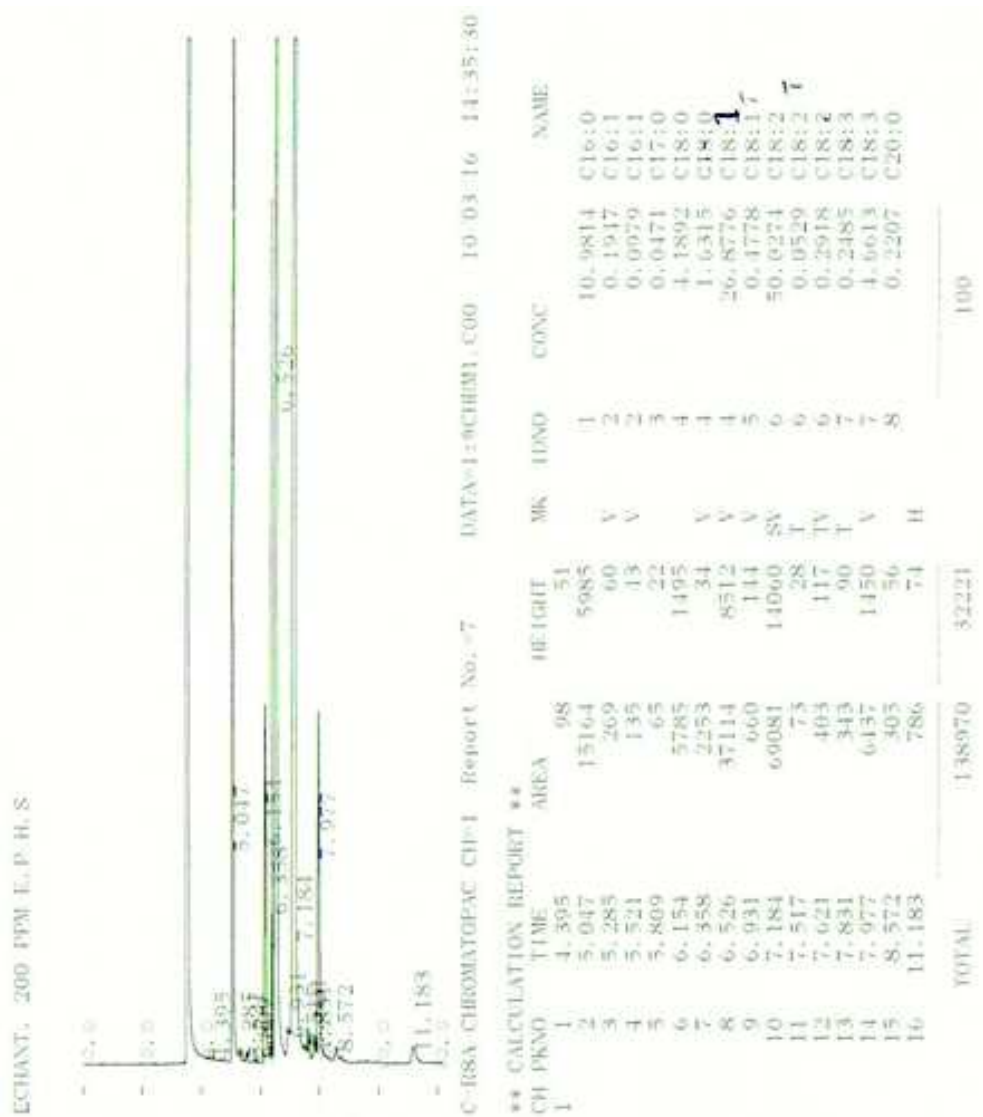


Figure 3. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja 200 ppm (20 jours).

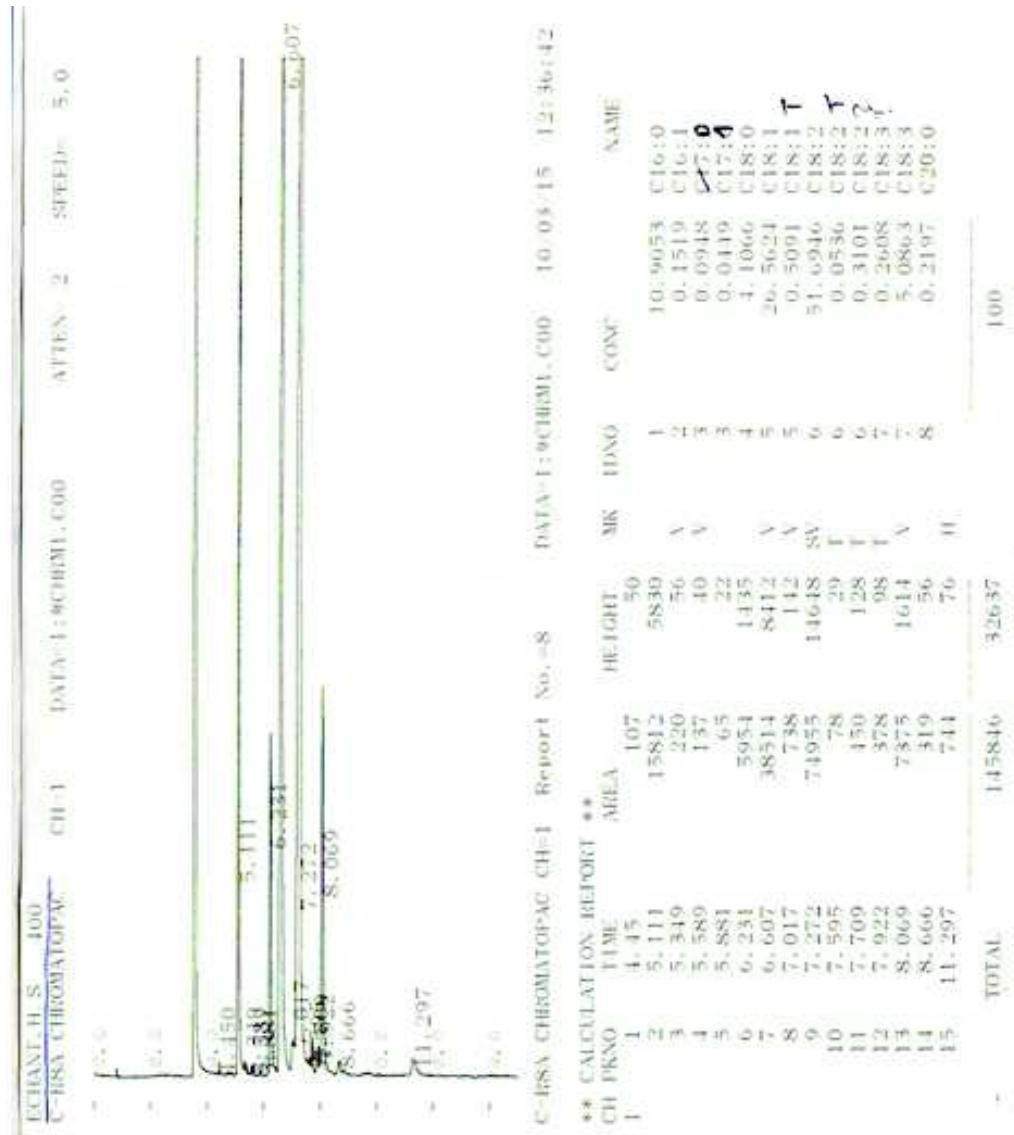


Figure 4. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja 400 ppm.

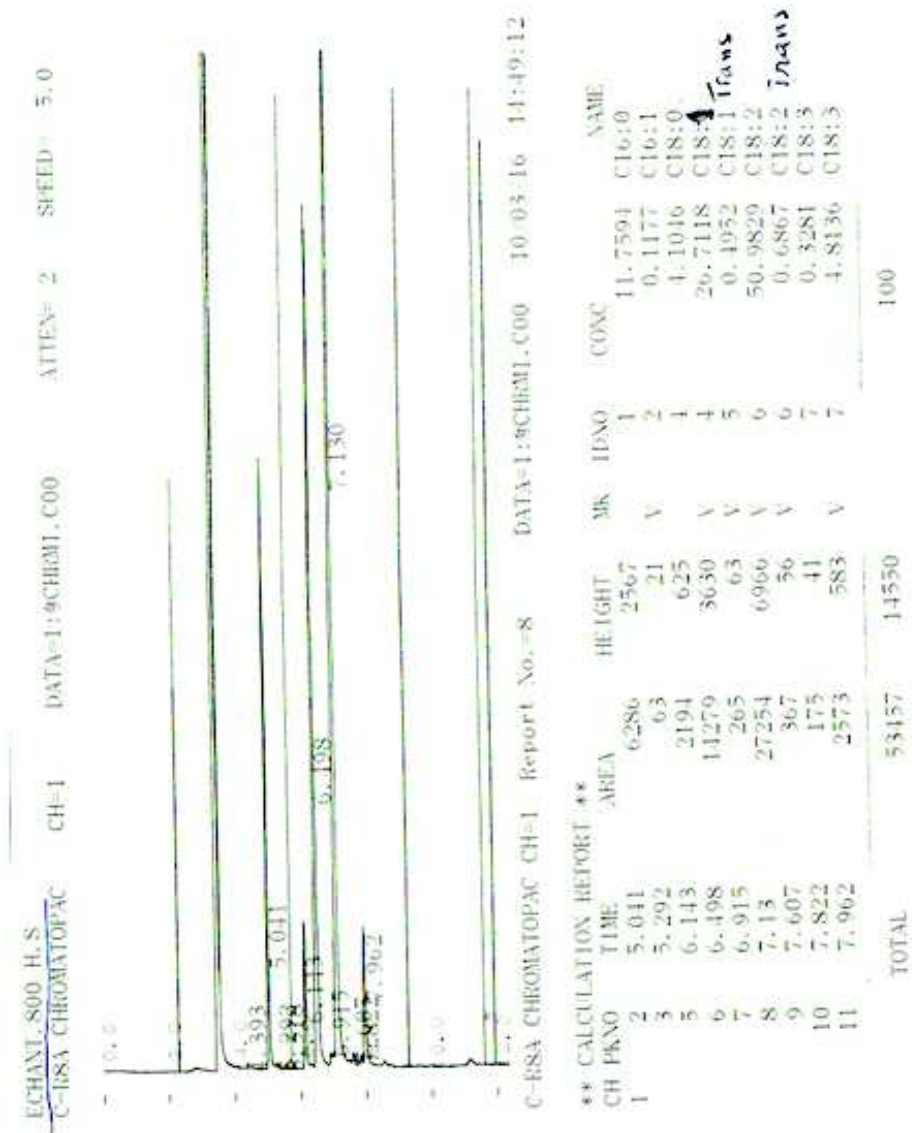


Figure 5. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja 800 ppm.

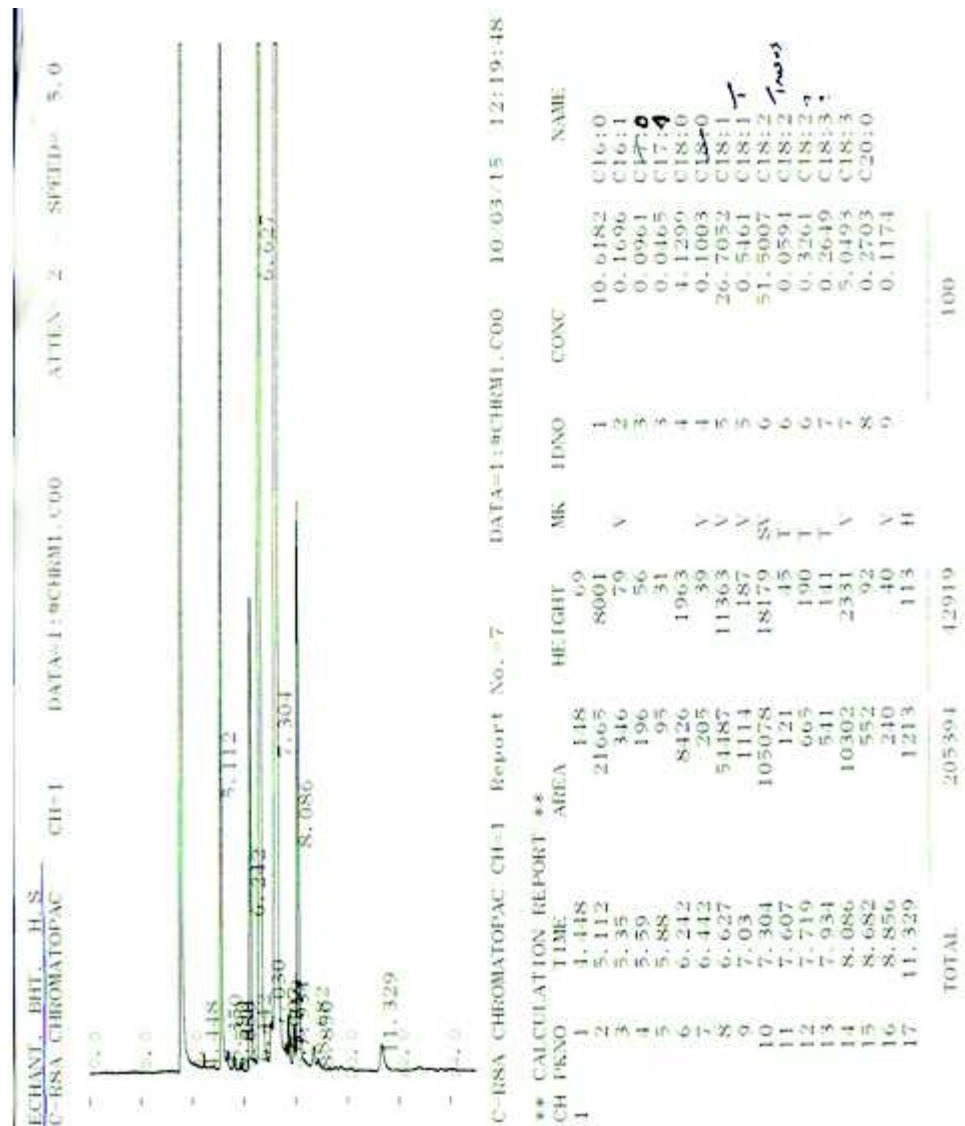


Figure 6. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de soja BHT

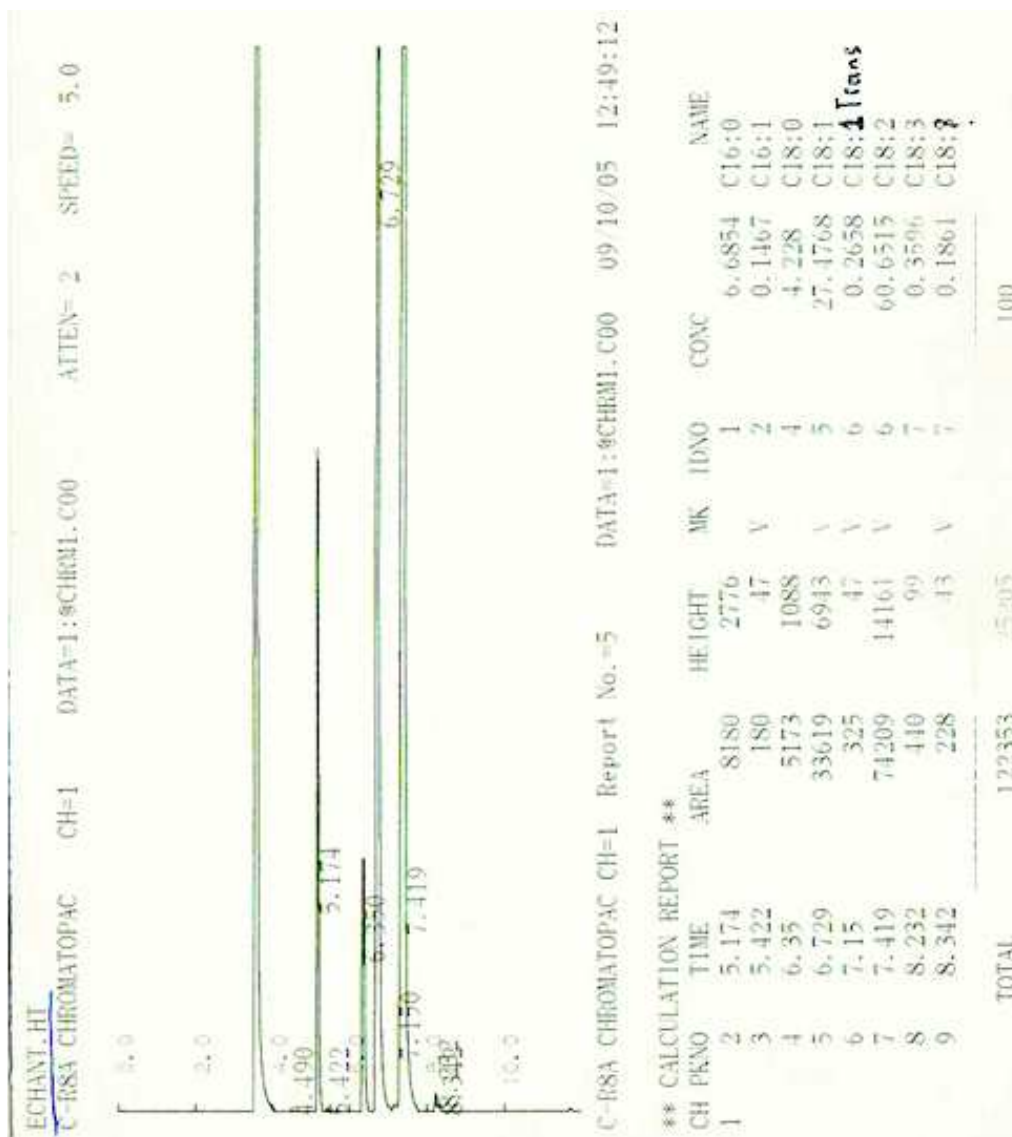


Figure 7. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol 0 ppm

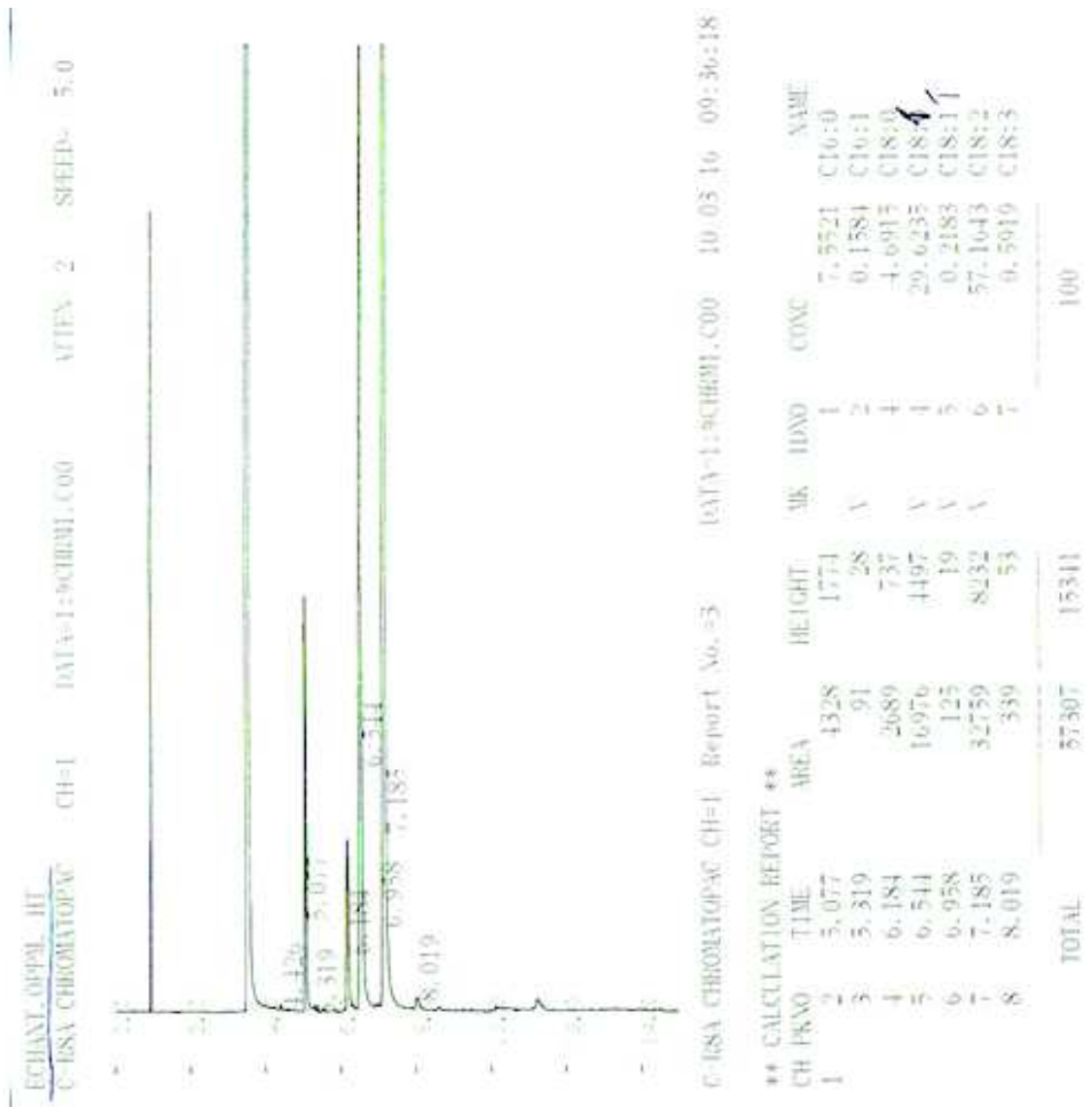


Figure 8. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol 0 ppm (20 jours)

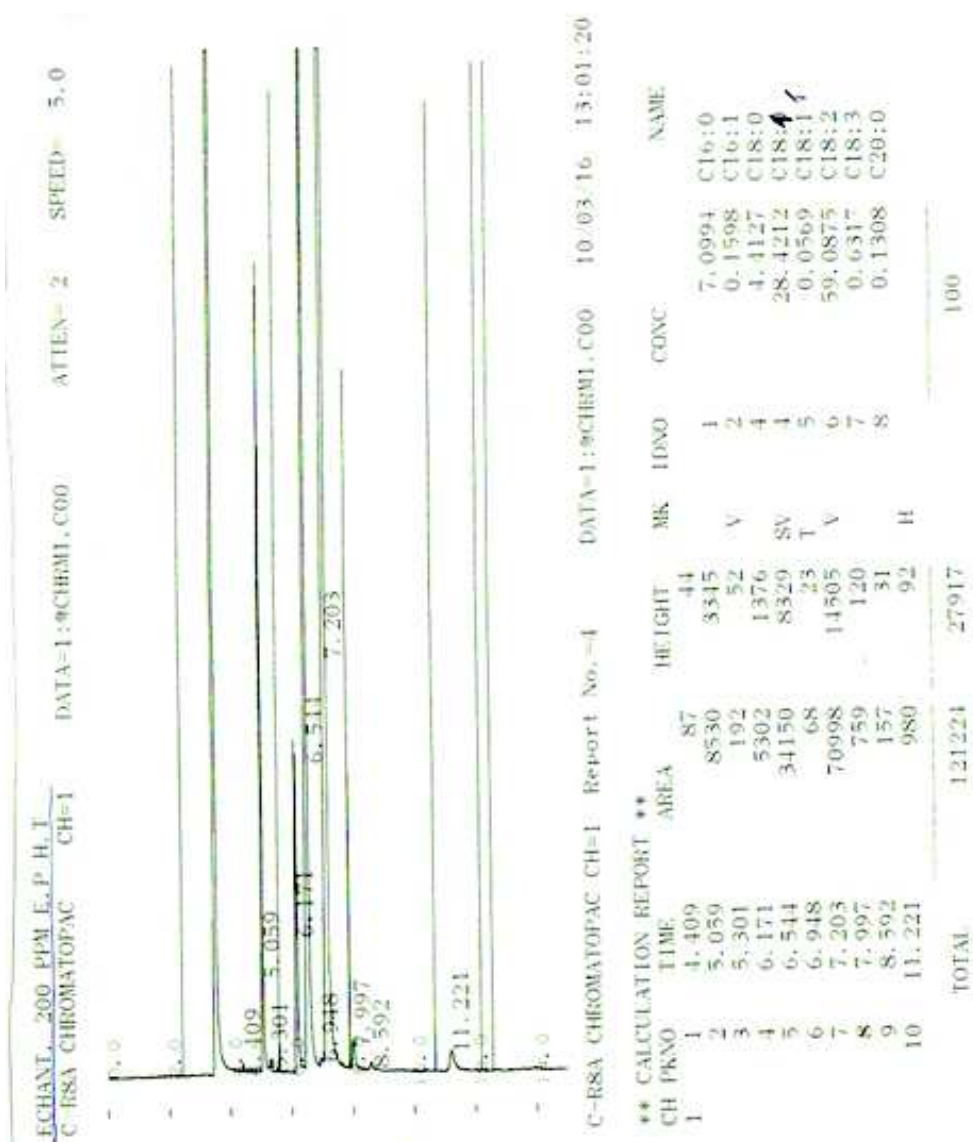


Figure 9. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol 200 ppm

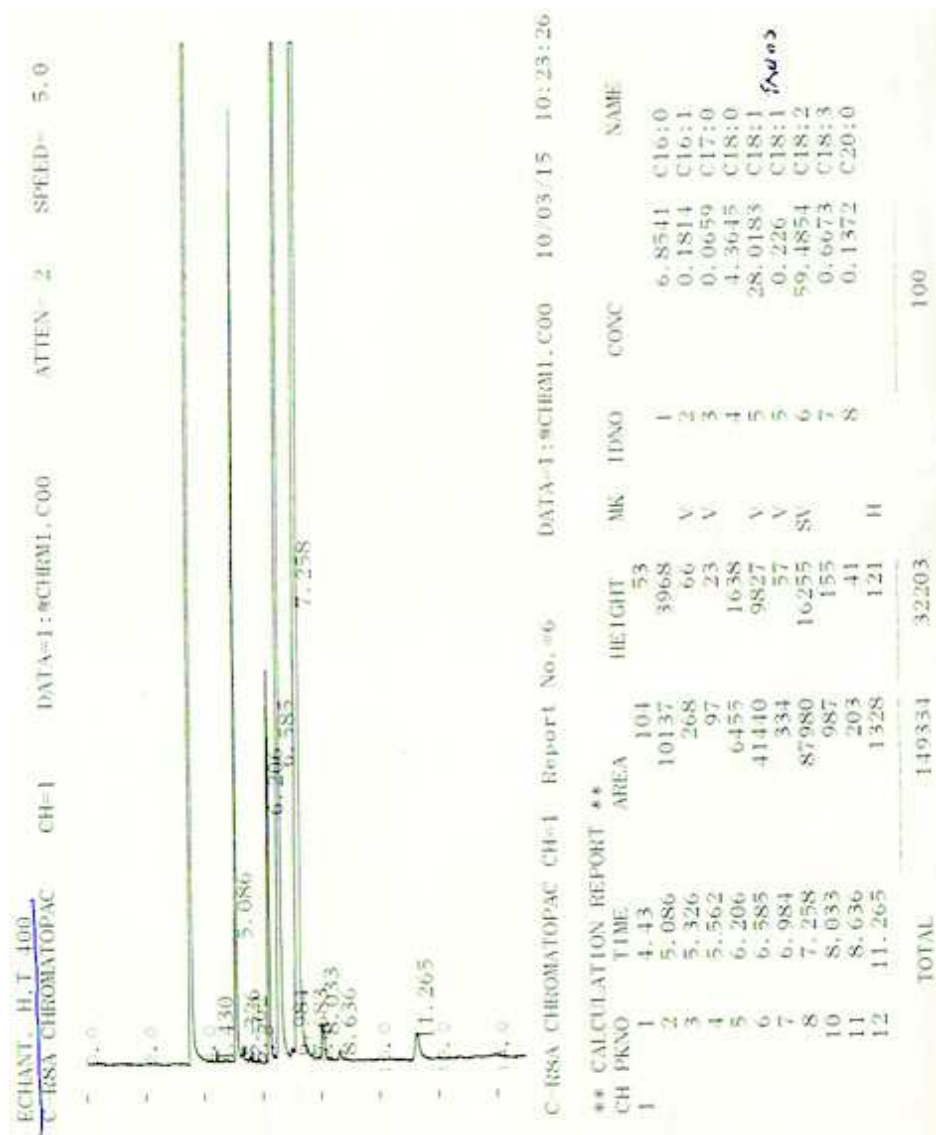


Figure 10. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol 400 ppm

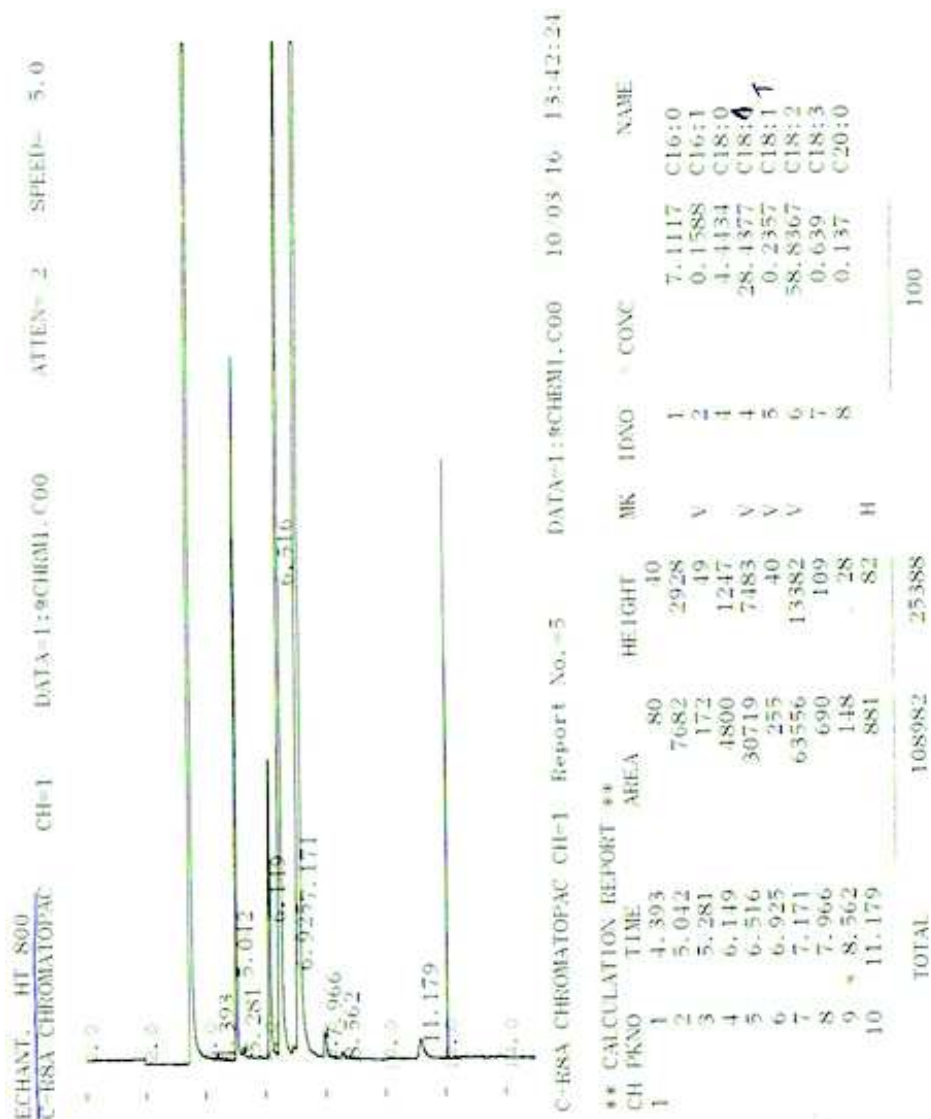


Figure 11. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol 800 ppm

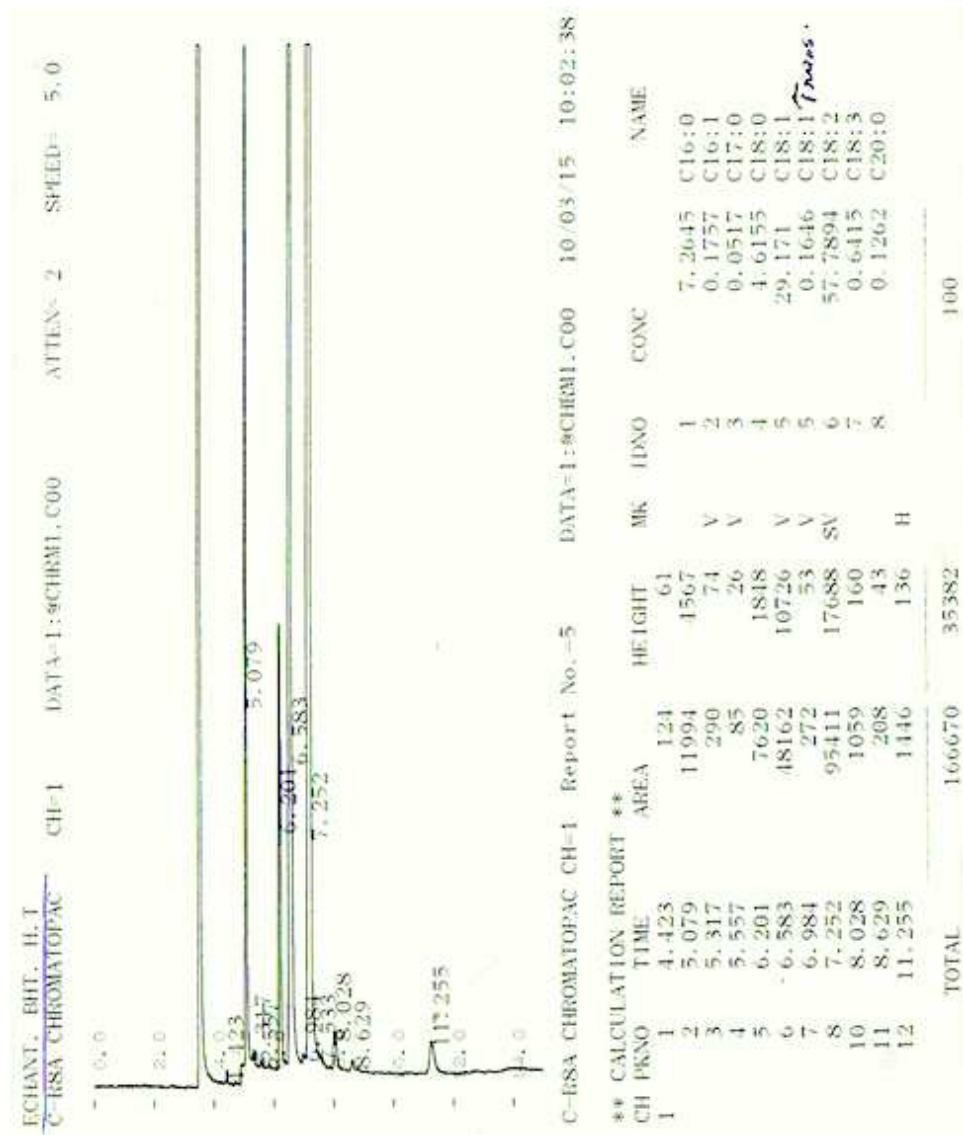


Figure 12. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile de tournesol BHT

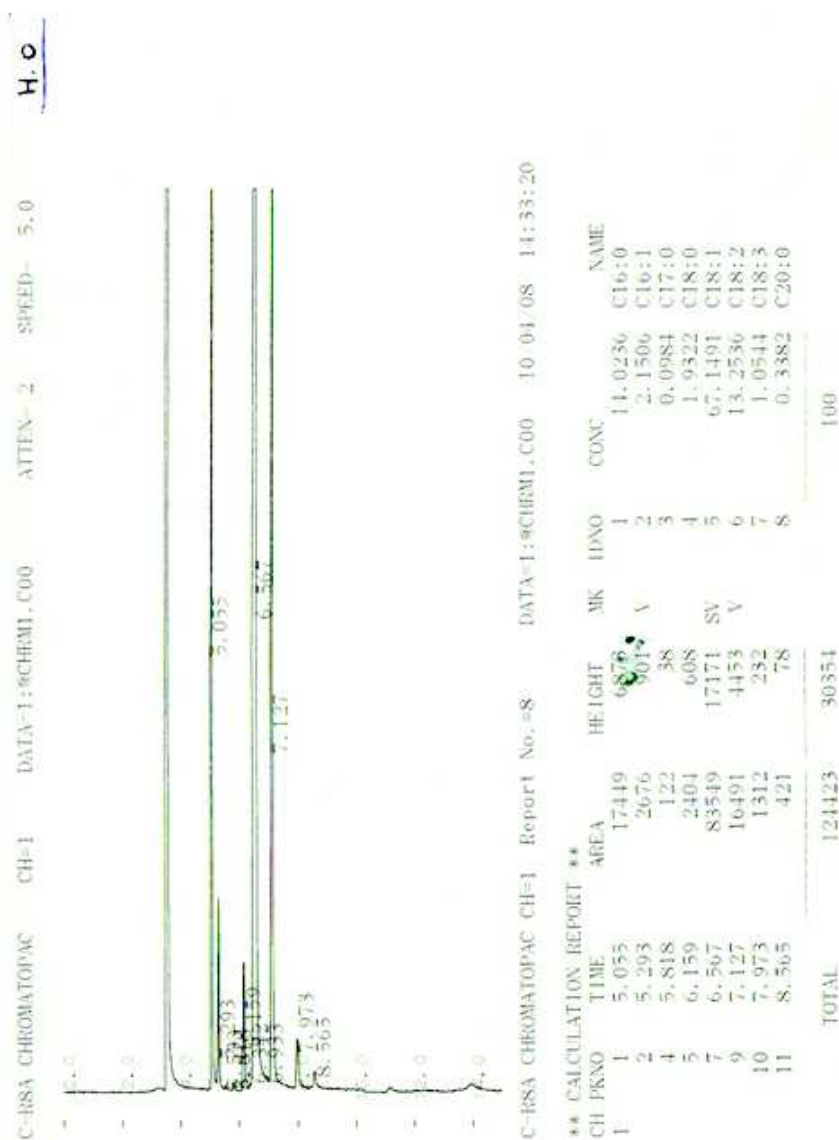


Figure 13. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive 0 ppm

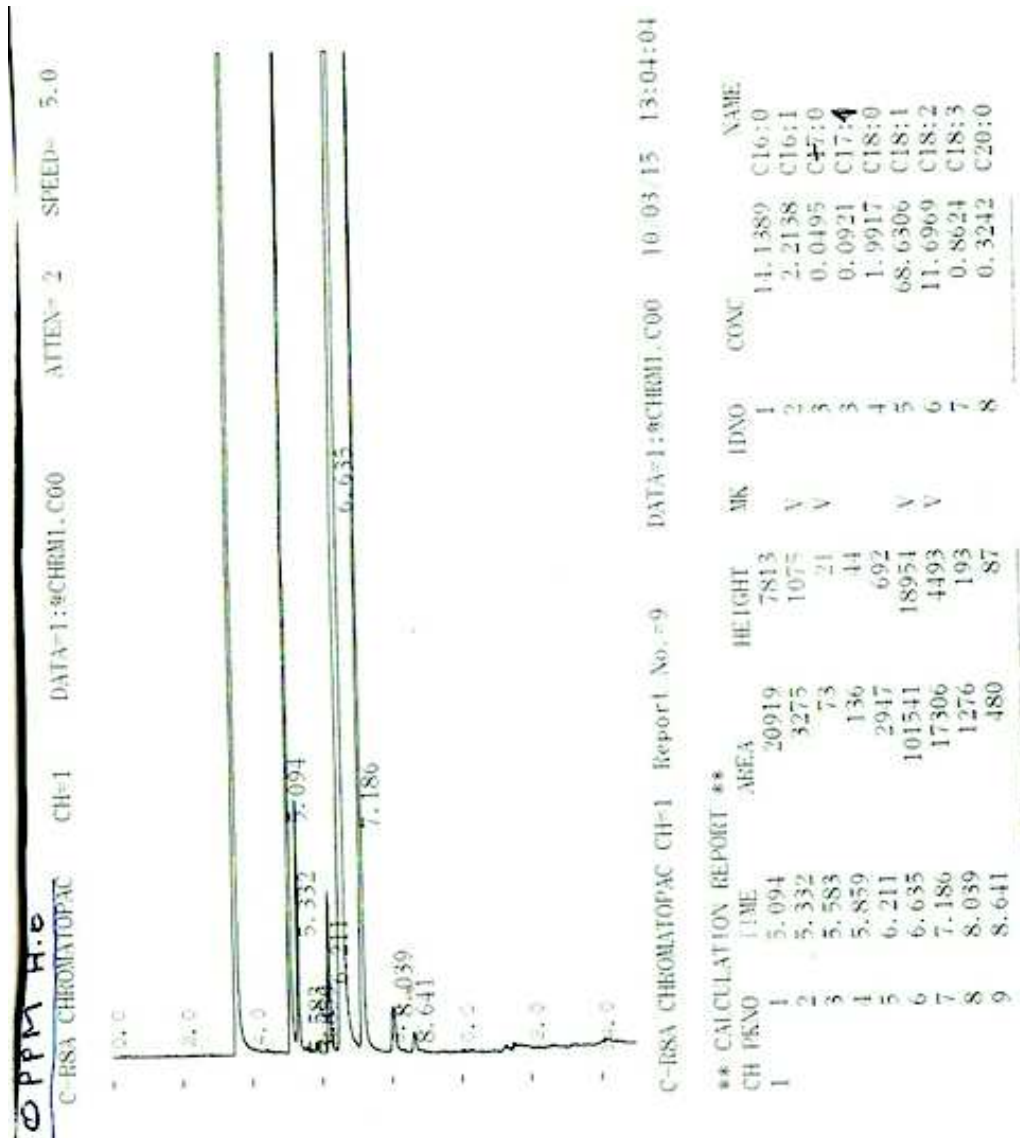


Figure 14. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive 0 ppm (20 js)

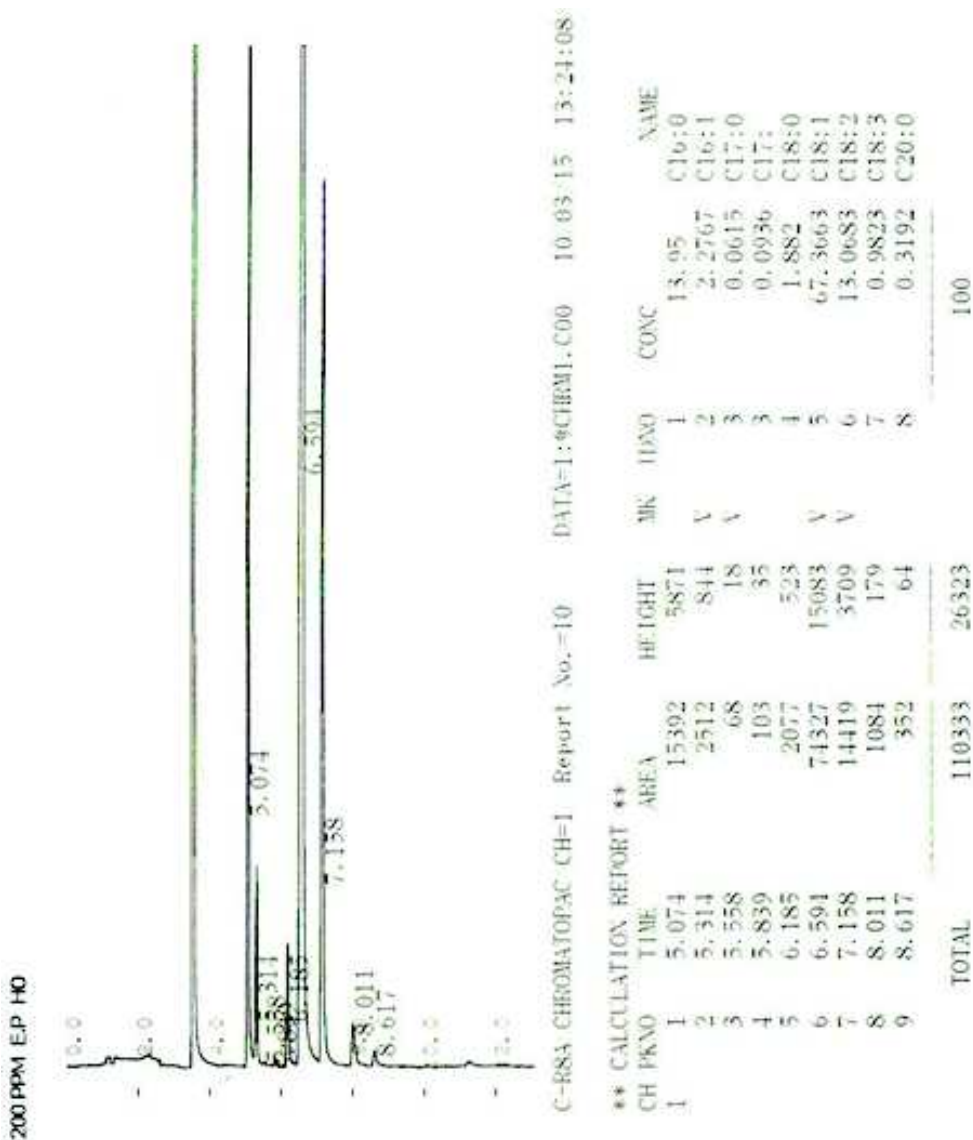


Figure 15. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive 200 ppm EP

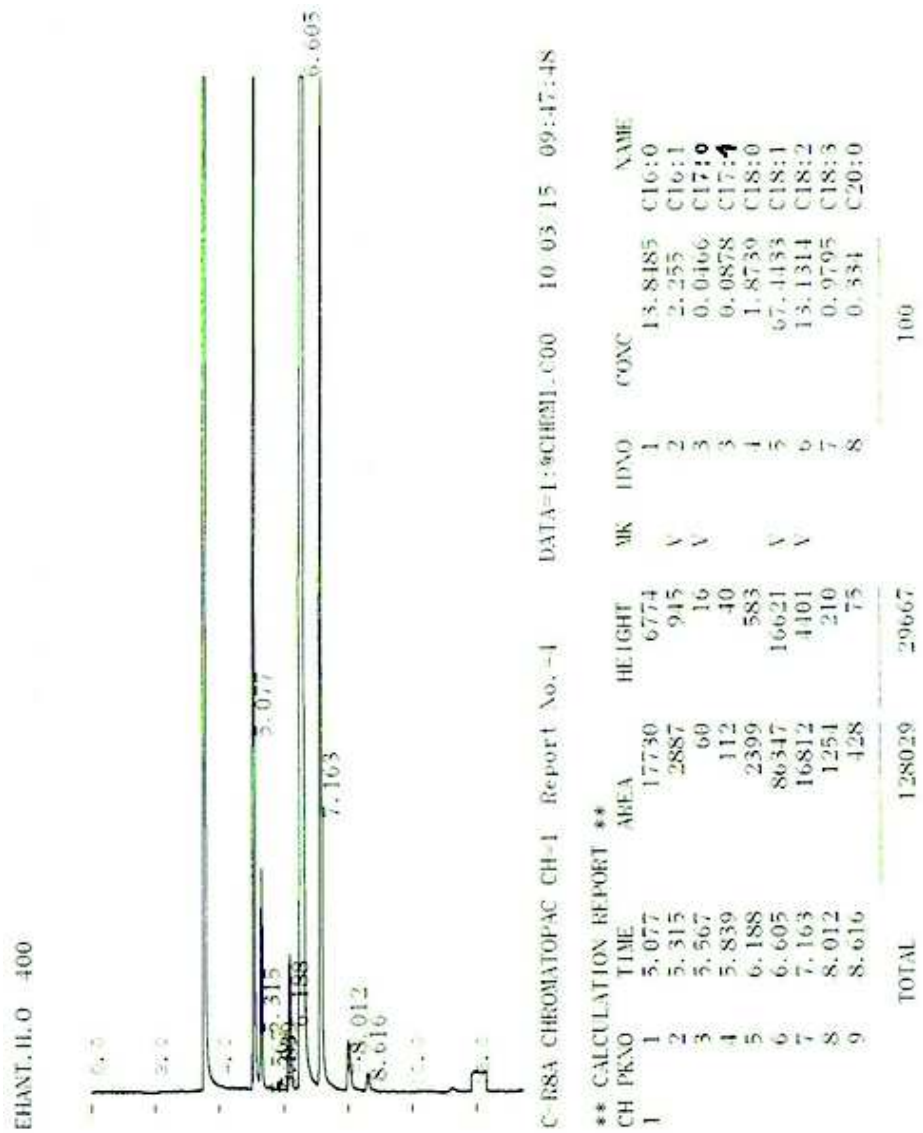


Figure 16. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive 400 ppm EP

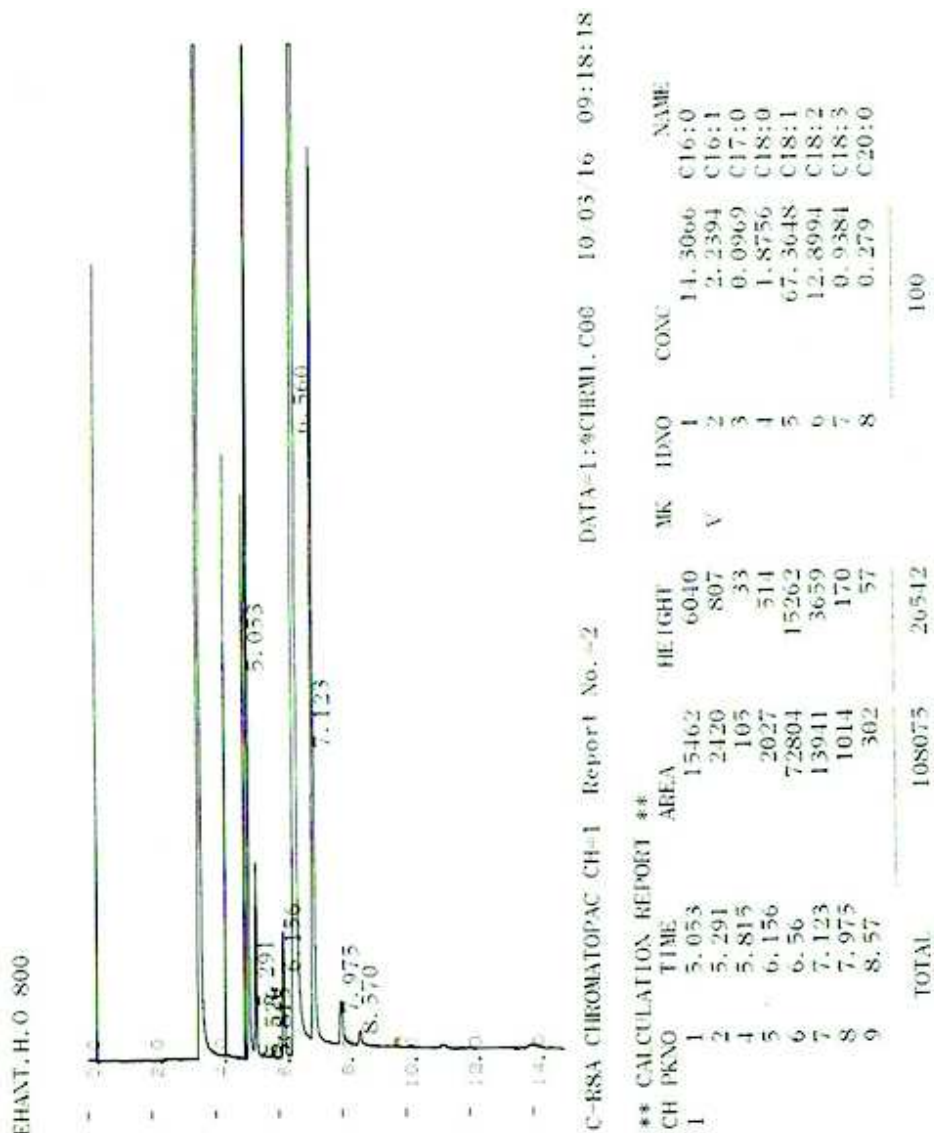


Figure 17. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive 800 ppm EP

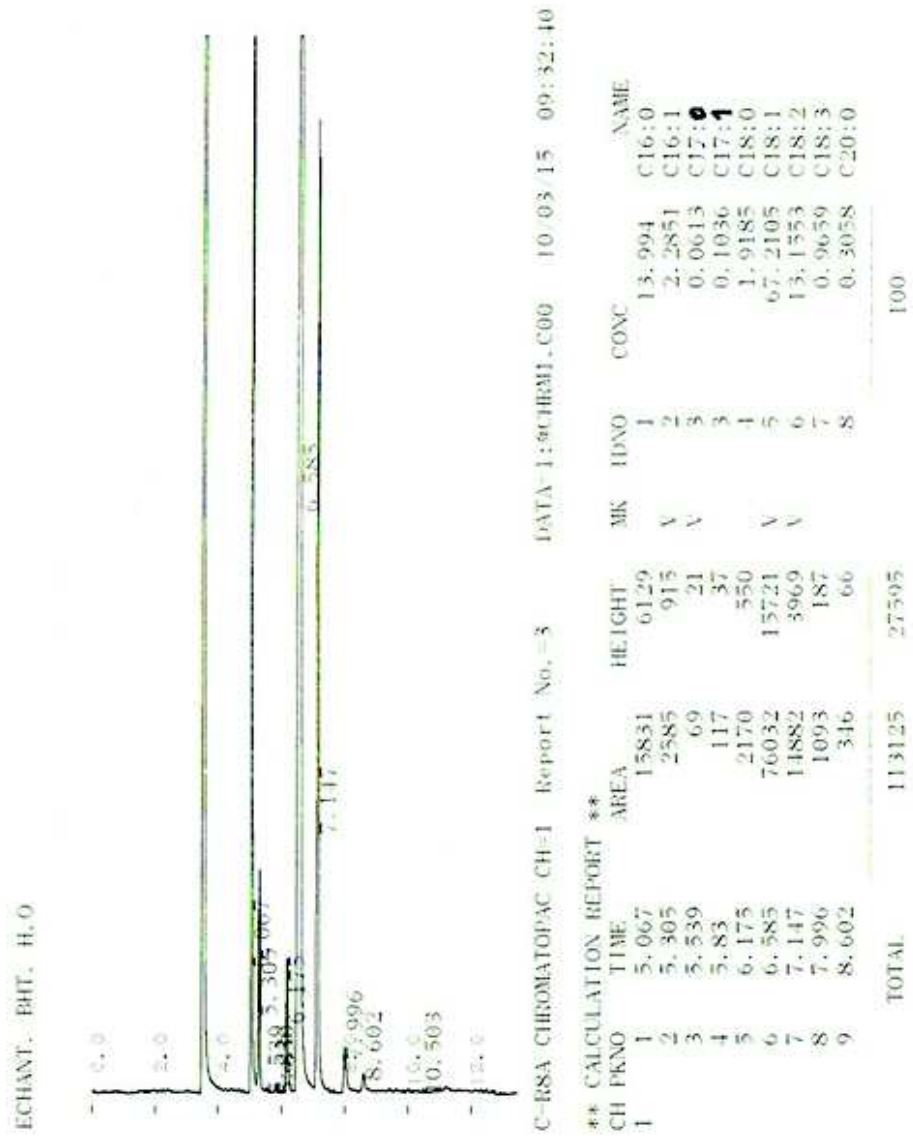


Figure 18. Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras d'huile d'olive BHT