

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE D'EL HARRACH
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE**

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Sciences Agronomiques
Option : Technologie alimentaire & Nutrition humaine

Présentée
Par : SADOUDI Rabah

**CONSEQUENCES METABOLIQUES DE LA
CONSOMMATION DE L'HUILE DE TOURNESOL
THERMOOXYDEE CHEZ LE RAT BLANC**

Devant le jury composé de :

M. BELLAL M. M.	Professeur	E. N. S. A	Président
M. AMMOUCHE A.	Professeur	E. N. S. A	Rapporteur
M. ARAB K.	M. C. A	U. M. B. B	Examinateur
Mme FAZOUANE-NAIMI F.	Professeure	U. M. B. B	Examinatrice
M. MEKIMENE L.	M. C. A	E. N. S. A	Examinateur

Soutenue publiquement le 02 / 07 / 2014

DEDICACES

A mon épouse
A mes enfants, TOUFIK et
YANIS sans oublier ... « chez
Micha » où on prend tant soin
d'eux
A la mémoire de mes parents

REMERCIEMENTS

Chers collègues membres du jury,
je vous remercie vivement autant que
vous êtes d'avoir répondu à ma
sollicitation. Je suis très honoré de vous
avoir dans mon jury de soutenance. Ma
sincère reconnaissance.

Je remercie, également, M.
AMMOUCHE A. pour m'avoir confié
cette thématique

Liste des figures

N°	Titres	Page
1	Auto-oxydation d'une molécule d'acide linoléique	26
2	Stabilisation du radical phénolique par mésomérie	31
3	Mécanisme d'action de l' α -tocophérol	32
4	Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique	32
5	Montage de l'appareil de la thermo-oxydation	46
6	Voies de décomposition des hydroperoxydes	77
7	Spectres MIR d'une huile alimentaire	79
8	Spectre MIR de l'huile de tournesol fraîche	82
9	Spectre MIR de l'huile de tournesol thermo-oxydée	82
10	Micrographie de tissu de foie de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche ($G \times 1000$).....	107
11	Micrographie de tissu de foie de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée ($G \times 1000$).....	107
12	Micrographie des hépatocytes de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée ($G \times 1000$).....	107
13	Micrographie d'un adipocyte de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée ($G \times 1000$).....	107
14	Micrographie montrant la rupture de la membrane d'un adipocyte de rats nourris à l'huile thermo-oxydée	107
15	Micrographie du tissu intestinal de rats nourris à l'huile fraîche ($G \times 1000$).....	108
16	Micrographie du tissu intestinal de rats ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée ($G \times 1000$).....	108
17	Micrographie du tissu adipeux de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche ($G \times 400$).....	109
18	Micrographie montrant des adipocytes hypertrophiés chez le rat nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée ($G \times 400$)	109

Liste des tableaux et annexes

N°	Titres des tableaux	Page
I	Propriétés physico-chimiques des huiles de tournesol fraîche et thermo-oxydée..	66
II	Extinctions moléculaires des diènes et triènes conjuguées des huiles de tournesol, fraîche et thermo-oxydée	76
III	Intensités des pics des spectres IR des huiles de tournesol, fraîche et thermo-oxydée	83
IV	Variation de la teneur en principaux AG des huiles, fraîche et thermo-oxydée ...	96
V	Composition en AG des lipides neutres extraits de foies et de tissus adipeux de rats nourris à l'huile fraîche ou à l'huile thermo-oxydée	100
VI	Profils en AG des lipides intestinaux de rats nourris à l'huile fraîche ou thermo-oxydée	101
VII	Résultats de l'analyse macroscopique des échantillons d'organes	106

N°	Titres des annexes	Page
1	Spectre électromagnétique	151
2	Spectres IR des huiles de coco vierge, fraîche et thermo-oxydée	152
3	Spectres FT-IR des huiles de poisson, fraîche et oxydée	153
4	Spectres des échantillons d'huiles de maïs chauffés à 165°C et 245°C en comparaison au spectre de cette huile à température ambiante	154
5	Changements de spectre FT-IR de l'huile de coco fraîche et après incorporation d'antioxydants	155
6	Spectres MIR enregistrés en ATR : acide oléique, acide élaïdique et acide linoléique	156

Liste des abréviations

4-HNE : *4-hydroxy-2-enonal*

AG : acide gras

AGE : acide gras essentiel

AGI : acide gras insaturé

AGL : acide gras libre

AGMI : acide gras monoinsaturé

AGPI : acide gras polyinsaturé

AGS : acide gras saturé

CD : diènes conjugués

CLA : acide linoléique conjugué

CG : corps gras

FT-IR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

H-NMR ou Proton NMR : nuclear magnetic resonance

H₂O₂ : peroxydes d'hydrogène

IP : indice de peroxyde

MDA : malondialdéhyde

MG : matière grasse

O₂ : dioxygène

¹O₂• ou •O-O• : oxygène *singulet*

O₂•⁻ : superoxyde

•OH : hydroxyle

R• : radical *alkyle*

ROO• : radical *peroxy*

ROOH : hydroperoxyde

ROS : *reactive oxygen species* (ou radicaux oxygénés libres)

TAG : triacylglycérol

TBARS : *thiobarbituric acid reacting substances*

UV : ultra-violet

Abstract

This work assigned two objectives. Initially, we characterized the thermally oxidized sunflower oil. In the second time, we incorporated this oil (5%, w/w) in the diet given to rats in growth to study the modifications induced on the fatty-acids composition of some tissues and to observe histological deteriorations induced. This oil was heated at $99\pm 2^{\circ}\text{C}$ with incorporation of 9 liters of air / second during 52 hours continuously. The treatment applied induced high level alteration to this oil. The most significant effect was on C18:2, $\omega 6$ content. Changes observed in the fatty acid composition of oil were similar to those found in tissues (livers, intestine and adipose tissues). Contrary to the linoleic acid, the palmitic acid was strongly converted into C16 :1, $\omega 9$ and C16 :1, $\omega 7$ in particular. This was due probably to the activation of $\Delta 9$ -desaturase and the reduction of the $\Delta 6$ - and $\Delta 5$ -desaturases by the products generated during the thermoxidation of the sunflower oil incorporated in the diet. Microscopic examination of the *test group* showed a significant histological change, when compared with the control, such as increase in cell size. Hepatocytes showed large and spherical nuclei that were centrally located, with one or two prominent nucleolus. Adipose cells had nuclei that migrated to the cell periphery; the cell membrane was destroyed.

Key words: sunflower oil, thermo-oxidation, rat, fatty acid composition, histology and tissues.

Résumé :

Cette étude avait pour objectif de déterminer l'effet de l'ingestion de l'huile de tournesol thermo-oxydée sur la composition en acides gras et l'altération histologique éventuelle des tissus de quelques organes chez le rat. L'huile 100% tournesol a été soumise à un traitement thermo-oxydatif ($99\pm 2^\circ\text{C}$) avec insufflation de 9 litres d'air / seconde pendant 52 heures en continue et à l'obscurité. L'huile thermo-oxydée, de texture épaisse, a été incorporée dans le régime alimentaire à raison de 5g / 100g. La durée expérimentale a été de 9 semaines. A la fin de la période d'élevage, les rats, à jeun, ont été sacrifiés ; le foie, les intestins et la matière grasse entourant les intestins ont été prélevés. Les modifications du profil en acides gras de l'huile thermo-oxydée ont été similaires à celles constatées dans les tissus d'organes testés. Les proportions des dérivés de l'acide palmitique, le C16 :1, $\omega 7$ sont élevées, tandis que le dérivé supérieur de l'acide linoléique, l'acide arachidonique n'a pas été détecté. Ceci est dû probablement à l'activation de la $\Delta 9$ -désaturase et à l'inactivation de la $\Delta 6$ -désaturase par les produits générés dans l'huile thermo-oxydée introduite dans le régime. Par ailleurs, l'observation des micrographies d'organes a laissé apparaître des changements histologiques significatifs, on en cite l'hypertrophie des cellules, le gonflement et l'emplacement des noyaux. Les hépatocytes de rats ont un noyau large et sphérique de position centrale ; il recèle un ou deux larges nucléoles. Les adipocytes hypertrophiés ont un noyau ayant migré à la périphérie de la cellule ; certains adipocytes ont montré une rupture dans leurs membranes.

Mots clés : huile de tournesol, thermo-oxydation, composition en acides gras, histologie, rat.

ملخص

الهدف المرجو من هذا البحث هو تحديد تأثير اكل الزيوت المؤكسدة مثل زيت عباد الشمس على نوعية الأحماض الدهنية عند انسجة الفئران .

تعرضت زيت عباد الشمس إلى المعاملة الحرارية المؤكسدة (99 ± 2 درجة مئوية) مع نفخ 9 لترات من الهواء / ثانية بشكل مستمر لمدة 52 ساعة في الظلام. ادخلت هذه الزيت في النظام الغذائي للفئران بمعدل 5 غ / 100 غ. كانت مدة التجربة 9 أسابيع. في نهاية فترة تربية قتل الفئران تم إستخلصنا الكبد والأمعاء والدهون المحيطة الأمعاء لدراسة احماضها الدهنية. وكانت هذه الاخيرة مماثلة مع الأحماض الدهنية للزيت المؤكسدة. نسبة حمض البالمتيك، 1 : C16، 7□ مرتفعة، في حين أن مشتقات العليا من حمض اللينوليك مثل حمض الأراكيدونيك لم يتم الكشف عنه. هذا ربما يرجع إلى تفعيل $\Delta 9$ -desaturase و إهماد $\Delta 6$ -desaturase من طرفامنتجات للأكسدة الحرارية التي أدخلت على النظام الغذاء. وعلاوة على ذلك مراقبة بجهاز الميكروسكوب تظهر تغيرات نسيجية كبيرة عند الفئران المغداة على الزيت المؤكسدة ، فإنه شهدنا تضخم الخلايا، وتورم و تغير موقع النواة. خلايا الكبد لها نواة مركزي كروية واسعة و أنه يحتوي على واحد أو اثنين من الأنوية. الخلايا الشحمية متضخمة و لديها نواة مهاجرة إلى محيط الخلية. وأظهرت بعض الخلايا الشحمية انقطاع في أغشيتها.

كلمات البحث: زيت عباد الشمس، والأكسدة الحرارية، وتكوين الأحماض الدهنية، الأنسجة، الفئران.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	13
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Lipides et acides gras	18
II. Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras insaturés	23
II.1. Formation de radicaux libres	27
III. Mécanisme d'anti-oxydation des lipides par les composés phénoliques	29
IV. Huile de tournesol	34
IV.1. Assimilation et rôle nutritionnel des lipides	36
V. Effets toxicologiques des huiles alimentaires chauffées	37
V.1. Effets des produits d'oxydation des acides gras insaturés	37
V.2. Effets des acides gras <i>trans</i>	39
VI. Conséquences du stress oxydant sur les tissus	42
 DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	
I. Objectifs de l'étude et conduite expérimentale	46
II. Méthodes de dosage des produits d'oxydation des acides gras insaturés	47
II.1. Détermination des produits primaires d'oxydation	48
II.1.1. Indice de peroxyde	49
II.1.2. Diènes conjugués	49
II.1.3. Chromatographie liquide haute performance	49
II.1.4. Spectroscopie infrarouge	50
II.2. Détermination des produits secondaires d'oxydation	53
II.2.1. Test au thiobarbutiric acid reactive substance (TBARS)	53
II.2.2. Test anisidine	54
II.2.3. Indice de la stabilité oxydative (Méthode de Rancimat)	55
II.2.4. Indice d'acide	57
II.2.5. Spectroscopie de fluorescence	57
II.2.6. Chromatographie en phase gazeuse	58
II.3. Résidus de substrats non oxydés	59

III. Appréciation de l'oxydation de l'huile de tournesol	59
IV. Expérimentation animale (Etude <i>in vivo</i>)	63
V. Analyse statistique des résultats	64

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Oxydation de l'huile de tournesol	66
I.1. Analyses physico-chimiques	66
I.2. Analyses spectrométriques	74
I.2.1. Spectrométrie ultra-violette (UV-visible)	75
I.2.2. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	78
I.2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse	95
II. Analyse par la chromatographie en phase gazeuse des lipides tissulaires	99
III. Analyse macroscopique et microscopique des tissus d'organes	105

CONCLUSION GENERALE	116
----------------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121
--	------------

ANNEXES	150
----------------------	------------

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'oxydation des lipides est l'une des principales causes de l'altération de la qualité des aliments ; cette réaction de détérioration diminue la valeur nutritionnelle, altère le goût, modifie la texture et l'aspect de la denrée alimentaire (*WARNER et al., 1989*) ; elle peut, même, réduire sa durée de conservation et limiter les vertus des lipides dans les aliments fonctionnels (*SUN et al., 2011*). Ceci est en contradiction avec les recommandations nutritionnelles préconisant un apport supplémentaire d'acides gras insaturés (AGI) dans la prévention de maladies dégénératives (*FORSYTHE et al., 2008* ; *PERSAUD, 2008* ; *WILLEMSEN et al., 2008*).

Il a été admis que la substitution des matières grasses (MG) saturées alimentaires par des huiles riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) diminue le risque des maladies cardiovasculaires. Par conséquent, des aliments riches en AGPI, tels que les huiles végétales, les poissons gras et les suppléments $\omega 3$ d'origine marine sont recommandés.

L'apport lipidique conseillé (% d'apport énergétique), fixé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) en 2010, pour un homme adulte consommant 2000Kcal/j est estimé à 30% de lipides totaux dont 2% d'origine linoléique et 0,8% d'origine α -linoléique (*LAVIALLE et LAYES, 2010*). Ces AGPI sont physiologiquement importants ; ils sont susceptibles de traiter et prévenir certaines maladies (*LEITZMANN et al., 2004* ; *PARDINI, 2006* ; *HOFMANOVA et al., 2008* ; *PERSAUD, 2008*).

Cependant, ces AGPI sont facilement oxydables ; une ingestion excessive de lipides oxydés induit un effet néfaste sur la santé. C'est la raison pour laquelle la recherche sur l'oxydation des lipides, en particulier sur l'oxydation des AGPI est devenue un sujet de grande importance a fait l'objet de nombreuses études (*BINKOSKI et al., 2005*).

L'oxydation des lipides est le principal processus de détérioration se produisant pendant le traitement thermique des huiles végétales contenant des AGPI (*GERTZ et al., 2000* ; *EL ANANY, 2007*). Il est bien connu que les huiles alimentaires utilisées en cuisson à très hautes températures et en présence d'oxygène subissent la thermo-oxydation, la polymérisation et l'hydrolyse (*NZIKOU et al., 2009* ; *REHAB, 2010*).

A la lumière des résultats de recherches épidémiologiques et cliniques, une évolution significative a été opérée, ces dernières décennies, en matière de choix de corps gras (CG) à utiliser en cuisson. Comparée aux MG (animales), les huiles végétales sont de plus en plus utilisées en raison de leurs richesses en acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et

polyinsaturés (*HARWOOD et al, 1994*) ; elles sont, généralement, mieux digérées (*CERA et al., 1988 ; CERA et al., 1989*).

De plus, les huiles alimentaires riches en AGPI représentent une source principale et peu coûteuse d'acides gras essentiels (AGE) et de vitamines (*BILLEK, 1980*). Toutefois, ces huiles sont susceptibles de subir des modifications lorsqu'elles sont soumises à un traitement thermo-oxydatif comme dans le cas des fritures (*OLOGAN, 2002*). Généralement, les huiles alimentaires hautement insaturées sont oxydées plus rapidement que les huiles saturées (*PARKER et al., 2003*) ; leurs AGPI sont facilement oxydés menant à la formation de peroxydes, d'aldéhydes, de cétones, etc. (*FRANKEL, 1980 ; KUBOW, 1992 ; XIAO et OU, 2005*).

Le chauffage de l'huile en présence de l'air produit des dégradations thermo-oxydatives ; ces réactions d'altération concernent les groupes acyles insaturés des triacylglycérols (TAG) et autres composés insaturés présents dans ces CG. Ces changements génèrent beaucoup de composés oxydés et polymérisés de polarité plus élevée que celle des TAG originaux (*SANCHEZ-MUNIZ, 2004*).

Compte tenu de sa carence en AGS, sa faible teneur en AGPI de la série des $\omega 3$, sa saveur légère et notamment sa richesse en vitamine E, l'huile de tournesol est très utilisée dans la préparation des aliments. Le tournesol est l'oléagineux le plus cultivé dans le monde ; la superficie réservée à cette culture est d'environ 22 millions d'hectares ; la production mondiale a été estimée à 32 millions de tonnes et un rendement moyen de l'ordre de 12 quintaux / hectare (*BOVER, 2009*). La teneur en huile des graines de tournesol est voisine de 45% ; elle représente 12% de la production mondiale (*HACHEMI, 2006*).

L'Algérie est l'un des premiers marchés d'huiles de graines oléagineuses du Maghreb avec plus de 500.000 tonnes importées en 2004, soit 12% des importations alimentaires. L'huile de tournesol domine le marché national (*BEDRANI, 2008*). La consommation nationale totale d'huiles s'élève à 486 millions de tonnes d'huiles (*HALES, 2002*) ; la part énergétique des MG a été estimée aux environs de 19% en 2004 (*HACHEMI, 2006*).

Par ailleurs, *GORNAY (2006)* a rapporté que le procédé de friture absorbe la majorité des huiles alimentaires produites dans le monde et que des produits frits sont consommés sur tous les continents. Mais, l'huile de tournesol, riche en acide linoléique, n'a pas une stabilité oxydative élevée ; l'oxydation de cet AGPI commence par une réaction radicalaire, produisant des hydroperoxydes (ROOH), produits primaires d'oxydation ; ceux-ci sont très instables et se décomposent rapidement pour former des produits secondaires d'oxydation, susceptibles d'induire le développement de maladies (*STAPRANS et al, 1996_{a,b} ; KANAZAWA et al, 2002*).

De nombreuses méthodes d'analyse sont couramment utilisées pour mesurer l'oxydation des lipides. Toutefois, il n'y a pas de méthode uniforme et standard pour détecter toutes les modifications oxydatives (*SHAHIDI et WANASUNDARA, 2002*). Les méthodes disponibles pour surveiller l'oxydation des lipides peuvent être classées en cinq groupes selon qu'elles mesurent : la fixation d'oxygène, la perte de substrats, la formation de radicaux libres et la formation de produits primaires et secondaires d'oxydation (*DOBARGANES et VELASCO, 2002*).

Plusieurs études ont confirmé la nocivité des produits d'oxydation des lipides alimentaires ou ceux générés dans l'organisme. Néanmoins, certains chercheurs ont estimé que la toxicité des huiles alimentaires oxydées est très faible pour nuire à la santé humaine (*NOLEN et al., 1967*). Ces auteurs se sont appuyés sur le fait que les niveaux d'oxydation atteints lors des expériences au laboratoire sont, généralement, fortement supérieurs à ceux constatés dans des pratiques culinaires courantes.

Cependant, une réutilisation chronique de l'huile usagée peut induire une accumulation excessive des produits d'oxydation et par voie de conséquence une augmentation de leur toxicité (*FRANKEL, 1980 ; HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1984 ; ADDIS, 1986 ; KUBOW, 1992*). Ces produits sont, en effet, absorbés (*STAPRANS et al., 1999*) et incorporés dans les phospholipides membranaires induisant ainsi une modification de la fluidité des membranes (*HAYAM et al., 1994 ; WILSON et al., 2002*). Cette dernière est influencée par la composition en AG de cette bicouche lipidique. Ainsi, en contradiction aux effets bénéfiques des AGPI, il a été montré qu'un régime alimentaire hautement insaturé augmente le rapport AGPI / AGS dans toutes les membranes biologiques et par conséquent leur sensibilité à l'oxydation.

L'ingestion d'une huile thermo-oxydée induit une accumulation excessive de peroxydes lipidiques dans le foie et le rein (*NWANGUMA et al., 1999*) ; ceci entraîne l'augmentation du poids du foie et une diminution du gain de poids corporel. Ainsi, des désordres métaboliques apparaissent, telle une réduction de l'activité anti-oxydante de la glutathion peroxydase (*KITTS, 1996 ; SHEEN et al., 1999*).

Par ailleurs, la réduction de l'activité de plusieurs enzymes est considérée comme l'une des conséquences de l'ingestion de l'huile oxydée (*ODUTUGA et al, 1997 ; ODUTUGA and OLOGAN, 1999*). La conversion de l'acide linoléique en ses dérivés supérieurs, tel l'acide arachidonique dans l'organisme vivant nécessite la présence de deux enzymes, une élongase et une désaturase (*WOODS and FEARON, 2009*). Il semble que les produits d'oxydation et les isomères de l'acide linoléique interfèrent avec le métabolisme de cet AGE en inhibant l'activité de la $\Delta 6$ -désaturase (*PRIVET et al., 1967*).

Les conséquences histologiques de la consommation d'huiles oxydées ont été peu étudiées. Les résultats de l'étude menée par *JIMOH et ODUTUGA (2004)* sur l'ingestion de l'huile d'arachide oxydée par le rat ont montré une désintégration de la membrane des alvéoles et un rétrécissement de la lumière des alvéoles des poumons indiquant une atteinte à l'oxygénation du sang, fonction principale assurée par les poumons.

Ces auteurs ont, également, remarqué une désorganisation de la disposition spatiale des cellules du myocarde ainsi qu'une amplification des fibres ; cette anomalie pourrait conduire à une faiblesse du muscle cardiaque, ce qui peut entraîner une insuffisance cardiaque.

En complément aux travaux antérieurs effectués au département de la technologie alimentaire et nutrition humaine sur les huiles oxydées, nous nous sommes proposés de mener cette étude. Celle-ci est organisée en deux volets : thermo-oxydation puis caractérisation de l'huile de tournesol thermo-oxydée et effet de l'ingestion de cette huile thermo-oxydée d'une part sur le profil en acides gras des tissus de trois organes vitaux (le foie, les intestins et le tissu adipeux) et sur une modification histologique éventuelle de l'architecture tissulaire de ces organes d'autre part.

A cet effet, l'huile de tournesol 100% tournesol dénommée « FLEURIAL » a été thermo-oxydée selon une technique de laboratoire d'oxydation accélérée, sans incorporation d'aliments. Cette huile est chauffée modérément (100°C) avec insufflation continue d'air pour favoriser le processus oxydatif. L'huile de tournesol thermo-oxydée est, ensuite, incorporée dans le régime alimentaire pour rats en croissance. A l'âge adulte, les rats mâles sont sacrifiés ; les organes vitaux sont prélevés pour les analyser.

BIBLIOGRAPHIE

I. Lipides et acides gras

Le terme « lipides » est employé pour désigner les CG liquides ou solides (*ANTHEA et al., 1993*). La définition des lipides repose sur une propriété physique, la solubilité. Les lipides simples (ou homolipides) sont des composés ternaires formés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène (moins présent). Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau, mais élevée dans les solvants organiques non polaires (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique, acétone, etc.).

Les lipides sont constitués principalement de TAG, de cholestérol, d'alcools gras libres ou estérifiés par des AG et de quelques composés mineurs. Les TAG sont des lipides neutres, c'est-à-dire de triesters du glycérol et d'AG ; ils représentent 98 à 99 % de l'huile végétale raffinée ; ils résultent de l'union de trois AG au glycérol. Les composés mineurs intègrent les mono et diacylglycérols, acides gras libres (AGL), phosphatides, stérols, vitamines liposolubles et autres substances (*STRAYER, 2006*). Ces composés sont appelés non saponifiables car ils ne produisent pas de savons lors de l'hydrolyse ; certains d'entre eux sont perdus pendant le raffinage.

Les AG sont les constituants prédominants des TAG : 100g d'huile ou de MG contiennent 95g d'AG. Ils sont peu abondants à l'état libre. Ce sont des acides carboxyliques (R-COOH) dont le radical R *alkyle* est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable donnant à la molécule son caractère hydrophobe. Le radical se termine par un groupe méthyle (CH₃). Ceci impliquera que la solubilité dans l'eau des AG diminuera avec l'augmentation du nombre de carbones : en-dessus de C4 et C5, les AG sont insolubles.

Plus de 1000 AG sont connus, mais 20 ou moins sont produits en quantités significatives dans des huiles et MG commercialisées. Les AG communs sont les C16 et C18. A nombre d'atomes de carbone inférieure, les AG sont dits à chaîne moyenne et au-dessus de ce nombre, ils sont à longue chaîne.

La grande majorité des AG naturels présentent les caractères communs suivants : monocarboxylique, chaîne linéaire avec un nombre pair de carbones, saturés ou en partie insaturés avec un nombre de double liaisons maximal de 6. Un AG est dénommé à partir du nom du radical (R) correspondant complété par le suffixe *oïque*. Le nom du radical se termine par *an*, *én*, *dién*, *trién*, etc. selon qu'il s'agit d'un AGS, monoénique, diénique ou triénique, etc. ; il a été admis que plus le nombre d'insaturations augmente, plus la chaîne carbonée de l'AGPI est courbée. L'huile de tournesol est une source d'AGE (l'acide linoléique, C18 :2, n-6), dénommé le 9-*cis*, 12-*cis*-octadecadiénoïque.

Les AGS ont pour formule générale brute : $C_nH_{2n}O_2$ et pour formule développée $CH_3 - (CH_2)_{n-2} - COOH$; il s'agit, donc, d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue, apolaire, avec un groupement carboxylique polaire ou chargé négativement (carboxylate). Ce groupement hydrophile est rarement libre ; l'acidité libre des lipides est dosable, elle sert de marqueur de la dégradation des CG en contrôle alimentaire. Pour les plantes supérieures et les animaux, les AGS les plus communs ont de 14 à 20 carbones, avec une nette prédominance de ceux à 16 ou 18 carbones. Les AGS sont chimiquement moins réactifs que les AGI. Le point de fusion des AGS augmente avec l'allongement de leurs chaînes hydrocarbonées. La réactivité chimique des AGI est due à la présence de doubles liaisons ; cette réactivité est d'autant plus élevée que le nombre d'insaturation augmente.

Contrairement aux AGS, la chaîne aliphatique des AGI comporte au moins une insaturation, c'est-à-dire une double liaison ; ces liaisons sont relativement instables et généralement de configuration « *cis* ». Les AGI représentent plus de la moitié des AG des plantes et des animaux. La quantité d'iode (indice d'iode) captée par une MG permet de connaître le nombre de doubles liaisons présentes dans les AG, donc la proportion d'AGI qu'elle contient.

En nomenclature normalisée (nomenclature chimique internationale), le carbone carboxylique est le carbone 1 ; il définit la chaîne principale. Dans la nomenclature adoptée par les physiologistes (nomenclature biochimique, abrégée ω), c'est le carbone du méthyle terminal de la chaîne carbonée qui est numéroté 1. Cette numérotation permet de mettre en évidence des analogies de structure entre des AG appartenant à des séries isologues. En chimie, le mot « isologue » se dit de corps organiques ayant des propriétés chimiques voisines.

Ainsi, les AGI peuvent être classés dans la série des ω_3 , ω_6 et ω_9 ; cette classification est basée sur la structure chimique des AG. Elle se base sur l'emplacement de la première double liaison de l'AG située respectivement à la troisième, sixième et neuvième à partir de l'extrémité méthylique : l'atome de carbone de rang x , en partant du méthyle terminal, est désigné par $(n-x)$, quelle que soit la condensation en carbone de la chaîne. Ainsi, les transcriptions $n-x$ ou ωx sont employées pour désigner la position de la double-liaison relative à l'extrémité méthylique ; la position de la première double liaison de l'extrémité carboxylique est indiquée Δx .

La plupart des AGI ont des longueurs de chaînes de 16 à 20 carbones. En règle générale, la première ou la seule double liaison est établie entre le C9 et le C10 (Ex : acide oléique C18 : 1, Δ 9) ; les doubles liaisons multiples sont séparées par un groupe méthylène (CH_2), ce qui les place, par exemple, en Δ 9, Δ 12 (acide linoléique) et en Δ 9, Δ 12, Δ 15 (acide α -linoléique) ; les doubles liaisons sont de configuration *cis*. Plus le nombre d'insaturations (*cis*) augmente, plus la chaîne carbonée de l'AGPI est courbée.

Il est fréquemment commode de remplacer le nom d'un AG par un symbole. Il s'agit d'un groupe de chiffres ou de lettres comprenant dans l'ordre : le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons, la place et la forme de chacune de celles-ci.

Les AGI répondent aux formules générales : $\text{C}_n\text{H}_{(2n-2x)}\text{O}_2$; $\text{C}_n: x (n-y)$;

Où :

n = nombre d'atomes de carbone ;

x = nombre de doubles liaisons ;

y = premier carbone engagé dans une double liaison en comptant à partir du méthyle.

Exemple : Les AG *mono-éniques* ou mono-insaturés ne comportent qu'une seule double liaison. Ils ont pour formule générale brute : $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$ et pour formule développée : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_{n'} - \text{COOH}$

Ainsi, l'acide linoléique est de formule chimique brute $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$; il est constitué de 18 atomes de carbone et deux doubles liaisons, dont la première comptée à partir du méthyle terminal est portée par les atomes de carbone 6 et 7 ; l'acide linoléique a comme symbole C18:2 (n-6) en nomenclature ω (également noté C18:2, ω 6) ou C18:2, Δ 9, 12 en nomenclature normalisée.

Les doubles liaisons de configuration *cis* sont insérées grâce à des enzymes, les désaturases aux endroits relativement spécifiques du côté de la fonction carboxylique. Deux doubles liaisons de conformation *cis* sont séparées par un groupement méthylène (CH_2). Un grand nombre d'AG de longueur de chaîne hydrocarbonée et de nombre de doubles liaisons différents sont synthétisés selon cette voie. Par ailleurs, l'allongement, *in vivo*, des chaînes d'AG se fait par addition d'un résidu de deux groupements *acétyle* du côté du carbonyle (COOH). Ainsi, pour la série ω 6, on a :

Acide linoléique (C18:2 Δ 9, 12) — désaturase \rightarrow Acide γ -linoléique (C18:3 Δ 6, 9, 12) + 2C \rightarrow Acide dihomogamma-linoléique (C20:3 Δ 8, 11, 14) — désaturase \rightarrow Acide arachidonique (C20:4 Δ 5, 8, 11, 14) + 2C \rightarrow Acide docosatetraénoïque (C22 :4, Δ 7, 10, 13, 16) — désaturase \rightarrow C22 :5, Δ 4, 7, 10, 13, 16.

Les désaturases ont une spécificité de site (par exemple la $\Delta 9$ -désaturase ne peut introduire une double liaison qu'entre les carbones 9 et 10 d'un AG). Certaines désaturases sont communes aux animaux et aux végétaux ($\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$, $\Delta 4$ -désaturases). D'autres sont spécifiques au monde végétal ($\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases). Ces deux désaturases sont à l'origine de deux familles d'AG dont les précurseurs ne peuvent être synthétisés par l'homme. Ils sont dits essentiels. Il s'agit de l'acide linoléique, dont sont issus tous les AG de la famille n-6 et de l'acide α -linoléique précurseur de la famille n-3.

L'acide linoléique est le produit d'une $\Delta 12$ -désaturase, qui n'existe que chez les végétaux. Elle catalyse la désaturation d'un AG $\Delta 9$ entre les carbones 12 et 13 pour créer une liaison éthylénique $\Delta 12$. Lorsqu'elle a pour substrat l'acide oléique (18:1 n-9), elle produit l'acide linoléique : 18:2 n-6, n-9. Ce dernier est un nutriment indispensable et essentiel pour les animaux ; il conserve toujours cette insaturation en n-6 au cours du métabolisme : c'est à ce titre qu'il est le précurseur de tous les AG dits de la série n-6, parmi lesquels se trouve l'acide arachidonique (20:4 n-6, n-9, n-12, n-15).

La $\Delta 15$ -désaturase est une enzyme qui n'existe que dans le règne végétal. Elle catalyse la désaturation d'un AGPI $\Delta 9$, $\Delta 12$ entre les carbones 15 et 16 pour créer une liaison éthylénique $\Delta 15$. Lorsqu'elle a pour substrat l'acide linoléique (18:2 n-6, n-9) elle produit l'acide α -linoléique : 18:3 n-3, n-6, n-9. Celui-ci conserve toujours cette insaturation en n-3 au cours du métabolisme : c'est à ce titre qu'il est le précurseur de tous les AG dits de la série n-3.

Ces doubles liaisons dites « maloniques » ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) peuvent se trouver dans une position conjuguée, non séparées par un groupement méthylène ; la double liaison alterne avec une seule liaison ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$). La présence de doubles liaisons conjuguées accentue le risque d'oxydation et de polymérisation du CG.

Les doubles liaisons éthyléniques des AGI sont, également, à l'origine d'isomères de configuration *cis* ou *trans*. La forme géométrique de toute liaison éthylénique est définie par les termes *cis* ou *trans*. Les isomères de conformation *cis* et *trans* se réfèrent à la position des groupements de part et d'autre de la double liaison.

Dans les AG *cis*, les groupes d'atomes du même type sont situés du même côté que la double liaison ; la conformation *cis* est la plus courante, naturelle ; les AGE sont toujours de configuration *cis*. Dans les AG *trans*, les groupes d'atomes du même type sont situés en opposition par rapport à la double liaison. Les AG à double liaison *trans* ou à insaturation non séparée par le méthylène existent à l'état naturel ou sont formés pendant le traitement des CG.

Par exemple, l'acide vaccénique (18: 1, 11-*trans*), l'acide ruménique et l'acide linoléique conjugué (CLA) (18: 2 9-*trans*, 11-*cis*) sont détectés dans les MG laitières.

Les AG *cis* et *trans* ont une conformation dans l'espace différente : les AG *trans* ont une forme plutôt linéaire alors que les AG *cis* sont courbés. Cette particularité rend les AG *trans* moins fluides (plus rigides). Ils sont plus à l'état solide à température ambiante et possèdent une température de fusion plus élevée que la forme *cis*. Le point de fusion est la température à laquelle un CG passe de l'état solide à l'état liquide (MASSON, 2002).

La température de fusion des AG augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée [les AGS à chaîne courte ($n < 10$) sont liquides à température ambiante ; les AGS à $n > 10$ sont solides à température ambiante] et elle diminue avec le nombre de doubles liaisons *cis* ; les AG *trans* ont tendance à avoir un point de fusion plus proche des AGS correspondants. Les points de fusions des acides palmitique, oléique et linoléique sont respectivement de 62.9°C, 16.3°C et -5°C (SCRIMGEOUR, 2005).

Ainsi, le point de fusion des TAG reflète généralement sa composition en AG ; les TAG riches en AGS à longue chaîne ont un point de fusion élevé, alors que ceux riches en AGPI ont un point de fusion inférieur ; par exemple dans la série des C18, la différence de température du point de fusion entre un AGS et un AGI avec une seule double liaison en configuration *cis* est de 50°C. Le point d'ébullition correspond à la température à partir de laquelle un composé passe de l'état liquide à l'état gazeux. Il augmente lorsque le nombre de carbones augmente, mais ne varie pratiquement pas en fonction du nombre d'insaturations.

Dans des huiles végétales, les AGI sont estérifiés en position S_{n-2} ; les AGS sont portés dans les positions S_{n-1} et S_{n-3} . Comme tenu de sa teneur élevée en acide linoléique, le principal TAG de l'huile de tournesol est le tri-linoléine (36,3%), suivi d'oléo-di-linoléine (29,1%) ; le tri-oléine étant pratiquement inexistant (0,6%). Ainsi, le pourcentage des TAG avec plusieurs doubles liaisons est supérieur à 80%. Cette distribution de TAG est responsable du faible point de solidification de l'huile de tournesol classique, soit de -16°C à -19°C (GROMPONE, 2005).

Les lipides riches en ces AGPI sont susceptibles de s'oxyder. La présence d'une double liaison dans la chaîne hydrocarbonée d'AG affaiblit les liaisons C-H de l'atome de carbone se trouvant à côté de la double liaison et ainsi facilite l'abstraction de l'hydrogène (H). L'oxydation génère un radical libre suite à une réaction catalysée par la chaleur, la lumière, des traces de métaux ou des enzymes. Le carbone radicalaire tend à se stabiliser par un réarrangement moléculaire pour former un diène conjugué (CD).

L'oxydation des lipides est l'une des causes principales de la détérioration de la qualité d'un aliment ; elle diminue la qualité nutritionnelle, altère le goût, modifie la texture et l'aspect de la denrée et raccourcit sa durée de conservation. Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit d'une part de facteurs intrinsèques, tels que la composition en AGI (concentration et nombre d'insaturations), l'activité de l'eau, la présence de pro-oxydants (ions métalliques, hèmes, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc.), et d'autre part de facteurs environnementaux dont les principaux sont la température, la lumière et la pression partielle en oxygène (HSIEH *et al.* 1989).

Ainsi, l'oxydation des lipides insaturés, notamment celle des AGI, se produit selon trois mécanismes, la photo-oxydation, l'auto-oxydation et l'oxydation catalysée par des enzymes. L'auto-oxydation en est la plus fréquente. Les AG peuvent être auto-oxydés tout en étant libres (AGL) ou en étant combinés dans des glycérolipides ou des glycolipides. Par ailleurs, il a été remarqué qu'un AGPI estérifié à la position S_{n-2} de la molécule de glycérol est mieux protégé contre l'oxydation que lorsqu'il se trouve à la position S_{n-1} (WIJESUNDERA, 2008).

II. Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras insaturés

Les lipides contenant des AGI subissent une peroxydation spontanée. L'auto-oxydation est catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ; la photo-oxydation est initiée par la lumière UV en présence de photo-sensibilisateurs (exemples : la chlorophylle, la riboflavine ou les hémoprotéines) et catalysée par l'oxygène *singulet* ; l'oxydation enzymatique est initiée par la lipoxigénase.

L'auto-oxydation aboutit à la formation de nombreux composés allant de la formation des produits primaires de type hydroperoxydes jusqu'à celle des produits terminaux (aldéhydes, composés cycliques, composés polaires et polymères).

Cette oxydation spontanée, réaction auto-catalytique, est responsable de la dévalorisation des aliments et de la dénaturation des tissus de l'organisme vivant. La modification peroxydative des lipides insaturés peut être provoquée par des réactions déclenchées par des espèces de radicaux libres, tels que les radicaux *peroxyls* et des espèces non radicalaires, tel que l'oxygène *singulet* ($\bullet\text{O-O}\bullet$ ou $^1\text{O}_2$). Ce dernier est la forme excitée du dioxygène (O_2) qui est à l'état triplet ; il est rendu chimiquement très réactif par la présence d'électrons de valence non appariés.

La formation de l'oxygène *singulet* est souvent liée la présence d'un photosensibilisateur. Ce dernier qui est à l'état triplet, absorbe des photons et passe à l'état *singulet*. Il transmet son énergie d'excitation électronique à l'oxygène moléculaire qui devient excité à son tour pour donner l'oxygène *singulet* qui est environ 1 500 fois (forme Δg^1O_2) plus réactif que l'oxygène triplet.

A la différence de l'oxygène *singulet* (1O_2 état excité, forme réactive), l'oxygène à l'état triplet (3O_2 état fondamental) ne peut pas se fixer directement sur les doubles liaisons de l'AGI. Ainsi, une étape d'initiation par des radicaux libres est nécessaire pour permettre cette fixation et la formation des hydroperoxydes. L'auto-oxydation implique l'AGI et l'oxygène sans l'intervention de la lumière et d'un catalyseur. Avant le déroulement de cette réaction, l'AGI ou l'oxygène doit, donc, être activé.

La réaction, en chaîne radicalaire, entre ces deux substrats se déroule en trois étapes : initiation, propagation et arrêt (GORDON *et al.*, 2001). L'oxydation commence par l'abstraction de l'atome d'hydrogène du carbone ' α ' (CH_2) se trouvant à coté d'une double liaison avec formation d'un radical *alkyle* (R^\bullet). Cet AGI radical fortement réactif peut ensuite réagir avec l'oxygène pour former un radical *peroxy* (ROO^\bullet) dans une réaction de propagation. Durant la phase de propagation, les radicaux *peroxy* réagissent avec un autre AGI pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical (AGI amputé d'un H) instable. Cet AGI radical réagit alors avec l'oxygène et génère ainsi un autre radical *peroxy*, décrivant ainsi un mécanisme cyclique auto-catalytique.

L'arrachement de l'atome hydrogène par un radical libre est assez spécifique et survient préférentiellement au niveau des hydrogènes *allyliques* pour lesquels l'énergie d'activation de la liaison C-H est la plus faible. Un radical libre existe à l'état libre ; il contient un ou plusieurs électrons non appariés. Ils sont générés suite à l'hydrolyse d'une double liaison. En présence d'un ion métallique, des hydroperoxydes (molécules instables) sont hydrolysés et en constituent la principale source de ces radicaux catalysant les réactions de propagation.

Dans le cas de l'acide linoléique, le « départ » d'hydrogène se fait principalement sur le carbone 11 ; la fixation de l'oxygène se fera ensuite en positions 9 et 13. L'arrachement de l'atome d'hydrogène par un radical *hydroperoxyl* (ROO^\bullet) est favorisé par les températures élevées (à 60°C). Ce radical *hydroperoxyl*, à l'origine de cette première phase d'oxydation, est formé par le fer et surtout le cuivre présents dans l'huile :



Ces métaux lourds, très actifs, augmentent aussi la dégradation de composés issus de l'oxydation des AGI ; c'est, ainsi, que *PAZ et MOLERO, (2000)* ont montré que la présence de fer ou d'étain abaisse la stabilité thermique de l'huile d'olive.

L'étape d'initiation, lente, peut être enclenchée par l'action des radicaux libres. Etant donné que les liaisons chimiques ont des énergies de l'ordre de centaines de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, les conditions mises en jeu pour donner des radicaux sont souvent drastiques ; on en cite entre autres, les hautes températures appliquées au niveau industriel lors du raffinage (*désodorisation à 180-240°C*) et au cours de la cuisson et friture (*180°C*).

Par ailleurs, les radicaux libres se forment suite à la scission des hydroperoxydes préalablement formés lors d'un stockage inadéquat des huiles ou des aliments contenant des lipides insaturés. Ainsi, l'oxygène n'est pas responsable de cette réaction initiant la peroxydation. En biologie, le terme « radical libre » est utilisé pour désigner les dérivés réactifs de l'oxygène ou « espèce réactive oxygénée » (*Reactive oxygen species : ROS*) ou « radicaux oxygénés libres » ; il s'agit d'une classe spécifique de radicaux ; on en cite, entre autres, des peroxydes et des ions oxygénés. Ces ROS se forment lors de l'utilisation de l'oxygène dans la mitochondrie ; elles sont particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire à cause de leurs propriétés oxydantes.

Le H de CH_2 proche de la double liaison de l'AGI sera remplacée par OO dans le peroxyde lipidique ($-\text{CH}=\text{CH}- + \text{O}_2 \longrightarrow -\text{CH}_2-\text{O}-\text{O}-\text{CH}_2-$) c'est l'étape de propagation. Les réactions de la phase de propagation sont principalement responsables de la nature auto-catalytique de l'auto-oxydation. Durant cette phase, rapide, la concentration des hydroperoxydes augmente sensiblement et la consommation d' O_2 est proportionnelle :



Cette étape est caractérisée, aussi, par la formation de composés secondaires d'oxydation. En effet, les hydroperoxydes peuvent réagir avec l'oxygène pour former d'autres produits secondaires, tels que des *epoxyhydroperoxydes*, des *cetohydroperoxydes*, des *dihydroperoxydes*, des peroxydes cycliques et des *endoperoxydes bicycliques*. De plus, les hydroperoxydes peuvent se condenser en polymères, susceptibles de se décomposer en composés volatils.

L'acide linoléique, après action de l'oxygène, donne essentiellement deux hydroperoxydes isomères : hydroperoxydiènes conjugués majoritaires, le 13-OOH $\Delta 9_{cis}$, 11 $trans$ et le 9-OOH $\Delta 10_{trans}$, 12 cis (figure 1). La phase de terminaison correspond à la disparition des peroxydes, à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation, autrement dit, l'oxydation complète du substrat. Il se forme des polymères non-radicalaires

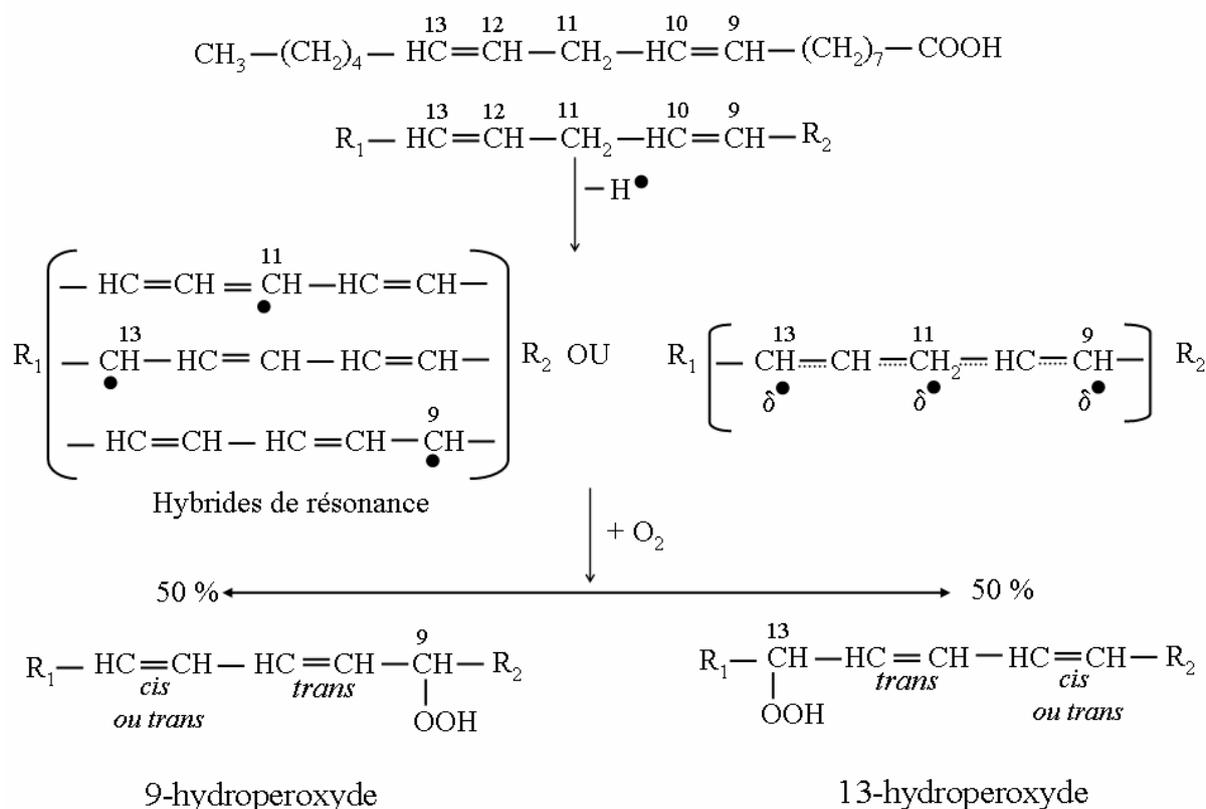
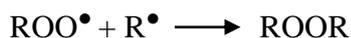


Figure 1 : Auto-oxydation d'une molécule d'acide linoléique
(FRANKEL et FRIEDMAN, 1957)

La décomposition des hydroperoxydes par le chauffage ou par l'action catalytique d'ion métallique de transition peut produire des radicaux *peroxyls* et *alcoxyles* (HEADLAM et DAVIES, 2003). La formation du radical *peroxyl* est l'étape principale de l'étape de propagation (NIKI et al., 2005) pendant laquelle les radicaux libres « s'attaquent » aux AG. Les antioxydants peuvent convertir ces radicaux en une forme inactive, beaucoup plus stable bloquant ainsi cette réaction de propagation (HARRY-O'KURU et al., 2002 ; YAMANE, 2002 ; OKIEIMEN et al., 2005).

L'hydroperoxyde, produit primaire instable, est scindé en composés secondaires. Il se forme des composés volatils, tels que des aldéhydes, cétones, l'acide organique, l'époxyde ou des polymères conférant un goût piquant et fort. Ceci accélère l'oxydation du pigment, de l'arôme et des vitamines, ce qui rend les aliments contenant les lipides insaturés complètement rances (accumulation de radicaux peroxydes).

De plus, l'oxydation des lipides peut entraîner la formation de produits d'oxydation potentiellement toxiques (oxycholestérol, malonaldehyde, endoperoxydes, acroléine, polymères de peroxydes) (STAN, 1992 ; KIM et MIN, 2008 ; FARHOOSH et ESMAEILZADEH KENARI, 2009). *In vivo*, la peroxydation est responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres.

II.1. Formation de radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute entité indépendante contenant un ou plusieurs électrons non appariés, représenté(s) par un point dans la formule chimique correspondante. On en cite : le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et l'hydroxyle ($^{\bullet}OH$). Les radicaux libres sont générés suite à l'hydrolyse d'une double liaison. Ils peuvent réagir avec d'autres molécules de plusieurs manières (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1989 ; SIES, 1991). Du fait de sa grande réactivité, un radical libre a une durée de vie très courte, 10^{-3} à 10^{-6} seconde.

La plupart des molécules biologiques ne sont pas radicalaires. Quand un radical cède ou capte un électron ou s'additionne à une molécule non radicalaire, celle-ci devient un radical. Ainsi, la réaction des radicaux libres avec des entités non radicalaires est un processus en chaîne : un radical en engendre d'autres.

L'abstraction d'un atome d'hydrogène d'une molécule biologique laisse un électron non apparié sur l'atome amputé de cet hydrogène. Les radicaux fortement réactifs, comme le $^{\bullet}OH$, ciblent les molécules biologiques (y compris des lipides) par abstraction d'un atome

d'hydrogène. C'est le point de départ de la peroxydation des lipides (*HALLIWELL et CHIRICO, 1993*).

Il est maintenant bien établi que les radicaux libres notamment le $O_2^{\bullet-}$ et d'autres ROS, comme le H_2O_2 sont générées continuellement *in vivo* (*HALLIWELL et CHIRICO, 1993*). Ils sont susceptibles de provoquer des dommages cellulaires où ils s'accumulent en excès (*FRIDOVICH, 1989*).

Ils sont formés suite à une perte ou un gain d'un électron par un composé non radicalaire. Par ailleurs, ils peuvent facilement être formés quand une liaison covalente est rompue (*HALLIWELL and CHIRICO, 1993*). Ainsi, la combinaison de deux radicaux forme une liaison covalente.

Les peroxydes sont des molécules comportant un ou plusieurs atomes d'oxygène possédant un électron célibataire. Ils appartiennent aux radicaux libres de l'oxygène parmi lesquels, on distingue : les atomes d'oxygène sous une forme de radical libre : anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $\bullet OH$, oxyde nitrique, peroxydite, radical nitrosyl et les atomes d'oxygène sous forme de peroxydes : on parle alors de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) ou de peroxydes organiques (ROOH).

Les peroxydes sont des molécules instables appelées au sens large radicaux libres de l'oxygène. Cette structure chimique caractéristique les rend néfastes pour l'organisme vivant. En effet, pour combler la vacance de leur orbite par appariement avec un autre électron et stabiliser ainsi leur énergie, ils interagissent avec divers composés comme les AGPI des phospholipides des membranes cellulaires, les acides nucléiques et les acides aminés des protéines induisant ainsi une perte d'activité enzymatique (*BONNEFIS, 2005*).

Leur accumulation excessive provoque des dommages cellulaires irréversibles. Ce phénomène est appelé stress oxydant. Il résulte soit d'une augmentation de production de ces radicaux par voie endogène (dans une moindre mesure cependant) lors d'une inflammation et aussi par des processus exogènes lors d'une exposition importante à des sources extérieures (fumées, pollution, radiations, rayons UV et X, etc.) ou d'un défaut des systèmes de défense contre ces radicaux. Ces facteurs exogènes augmentent le métabolisme anormal mitochondrial et par conséquent une production de radicaux libres dans l'organisme (*BONNEFIS, 2005*).

Il importe de souligner que la nature et la quantité d'AGPI absorbés (peroxydes alimentaires absorbés ou composition lipidique inadéquate) peuvent conduire à la formation de radicaux libres dans l'organisme. Les radicaux libres participent à la peroxydation des lipides tissulaires, et donc créent des anomalies dans la structure des membranes cellulaires.

Les produits d'oxydation ainsi formés sont appelés peroxydes. Ces molécules sont très instables et peuvent à leur tour produire des diènes et triènes conjugués. Tous ces composés instables se révèlent toxiques notamment pour les membranes cellulaires. Ils sont impliqués dans la pathogénie de certains cancers et d'autres maladies telles que des troubles cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

La peroxydation des lipides est initiée suite à une action sur la chaîne latérale d'un AG ou d'acyle gras de toutes les espèces chimiques ayant une réactivité suffisante pour soustraire un atome d'hydrogène du méthylène. Plus le nombre de doubles liaisons sur la chaîne latérale d'un AG est élevé, plus le déplacement d'un atome d'hydrogène est facile, c'est ce qui explique la susceptibilité particulière des AGPI à la peroxydation.

Néanmoins, l'organisme vivant recèle plusieurs moyens de défense, telles les molécules anti-oxydantes de faibles poids moléculaires, permettant de réduire les effets délétères de ces espèces chimiques réactives. Ces molécules réductrices immobilisent les radicaux libres formés au cours de réactions d'oxydoréduction. Un déséquilibre entre la production excessive de molécules oxydantes (tels que les radicaux $\bullet\text{OH}$ ou $\text{O}_2\bullet^-$) et/ou une diminution du taux d'antioxydants dans l'organisme est défini par le terme de stress oxydant.

III. Mécanisme d'anti-oxydation des lipides par les composés phénoliques

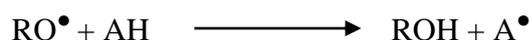
Un antioxydant est défini comme "toute substance capable de retarder ou de ralentir le rancissement (action de l' O_2 sur des AGI), la décoloration ou l'apparition de saveurs indésirables dues à l'oxydation". Ainsi, l'antioxydant augmente la durée de vie d'un aliment et réduit les pertes en vitamines ou en AGE.

La vitesse de détérioration de l'acide linoléique diminue avec l'augmentation de la concentration en anti-oxygène dans le milieu. Néanmoins, l'ajout de fortes concentrations induit l'effet inverse (effet pro-oxydant), comme dans le cas de fortes doses d' α -tocophérol (CILLARD *et* CILLARD, 1980). Il importe de souligner l'effet temporaire des vertus des antioxydants ; ces molécules, sous leurs formes actives, disparaissent progressivement du milieu. Les antioxydants peuvent être classés, selon leurs modes d'action, en antioxydants primaires et en antioxydants secondaires. Ils peuvent intervenir à toutes les étapes du processus oxydatif radicalaire.

Les composés phénoliques font partie des antioxydants primaires où figurent les anti-oxygènes de synthèse, tels le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) (KORTENSKA *et al.*, 2002). Ces antioxydants synthétiques sont perçus comme

potentiellement toxiques par les consommateurs et par conséquent, les antioxydants naturels leur sont souvent préférés. Les extraits de romarin (*Rosemarinus officinalis* L.) sont utilisés en fabrication dans les industries agro-alimentaires ; leur activité anti-oxydante consiste en l'inhibition des radicaux libres (BASAGA *et al.*, 1997 ; VARELTZIS *et al.*, 1997). Les principes actifs de cet extrait naturel sont des molécules phénoliques et les acides *carnosique*, *romarinique* et *carnosol*. Ces antioxydants phénoliques sont efficaces à faible concentration ; ils sont utilisés souvent, en fabrication, à des doses inférieures à 0,01% (RAJALAKSHMI *et NARASIMHAN*, 1996).

Les antioxydants de type I (ou antioxydants de la rupture de la chaîne d'oxydation) agissent particulièrement sur les radicaux lipidiques pour les inactiver en les stabilisant (SHAHIDI *et al.*, 1992). Ils retardent ou inhibent l'étape d'initiation en séquestrant les radicaux libres ou interrompent la phase de propagation en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents.



(AH : antioxydant et A[•] : radical de l'antioxydant)

Les antioxydants les plus efficaces sont ceux ayant les énergies de liaisons les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène (énergie de dissociation homolytique de la liaison O-H). Plus cette énergie est faible, plus le caractère donneur d'atome hydrogène du phénol est élevé (DANGLES, 2006). Par ailleurs, l'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux *phénoxyliques* par la délocalisation des électrons autour du cycle aromatique (figure 2). L'efficacité d'un composé phénolique dépend, également, du nombre de fonction OH à hydrogène labile (CUVELIER *et al.*, 1992 ; GUNSTONE, 2007).

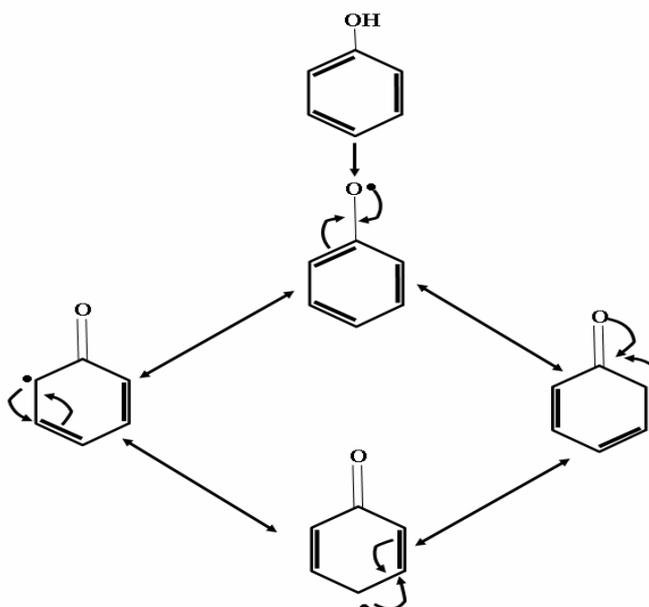


Figure 2 : Stabilisation du radical phénolique par mésomérie (BERSET, 2006)

Les tocophérols sont présents dans les huiles végétales en quantité non négligeable (0,09%, m/m) ; les isomères α et γ sont les plus fréquents ; l' α -tocophérol naturel ou de synthèse est l'antioxydant le plus utilisé ; 100g d'huile de colza renferme 26-27 mg d' α -tocophérols (DOLDE *et al.*, 1999) ; 100g d'huile de tournesol contient 49mg d' α -tocophérols (GUNSTONE, 2007). Les tocophérols et certains dérivés possèdent des propriétés anti-oxydantes ; ces molécules, à faible concentration (< 4%), ont la capacité à céder des atomes d'hydrogène aux radicaux lipidiques afin de les stabiliser, retardant ainsi l'oxydation.

Les tocophérols sont des antioxydants de rupture de chaîne ; ils agissent au niveau de l'étape de propagation et de terminaison. LAMPI *et* KAMAL-ELDIN, (1998) ont montré que l' α et le γ tocophérol empêchait la formation de polymères dans une huile à haute teneur en acide oléique chauffée à 180°C. KISHIDA *et al.* (1990) ont montré une relation inverse entre la formation du MDA et la concentration en tocophérols de l'huile de colza durant le chauffage.

Pour améliorer la stabilité d'une huile soumise à un chauffage, les tocophérols cèdent l'hydrogène de la fonction hydroxyle ; cette réaction forme des radicaux *tocophéroxyles*, puis des *tocophérylquinones* (figure 3). Les tocophérols perdent alors leur activité anti-oxydante ; ces molécules peuvent, tout de même, être régénérées par d'autres composés, comme la vitamine C et les *polyphénols* (figure 4). LI *et al.* (2002) ont montré qu'un mélange de tocophérols était plus efficace vis-à-vis de la peroxydation lipidique que l' α -tocophérol seul.

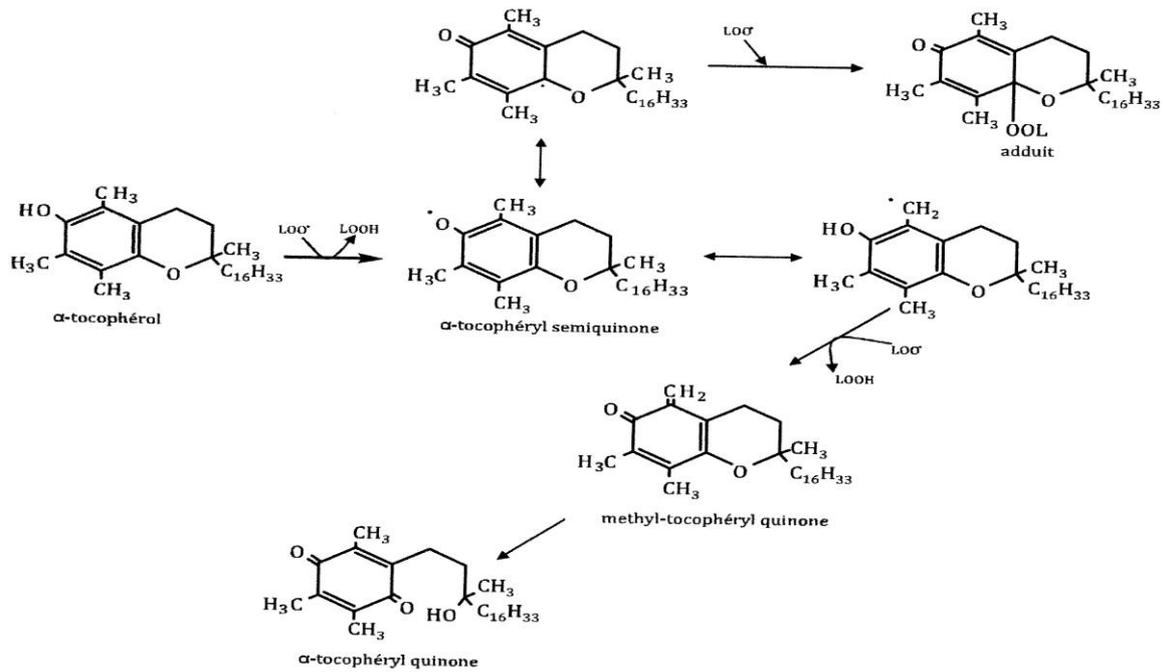


Figure 3: Mécanisme d'action de l'alpha-tocophérol (VERLEYEN, 2001)

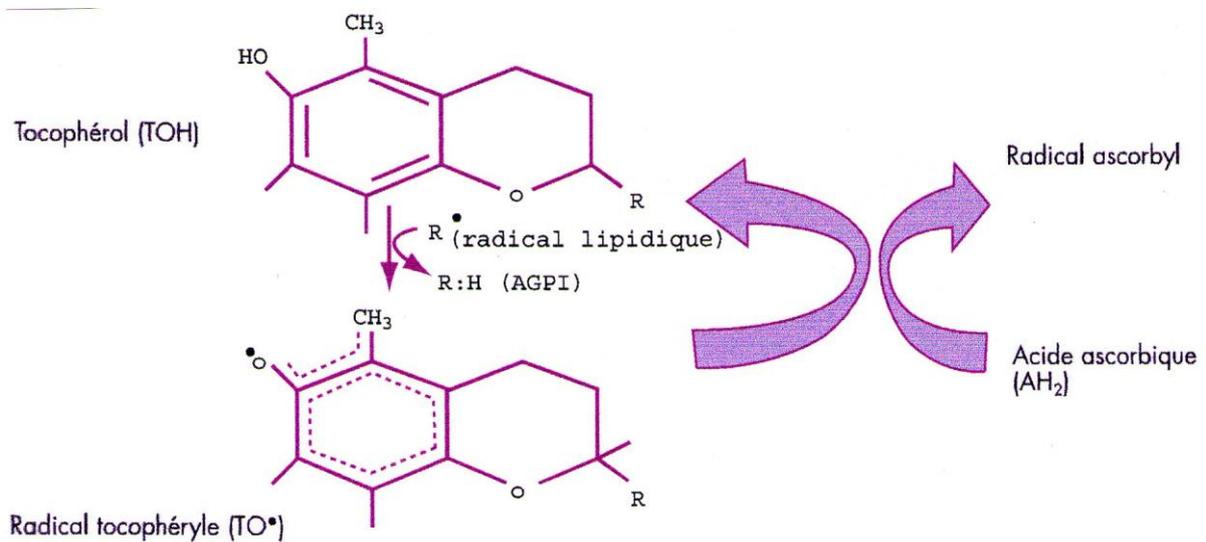


Figure 4: Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique (PINCEMAIL *et al.*, 1998)

Les radicaux *peroxyde* (LOO^\bullet) formés après avoir capté l'oxygène, lors de la phase de propagation, reçoivent un hydrogène, soit d'un α -tocophérol, soit d'un nouvel AGI, qui devient un radical. La formation de ces radicaux dépend de la présence de l'oxygène, la quantité et la capacité de l'antioxydant à céder des protons et la sensibilité des AG à l'oxydation. En présence d'antioxydants, la formation d'hydroperoxyde s'arrête ; en effet, le radical *peroxyde* réagit plus rapidement avec un tocophérol qu'avec un AGPI ; les radicaux A^\bullet sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux AGI, la propagation s'arrête alors. C'est, ainsi, que ces composés phénoliques (piégeurs de radicaux) retardent le phénomène oxydatif (*DANGLES et DUFOUR 2008*). De plus, *FRANKEL, (1998) et KAMAL-ELDIN et APPELQVIST (1996)* ont trouvé une forte corrélation entre la dégradation de l' α - et du γ -tocophérols, et le développement de l'oxydation.

Les antioxydants de type II préviennent la formation des radicaux libres selon différents mécanismes. Les acides phosphorique et citrique réduisent l'effet pro-oxydant des ions métalliques en les *chélatant*. L'association de ces deux types d'antioxydants (I et II) permet l'inhibition des phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (*FRANKEL, 1998*).

Les antioxydants de type III intègrent les facteurs de l'environnement susceptibles d'agir sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène et la lumière ; on en cite l'effet de l'emballage imperméable à l'oxygène et filtrant la lumière, le remplissage sous vide et l'introduction de gaz inerte (azote) et le CO_2 avant la fermeture des boîtes de conserve.

Les molécules synergiques améliorent l'efficacité de certains antioxydants ; on en cite les acide lactique, tartrique et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Enfin, les antioxydants de nature protéique ont aussi une activité anti-oxydante ; on cite le cas de la *carosine* (*KANSCI et al., 1997*) et des concentrés protéiques extraits du lait. Ces molécules protéiques sont susceptibles de complexer le fer ; de plus, ces agents renferment des composés poly-phénoliques et des flavonoïdes dotés d'activité anti-oxydante.

IV. Huile de tournesol

L'huile de tournesol est de couleur jaune citron, limpide, de saveur douce et d'odeur légère et agréable (DRONNE, 2001). Elle présente une grande diversité de composition en AG et en composés mineurs, tels que les tocophérols et les phytostérols. Cette huile possède des qualités gustatives et une valeur alimentaire lui permettant de tenir une place de choix parmi les autres huiles de grande consommation. Elle est riche en acide linoléique (C18 :2, ω 6) et carencée en acide α -linoléique (C18 :3, ω 3).

Sa principale qualité est, donc, sa richesse en acide linoléique que l'organisme humaine ne peut synthétiser ; cet AGE exerce une action protectrice sur la peau, les muqueuses, le système nerveux et endocrinien. Son activité est surtout remarquable en cas d'hypercholestérolémie ; de manière générale, cette huile agit favorablement sur toutes les maladies cardio-vasculaires (KARLESKIND, 1992).

Les AGPI ω 6 réduisent le risque de maladies cardiovasculaires. Les recommandations actuelles conseillant un apport nutritionnel supérieur à 5%, voire autour de 10% des apports caloriques totaux, apparaissent justifiées pour la prévention des cardiopathies ischémiques (CZERNICHOW *et al.*, 2011).

Dans le domaine alimentaire, l'huile de tournesol, seule ou combinée à d'autres, permet de répondre à des exigences technologiques (stabilité à la cuisson) et nutritionnelles (effets bénéfiques sur la santé) grâce à sa richesse en acide linoléique. La consommation d'huile de tournesol représente, à elle seule, plus de 50% des huiles de table.

L'huile de tournesol se compose d'environ 90% d'AGI [acide oléique (C18 :1, ω 9) et acide linoléique (C18 :2, ω 6)] et 10% d'AGS [acide palmitique (C16 :0) et acide stéarique (C18 :0)]. Néanmoins, cette composition en AG des TAG varie en fonction du génotype.

On distingue deux classes de tournesol : le tournesol standard (classique) offre des huiles dont la caractéristique essentielle est leur richesse en acide linoléique, 60 à 70% et une teneur en acide oléique de 15 à 20% ; le tournesol oléique est apparu pour la première fois en Russie dans les années 70 ; les huiles extraites sont riches en acide oléique (83%) (KARLESKIND, 1992).

L'akène de tournesol, appelé aussi graine, contient 55 à 70% d'huile. Les huiles brutes extraites contiennent des éléments indésirables (matières colorantes, AGL, etc.) qui influent négativement sur le goût, l'odeur, la qualité visuelle et la capacité de leur conservation.

Les huiles et MG alimentaires jugées de bonne qualité sont oxydativement stables. Toutefois, ces CG peuvent s'oxyder et développer des odeurs et goûts désagréables pendant leur élaboration, stockage et utilisations culinaires. Le traitement industriel de l'huile brute est conçu pour éliminer, en partie, les AGL et des impuretés (contaminants) susceptibles d'initier des réactions d'oxydation (*CHOW, 2008*).

Le raffinage constitue une étape clé de la technologie de production des huiles ; il permet d'obtenir une huile de qualité conforme aux exigences des différentes utilisations alimentaires humaines, animales, cosmétiques (*FRANCOIS, 1974*). Ainsi, le but du raffinage est de prolonger la durée de conservation d'une huile en éliminant les composés indésirables. Cependant, les pertes en tocophérols et en phytostérols pendant ce procédé sont importantes (*TASEN et DEMIRCI, 2005*).

Le raffinage a pour but de maintenir ou d'améliorer les caractères organoleptiques et la stabilité des CG alimentaires. La désodorisation, dernière étape du raffinage, consiste à injecter sous vide, de la vapeur d'eau dans l'huile portée à des températures comprises entre 180 et 240°C pendant une heure à quatre heures (*LINDEN et LORIENT, 1994*). Cette étape doit être maîtrisée afin de maîtriser et limiter la formation d'AG isomères *trans* (*DE GREYT et al., 1998 ; BREVEDAN, et al., 2000*).

Ainsi, la qualité et la stabilité d'une huile dépend de ses caractéristiques chimiques telles que, sa composition en AG (plus le degré d'insaturation est élevé, plus l'huile est instable) et de sa teneur en antioxydants (tocophérols, flavonoïdes, etc.). De plus, la stabilité de l'huile est influencée par les différents procédés d'extraction, de raffinage et les conditions de stockage en présence de lumière et / ou d'oxygène (*VERLEYEN, 2002*).

Les principales conséquences du raffinage des huiles sont : altération des nutriments essentiels de l'huile, destruction de la vitamine E, anti-oxydante ; ce micronutriment est essentiel à la prévention de l'oxydation et les conséquences de cette réaction d'altération chez l'organisme vivant (athérosclérose, vieillissement accélérée et cancérisation), transformation de la structure des AG, saturation d'une partie des AGI et enfin, inversion de la configuration spatiale de la chaîne hydrocarbonée d'un AGPI autour de la double liaison et son passage de la forme *cis* à la forme *trans* (*LEGOFF, 2003*).

V. Assimilation et rôle nutritionnel des lipides

Les lipides se solubilisent dans l'eau grâce aux sels biliaires (glycocholate de sodium) et les phospholipides de la bile. Ils sont d'abord émulsionnés pour faciliter l'action des lipases pancréatiques. Ces enzymes agissent préférentiellement sur les AG estérifiés en position S_{n-1} et S_{n-3} du glycérol aboutissant, ainsi, à leur libération. Les produits issus de cette action rejoignent, par diffusion passive, les cellules épithéliales de l'intestin.

Les AG à courte chaîne (< 12 carbones) et le glycérol passent directement dans le sang ; ils sont acheminés vers le foie par la veine porte. Les AG à longue chaîne y seront activés par le coenzyme A, et ils seront neutralisés pour synthétiser à nouveau des TAG ; ceux-ci seront déversés dans les vaisseaux lymphatiques.

Les chylomicrons sont formés dans la muqueuse intestinale et sont conduits jusqu'au sang par les vaisseaux lymphatiques. Ils transportent les lipides alimentaires de l'intestin jusqu'aux tissus. Dans les muscles et les tissus adipeux, les chylomicrons déversent une grande partie de TAG sous l'action de la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les TAG en glycérol et AG ; ils se transforment, alors, en résidus de chylomicrons et sont finalement captés par le foie.

Les lipoprotéines de basse densité (VLDL, IDL, LDL) transportent les TAG, le cholestérol et les phospholipides du foie aux cellules extra-hépatiques. Les VLDL sont formés dans le foie et se transforment en IDL puis en LDL en abandonnant des AG comme dans le cas des chylomicrons ; les HDL, au contraire, transportent au foie le cholestérol excédentaire des cellules extra-hépatiques et contribuent ainsi à débarrasser l'organisme d'une partie de son cholestérol via la bile et les fèces.

Comme les taux de lipoprotéines plasmatiques oxydées sont corrélés à la quantité de lipides alimentaires oxydés, il est admis de suggérer que les lipides alimentaires oxydés soient absorbés par l'intestin grêle et incorporés dans les chylomicrons ; ils atteignent la circulation sanguine où ils contribuent à la constitution du pool de lipides oxydés corporels (*STAPRANS et al., 1994*). Ainsi, les produits d'oxydation des huiles et MG alimentaires peuvent exercer des effets cardiovasculaires délétères et contribuer à la pathogénéicité de l'athérosclérose (*COHN, 2002*).

Un tiers de l'énergie totale d'un homme adulte (estimée à 2500 Kcal / jour) est apporté par les lipides ; la quantité de lipides ingérée quotidiennement est d'environ 100g (MALVY et al., 1999). Après leur absorption au niveau intestinal par les entérocytes, les AG sont transportés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines ; celles-ci approvisionnent les tissus périphériques (tissu adipeux, muscle et foie).

Dans le foie, les AG sont métabolisés puis redistribués sous forme de VLDL dans l'ensemble de l'organisme. Par leur catabolisme, notamment par la β -oxydation mitochondriale, tous les AG alimentaires fournissent de l'énergie (1 g en fournit 9 kilocalories, contre 4 kilocalories pour les glucides et les protéines) (DURAND et al., 2002). Cependant, les AGPI des deux séries, ω 3 et ω 6 sont distribués dans les cellules de l'organisme où ils sont impliqués dans une myriade de processus physiologiques, y compris le règlement des fonctions cardio-vasculaires, immunitaires, hormonales, métaboliques, neuronales et visuelles.

VI. Effets toxicologiques des huiles alimentaires chauffées

Les effets néfastes de la consommation des huiles chauffées ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les anomalies induites diffèrent d'un organisme à un autre. Les symptômes décelés sont variés, ils consistent en une perte d'appétit, diminution de la croissance, diarrhée, modifications histologiques des tissus et à l'extrême la mort (IZAKI et al., 1984).

VI.1. Effets des produits d'oxydation des acides gras insaturés

KANAZAWA et al., (1985) ont prouvé, chez le rat, que quelques produits secondaires d'oxydation, tels que aldéhydes, des cétones, des polymères et des époxydes sont absorbés au niveau intestinal et véhiculés vers le foie. La détection du MDA dans les urines de rats après leur ingestion d'une dose de sel de sodium *énolique* indique l'absorption de ce produit secondaire d'oxydation des lipides (DRAPER et al., 1984). Par ailleurs, NARUSZEWICZ et al., (1987) ont remarqué une augmentation marquée de TBARS dans le plasma de sujets ingérant l'huile de soja thermo-oxydée, alors que les sujets consommant l'huile fraîche en présentent des niveaux plus bas.

Contrairement aux produits secondaires d'oxydation, les hydroperoxydes lipidiques sont absorbés lentement ; les radicaux peroxyils ont tendance beaucoup plus à se lier à d'autres AGI dans l'appareil gastro-intestinal ou dans l'enterocyte qu'à diffuser dans la lymphe ou le plasma (*SHEEHY et al., 1994*).

Ainsi, les produits d'oxydation des lipides peuvent être assimilés dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux. Mais, leur devenir une fois arrivés dans le plasma demeure inconnu (*FREI et al., 1988*). C'est la raison pour laquelle, des recherches sur les effets biologiques de la consommation des aliments contenant des niveaux élevés des produits d'oxydation des lipides doivent être entreprises (*SHEEHY et al., 1994*).

STAPRANS et al., (1999) ont montré que les lipides oxydés alimentaires augmentent l'oxydation des lipides des chylomicrons chez les diabétiques ayant un mauvais équilibre glycémique par rapport aux sujets témoins ou des patients diabétiques ayant un bon équilibre glycémique. L'augmentation postprandiale de lipides oxydés potentiellement athérogènes peut contribuer à la survenue de l'athérosclérose associée au diabète.

Par ailleurs, *GARRIDO-POLONIO et al., (2004)* ont montré que l'incorporation d'huile de tournesol ayant subi plusieurs cycles de fritures dans le régime alimentaire a augmenté les concentrations de cholestérol total et de cholestérol des VLDL, LDL et HDL ; le taux de *thiobarbituric acid reacting* substances (TBARS) sériques et hépatiques ont, également, augmenté.

Des produits d'oxydation d'AG et les oxydes de cholestérol ont été impliqués dans la mutagénèse, la carcinogénèse et en étiologie de maladie cardiaque coronaire (*ADDIS et WARNER, 1991*). Par ailleurs, les produits d'oxydation des AG de l'huile (peroxydes lipidiques) peuvent avoir des effets mutagènes et carcinogènes en modifiant le matériel génétique de la cellule. Certains produits secondaires de dégradation des lipides, comme le malondialdéhyde (MDA) ou les *4-hydroxycénales* peuvent avoir des effets inhibiteurs sur les systèmes enzymatiques membranaires (chaîne respiratoire) et sur la synthèse protéique (*ADDIS, 1986*). Mais, il semble qu'une consommation modérée ne semble pas être nocive puisque le taux de produits d'oxydation ingéré est bas (*ARTMAN, 1969*).

Des études ont été effectuées sur les effets physiologiques des aldéhydes volatils. Le *4-hydroxy nonenal* (4-HNE), a été particulièrement étudié ; ce produit est biologiquement actif et présente des propriétés cytotoxiques, hépatotoxiques, mutagéniques et génotoxiques (ESTERBAUER *et al.*, 1990 ; ESTERBAUER *et al.*, 1991). Les aldéhydes se combinent, également, aux protéines en formant des *aldimines* avec des groupes aminés libres (GARDNER, 1983) ; les aldéhydes α , β -insaturés sont particulièrement réactifs vis-à-vis des groupements *sulphydryls*.

Par ailleurs, on a constaté que des fractions contenant des composés de bas poids moléculaire du linoléate de méthyle ou d'acide linoléique au carbone 14 marqué auto-oxydé ont été facilement absorbées et distribuées dans les tissus de rat (KANAZAWA *et al.*, 1985 ; OARADA *et al.*, 1986). Enfin, on a rapporté que l'acide 9-oxononanoïque, l'acide aldéhydique majeur des lipides oxydés, pourrait induire la peroxydation des lipides hépatiques (MINAMOTO *et al.*, 1985) et affecter le métabolisme hépatique (MINAMOTO *et al.*, 1988 ; KANAZAWA *et al.*, 1991).

VI.2. Effets des acides gras *trans*

Au cours des traitements thermiques (la désodorisation ou la friture), les AGPI, tel que l'acide linoléique (C18 :2, 9*cis*, 12*cis*) sont soumis à des températures pouvant dépasser 200°C. Dans ces conditions, les liaisons éthyléniques de la géométrie *cis* subissent une isomérisation géométrique donnant un mélange d'AG possédant une ou plusieurs liaisons *trans* (SEBEDIO *et al.*, 2007).

Les AG *trans* entrent dans la composition des aliments. Ils se retrouvent dans les tissus de l'organisme vivant. En général, la quantité d'AG *trans* mono-insaturés ingérée est plus grande que celle d'AG *trans* polyinsaturés (ECKEL *et al.*, 2007). Pendant la friture (à 180°C), il se forme une quantité relativement négligeable d'AG *trans* (ROMERO *et al.*, 2000) ; la quantité formée est de l'ordre du mg/Kg (GAMEL *et al.*, 1999). Néanmoins, cette quantité augmente lorsque l'huile de bain de fritures n'est pas régulièrement remplacée (CHOW, 2008).

Des essais cliniques, menés en 1990, ont montré que la consommation d'AG *trans* induisait, comme les AGS, une augmentation du cholestérol plasmatique, notamment le C-LDL ; mais, à la différence des AGS, une baisse du taux de C-HDL pouvait se produire. En conséquence, les AG *trans* pouvaient être plus athérogènes que les AGS (VAN de VIJVER *et al.*, 2000 ; SUN *et al.*, 2007).

MENSINK et al., (2003) ont montré qu'une augmentation de 1% de la consommation en AG *trans* (18 :1 *trans*) au dépens des glucides entraînerait une élévation du C-LDL de +0,040 mmole/L ($p = 0,002$) ; par contre, l'effet sur le C-HDL serait similaire à celui des glucides. L'estimation de l'impact sur le rapport CT / C-HDL serait de +0,022 mmole/L ($p = 0,015$).

En outre, des études menées par *ASCHERIO et al.*, (1996) ; *PIETINEN et al.*, (1997), *OOMEN et al.*, (2001) ; *OH et al.*, (2005) ont montré qu'une augmentation de 2% de l'apport énergétique total par les AG *trans* augmentait de 23% le risque de maladies cardiovasculaire (*MOZAFFARIAN et al.*, 2006). De plus, la consommation d'AG *trans* promouvait l'inflammation (*MOZAFFARIAN et al.*, 2004 ; *LOPEZ-GARCIA et al.*, 2005) et un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Mais, la relation entre AG *trans* et diabète est encore controversée (*MOZAFFARIAN et al.*, 2006).

L'acide linoléique conjugué (CLA) regroupe l'ensemble des isomères de position et géométriques de l'acide linoléique ; il est caractérisé par la présence de doubles liaisons conjuguées, non séparées par un groupe méthylène. Les isomères de CLA sont des composés mineurs dans les lipides. L'isomère le plus abondant est le *cis*-9, *trans*-11 ; il représente jusqu'à 80% de CLA total dans les aliments. Ces isomères sont métabolisés dans l'organisme selon différentes voies métaboliques. L'isomère 10-*trans*, 12-*cis* est oxydé plus efficacement que l'isomère 9-*cis*, 11-*trans* du fait de la position de ses doubles liaisons.

Le CLA est présent à l'état naturel dans le lait et la viande des ruminants ; il est produit par les bactéries anaérobies dans le rumen de ces animaux ; il peut, également, être produit industriellement par l'hydrogénation partielle de l'acide linoléique (*CHIN et al.*, 1994 ; *PARODI*, 1994).

La consommation de CLA semble être bénéfique pour la santé ; il a un effet contre le cancer (*anticarcinogenic*) (*IP et al.*, 1994, 1997 ; *THOMPSON et al.*, 1997), anti-atherogénique (*LEE et al.*, 1994 ; *NICOLOSI et al.*, 1997) et antidiabétique (*HOUSEKNECHT et al.*, 1998). Il a, également, été rapporté que le CLA diminue la masse grasse et augmente la fraction maigre de l'organisme (*WEST et al.*, 1998 ; *DELANY et al.*, 1999 ; *BLANKSON et al.*, 2000).

En outre, des études sur les animaux ont révélé des effets favorables du CLA sur la fonction immunitaire (WONG *et al.*, 1997 ; TUREK *et al.*, 1998 ; HAYEK *et al.*, 1999 ; YANG *et al.*, 2000). Toutefois, ces effets bénéfiques chez l'homme ne sont pas encore établis (KELLEY *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré que le CLA empêche le développement de plusieurs types de tumeurs induites ; on en cite certaines tumeurs de la peau (BELURY *et al.*, 1996), tumeurs mammaires (IP *et al.*, 1991, 1995 ; THOMPSON *et al.*, 1997) et le *gastrointestinal carcinomas* (HA *et al.*, 1990).

Les effets biologiques de CLA incombent à l'action distincte des isomères cités précédemment. Néanmoins, quelques effets peuvent également être induits et / ou catalysés suite à l'action synergique de ces deux isomères. Bien que l'isomère *cis*-9, *trans*-11 soit le principal responsable de l'effet *anticarcinogenic*, l'isomère *trans*-10, *cis*-12 réduit l'accumulation des lipides dans l'organisme et est considéré comme le plus efficace sur les lipides sanguins. Ces deux isomères sont, toutefois, considérés responsables du syndrome de la résistance à l'insuline chez l'homme. Concernant le système immunitaire, le mode d'action des différents isomères de CLA n'est pas élucidé.

Des résultats expérimentaux ont montré que l'isomère 9*cis*, 11*trans* de CLA a un effet antioxydant (HA *et al.*, 1990 ; IP *et al.*, 1991). Combinés aux phospholipides des membranes cellulaires, ces isomères protègent celles-ci contre les effets néfastes des radicaux libres et empêchent la formation des peroxydes des AGI.

Ainsi, l'augmentation du contenu en acide linoléique (C18 :2, ω 6) et acide α -linoléique (C18 :3, ω 3) dans le régime s'avère une voie efficace dans l'élévation de la concentration en CLA dans les tissus de ruminants ; le CLA est, en effet, un produit intermédiaire de l'hydrogénation des AGI dans le rumen.

La supplémentation du régime avec de l'huile de tournesol a induit une augmentation du contenu intramusculaire en CLA des agneaux (IVAN *et al.*, 2001). Les contenus en 9-*cis*, 11-*trans* du muscle en étaient encore plus élevés. Ces deux isomères de l'acide linoléique ont des effets favorables en nutrition humaine.

Une autre possibilité d'accroître la teneur en CLA des produits animaux (lait et viande) consiste à fournir aux animaux le forage vert, principalement des herbes, comme partie substantielle du régime. En effet, on a rapporté que la teneur en CLA du lait ou du muscle est plus élevée chez les bovins de pâturage que chez les animaux « logés » et nourris au concentré (KELLY *et al.*, 1998 ; FRENCH *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Les résultats obtenus par *HUSVÉTH et al., (2011)* ont montré que les différentes sources d'AG alimentaires sont susceptibles d'augmenter le contenu de CLA dans la viande des agneaux. En plus des huiles végétales riches en AGPI, l'herbe ensilée peut constituer une bonne source alimentaire pour modifier la composition en AG de la viande d'agneau.

Néanmoins, les CLA ne possèdent pas que des avantages. En effet, *HUSVETH et al., (2011)*, le CLA *trans*-10, *cis*-12 alimentaire induit une stéatose hépatique sévère chez les souris ; cette accumulation de lipides au niveau hépatique est due, selon ces *auteurs*, d'une part à l'utilisation accrue des AG mobilisés du tissu adipeux et l'incapacité du foie à augmenter suffisamment l'oxydation des AG et la libération des TAG synthétisés d'autre part.

Selon ces *mêmes auteurs*, le CLA alimentaire n'a aucun effet sur la β -oxydation des AG ; de plus, la biosynthèse des AGPI à longue chaîne a diminué sensiblement par inhibition de la désaturation et l'élongation de l'acide linoléique.

Le CLA peut être généré lors du traitement thermique des huiles. Hormis ses propriétés contre le cancer, le CLA semble avoir des effets cytotoxiques sur le système de défense antioxydant des enzymes des hépatocytes de rat. Ces effets cytotoxiques se traduisent par l'inactivation de l'enzyme, la lactate déshydrogénase et le ralentissement de la gluconéogenèse. De plus, le CLA a une action pro-oxydante ; il affecte l'intégrité de la membrane, la fonction métabolique, la composition des lipides cellulaires, la peroxydation des lipides et l'activité des enzymes anti-oxydantes.

VII. Conséquences du stress oxydant sur les tissus

Le stress oxydant est défini comme une accumulation des métabolites oxydants dans l'organisme ou dans un compartiment cellulaire. Cette définition a été complétée et inclut la présence de métabolites oxydants ou une insuffisance relative en antioxydants. L'oxygène moléculaire est à l'origine de beaucoup d'espèces oxydantes fortement réactives qui peuvent directement endommager ou mener à la génération des réactions secondaires qui enclenchent alors des processus oxydants.

Le stress oxydant est susceptible d'induire, dans la cellule, des perturbations inter métaboliques, comme la rupture des brins d'ADN, une augmentation de calcium libre intracellulaire, perturbation de transfert d'ion membranaire et/ou d'autres protéines spécifiques et la peroxydation des lipides. Les dommages peuvent être directs (par exemple, si H_2O_2 oxyde des groupes *thiol* et/ou indirect si $\bullet OH$ est formé près des filaments d'ADN).

Ainsi, une élévation excessive de calcium libre intracellulaire peut activer les protéases et les nucléases (fragmentant l'ADN). Les protéines kinases, les protéines contenant du thiol (liaisons *thiols*) (telle que la *thioredoxine* de la surface cellulaire) et des récepteurs de la surface de la cellule peuvent toutes répondre au stress oxydant mais de manière à perturber le métabolisme de cellules.

La production excessive de radicaux libres ou le stress oxydant peut être impliqué dans l'expression de la pathophysiologie de la schizophrénie ; ceci est mis en évidence par l'activité accrue de superoxyde dismutase (SOD), enzyme clé de détoxification des radicaux superoxydes. Le stress oxydant est plus grand chez les patients schizophrènes. De plus, la teneur en cytochrome P-450 a augmenté significativement chez des rats nourris avec un régime contenant 15% d'huile de friture de soja (*HUANG et al., 1988*).

La peroxydation des lipides contribue à la survenue de l'athérosclérose ou du traumatisme crânien ou ischémique ou des lésions du cerveau ou de la moelle épinière. Les radicaux *peroxyls* peuvent se combiner entre eux ou cibler des protéines membranaires ou capte un hydrogène à partir d'une chaîne latérale d'un AG adjacent propageant ainsi la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides. Ainsi, une simple action peut convertir une centaine d'AG en hydroperoxydes lipidiques.

Le déroulement de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques cause son dysfonctionnement, le changement de sa fluidité, l'inactivation des récepteurs et des enzymes, et enfin augmentation de sa perméabilité non spécifique aux ions, tels que le Ca^{2+} (*BURTON et INGOLD, 1989*). En outre, la déformation des globules rouges après leur exposition aux peroxydes les rend perméables aux ions K (*SUGIHARA et al., 1991*).

Néanmoins, l'organisme vivant dispose de divers antioxydants de défense ; mais, leur efficacité n'est pas absolue (pas à 100%). Cette inefficacité est due probablement au fait que certains radicaux libres et autres espèces réactives d'oxygène (ROS) ont des rôles biologiquement utiles. L'épuisement des défenses anti-oxydantes et/ou l'augmentation de la production de ROS peut compromettre l'équilibre antioxydant / ROS et causer le stress oxydant susceptible d'entraîner des dommages tissulaires (*SIES, 1991*).

L'oxydation des AGPI de la série $\omega 6$ et $\omega 3$ induit la formation des hydroperoxydes ; ceux-ci sont convertis en leurs alcools correspondants par la glutathion peroxydase (*BRYANT et BAILEY, 1980*). Cependant, ces produits primaires d'oxydation peuvent s'accumuler suite à l'inhibition de l'activité de cette enzyme, comme observé en vieillissement et diabète (*LAGARDE et al., 2003*). Les deux principaux produits de décomposition de ces hydroperoxydes sont, le 4-HNE (*ESTERBAUER et al., 1991*) et le 4-hydroxy-2e-hexenal (4-HHE) (*VAN KUIJK et al., 1990*).

Ces aldéhydes sont particulièrement nocifs parce qu'ils peuvent se combiner avec de nombreuses biomolécules, telles que les lipoprotéines, le glutathion, le phosphatidylethanolamine et les nucléotides. Le 4-HNE est détoxifié dans le foie par au moins trois voies distinctes : transformation à l'alcool correspondant, le 1,4-dihydroxynonene, réaction catalysée par la déshydrogénase d'alcool (*BOLEDA et al., 1993*) ; conversion de 4-HNE en acide carboxylique correspondant, le 4 hydroxy-2E-nonenoic (4-HNA), catalysée par la l'aldéhyde déshydrogénase (*MITCHELL et PEDERSEN, 1987*) ; enfin, sa conjugaison en glutathion, catalysée par la glutathion transférase (*JENSON et al., 1986*). Cette voie peut, à travers une série de réaction, générer de l'acide mercapturique correspondant (*ALARY et al., 1995*).

Le changement dans la structure de la membrane cellulaire suite à l'oxydation des AGPI des phospholipides induit l'afflux des ions Ca^{2+} . Ces ions catalysent les enzymes dégradantes, les phospholipases et les lipoxygénases. Les phospholipases membranaires hydrolysent la liaison et libèrent les AGPI ; les LOX transforment les AGPI liés aux phospholipides membranaires aux hydroperoxydes lipidiques (LOOHs). Les produits de la réduction enzymatiques des LOOHs se lient aux protéines induisant, ainsi, l'activation du gène traduisant une réponse physiologique menant dans un premier temps à une apoptose puis à une nécrose (*SPITELLER, 2003 ; 2005*).

MATERIEL ET METHODES

I. Objectifs de l'étude et conduite expérimentale

L'objectif central de cette étude consistait en une évaluation de la répercussion de la consommation de l'huile de tournesol thermo-oxydée chez le rat en croissance. A cet effet, l'étude a été scindée en deux parties : préparation de la thermo-oxydation de cette huile polyinsaturée et son incorporation dans le régime alimentaire pour rats. Ainsi, le premier volet de ce travail a trait à la caractérisation de l'huile de tournesol thermo-oxydée selon le barème fixé ; le deuxième volet a concerné l'effet de l'ingestion de cette huile thermo-oxydée d'une part sur la composition en AG des tissus de certains organes et les modifications histologiques induites d'autre part.

L'oxydation de l'huile de tournesol a été réalisée selon la technique, de laboratoire, mise au point par *DROZDOWSKI et SZUKALSKA, (1984)* et modifiée par *BLANC-GONDARMARY et al., (1989)*. Le dispositif expérimental de la thermo-oxydation est constitué d'un ballon tricol de capacité d'un litre ; il est monté sur une plaque chauffante ; il est muni d'un thermocouple. L'air est amené par une pompe à vide dont le débit est réglé par un manomètre. Le dispositif est équipé d'un agitateur électrique à vitesse réglable (*figure 5*).

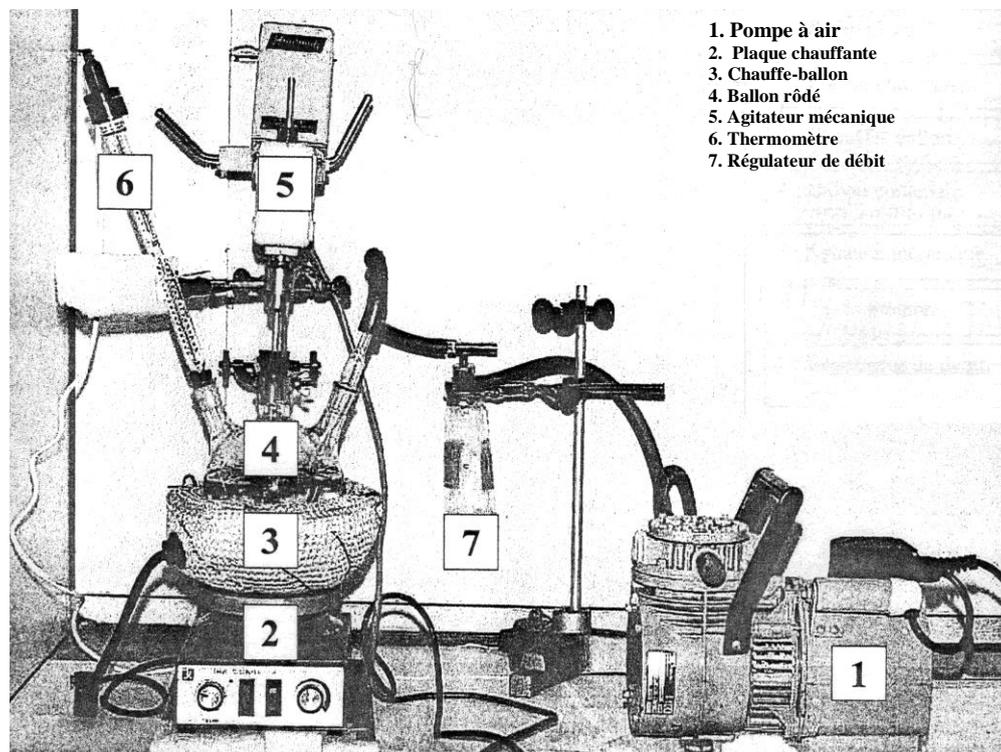


Figure 5 : Montage de l'appareil de la thermo-oxydation

L'huile utilisée dans notre étude est à 100% tournesol ; elle est commercialisée sous la dénomination « fleurial » ; elle est extraite à partir des graines de tournesol classique, *Héliantulus annus linnaeus* contenant 45% d'huile. Cette huile contient une forte proportion d'acide linoléique sous forme de TAG. Une diminution de la proportion de cet AGPI est utilisée comme un indicateur de l'oxydation des lipides.

Un volume de 500ml de cette huile fraîche a été introduit dans le ballon tricol ; l'huile, en agitation, a été maintenue à une température de $99 \pm 2^\circ\text{C}$ avec insufflation d'air à un débit de 9 litres / seconde pendant 52 heures en continue. La température est contrôlée régulièrement ; l'insufflation d'air est assurée par un accessoire du bioréacteur baignant dans l'huile. La thermo-oxydation a été menée à l'abri des rayons solaires. A la fin du processus, l'huile de tournesol thermo-oxydée a été répartie dans des flacons étanches de 100ml, dans lesquels on a introduit de l'azote avant de la conserver à -20°C et son utilisation (analyses et supplémentation du régime pour rat). L'huile fraîche a, également, été maintenue dans ces mêmes conditions de conservation.

Il a été admis que le mécanisme d'oxydation des lipides change significativement aux températures élevées et dépend fortement de la disponibilité de l'oxygène. Dans notre étude expérimentale, le processus oxydatif a été favorisé. De nombreux auteurs estiment qu'une température de 100°C est modérée par rapport aux températures appliquées dans la préparation des aliments dépassant, largement 180°C où les réactions thermiques prédominent.

II. Méthodes de dosage des produits d'oxydation des acides gras insaturés

Diverses méthodes sont employées pour évaluer l'oxydation des lipides ; certaines consistent en l'appréciation des propriétés organoleptiques, d'autres déterminent les différents changements physico-chimiques induits (GRAY, 1978 ; FRANKEL, 1993 ; WARNER et ESKIN, 1995 ; AOCS, 1993 ; IUPAC, 1992). La plupart de ces méthodes se basent sur la détermination des produits primaires ou secondaires de l'oxydation des AGI générés lors des étapes d'initiation, propagation et terminaison.

Il importe de souligner qu'il n'existe, cependant, aucune méthode standard pour détecter les changements oxydatifs pendant tout le processus ; ainsi, une combinaison de différentes techniques analytiques est habituellement exigée (GRAY, 1978 ; FRANKEL, 1993 ; WARNER et ESKIN, 1995). Certaines de ces méthodes ont été employées pour évaluer la stabilité et l'oxydation des huiles de tournesol raffinées (WARNER et al., 1989 ; GORDON

et MURSI, 1994 ; JAIMAND et REZAEI, 1995 ; TOPALLAR et al., 1997 ; CARELLI et al., 1998).

Ainsi, l'évaluation du niveau d'oxydation des huiles est difficile ; elle exige l'application de plusieurs méthodes analytiques pour déterminer son contenu en composés primaires et secondaires d'oxydation et par voie de conséquence son niveau de détérioration oxydative (FRANKEL, 2005). Ces dernières années, de nouvelles méthodes ont été mises au point pour détecter la peroxydation des lipides. Ces méthodes s'appuient sur les développements technologiques récemment acquis, compte tenu de la complexité des réactions d'oxydation (SUN et al., 2011).

II.1. Détermination des produits primaires d'oxydation

Les produits primaires d'oxydation peuvent être évalués par la détermination de la valeur de l'indice de peroxyde (IP), la perte en AGI, la valeur des CD et d'autres. L'IP est le plus utilisé ; cette méthode volumétrique mesure la concentration des hydroperoxydes. L'analyse des hydroperoxydes constitue une mesure directe de la peroxydation des lipides.

Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires instables ; ils sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre formation et décomposition des peroxydes. Les concentrations en hydroperoxydes peuvent être déterminées à l'aide de nombreuses méthodes à adapter en fonction du substrat étudié. Deux groupes de méthodes peuvent être distingués : les méthodes analytiques permettent de déterminer la concentration en hydroperoxydes et les techniques chromatographiques permettant d'identifier et de quantifier la nature et les teneurs en hydroperoxydes spécifiques (DOBARGANES et VELASCO, 2002).

L'indice de peroxyde permet d'évaluer le degré d'oxydation des AGI de la MG (rancissement). Plus celui-ci est élevé, plus la MG est oxydée. Cependant, cet indice n'est qu'un indicateur de début d'oxydation : celui-ci augmente pour atteindre un pic puis diminue avec l'état d'oxydation avancée.

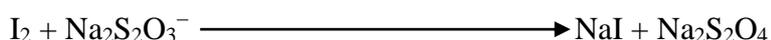
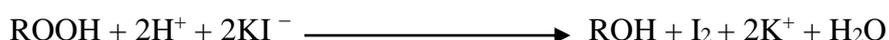
Concrètement, il est possible de trouver un indice de peroxyde élevé sur une MG qui ne présente pas encore des signes évidents de rancissement, comme l'odeur de rance, plutôt attribuables aux composés aldéhydiques volatils. Inversement, un indice de peroxyde peu élevé ne signifie pas qu'une MG n'est pas altérée, car le processus d'oxydation a pu évoluer vers la formation de composés aldéhydiques (HOLSER et ISBELL, 2000 ; LEE et al., 2004).

II.1.1. Indice de peroxyde

L'hydroperoxyde est le produit primaire de l'auto-oxydation des lipides insaturés. L'IP mesure directement la concentration des hydroperoxydes formés à l'étape d'initiation du processus d'oxydation des lipides. La revue, *the American Oil Chemists' Society* intègre plusieurs méthodes officielles de détermination de l'oxydation des lipides ; l'IP est la méthode la plus employée. Cette méthode iodométrique de titration est utilisée généralement pour doser les hydroperoxydes (*HAMM et al., 1965*).

Le principe de cette méthode est que le thiosulfate de sodium titre l'iode libéré suite à l'oxydation de l'iodure de potassium par les peroxydes présents (*LEA, 1946 ; AOCS, 1989*). Cette méthode normalisée nécessite une quantité de lipides assez importante. De plus, l'oxygène de l'air, la présence de lumière et l'absorption de l'iode par les AGI interfèrent sur le dosage (*FRANKEL, 1998*).

Ainsi la teneur en peroxyde peut être calculée directement par la titration de l'iode libéré. L'équation peut être présentée comme suit :



II.1.2. Diènes conjugués

La spectrophotométrie ultra-violette est utilisée généralement pour détecter des lipides contenant des insaturations conjuguées. Des CD peuvent être produits pendant le processus de raffinage des huiles ou lors de l'auto-oxydation. Ces CD absorbent la lumière ultra-violette aux environs de 230-240 nm, avec une forte absorption caractéristique à 234 nm.

IQBAL et al., (2005) ont déterminé le taux de CD en mesurant l'absorbance à 234 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de marque *Perkin- Elmer lambda-2* utilisant le *n*-hexane comme blanc. L'échantillon doit être dilué avant de déterminer son coefficient d'extinction moléculaire. La méthode est appliquée pour étudier l'auto-oxydation des lipides à l'état pur ; des interférences peuvent, en effet, se produire en présence de composés peroxydés d'origine non lipidique notamment (*SUN et al., 2011*).

Les CD sont souvent considérés comme indicateurs de production de radicaux libres. Mais, ces derniers sont très instables ; pour se stabiliser, ils réagiraient rapidement avec d'autres composés formés. Ainsi, les CD ne reflètent le niveau de l'auto-oxydation des lipides qu'à l'étape initiale du processus de peroxydation (*SUN et al., 2011*).

CORONGIU et MILIA (1983) ont suggéré une autre méthode UV de mesure de la formation des CD. Ces auteurs ont, d'abord, estimé l'ampleur de l'oxydation des AG en mesurant la hauteur du pic apparaissant à 233 nm, puis ont confirmé la structure des doubles liaisons conjugués par la spectrométrie H-NMR (*Nuclear magnetic resonance*). La hauteur du pic est proportionnelle au nombre d'AGPI oxydés. Cependant, l'application quantitative de cette méthode requiert la disponibilité de standard d'hydroperoxydes d'AGPI à l'état pur (SUN et al., 2011).

II.1.3. Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode simple et fortement sensible ; elle est appliquée pour déterminer les peroxydes lipidiques. HOPIA et al., (1996) ont déterminé la teneur en hydroperoxydes et la répartition des isomères *cis*, *trans* et les isomères *trans, trans* en utilisant cette technique.

Comparativement à la CPG, l'HPLC peut déterminer et distinguer les hydroperoxydes de différentes volatilités, de poids moléculaires différents ou de polarités différentes. En outre, l'HPLC munie de différents détecteurs, comme le détecteur ultraviolet, *evaporative light-scattering detector*), à détection électrochimique et un détecteur de rangée d'iode (*diode array detector*) peut être appliquée pour une diverse gamme d'échantillons (SUN et al., 2011).

GIUFFRIDA et al., (2004) ont analysé, par la technique *liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry* (LC-ESI-MS) à phase inversée utilisant un analyseur triple *quadrupole mass*, des epoxy et hydroperoxy de TAG formés à partir de l'oxydation des TAG contenant l'acide oléique. Ces auteurs estiment que cette approche peut être adaptée à l'étude d'autres molécules oxydées.

En analysant et distinguant les divers types d'acides aldéhydiques dans des lipides oxydés, KUKSIS et al., (1990) ont combiné deux méthodes, la chromatographie sur couche mince (TLC) et la HPLC-MS aux dérivés d'hydrazone de dinitrophenyl (*TLC and HPLC-MS of dinitrophenyl hydrazone derivatives*). Cependant, ces méthodes s'avèrent complexes notamment dans le cas où ces acides aldéhydiques soient liés au glycérol ou aux différents AG et/ou leurs produits d'oxydation. Par conséquent, l'estimation quantitative des taux de ces composés dans des lipides alimentaires serait difficile.

KAMAL-ELDIN et al., (1997) ont suggéré un procédé analytique pour détecter la présence des acides aldéhydiques dans des huiles de friture faiblement altérées. Cette méthodologie comporte d'abord la scission des acides aldéhydiques liées aux molécules de

glycérol par transmethylation ; ensuite leur solubilisation dans une solution exempte d'AG modifiés puis séparation à l'aide d'une chromatographie sur colonne de silice et enfin, leur identification par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Récemment, une méthodologie basée sur une combinaison de la chromatographie d'adsorption et d'exclusion a été appliquée pour étudier l'altération des huiles de friture usagées, la qualité des huiles raffinées et le dosage des composés d'oxydation des MG et des aliments gras (DOBARGANES *et al.*, 1988 ; HOPIA, 1993_a et 1993_b ; ARROYO *et al.*, 1994 ; ALBI *et al.*, 1997 ; MARQUEZ-RUIZ et DOBARGANES, 1997). Cette méthodologie permet une meilleure connaissance de l'altération thermo-oxydative des lipides ; elle assure, aussi, une évaluation concomitante des composés primaires et secondaires d'oxydation à travers la détermination quantitative des monomères de TAG et des dimères oxydés de TAG. Cette méthode a donné des résultats cohérents sur les modifications des huiles de tournesol raffinées pendant l'auto-oxydation, lors du raffinage, en chauffage conventionnel et par micro-ondes, et enfin lors de la friture.

II.1.4. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie vibrationnelle, grâce à sa richesse en informations sur la structure moléculaire, est également utilisée dans l'analyse rapide de l'oxydation des lipides. Contrairement aux méthodes chromatographiques considérées longues, les techniques modernes de l'infrarouge (IR) sont rapides et ne nécessitent aucune préparation des échantillons avant l'analyse.

Ces techniques (chromatographiques et spectrométriques par rapport aux méthodes colorimétriques) sont reproductibles et sensibles mais complexes et inadaptées à des analyses de routine. La spectroscopie en proche infrarouge (NIR) appliquée directement sur des lipides est rapide, non destructive et les résultats sont bien corrélés avec les méthodes iodométriques et colorimétriques, mais l'appareillage reste coûteux (YILDIZ *et al.*, 2001).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) fournit des informations sur les différents groupements fonctionnels présents dans l'échantillon ; ainsi, elle ne se limite pas uniquement à un type de composé comme est le cas avec les indices mentionnés ci-dessus. Cette technique a été employée pour suivre l'oxydation d'une huile sous des conditions modérées et sévères ; les changements des principales bandes d'absorption ont été interprétés (VAN de VOORT *et al.*, 1994). De nombreux auteurs ont utilisé la spectroscopie IR pour déterminer l'indice de peroxyde (GUILLEN et CABO, 2002 ; RUIZ MEDINA *et al.*, 2001), la

valeur de l'indice *para anisidine* (DUBOIS *et al.*, 1996), les composés volatils (AHRO *et al.*, 2002) et quantifier le taux de MDA (MIRGHANI *et al.*, 2002) durant l'oxydation des huiles. Certains de ces paramètres ont été également déterminés par la spectroscopie NIR (YILDIZ *et al.*, 2001 ; LI *et al.*, 2002 ; YANG *et al.*, 2005).

La spectroscopie IR est une technique sensible ; elle peut détecter les principaux produits de la peroxydation des lipides, tels que des groupements hydroxyles et hydroperoxylys lipidiques. Quelques travaux antérieurs utilisant la spectroscopie NIR et la spectroscopie moyenne infrarouge (MIR) pour mesurer la teneur en peroxyde des lipides oxydés ont été rapportés par GUILLEN *et GOICOECHEA*, (2007) ; SINELLI *et al.*, (2008).

La « NIR » est appliquée dans l'analyse des groupements fonctionnels spécifiques, tels que -OH, -CH, -NH et autres liaisons chimiques contenant l'hydrogène ; ces groupements fonctionnels représentent la plupart des principales bandes d'absorption observées dans le NIR (SUN *et al.*, 2011).

La spectroscopie NIR est une méthode d'analyse quantitative et qualitative ; elle est rapide et non destructive ; elle est employée dans de nombreux domaines, tels que l'agriculture, l'alimentaire, la chimie et la médecine. Elle peut détecter des doses de peroxydes allant de 0 à 100 meq/Kg d'échantillon. La spectroscopie MIR a, également, été employée pour mesurer l'oxydation des lipides. GUILLEN *et CABO* (1999) ont évalué la stabilité oxydative d'huiles de table à l'aide de la FT-IR.

Les principaux produits de l'étape d'initiation de la réaction de peroxydation des lipides sont des hydroperoxydes. Ceux-ci sont des espèces labiles, instables ; ils peuvent subir une dégradation enzymatique et non-enzymatique pour générer une diversité de produits secondaires complexes ; ces derniers peuvent être des hydrocarbures volatils, le MDA, un précurseur de MDA et des composés carbonylés. L'analyse des hydroperoxydes constitue une mesure directe de la peroxydation des lipides.

En analysant les spectres ¹HNMNR obtenus dans leur étude, GUILLEN *et GOICOECHEA* (2007) ont montré que lors des premières étapes de l'oxydation seuls des hydroperoxydes portant des doubles liaisons *cis*, *trans* conjugués sont formés et qu'aux étapes ultérieures des hydroperoxydes ayant des doubles liaisons *trans*, *trans* conjuguées sont générés mais à des concentrations plus faibles que les produits de départ. En outre, la présence des dérivés *hydroxy* possédant des doubles liaisons *cis*, *trans* conjugués parmi les composés primaires d'oxydation a été montrée pour la première fois.

II.2. Détermination des produits secondaires d'oxydation

L'oxydation des lipides se fait par un ensemble de réactions auto-catalytiques produisant un nombre élevé de nouveaux composés. Les produits primaires de l'oxydation des lipides sont assez instables ; ils se décomposent rapidement en divers produits secondaires. Les méthodes de dosage de quelques produits secondaires sont considérées efficaces ; les résultats obtenus reflètent le niveau réel d'oxydation. Ces produits secondaires sont généralement dosés par deux méthodes colorimétriques : le test *p-anisidine* et la teneur de l'acide thiobarbiturique ; les techniques chromatographiques analysent les produits spécifiques de l'oxydation (FRANKEL, 1998).

II.2.1. Test au thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

La méthode à l'acide *2-thiobarbiturique* (TBA) est une technique ancienne, mais souvent utilisée pour évaluer l'ampleur de l'oxydation des lipides des aliments et autres systèmes biologiques. La valeur de TBA est exprimée en milligrammes d'équivalents de *malondialdéhyde* [ou aldéhyde malonique, MDA de formule $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$] par kilogramme d'échantillon ou en équivalents de micromoles MDA par gramme d'échantillon (SALIH *et al.*, 1987 ; PIKUL *et al.*, 1989). Deux molécules de TBAs réagissent avec le MDA issu de l'oxydation des AGPI donnant une couleur rouge dont l'intensité est mesurée grâce à un spectrophotomètre ; ce complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm.

De nombreuses adaptations de cette méthode ont été proposées (VINCKE, 1970 ; GUILLEN-SANS *et* GUZMAN-CHOZAS, 1998 ; WANG *et al.*, 2002 ; ULU, 2004). Des aldéhydes, tels que les *4-hydroxy-alcénal*, les *2,4-alcadiénal*, les *2-alcénal* réagissent également avec le TBA pour former un complexe coloré (SUN *et al.*, 2001). C'est la raison pour laquelle le terme de « substances réactives à l'acide thiobarbiturique, TBARS » est employé. La réaction du TBA est réalisée en milieu acide (pH 1-2) et à haute température (70°C-100°C) pour accélérer la vitesse de réaction et augmenter la sensibilité. Certaines substances de nature glucidique sont susceptibles d'interférer avec le test.

D'autres produits d'oxydation des lipides, tels que *2-alkenals* et *2,4-alkadienals*, réagissent également avec le réactif TBA. La solution prend la teinte jaune après sa réaction avec un autre aldéhyde en milieu acide. L'absorption maximale des produits de couleur rouge et jaune est de 532 nm et 450 nm, respectivement (SUN *et al.*, 2001). Cette technique, à la TBA, a été améliorée par MARCUSE *et* JOHANSSON (1973) ; HODGES *et al.*, (1999). Comme le TBA peut former un additif non seulement avec le MDA, mais également avec

d'autres produits oxydés, cette méthode peut s'appeler également auto-oxydation des lipides insaturés dans l'émulsion alimentaire, test TBARS. Généralement, seuls les AG contenant trois doubles liaisons ou plus peuvent produire beaucoup de substrats susceptibles de réagir avec le TBA.

FRANKEL et NEFF (1983) ont étudié la formation de MDA à partir d'une panoplie de produits primaires et secondaires d'oxydation des lipides par un procédé de décomposition d'acide acetalation-acide. Ils ont précisé que la réaction colorée de TBA n'est pas spécifique au MDA ; beaucoup de produits d'oxydation des lipides et leurs produits d'interaction avec d'autres molécules biologiques ont donné des réactions positives. De plus, ces auteurs n'ont trouvé aucune corrélation entre les teneurs en TBA des produits d'oxydation de lipides et les analyses de MDA par ce procédé. C'est pour ces raisons que ces auteurs ont suggéré que la méthodologie spécifique développée dans leur étude permettrait une évaluation plus fiable du potentiel des produits d'oxydation des lipides pour former le MDA.

En dépit de toutes ces limitations, l'essai TBA demeure l'une des analyses les plus appliquées grâce à sa simplicité et son faible coût. L'échantillon à analyser est chauffé dans des conditions de faible valeur de pH en présence de TBA et un chromogène rose ; la lecture se fait à 532 nm ou par la fluorescence à 553 nm. On considère souvent que l'essai TBA mesure le MDA formé dans un système de peroxydation des lipides, ainsi des résultats sont fréquemment exprimés comme équivalents moles MDA.

II.2.2. Test anisidine

La nature des aldéhydes et leurs proportions relatives dépendent beaucoup de l'AG oxydé. La détermination de l'indice de *para-anisidine* repose sur le principe qu'en milieu acétique la *p-anisidine* donne un complexe coloré en jaune avec des *diénals* conjugués. L'indice de *p-anisidine* est défini comme 100 fois l'absorbance mesurée à 350 nm, d'une solution résultant de la réaction de 1 g de lipides dans 100 ml de solvant contenant la *p-anisidine*.

L'indice *para anisidine* permet de déterminer les produits secondaires d'oxydation absorbant à 350 nm. Il s'agit des composés carbonyles saturés et insaturés de haut poids moléculaire, principalement le *2-enals*. Les absorptions spécifiques à 232 nm (E_{232}) et à 270 nm (E_{270}) sont liées au taux des diènes et triènes conjugués, respectivement.

La décomposition des hydroperoxydes entraîne la formation d'aldéhydes volatils, tels que l'*hexanal* ainsi qu'un résidu d'AG non volatil. C'est ce dernier qui est mesuré par la réaction à l'indice *para anisidine*. L'obtention de valeurs *anisidine* élevées renseigne sur le déroulement de l'oxydation des lipides même si les méthodes au TBA et autres tests d'aldéhyde ne donnent que de faibles valeurs car les aldéhydes volatils peuvent accidentellement ou intentionnellement s'évaporer pendant le traitement.

La valeur de *para anisidine* est déterminée selon la méthode AOCs officielle Cd 18-90 de 1998. SHAHIDI et WANASUNDARA (2002) ont utilisé le test *anisidine* pour déterminer les aldéhydes, principalement le *2-alkenals* et *2, 4-alkadienals*, présents dans une huile émulsionnée. A la différence des hydroperoxydes, les aldéhydes ne s'hydrolysent pas rapidement ; ainsi, ce test permet de connaître la qualité initiale de l'huile.

La valeur *anisidine* est beaucoup plus une mesure combinée de *2-alkenals*, *2, 4-diénals* que de celle des aldéhydes saturés. La méthode implique une réaction colorée entre les composés carbonylés et le réactif *p-anisidine*. Le pic correspondant à la couleur rouge-rose est mesuré à 350 nm. Cette technique n'est adaptée et fiable que pour les huiles et MG alimentaires à l'état pur.

Par ailleurs, la combinaison de l'IP et l'indice *para anisidine* permet de calculer l'oxydation globale ; la valeur du paramètre TotOx (*Total Oxydation*) est déterminée comme suit : $\text{TotOx} = 2 \times \text{IP} + \text{valeur } anisidine$. Le paramètre TotOx permet de mieux évaluer l'état d'oxydation de la MG, en tenant compte des différentes formes d'oxydation des AG. La valeur TotOx renseigne sur la qualité initiale et finale d'une huile ; actuellement, cette mesure est adoptée fréquemment dans l'industrie alimentaire pour estimer l'ampleur d'oxydation des aliments élaborés.

II.2.3. Indice de la stabilité oxydative (Méthode de Rancimat)

L'oxydation des lipides est la principale cause de la détérioration des produits alimentaires contenant de la MG (FIRESTONE, 1993). Le niveau d'oxydation des lipides peut être mesuré par des méthodes chimiques et physiques, aussi bien que par des tests de stabilité mesurant la stabilité d'une huile dans des conditions favorisant l'oxydation naturelle. L'auto-oxydation inclut la période d'induction et la période d'oxydation. C'est la durée de la phase d'induction qui renseigne sur la stabilité d'un lipide. Plus le temps d'induction est long, plus est le lipide est stable (MARKUS et PETER, 1986).

Le principe de l'indice de stabilité oxydative (OSI) est semblable à celui de la méthode à l'oxygène actif (AOM), mais plus rapide et plus automatisé. Il détermine la stabilité oxydative d'une huile en faisant traverser un échantillon d'huile, soumis à un traitement thermique contrôlé, par un courant d'air, ce qui facilite la dégradation rapide des lipides en acides organiques volatils. Le courant d'air capte les acides volatils libérés et les solubilise dans un réservoir rempli d'eau dés-ionisée ; les acides solubilisés sont dissociés en ions, entraînant, ainsi, un changement de la conductivité de cette eau. La valeur d'OSI est définie comme le temps (en heures) nécessaires pour que la conductivité atteigne une valeur prédéterminée (MARKUS et PETER, 1986).

Le Rancimat est un appareil automatisé ; il mesure, en un laps de temps très court, la conductivité des AG de faible poids moléculaire libéré pendant l'auto-oxydation des lipides chauffés à 100°C ou plus. Le principe de la détermination de la conductivité est basé sur la mesure de la résistance de la solution des acides volatils récupérés. Cet appareil peut déterminer la période d'induction des lipides et l'effet anti-oxygène des différents antioxydants.

LUTHER *et al.*, (2007) ; ROMEU-NADAL *et al.*, (2007) ont utilisé le test Rancimat pour évaluer la stabilité relative des préparations infantiles et d'huiles de poisson respectivement. Néanmoins, plusieurs auteurs ne soutiennent pas l'utilisation de l'OSI pour l'évaluation de la stabilité oxydative des huiles. FRANKEL (1993) a suggéré que « OSI et AOM » sont inappropriées compte tenu de la complexité du mécanisme d'oxydation des lipides ; celui-ci change de manière significative à de très hautes températures. Les niveaux d'oxydation deviennent dépendants de la concentration en oxygène disponible car la solubilité de l'oxygène diminue aux températures élevées. Le contrôle de l'oxydation, y compris la détermination des teneurs en peroxyde, diènes conjugués ou les taux de carbonyles des huiles est discutable ou équivoque. En outre, les réactions secondaires deviennent importantes et ne reflètent pas les températures de stockage habituel.

L'AEUBLI et BRUTTEL (1986) ont comparé la méthode Rancimat à celle de l'oxygène actif dans la détermination de la stabilité oxydative des MG et des huiles. Ils ont conclu que ces méthodes donnent les mêmes résultats ; mais, la méthode Rancimat est plus intéressante car elle ne nécessite pas une préparation préalable de l'échantillon. En raison de sa facilité d'utilisation et de la reproductibilité des résultats donnés, le test Rancimat est très utilisé pour déterminer la stabilité des huiles (MENDEZ *et al.*, 1996).

II.2.4. Indice d'acide

L'accumulation des AGL indique un rancissement hydrolytique d'une huile. Par ailleurs, la chaîne hydrocarbonée d'un AGPI libre peut se rompre facilement pour donner de petits fragments moléculaires susceptibles de dégrader la qualité d'un aliment. Ainsi, il est utile de connaître la composition en AGL dans un échantillon afin de comprendre la cause de leur formation ou décomposition.

L'indice d'acide est un indicateur de la qualité ; il est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les AGL présents dans un gramme de MG. C'est une mesure relative de la rancidité car des AGL sont normalement formés pendant la décomposition d'une huile. L'indice d'acide est déterminé en titrant directement un CG dans un milieu alcoolique par la solution standard d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium. La valeur obtenue correspond à la quantité d'AG libérés par l'hydrolyse des glycérides sous l'action de l'humidité, de la température, et/ou d'une enzyme lipolytique.

II.2.5. Méthode de la spectroscopie de fluorescence

Les composés carbonylés, comme le MDA, produit pendant l'oxydation des lipides peuvent réagir avec des protéines ou acides aminés et générer la base de *Schiff* fluorescente ayant la structure $N-C=C-C=N$ (*IIO et YODEN, 1987*). La base de *Schiff* possède des spectres caractéristiques d'excitation et d'émission de fluorescence. Ainsi, un spectrophotomètre à fluorescence peut analyser l'oxydation des lipides par la détermination de leurs intensités *fluorescentes*. La méthode est d'une sensibilité élevée et a une signification biologique importante ; elle peut refléter l'interaction entre le MDA et une protéine. L'aldéhyde peut polymériser pour former des macromolécules induisant une fluorescence même en absence de composés carbonylés. Bien que le mécanisme de la spectroscopie de fluorescence soit très complexe, sa sensibilité est élevée. L'ampleur de l'oxydation des lipides est habituellement exprimée en fonction de l'intensité *fluorescente* relative comparée à une substance fluorescente standard (*SUN et al., 2011*).

II.2.6. Chromatographie en phase gazeuse

Le commun de ces méthodes analytiques routinières (traditionnelles) est qu'elles fournissent une lecture simple (indices). Malgré leur utilité, elles ne fournissent pas des informations sur la composition chimique réelle de l'échantillon. Contrairement à ces méthodes, la CPG a été employée pour étudier le processus d'oxydation en détail (*SNYDER et al., 1988*). Récemment, la détermination des composés *époxy* dans des huiles thermo-oxydées a, également, été rapportée (*VELASCO et al., 2002*). Ces méthodes sont sensibles ; elles peuvent détecter les produits d'oxydation même à faible concentration dans divers lipides alimentaires ; ces techniques sont, cependant, généralement longues.

La CPG est une méthode instrumentale ; elle est utilisée pour séparer et identifier des composés chimiques. L'oxydation des lipides génère une panoplie de composés volatils, tels que des hydrocarbures, des aldéhydes, des *enals*, des *diénals*, des cétones et des acides organiques. À mesure que l'oxydation avance, la concentration de ces composés volatils augmente ; ces produits d'oxydation peuvent être mesurés en les injectant dans cet appareil.

Ces composés volatils peuvent être analysés à l'état brut (mélange) ou à l'état pur. *JENSEN et RISBO (2007)* se sont intéressés à la teneur en *hexanal* issu de l'oxydation des lipides des snacks et dérivés des céréales pendant le stockage par la *static headspace GC*. *GASPARDO et al., (2008)* ont utilisé la méthode chromatographique associant la CPG à la technique de l'espace de tête statique ou dynamique [*dynamic headspace gas chromatography-mass spectrometry (DHS-GC-MS)*] pour détecter la fraction volatile du jambon italien de *San Daniele*.

KALUA et al., (2006) ont employé la méthode *headspace solid phase microextraction-gas chromatography (SPME-GC)* pour quantifier les changements des composés volatils de l'huile d'olive exposée à la lumière. La formation des produits volatils d'oxydation des lipides est liée étroitement à la détérioration de la saveur (*GARCIA-LLATAS et al., 2007*). Plus le contenu en aldéhydes de faible poids moléculaire est élevé, plus l'ampleur de l'oxydation est grande. La CPG est de sensibilité élevée et peut refléter le changement de la saveur des lipides.

II.3. Résidus de substrats non oxydés

L'auto-oxydation des lipides a fait objet de beaucoup de sujets de recherche. Dans leurs recherches, *MINEMOTO et al.*, (2002 ; 2006) ; *WATANABE et al.*, (2004) ont mesuré les résidus d'*oléoyl*, d'acide linoléique et d'acide arachidonique à l'aide de la CPG. *ADACHI et al.*, (1995) ont suggéré une cinétique d'auto-oxydation des AGPI de la série n-3 et la série n-6 et de leurs esters en suivant les proportions des substrats non réagis.

Une grande variété de méthodes de dosage des hydroperoxydes est disponible. Les principales méthodes utilisées reposent sur des dosages colorimétriques. Il existe, également, des méthodes chromatographiques (HPLC et CPG couplée à la spectrométrie de masse) et spectroscopiques (RMN et IR) pour caractériser les hydroperoxydes dans des systèmes biologiques (*GRAY et MONAHAN, 1992 ; DOBARGANES, 2002*).

Ces techniques sont reproductibles et sensibles ; mais elles sont complexes, elles nécessitent des traitements préalables de l'échantillon à analyser. La méthode *iodométrique* (*AOAC, 1990*) officielle est fréquemment utilisée malgré son manque de sensibilité et la quantité importante de lipides qu'elle requiert. Les méthodes adaptées à des dosages de routine reposent sur des dosages colorimétriques. Ces méthodes, au *thiocyanate de fer* ou au *xylénol*, sont basées sur la propriété des hydroperoxydes à oxyder les ions ferreux. L'ion ferrique ainsi produit forme un complexe coloré avec le thiocyanate ou le *xylénol* orange, la formation du complexe est quantifiée par mesure de l'absorbance au spectrophotomètre.

III. Appréciation de l'oxydation de l'huile de tournesol

Le degré d'oxydation de l'huile de tournesol a été évalué à travers plusieurs analyses physico-chimiques. Les analyses chimiques effectuées sur les deux échantillons d'huile de tournesol (fraîche et thermo-oxydée) sont l'acidité et indice d'acide (*NF. T60-204, 1988*), l'indice de peroxyde (IP) (*AFNOR ; NF. T60-220, 1988*), l'indice d'iode : (*NF. T60-203, 1968*) et l'indice de saponification : (*NF. T60-206, 1968*). Les analyses physiques ont été représentées par l'indice de réfraction (*NF T60-212, 1988*), l'humidité (*AFNOR, NF. T60-201, 1988*) et la densité (*Norme ISO 6883, 1987*). L'analyse qualitative et quantitative des AG a été réalisée à l'aide de la CPG. L'analyse spectrométrique UV a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible selon la technique *AFNOR T60-223, (1978)* ; l'analyse spectrométrique FT-IR a été réalisée à l'aide d'un appareil de marque SHIMADZU FTIR 8300 p.c (*AOCS. I-25, 1992*). Ces deux techniques spectrométriques permettent de déterminer

les produits primaires et secondaires d'oxydation de l'huile de tournesol, ainsi que les isomères de l'acide linoléique.

La masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. L'unité de mesure de la masse volumique dans le système international est le kilogramme par mètre cube (Kg/m^3). La masse volumique de l'eau est très proche de 1 Kg/l . La détermination de la masse volumique est effectuée à la température de référence de 40°C. La densité d'un matériau (ex. huile) est le rapport de la masse volumique de ce matériau à celle de l'eau dans des conditions définies ; les AG sont moins denses que l'eau. Ainsi, la densité est un nombre sans unité. La mesure de la densité est intéressante, à titre indicatif sur le plan commercial, pour se représenter en poids un volume d'huile transportée en vrac.

La densité relative de l'huile de tournesol « classique » portée dans le *Codex Alimentarius* (*Codex Stan 210-1999*) est l'ordre de 0,918–0,923 à 20°C ; ces valeurs suggérées ne diffèrent pas sensiblement de celles de la plupart des huiles végétales. La densité d'une huile est influencée par sa composition, la longueur de la chaîne hydrocarbonée et de l'insaturation des AG constitutifs. La densité des AG et de glycérides augmente en présence de fonctions secondaires (alcool, cétones, etc.) sur les chaînes hydrocarbonées ; ce paramètre physique diminue au fur et à mesure que le poids moléculaire diminue et que le degré d'insaturation augmente (*KARLESKIND, 1992*).

L'indice de réfraction est particulièrement utile car il renseigne sur l'état de dégradation d'une huile. En effet, la présence d'AGL abaisse fortement l'indice de réfraction. Etant donné les points de fusion élevés des huiles entre 25°C et 40°C, les indices de réfraction ont été aussi mesurés à la température de 40°C.

L'indice de réfraction est un critère caractéristique des CG ; il peut être utilisé comme une mesure rapide de déroulement de l'hydrogénation. Un indice de réfraction élevé permet de conclure à la présence de doubles liaisons. Selon les normes du *Codex Alimentarius* (*Codex Stan 210-1999*), l'indice de réfraction de l'huile de tournesol « classique » est compris entre 1,461 et 1,468 à 40°C ; *MERRIEN (1998)* le situe entre 1,474 et 1,476 à 20°C.

L'indice d'acide correspond à la teneur en AGL contenus dans l'huile. Cette caractéristique rend compte de l'état de dégradation d'une huile dans la mesure où les AGL sont des produits de dégradation et plus particulièrement d'hydrolyse des TAG, constituants majoritaires de l'huile (*OLLE, 2002*). C'est la quantité de KOH en milligrammes nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans 1 g de CG.

L'indice de saponification (I_s) est par définition la quantité en milligramme de potasse nécessaire pour saponifier un gramme de CG. Pour un poids donné de TAG, la quantité de potasse nécessaire à la saponification augmente avec la diminution de la longueur de chaînes d'AG. Ce paramètre renseigne sur la masse moléculaire moyenne d'AG ; la valeur de cet indice est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne hydrocarbonée d'un AG (MORDERET, 1992).

L'indice d'iode indique le nombre de doubles liaisons ou le degré d'insaturation globale des lipides. Cet indice renseigne, donc, sur le degré d'oxydation des huiles utilisées et sur leur stabilité oxydative (VINAIXA *et al.*, 2005).

On entend par IP d'un CG, le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenu dans un gramme de CG capable d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Il reflète l'état d'oxydation de l'huile (JUDDE, 2004). Cet indice permet de prévoir une détérioration ultérieure des qualités organoleptiques de l'huile, mais ne renseigne absolument pas sur le passé oxydatif de l'huile (PERRIN, 1992). Dans les CG alimentaires, les peroxydes se forment à partir des AGPI libres ; ainsi, l'IP dépend du nombre d'AGL formés.

Industriellement, les produits d'oxydation volatils ou non volatils d'une huile sont éliminés lors du raffinage (étape de la désodorisation). Ces produits sont responsables des mauvaises saveurs d'une huile. En général, une huile fraîchement raffinée a un IP inférieur à 1 meq/Kg d'huile ; mais, il n'est pas rare de trouver des huiles ayant des IP supérieurs à 10 meq/Kg et qui ne présentent pas de défauts sensoriels (HOSLER *et ISBELL*, 2000 ; LEE *et al.*, 2004). Les produits primaires et secondaires d'oxydation des lipides sont, également, déterminés par des analyses spectrométriques et chromatographiques.

La spectrométrie UV-visible est une technique d'analyse dans laquelle les molécules soumises à un rayonnement dans le domaine ultraviolet (de 200 à 500 nm), visible et jusqu'au proche IR (de 750 à 1400 nm), subissent une transition électronique impliquant les photons (*aspect corpusculaire de la lumière*). Les spectres UV ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre *Perkin elmer modèle lambda 5*. Le spectre sert, essentiellement, à détecter ou à confirmer la présence d'AG ayant des doubles liaisons conjuguées dans des huiles à l'état frais ou après avoir subi un traitement technologique pendant lequel une isomérisation chimique ou enzymatique forment des systèmes conjugués. Les CD absorbent à 232 nm, tandis que les triènes conjugués (CT) absorbent à 270 nm. Par ailleurs, un pic à 234 nm caractérise le système des doubles liaisons conjuguées *cis-trans* formé après action de la lipoxygénase ; cette propriété est utilisée pour détecter et quantifier la peroxydation des lipides en général ; l'absorbance doit être comprise entre 0,2 et 0,8.

Le rayonnement IR est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à l'intervalle 12800 cm^{-1} et 10 cm^{-1} ; ces radiations sont absorbées par les molécules en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. L'énergie absorbée est caractéristique de chacune des liaisons chimiques de la molécule analysée.

Ainsi, un spectre IR peut être défini comme étant la mesure de l'absorption lumineuse en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou de l'énergie de la lumière incidente. Le spectre IR obtenu est, ainsi, constitué de nombreuses bandes d'absorption (pics vibrationnels) ; le spectre est acquis à l'aide d'un spectromètre composé d'une source, d'un interféromètre et d'un détecteur. Le spectre présente l'absorbance A (ou la transmittance T) en fonction de la longueur d'onde. L'étude des spectres permet de tirer deux types d'informations :

***informations qualitatives** : les liaisons chimiques absorbent à une longueur d'onde caractéristique. Des tables IR permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques en présence et, donc, d'identifier la ou les molécules présentes.

***informations quantitatives** : l'intensité de la bande d'absorption rend compte de la concentration du groupe chimique caractéristique de cette absorption.

La biochimie des lipides est complétée par la spectroscopie IR grâce à l'activité vibrationnelle de ces molécules dans le MIR ; la région $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ correspond à l'étirement C-H, tandis que l'intervalle $3011\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$ est attribué aux TAG. L'attribution des bandes spectrales pour ces biomolécules a pu être réalisée grâce à des études sur les molécules isolées. Par ailleurs, la spectroscopie IR a été longtemps utilisée pour détecter les doubles liaisons *trans* dans la chaîne hydrocarbonée d'un AG. Ainsi, la spectroscopie IR est une méthode précieuse dans la détection et la quantification des taux de certains groupes fonctionnels d'AG estérifiés ; de plus, cette technique permet de localiser la position de groupements fonctionnels dans la chaîne *alkyle*.

L'analyse, par la CPG, de la composition en AG est réalisée après dérivation de ces AG en esters méthyliques correspondants. En effet, la transestérification par le méthanol permet d'obtenir ces dérivés méthyliques après saponification des glycérides du CG, puis estérification des AG libérés, par le méthanol en présence de bore.

VI. Expérimentation animale (étude *in vivo*)

Les rats mâles de souche *Wistar* utilisés dans notre expérimentation ont été fournis par l'institut Pasteur de Kouba (Alger). C'est dans le centre d'élevage de cette structure que l'étape préliminaire de notre étude a été menée. Ainsi, les rats ont été nourris avec un régime a-lipidique auquel a été incorporée soit l'huile de tournesol fraîche (lot de rats témoins), soit l'huile de tournesol thermo-oxydée (lot de rats tests), à raison de 5g d'huile / 100g d'aliment. Les régimes ont été préparés tous les deux ou trois jours par fraction de 500g et gardés à +4°C dans des boîtes hermétiques. Ces régimes ont été donnés sous forme de poudre huileuse dans des boîtes à raison de 25g / j / rat, quantité recommandée (*JADOT, 1982*) ; l'eau a été donnée *ad libitum*.

La composition du régime (% d'ingrédients) se présente comme suit : sucre cristallisé 21.94, amidon de maïs 44.90%, caséine 20, DL-Méthionine 0.16%, agar-agar 2%, mélange vitaminique 2%, mélange minéral 4% et huile 5. Les minéraux contenus (g/Kg de mélange minéral) sont : calcium 100 ; potassium 60 ; sodium 40 ; magnésium 10 ; fer 3 ; phosphore 77,5 ; manganèse 0,8 ; cuivre 0,125 ; cobalt 0,0009 ; zinc 0,45 ; iode 0,0049 (qsp Amidon) ; les vitamines apportées (/ Kg de mélange vitaminique) par le régime sont : vitamine A 2.000.000 UI ; D3 250.000 ; B1 2000mg ; B2 1500mg ; B3 7000mg ; B6 1000mg ; B7 15000mg ; B12 5mg ; C 80 000mg ; E 17 000mg ; K3 4000mg ; PP 10.000mg ; Chlorure de choline 136000mg ; Acide folique 500mg ; APAB 5000mg ; Biotine 30mg (qsp cellulose).

Les rats, au nombre de dix, ont été placés dans des cages métalliques ; chaque cage contient un rat maintenu sur une litière de sciure de bois ; celle-ci est renouvelée chaque jour. Les rats étaient âgés de trois semaines au début de l'essai nutritionnel. La température de l'animalerie a été maintenue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec un cycle nuit-jour de 12 heures et une hygrométrie de 35%. La durée d'élevage était de neuf semaines.

Les rats à l'âge adulte, maintenus à jeun pendant 24 heures, ont été sacrifiés par décapitation après les avoir anesthésié à l'éther ; des échantillons de foie, d'intestins et de MG entourant les intestins ont été prélevés sur cinq rats ; ils ont été rincés immédiatement avec une solution salée glacée (9g/l de NaCl) selon la méthode décrite par *WINTER (1994)*. Deux lots d'échantillons d'organes ont été constitués ; les échantillons destinés aux extractions des lipides ont été coupés en fines tranches et stockés au congélateur pour faciliter leur lyophilisation ; les échantillons d'organes destinés à l'analyse histologique ont été introduits directement dans du formol.

Après broyage des tissus lyophilisés dans vingt volumes d'un mélange chloroforme-méthanol (2 :1, v/v), les lipides totaux en sont extraits selon la méthode de *FOLCH et al. (1957)* modifiée par *POLLET et al., (1978)*. Les AG totaux ont été convertis en esters méthyliques correspondants par transesterification en présence de trifluorure de bore (14% dans le méthanol) selon la méthode de *MORRISSON et SMITH (1964)* ; les esters méthyliques ont été repris dans une solution d'hexane puis injectés dans la colonne du chromatographe en phase gazeuse.

Pour l'étude histologique, on a opté pour la méthode classique adoptée au laboratoire du service « Anapathologie » de l'hôpital de Tizi-Ouzou. Les échantillons de foies fixés dans du formol tampons à 10% (10 ml de formol dans 100 ml d'eau salée) après dissection des rats, ont été introduits dans des cassettes puis maintenus pendant 24 heures dans du formol pur. Ces échantillons ont subi, ensuite, diverses opérations ; la déshydratation a été effectuée dans des solutions d'alcool de concentrations croissantes ; l'enrobage a été réalisé à l'aide de la paraffine liquide ; après congélation, ces préparations en bloc ont été orientées vers le microtome, c'est la mise sur lame. Les préparations (sections de 3 à 6 μm sur lames) sont étuvées pendant 58°C pendant une nuit ; elles ont subi un déparaffinage avant de procéder à la coloration. Cette dernière a été réalisée à l'aide du mélange, hémalun + éosine. On a procédé, ensuite, à un éclaircissement à l'aide du xylène puis un montage entre lame et lamelle avant l'observation au microscope optique.

L'analyse microscopique des tissus d'organes prélevés a été précédée d'une observation macroscopique des échantillons de ces organes ; la largeur et l'épaisseur d'organes de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée ont été mesurées à l'aide d'une règle simple puis comparées aux dimensions d'organes prélevés de rats ayant ingéré l'huile de tournesol fraîche.

V. Analyse statistique des résultats

Les teneurs en AG des tissus sont exprimées en moyenne +/- écart type. Les différences de composition entre les deux lots (huile fraîche et l'huile thermo-oxydée) ont été traitées par le test « t » à l'aide du logiciel *Statistica* version 6, $P < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Oxydation de l'huile de tournesol

I.1. Analyses physico-chimiques

Le *tableau I* intègre les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de tournesol utilisée dans notre étude avant et après le traitement thermo-oxydatif. De nombreux travaux sur l'évolution de l'oxydation des huiles ont été entrepris. Différentes méthodes analytiques ont été appliquées à cet effet, d'où la difficulté de l'interprétation et de la signification des résultats obtenus. Cette difficulté est, également, liée aux conditions non spécifiques de stockage, en particulier la variabilité de la surface de contact de l'huile avec l'air ambiant (*MARMESAT et al., 2009*).

Tableau I: Propriétés physico-chimiques des huiles de tournesol fraîche et thermo-oxydée

Caractéristiques	Huile fraîche	Huile thermo-oxydée
Etat physique à température ambiante	Fluide	Texture épaisse, saveur rance
Indice de peroxyde (meq/Kg)	5,83 ± 0,76	152,5 ± 5,33
Indice d'acide (mg KOH/g)	0,182 ± 0,04	2,51 ± 0,11
Acidité (%)	0,093 ± 0,02	1,25 ± 0,07
Indice d'iode (g I ₂ /100g)	125,84 ± 1,59	80,51 ± 1,37
Indice de saponification (mg KOH/g)	192,60 ± 2,91	183,79 ± 1,32
Indice de refraction	1,461 ± 0,037	1,476 ± 0,023
Densité à 20°C	0,910 ± 0,018	0,985 ± 0,010
Humidité (%)	0,100 ± 0,012	2,006 ± 0,221

Valeurs, moyenne ± standard déviation de cinq déterminations

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré une nette augmentation de l'acidité de l'huile de tournesol après avoir subi le traitement thermo-oxydatif. En effet, l'acidité de l'huile de tournesol fraîche n'est que de 0,182 mg de KOH / g contre une valeur de 2,51 mg de KOH / g de l'huile thermo-oxydée.

Avant de subir le raffinage, la plupart des huiles brutes sont exposées aux changements de températures pendant un temps relativement long dans des hangars de stockage et/ou dans les cales des navires pendant le transport. L'auto-oxydation ou la rancidité oxydative est la principale cause des pertes de qualité des huiles brutes et raffinées pendant le stockage (*CRAPISTE et al., 1999*).

En effet, les AGL et les produits d'oxydation de faible poids moléculaire accentuent l'hydrolyse en présence d'eau (POKORNY, 1989). Comme tous les produits de dégradation de l'huile, les produits d'hydrolyse (AGL notamment) diminuent la stabilité des huiles.

De plus, la stabilité ou la détérioration oxydative des huiles dépendent d'une part de leurs compositions initiales, leurs concentrations en composés mineurs antioxydants ou pro-oxydants et du type de traitement subi et enfin des conditions de leurs stockages d'autre part. La conséquence de l'oxydation est le développement de goûts et d'odeurs désagréables, caractéristiques des CG rances, aussi bien que la dégradation de leurs propriétés fonctionnelles et alimentaires (CRAPISTE *et al.*, 1999).

Les AGL, même à des niveaux $< 0,5\%$ servent de pro-oxydants. En effet, des huiles contenant des AGL ont enregistré une plus grande teneur en peroxydes et en composés volatils que les huiles ne contenant aucun AGL après un stockage d'un jour à 55°C . Il a été suggéré que l'activité pro-oxydante d'un AGL est due à leurs groupements carboxyliques ; ainsi, pour produire une huile de bonne qualité, il est impératif d'éliminer les AGL pendant le raffinage (PATTERSON, 1989).

Bien que les AGL représentent une partie infime des AG totaux dans les huiles et MG comestibles fraîches, leur contenu peut considérablement augmenter pendant le traitement, stockage, ainsi que pendant certaines pratiques culinaires. Les AGL sont plus labiles à l'oxydation que AG estérifiés (FRANKEL, 1980 ; 1985).

L'acidification d'une huile serait due à la réaction d'hydrolyse des TAG ; ce processus peut être favorisé par l'eau contenue dans l'huile même sous forme de traces (IQBAL *et BHANGER*, 2007). L'intensité de la réaction d'hydrolyse dépend de divers facteurs, on en cite entre autres, la température appliquée à l'huile ainsi que sa teneur en eau ; il semble que l'eau hydrolyse l'huile plus vite que la chaleur (POKORNY, 1989). Néanmoins, l'action catalytique de l'eau est accentuée par le chauffage. Ces deux facteurs hydrolysent les TAG en produisant des mono-, diglycérides, AGL et éventuellement du glycérol. Le glycérol s'évapore au-dessus de 150°C et l'équilibre de la réaction se déplace vers la libération d'autres produits d'hydrolyse (POKORNY, 1989). Les AGL s'accumulent dans l'huile augmentant ainsi son acidité (GUILLAUMIN, 1969).

L'huile de tournesol thermo-oxydée a enregistré une valeur nettement inférieure à celle obtenue par BLANC-GRANDARMARY *et al.*, (1989) dont la valeur enregistrée est de $4,2 \text{ mg / g}$. Cette différence serait due au temps de chauffage réduit appliqué par cet auteur. La rancidité des lipides inclut la rancidité hydrolytique et la rancidité oxydative. Les AGPI sont, particulièrement, facilement oxydés par l'air ; il se produit la formation de peroxydes.

Un peroxyde est un composé chimique contenant un groupe fonctionnel de formule générale R-O-O-R'. Ces composés, oxydant très actifs, comportent une plus grande quantité d'oxygène qu'un oxyde normal. Les peroxydes se décomposent en aldéhydes et cétones, à l'origine de la perception du goût désagréable d'une huile. Le goût et l'odeur sont, en effet, des indicateurs très sensibles de la détérioration oxydative des huiles et MG.

La valeur de l'IP est l'un des paramètres de la qualité souvent déterminé au cours de l'élaboration, stockage et commercialisation des CG. Cet indice chimique indique le degré d'oxydation et mesure la quantité de peroxydes, produits primaires d'oxydation d'une huile (SAAD *et al.*, 2006).

L'augmentation du temps de chauffage appliqué dans notre étude aurait stimulé l'oxydation des AGI grâce à l'oxygène insufflé dans l'huile chauffée ; les AGL insaturés seraient transformés en composés finaux d'oxydation, révélés en grande quantité par l'analyse spectrométrique IR. L'état d'altération avancée de notre huile s'est traduit par sa forte humidification. Le traitement thermique, expérimental, appliqué à notre huile a induit une élévation de l'humidité ; cette dernière a été estimée à 2% dans l'huile de tournesol thermo-oxydée.

L'air et l'eau contenue dans l'huile même sous forme de traces enclenchent une série de réactions interdépendantes. La lipolyse et l'oxydation des lipides sont les principaux processus biochimiques et chimiques à l'origine de la détérioration de la qualité des produits alimentaires ; les produits générés leur confèrent une odeur et saveur désagréables et caractéristiques, c'est la rancidité. En plus de l'impalatabilité, certains composés comme des aldéhydes, des hydroperoxydes, des époxydes et des produits d'oxydation de cholestérol peuvent s'accumuler et devenir toxiques (STAPRANS *et al.*, 1994 ; STAPRANS *et al.*, 1996 ; FERIOLI, 2007).

CRAPISTE *et al.*, (1999) ont remarqué une augmentation continue du poids de l'huile avec l'avancement du processus oxydatif. Au fur et à mesure que l'oxydation se poursuit, l'oxygène se fixe sur les AGI et beaucoup d'hydroperoxydes se forment dans l'huile, comme a été constaté dans « notre » huile de tournesol thermo-oxydée. Des réactions de dimérisation, de polymérisation et une consommation rapide de l'oxygène se produisant dans l'huile oxydée sont, selon ces auteurs, à l'origine de l'augmentation du poids de l'huile de tournesol ; le poids de l'huile non ou peu oxydée demeure, toutefois, constant. Ainsi, l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée observé dans notre étude pourrait, en partie, être dû à l'insertion de l'oxygène sur les divers produits d'oxydation formés ; ceci s'est

traduit par l'augmentation de la concentration en C-O, comme révélé par l'analyse spectrométrique IR.

Les peroxydes se dégradent à haute température, tandis que pendant le refroidissement de nouveaux peroxydes se forment, c'est la raison pour laquelle *AUGUSTIN et BERRY (1983)* ont suggéré que l'IP n'indique pas l'ampleur réelle de la détérioration de l'huile au cours du processus de friture.

Selon *FAUZIAH et al. (2000)*, le taux d'AGL dans l'huile ayant subi un traitement thermo-oxydatif (comme huile de bains de fritures) dépend de leur concentration initiale dans l'huile fraîche. En outre, *TOPALLAR et al., (1997)* ont remarqué que l'auto-oxydation de l'huile de tournesol raffinée stockée dans des récipients ouverts et sous les conditions atmosphériques, dépend de la concentration initiale de cette huile en hydroperoxydes.

L'humidification de l'huile de tournesol thermo-oxydée, constatée durant notre étude, serait due à la formation d'eau et des matières volatiles au cours des réactions terminales d'oxydation. En effet, l'eau et le CO₂ constituent les produits finaux de la décomposition des produits primaires d'oxydation (hydroperoxydes) des AGI.

Le traitement thermo-oxydatif entraîne, donc, une diminution de l'insaturation totale de l'huile de tournesol ; cette altération est évaluée par la mesure de l'indice d'iode. Cet indice permet, en effet, de mesurer le degré d'insaturation globale d'un CG. Il ressort de nos résultats une baisse importante de la valeur de cet indice après la thermo-oxydation de l'huile de tournesol.

L'indice d'iode dosé dans l'huile de tournesol fraîche est évalué à 125,84 mg d'I₂/100g, tandis que dans l'huile de tournesol thermo-oxydée il n'est que de 80,51mg d'I₂/100g. Toutefois, nos résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus par *BLANC-GRANDARMARY et al., (1989)*. Ces derniers ont enregistré une valeur de 103 mg d'I₂/100 g d'huile. Cet écart est dû au temps de séjour plus prolongé appliqué à notre échantillon d'huile avec barbotage continue de l'air.

ADRIAN et al., (1997) ont noté que l'abaissement de cet indice reflète une diminution sensible de l'insaturation globale de l'huile. En effet, il découle de notre analyse chromatographique une réduction tangible de l'insaturation de l'huile de tournesol thermo-oxydée suite à l'action combinée de la chaleur et de l'oxygène insufflé comparativement à l'huile de tournesol fraîche.

ROJO et PERKINS (1987) ont classé les produits de cette dégradation en esters méthyliques d'AG polymérisés polaires et non polaires, et en esters méthyliques d'AG monomères non modifiés et modifiés (oxydés, cyclisés, isomérisés, etc.) et enfin en esters d'AG fragmentés à courte chaîne. *CLARK et SERBIA (1991)* ont reconnu que des diminutions élevées de la valeur de l'indice d'iode sont nécessaires pour la formation de grandes quantités de ces polymères. Ces auteurs ont, ainsi, suggéré que la formation de ces composés peut être réduite en renouvelant régulièrement l'huile de fritures.

D'après *GERTZ et KOCHAAR (2001)*, la présence de l'oxygène de l'air, catalyse la réaction d'oxydation des AGI. La teneur en AG oxydés augmente diminuant, ainsi, le degré d'insaturation de l'huile. Qualitativement, nos résultats ont confirmé une diminution marquée de l'acide linoléique. L'acide linoléique aurait subi les réactions d'isomérisation révélées par les analyses UV et IR.

Par ailleurs, *MILLER et WHITE (1988)* ont attribué cette diminution à des réactions de polymérisation se produisant au cours du chauffage de l'huile. L'analyse de « notre » huile thermo-oxydée a, en effet, révélé une diminution de l'indice de saponification.

La thermo-oxydation de l'huile de tournesol fraîche a entraîné une chute de la valeur de cet indice. Dans l'huile thermo-oxydée, on a enregistré une valeur de 185,32 mg de KOH / g d'huile. Selon *RAFIK (1986)*, cette diminution est due à l'augmentation de la chaîne hydrocarbonée des AG estérifiant la molécule de glycérol pour former les TAG.

En effet, l'indice de saponification renseigne sur la masse moléculaire moyenne des AG entrant dans la composition des TAG d'une l'huile. La masse molaire des AG est inversement proportionnelle à l'indice de saturation d'un CG. L'analyse chromatographique a, en effet, révélé l'augmentation du taux d'AGS dans l'huile de tournesol thermo-oxydée. La diminution de l' I_s dans l'huile de tournesol thermo-oxydée indique, donc, un degré de polymérisation des AG signalé antérieurement par *MILLER et WHITE (1988)*.

La polymérisation implique diverses réactions chimiques ; celles-ci entraînent la formation de composés de haut poids moléculaire et augmentent la polarité de l'huile. Les polymères peuvent se former à partir des radicaux libres ou des TAG selon la réaction d'*ALDER-DIELS (réaction d'addition d'un hydrocarbure insaturé sur un diène conjugué)*. Les AG cycliques peuvent se former dans un CG acide ; les AG dimères peuvent se former à partir de l'association de deux AG, soit au sein ou entre les TAG ; les polymères de haut poids moléculaire sont formés par réticulation de ces molécules. La formation et l'accumulation des produits polymérisés augmentent la viscosité de l'huile de friture.

Actuellement, les chimistes s'intéressent à la valorisation des huiles de fritures (usagées) en remplacement des dérivés du pétrole, source non renouvelable, pour produire de nouveaux matériaux (chimie des polymères). Le principe de cette conversion consiste en une insertion de groupements fonctionnels photopolymérisables (de type acrylate) sur les chaînes d'AG des TAG suivie d'une étape de photopolymérisation.

Il se produit, alors, une polymérisation qui accroît la viscosité de ces huiles usagées et leur vitesse de séchage, en favorisant la formation d'une pellicule protectrice particulièrement souple et imperméable. C'est ainsi qu'une multitude de produits ont été fabriqués, tels que des lubrifiants, produits cosmétiques, produits pharmaceutiques, peintures, etc. où les TAG « modifiés » sont à la base de ces nombreux produits chimiques.

La formation de polymères peut provoquer l'augmentation de la viscosité et la solidification de l'huile chauffée de façon prolongée (NOLEN, 1973). La viscosité (ou frottement interne) des AG et leurs esters est relativement élevée en raison de l'attraction entre les longues chaînes hydrocarbonées. La viscosité augmente, donc, avec la longueur de la chaîne et diminue légèrement avec l'insaturation.

Ainsi, l'accumulation de tous ces produits auraient contribué, du moins partiellement, à la modification apparente de la texture de l'huile de tournesol thermo-oxydée. Le traitement thermo-oxydatif a conféré à l'huile, utilisée dans notre étude, une texture épaisse. L'indice de réfraction et la densité interviennent, également, dans la consistance de l'huile ; ces indices ont augmenté lors du chauffage de l'huile.

Le processus thermo-oxydatif induit la formation de polymères de TAG et de dimères de TAG, tandis que l'hydrolyse mène à la formation de diglycérides (ARROYO *et al.*, 1992). PARADIS *et* NAWAR (1981) ont suggéré que les composés de haut poids moléculaire non volatils sont les indicateurs fiables de la détérioration de la MG, car ils persistent et s'accumulent dans l'huile contrairement aux produits volatils. Ainsi, la formation et l'accumulation de composés non volatils étaient responsables de l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée, ceci s'est traduit par des changements des critères physiques de l'huile, telle la densité. En effet, la présence sur les chaînes hydrocarbonées de fonctions secondaires (alcools, cétones, etc.) accroît la densité (KARLESKIND, 1992).

Par ailleurs, le traitement thermo-oxydatif appliqué dans notre étude a induit une augmentation de la polarité de l'huile de tournesol thermo-oxydée ; la polarité a été mise en évidence par l'analyse par spectrophotométrie FT-IR ; l'huile thermo-oxydée a enregistré une forte intensité d'absorption à 3466 cm^{-1} , caractéristique du groupement fonctionnel ($-\text{OH}$) par rapport à l'huile de tournesol fraîche.

Selon *GUILLAUMIN (1969) et EL-SHAMI et al. (1992)*, cette augmentation serait due à la formation de composés de haut poids moléculaire (polymères). *PAMPEO (1989)* a attribué cette polymérisation, en présence d'oxygène, à la formation des ponts de type éther C–O–C et peroxyde C–O–O–C. La polymérisation implique les doubles liaisons de l'acide linoléique.

Les produits non volatils de dégradation s'accumulent dans une huile sur-utilisée incluent, entre autres, des TAG polymérisés, dérivés oxydés de TAG et des substances cycliques. Les TAG polymérisés résultent de la condensation de deux ou plusieurs molécules de TAG formant des composés polaires et non polaires de haut poids moléculaire. La partie non polymérisée de cette huile contient principalement des TAG non modifiés en combinaison avec leurs dérivés oxydés. En outre, elle contient des mono- et di-acylglycérols, glycérols partiels contenant des produits de scission de la chaîne, TAG avec des AG cycliques et/ou dimériques et d'autres produits non volatils (*PERKINS, 1996*).

L'oxygène présent dans l'huile de tournesol fraîche et celui introduit expérimentalement par barbotage de l'air activent une série de réactions générant des radicaux libres, hydroperoxydes et acides diénoïques conjugués. Ces derniers sont des AGPI possédant un système conjugué de deux double liaisons, non séparées par un méthylène (CH₂), on en cite le CLA qui se forme dans la panse des ruminants suite à l'hydrogénation des AGPI.

Dans les CG alimentaires, les AGPI sont estérifiés en position S_{n-2} sur le glycérol. Les peroxydes se forment à partir des AGPI libres. Ainsi, l'IP dépend de la quantité de ces AGL formés. Les huiles et les MG s'oxydent facilement. Lorsqu'une molécule de l'oxygène se fixe sur une molécule de lipide, des peroxydes se forment. La lumière, en particulier le rayonnement UV, l'apport d'oxygène par l'air ambiant, la température de stockage et la teneur en ions métalliques provenant de la culture et du traitement favorisent cette réaction. L'oxydation est en partie déjà initiée dans la plante, par les biocatalyseurs (enzymes), la lumière et la chaleur.

La chaîne hydrocarbonée d'un AGI est sensible à l'oxydation au niveau des doubles liaisons et des carbones *allyliques* adjacents. L'action des radicaux libres sur les carbones allyliques adjacents sont responsables de la détérioration des huiles et MG insaturées (*SCRIMGEOUR, 2005*). L'oxydation des CG insaturés au contact de l'oxygène commence toujours par la formation de peroxyde.

L'IP indique la teneur d'une huile ou d'une MG en oxygène à liaison peroxyde (R-O-O-R) (surtout hydroperoxyde). Cette teneur est donnée en milliéquivalents d'oxygène actif présent dans 1 Kg de CG. L'IP mesure une oxydation débutante dans les huiles et MG: une molécule d'oxygène (O_2) pénètre en tant que groupe peroxyde (H_2O_2) dans la molécule de lipide. Cet indice s'intéresse au nombre d'oxygène actif dans les chaînes organiques d'un CG (lipides, AGL, mono-, di- et TAG). Cet oxygène actif peut être sous forme d'époxyde (substance chimique comportant un oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone) ou sous forme d'hydroperoxyde.

Cet indice révèle la présence d'hydroperoxydes et d'hypoxyperoxydes, appelés produits primaires de la dégradation, dans l'huile. L'IP indique la fraîcheur d'une huile. Plus l'indice est bas, plus l'huile est fraîche. L'IP varie entre 5 et 20 pour les huiles brutes pressées et entre 0 et 1 pour les huiles raffinées. La formation et l'accumulation des produits primaires d'oxydation augmentent avec l'augmentation du degré d'insaturation des huiles (MARTIN-POLVILLO *et al.*, 2004). Les résultats de notre étude ont montré que l'IP est très élevé dans l'huile de tournesol thermo-oxydée.

Il importe de souligner qu'un CG fraîchement raffiné a un IP inférieur à 1 milliéquivalent d' O_2 par Kg ; la valeur de cet indice peut atteindre 2 ou 3 meq / Kg après conditionnement et transport et 5 ou 10 meq / Kg en fin d'un stockage de 12 mois correspondant à une date limite optimale d'utilisation (DLUO) des huiles commerciales maintenues dans leur emballage d'origine. A cette dose, l'huile ne présente pas de défaut inacceptable sur le plan sensoriel. Par ailleurs, les hydroperoxydes sont présents à des teneurs de l'ordre de ppm et qu'ils ne présentent aucun caractère toxique à ce niveau.

L'huile de tournesol fraîche utilisée dans notre étude a présenté un IP de 5,83 meq O_2 /Kg CG, alors que dans l'huile thermo-oxydée cet indice augmente et atteint une valeur de 152,5 meq O_2 /Kg. Cette valeur indique une altération de l'huile chauffée. UZZAN, (1992) attribue cette variation aux effets combinés de la température élevée et de l'entrée d'air lors du chauffage induisant la formation de peroxydes. Par ailleurs, CRAPISTE *et al.*, (1999) ont montré que la formation de peroxydes augmente de façon notable avec le chauffage et la disponibilité de l'oxygène.

CRAPISTE *et al.*, (1999) suggèrent que l'augmentation de la température d'oxydation entraîne la décomposition des hydroperoxydes et par voie de conséquence une diminution de l'IP. En revanche, il se forme des produits secondaires d'oxydation, tels que les aldéhydes. Ces auteurs suggèrent que l'énergie d'activation de la réaction de décomposition des produits primaires d'oxydation est nettement supérieure à celle de leur formation.

En résumé, compte tenu de l'instabilité des peroxydes, *WOLFF (1994)* suggère que l'IP n'a pas beaucoup de signification. Donc, d'autres analyses complémentaires sont nécessaires, telles que la spectrophotométrie UV et IR caractérisant respectivement l'emplacement des doubles liaisons dans la molécule d'AGPI et les rotations moléculaires provoquées par le chauffage de l'huile.

En effet, *CRAPISTE et al., (1999)* attribuent la diminution de la valeur de l'IP (après avoir atteint son max) à la catalyse des réactions de décomposition ; celles-ci deviennent, alors, prédominantes. Les hydroperoxydes sont les produits primaires formés lors de l'oxydation, mais ce sont des produits intermédiaires labiles qui se décomposent en divers produits secondaires d'oxydation. Donc, bien que l'IP est l'indicateur commun de l'oxydation des lipides, son utilisation est limitée uniquement à caractériser les premières étapes de l'oxydation (*GRAY, 1978 ; FRANKEL, 1993 ; WARNER et ESKIN, 1995 ; LEE et al., 2004*).

Pour rappel, l'analyse des composés primaires d'oxydation est toujours effectuée soit par la détermination de la teneur en peroxydes, qui est une titration de l'iode libéré de la réaction des peroxydes avec l'iodure de potassium, soit alternativement, par la détermination de l'extinction à 232 nm ; les hydroperoxydes d'AGPI ont une forte absorbance à cette longueur d'onde (232 nm). Cette technique, contrairement à la première, ne nécessite que de faibles volumes et a l'avantage de ne pas détruire les échantillons (*DOBARGANES et VELASCO, 2002*).

I.2. Analyses spectrométriques

En mesurant les caractéristiques d'absorption de la lumière polarisée par l'huile de tournesol fraîche et l'huile de tournesol thermo-oxydée mises en solution, la spectrophotométrie permet d'identifier les molécules en présence, les doser ou les localiser. La caractérisation d'une molécule par son spectre nécessite la connaissance, en UV, de sa bande d'absorption maximale et, en IR, des longueurs d'onde des principales bandes d'absorption de ses groupements fonctionnels où peuvent se produire les vibrations de valence et vibrations de déformation (*AIME-GENTY et al., 1996*).

I.2.1. Spectrométrie ultraviolette (UV-visible)

Selon MAZLIAK (1968), les AG naturels contenant des «systèmes maloniques» ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$) n'absorbent pas les radiations ultraviolettes (dans le domaine $\lambda = 200 \text{ m}\mu$ à $\lambda = 400 \text{ m}\mu$). Toutefois, l'isomérisation des AG avec migration des doubles liaisons (réarrangement intramoléculaire) fait apparaître des systèmes conjugués ($=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$). Ces derniers sont fortement absorbants en UV (HOUHOULA *et al.*, 2002).

Les produits primaires de l'oxydation des lipides contenant des doubles liaisons conjuguées (molécules intermédiaires) peuvent être quantifiés par spectrométrie UV (KLEIN, 1970 ; CORONGIU *et* BANNI, 1994). L'oxydation des AGPI s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Les CD absorbent à 232-233 nm et les CT à 268 nm ; ils peuvent être déterminés par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'onde (WHITE, 1991 ; MELTON *et al.*, 1994).

Ainsi, le taux de CD est fréquemment employé pour mesurer la concentration en hydroperoxydes. La plupart des hydroperoxydes formés lors de l'oxydation des AGI ont un système conjugué diénique ; ce dernier est la forme de stabilisation de l'état radicalaire grâce à un réarrangement de la double liaison ; celle-ci absorbe le rayonnement UV à une longueur d'onde de 235nm. La mesure de cette absorbance UV renseigne sur le début du processus de la peroxydation des AGI. La détermination des CD est la meilleure mesure de l'état oxydatif des huiles, faisant de ce test un bon indicateur de l'efficacité des molécules anti-oxydantes (IQBAL *et* BHANGER, 2007).

Les huiles végétales, soumises à des températures élevées subissent une détérioration rapide. L'analyse par spectrométrie UV-visible de l'huile de tournesol, riche en acide linoléique, maintenue à 60°C pendant une heure, a montré l'apparition d'un pic à 234 nm, correspondant à la formation de CD générés lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Un autre pic a été observé à 268 nm dans l'huile maintenue à 180°C pendant 1h, correspondant aux produits secondaires d'oxydation (GROMPONE *et al.*, 2000).

Les résultats de notre étude relatifs aux absorbances UV enregistrées par les deux échantillons d'huile sont portés dans le *tableau II*. Le traitement thermo-oxydatif appliquée catalysé le processus oxydatif, ce qui a permis l'accumulation des produits primaires d'oxydation dans l'huile thermo-oxydée. Cette huile a enregistré des absorbances à des longueurs d'ondes inférieures (232, 250 et 262 nm). Les CD et les cétones forment le groupe des AG oxydés, très prépondérant dans les huiles oxydées.

Tableau II : Extinctions moléculaires des diènes et triènes conjuguées des huiles

Longueurs d'onde (λ)	Huile fraîche	Huile thermo-oxydée
200	-	0,112
232	-	0,036
250	0,0002	0,033
262	-	0,027
268	0,293	0,407
270	0,423	0,655

Afin de définir la relation entre l'IP et les CD, *MARMESAT et al.*, (2009) ont, dans un premier temps, procédé à l'extraction de la totalité des antioxydants naturels contenus dans l'huile de tournesol classique (riche en acide linoléique) et l'huile de tournesol oléique (riche en acide oléique); ces huiles ont été, ensuite, soumises à une oxydation à 40°C et à l'obscurité. Dans le but de comparer entre ces huiles de compositions en AG différentes, un échantillon de linoléate de méthyle pur a, également, été oxydé dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sur ces deux huiles ont été comparés à ceux du linoléate de méthyle, molécule exclusive à partir duquel se forment les hydroperoxydes à diènes conjugués. *MARMESAT et al.*, (2009) ont estimé que seule la valeur de l'IP est fiable dans l'évaluation des produits primaires d'oxydation des huiles de niveaux d'insaturations différents. En effet, des diènes non conjugués se forment à partir de l'acide oléique contenus dans ces huiles et peuvent interférer lors de la mesure de l'absorbance à 232 nm.

En outre, *MASKAN et BALKISS* (2003) ont montré que les évolutions des valeurs de CD et de l'IP d'un échantillon d'huile de tournesol pendant la friture sont différentes. Ils ont suggéré que les valeurs de CD obtenues n'étaient pas corrélées à celles de l'IP en raison de la décomposition des peroxydes à la température de friture. Les CD augmentent puis atteignent un plateau. Ceci est lié à l'équilibre entre les vitesses de formation de CD et de polymères par la réaction de *DIELS-ALDER* impliquant les CD (*WHITE, 1991*). C'est la raison pour laquelle, il a été suggéré que la cinétique des CD est totalement différente de celle de l'IP (*FARHOOSH et MOOSAVI, 2009*).

Le raffinage industriel est susceptible de générer des hydroperoxydes qui s'accumulent dans l'huile fraîche élaborée (IP = 5,83). Ainsi, la décomposition de ces produits primaires d'oxydation en radicaux libres est à l'origine de l'oxydation de l'huile de tournesol thermo-oxydée (IP = 152,5). Ces radicaux arrachent un atome d'hydrogène *allylique* et permet à

l'oxygène contenu dans l'air insufflé et dissous dans l'huile de se fixer sur les doubles liaisons de l'acide linoléique radical (amputé d'un H). Ceci entraîne l'avancement de l'oxydation.

Par ailleurs, les hydroperoxydes formés peuvent se décomposer et former des radicaux libres ; ceux-ci notamment ceux liés au squelette triglycéridique, sous l'oxydation poussée, se transforment en diperoxydes susceptibles de former des polymères (CHOE et MIN, 2006). Cette réaction génère, également, la formation d'époxydes et de glycérides hydroxylés (GRAY, 1978) (figure 6).

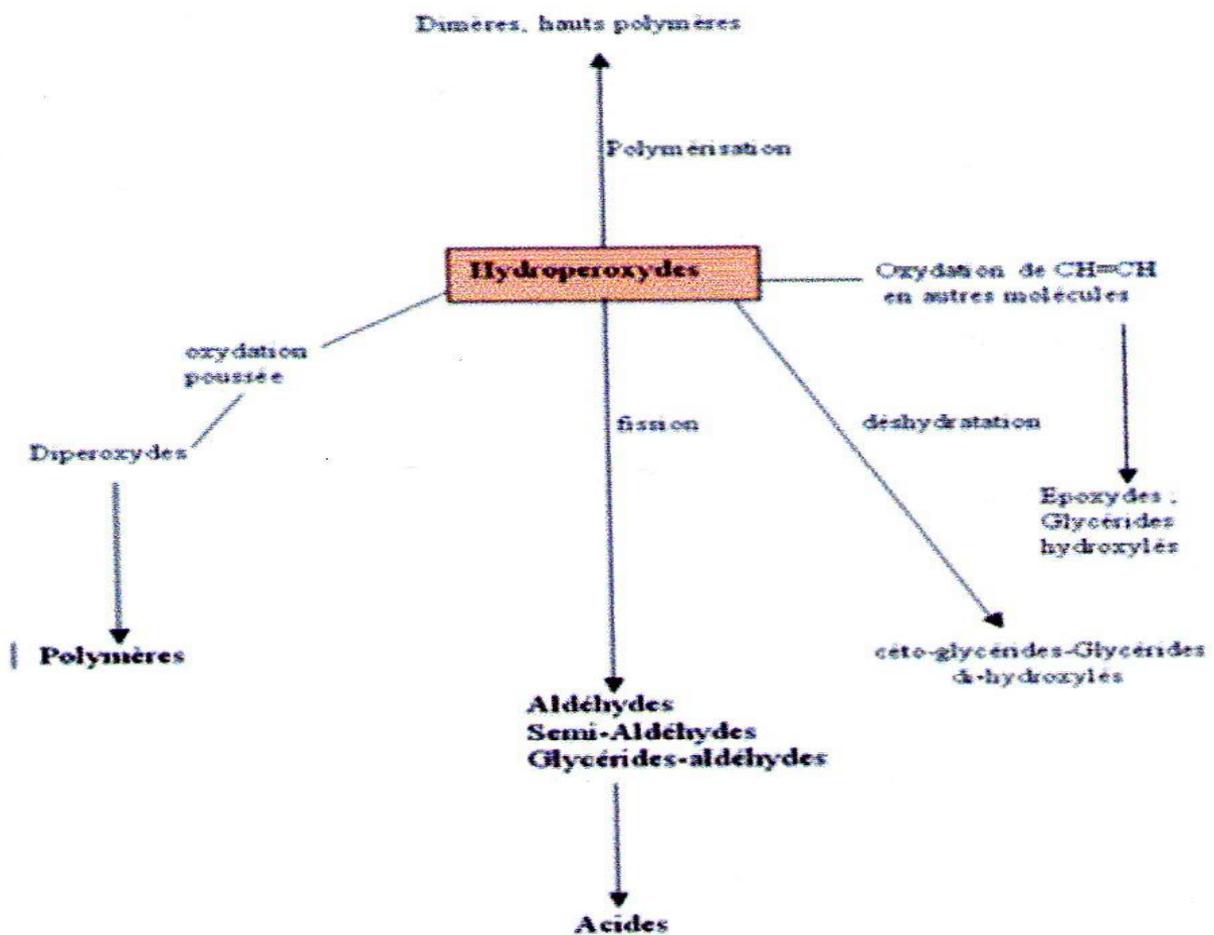


Figure 6: Voies de décomposition des hydroperoxydes (GRAY, 1978)

La majorité des produits de décomposition des AG de l'huile sont des composés polaires non volatils et des dimères et polymères de TAG. Quant aux composés cycliques, leur quantité formée dans les huiles reste relativement faible. Les dimères et les polymères ont une masse moléculaire de l'ordre de 692 à 1600 g / mol, sont formés par la combinaison de liaisons C-C, C-O-C et C-O-O-C et leur formation augmente la viscosité de l'huile (*CHOE et MIN 2007*). Ainsi, il est admis de conclure que le déroulement de ces réactions de polymérisation sont à l'origine de l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

I.2.2. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

La fenêtre spectrale de l'IR se décompose en trois parties : le proche, le moyen et le lointain IR (*Annexe I*). Nous nous sommes intéressés, dans notre étude, plus particulièrement à la région MIR ; celle-ci s'étend de 4000 cm^{-1} à 500 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ à $25\text{ }\mu\text{m}$). Ce domaine correspond aux transitions moléculaires de type vibration et rotation, lesquelles conduiront à des absorptions (*KEIRSSE, 2004*).

Le spectre IR est composé de bandes d'absorption ; celles-ci sont utilisées pour déterminer la structure d'une molécule purifiée ou d'un mélange à identifier. Les bandes d'absorption dans le MIR résultent des modes de vibration, attribués à des groupements fonctionnels fondamentaux. L'interprétation des spectres est empirique et consiste le plus souvent, en la comparaison des résultats obtenus avec ceux de la bibliographie. Elle est basée principalement sur l'analyse des spectres IR de molécules isolées (*KEIRSSE, 2004*).

Le spectre IR d'une huile fournit des informations importantes sur la structure et les groupements fonctionnels des lipides et aussi sur des impuretés y associées. Ces informations sont représentées comme des pics ou des bandes comme illustré par la *figure 7* (*SHAHIDI et WANASUNDARA, 2002*).

Les produits majeurs de la peroxydation des lipides contiennent dans leurs structures des groupements hydroxyls, hydroperoxyls, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques et des doubles liaisons *trans*. La spectroscopie IR permet de détecter tous ces groupements et plus particulièrement les groupements hydroxyl et hydroperoxyl.

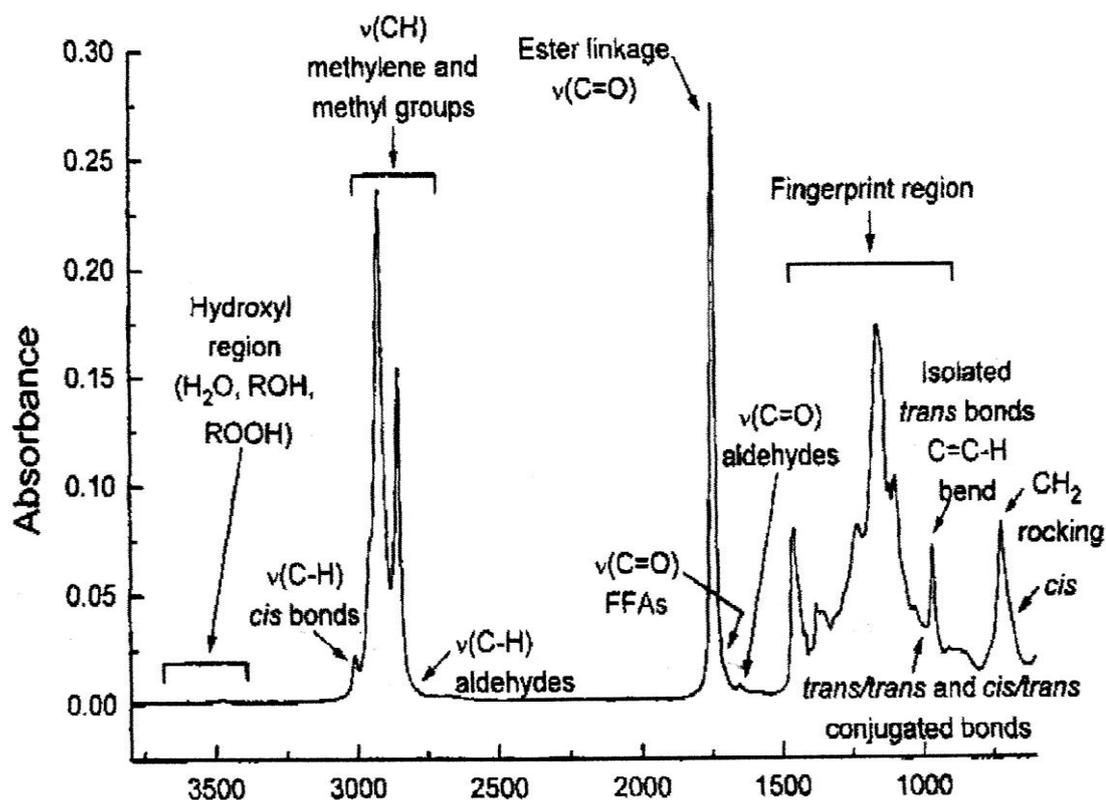


Figure 7: Spectre MIR d'une huile alimentaire (SHAHIDI et WANASUNDARA, 2002)

De plus, le spectromètre FT-IR permet de déterminer les indices d'iode, de saponification et le taux d'AGL (VAN de VOORT, 1992). La stabilité oxydative des lipides reflétée par la formation de peroxydes et des produits secondaires d'oxydation peuvent, également, être déterminés par la spectrométrie FT-IR (VAN de VOORT, 1992 ; SEDMAN et al., 1996 ; VAN de VOORT, 2000). C'est la raison pour laquelle SINELLI et al., (2007) ont considéré que cette technique pourrait être utilisée pour classer des échantillons d'huile fraîche et oxydée ; ils ont souligné, aussi, que les résultats obtenus grâce aux spectres FT-IR sont en accord avec les données de l'oxydation obtenues par des méthodes classiques.

Par ailleurs, l'utilisation de la FT-IR pour la mesure de la stabilité thermo-oxydative présente certains avantages par rapport à la technique conventionnelle (classique): c'est une technique rapide et ne nécessite aucune préparation de l'échantillon. En outre, cette technique n'utilise pas de solvants et réactifs chimiques dangereux pour la santé humaine ou l'environnement.

Aux hautes fréquences du spectre (3700-3400 cm^{-1}) se situe la région correspondant à des composés contenant des groupements hydroxyles, tels que l'eau (H-OH) et des hydroperoxydes (RO-H) ainsi que leurs produits de dégradation. Aux basses fréquences (3025-2850 cm^{-1}) se place la région d'étirement C-H où trois bandes sont visibles : une faible absorption de la double liaison *cis* (CH=CH) et de fortes liaisons liées aux groupements (CH_2) des chaînes aliphatiques des TAG ainsi que les groupements méthyle terminal (CH_3). Juste au-delà de cette région se localisent les bandes correspondant aux produits secondaires d'oxydation des lipides, tels que les aldéhydes et cétones qui absorbent faiblement l'énergie. Au milieu du spectre se localise une bande d'absorption de forte intensité liée au groupement (C=O) ; elle correspond à la liaison *ester* permettant la fixation des AG sur la molécule de glycérol pour former les TAG. A côté de cette bande se situe une bande correspondant à la fonction COOH des AGL dans le cas des lipides hydrolysés. Dans la même région du spectre, se placent des bandes d'absorption du carbonyle des aldéhydes (R-CHO) et des cétones (R-CO-R) dans le cas de l'huile oxydée (SHAHIDI et WANASUNDARA, 2002).

Ces groupements fonctionnels absorbent le rayonnement IR presque toujours dans la même région, indépendamment de la structure du reste de la molécule. Par exemple, les vibrations d'élongation de la liaison (C-H) apparaissent habituellement entre 3200 et 2800 cm^{-1} , les vibrations d'élongation du carbonyle (C=O) entre 1800 et 1600 cm^{-1} ; ces bandes indiquent donc la présence de tel groupement fonctionnel dans un échantillon d'huile (AKOH et MIN, 2002).

Les spectres des principaux AGL d'intérêt alimentaire ont été étudiés à l'aide de la spectroscopie IR, pour d'une part repérer les positions des bandes de vibration des groupes fonctionnels existant dans les AG, et d'autre part, séparer les AG en fonction de caractéristiques physico-chimiques, telles que les longueurs des chaînes carbonées ou leurs degrés d'insaturations.

Dans notre étude, nous avons tenté d'attribuer et de comprendre la signification spectrale des bandes d'absorption de l'huile de tournesol à l'état frais et après avoir subi un traitement thermo-oxydatif où le processus oxydatif a été favorisé grâce à l'incorporation de l'air et le maintien de l'huile à une température modérée. Les spectres au MIR en Réflexion Totale Atténuée (ATR) de ces huiles ont été enregistrés. Ainsi, les produits primaires et secondaires d'oxydation ainsi que les variations induites sur l'acide linoléique, principal AG, ont été mises en évidence ; on en cite la perte en cet AGPI de configuration *cis*, la formation d'insaturations de configuration *trans*, la diminution ou l'augmentation de la chaîne hydrocarbonée des autres AG constitutifs, etc.

Les spectres FT-IR de l'huile de tournesol fraîche et de cette huile après avoir subi le traitement thermo-oxydatif sont illustrés par les *figures 8 et 9* ; les intensités des pics enregistrés sont intégrées dans le *tableau III*. Le spectre de l'huile fraîche recèle neuf pics ; le traitement appliqué a induit l'apparition de neuf autres pics, observés dans le spectre IR de l'huile thermo-oxydée. Ces nouveaux pics se situent dans la région de basses fréquences ; ils sont attribués aux produits secondaires d'oxydation. Le barème appliqué lors de cette thermo-oxydation a favorisé le processus oxydatif (grâce à l'air insufflé) au détriment du processus thermique ; une température de 100°C est, en effet, considérée modérée. Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par *GUILLEN et CABO (2002)* ; ces derniers ont noté une corrélation entre les changements dans les spectres infrarouges et la stabilité oxydative des différentes huiles.

Les pics enregistrés ont été répartis dans les régions spectrales correspondant aux différents groupements fonctionnels des lipides et leurs produits d'oxydation pouvant absorber des radiations infrarouges, comme suggérés par de nombreux auteurs, on en cite entre autres, *MAZLIAK (1968)* et *SAFAR (1995)*.

Le spectre IR de l'huile de tournesol fraîche présente une bande de vibration des liaisons O-H au voisinage de 3500 cm^{-1} de très faible intensité, une bande à 3006 cm^{-1} correspondant aux insaturations de configuration *cis*. La région spectrale 3040-3000 cm^{-1} contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements (=C-H). L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons (*SAFAR, 1995*).

PRAMOD KUMAR et ANUPAM SINGH, (2012) ont remarqué que les huiles de tournesol, soja et maïs ont montré une absorbance maximale au voisinage de 3009 cm^{-1} en les comparant à l'huile d'olive extra vierge qui a un maximum d'absorbance à environ 3006 cm^{-1} .

Ces auteurs ont attribué cette différence à la composition en AG de ces huiles ; les premières huiles contiennent une proportion élevée des groupes linoléyle *acyl* ou linoléique, tandis que l'huile d'olive extra vierge contient une proportion plus élevée des groupes *oléil acyl*. Selon ces auteurs, le changement de l'intensité de la bande observée à 3009 cm^{-1} attribuée à la vibration d'élongation C-H de la double liaison *cis*, permet la détermination de l'adultération de l'huile d'olive extra vierge. En effet, le spectre IR de l'huile d'olive extra-vierge adultérée montre, selon l'ampleur de la fraude, une petite hauteur de la bande à 3006 cm^{-1} .

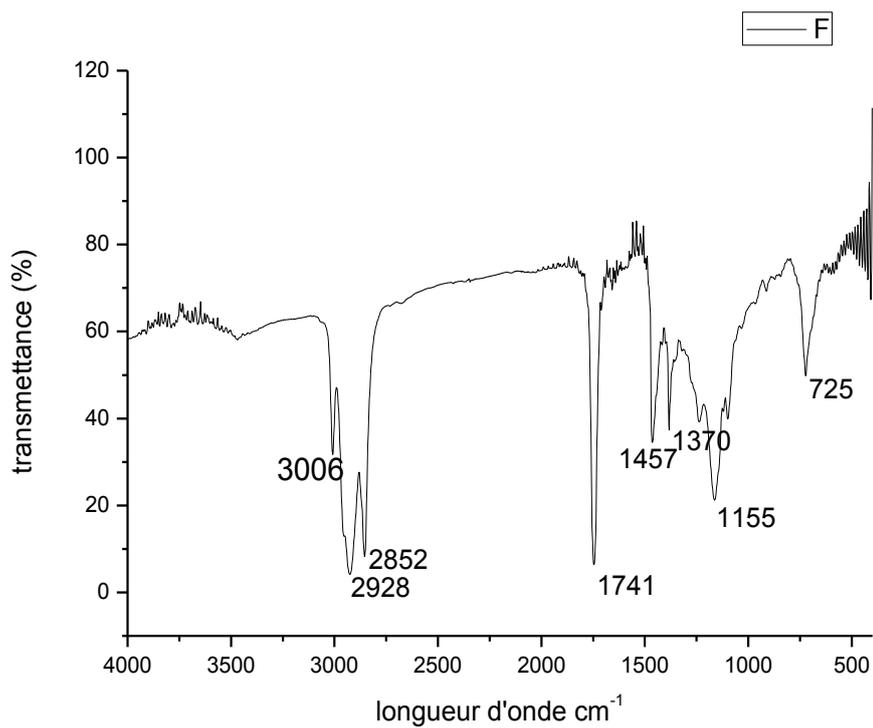


Figure 8: Spectre moyen infrarouge de l'huile de tournesol fraîche

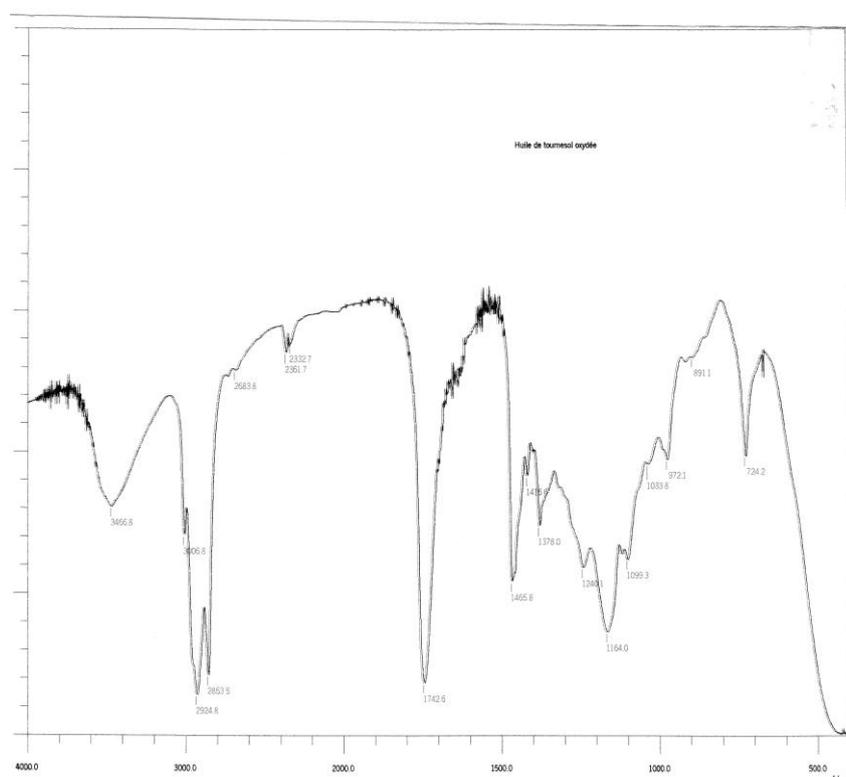


Figure 9: Spectre moyen infrarouge de l'huile de tournesol thermo-oxydée

Tableau III: Intensités des pics des spectres IR des huiles de tournesol, fraîche et thermo-oxydée

Intensités des pics des huiles de tournesol :			
Nombre d'ondes (cm⁻¹)	fraîche	thermo-oxydée	Attributions
3750-3375 3650-3120 3467-3470	~3500 : -58	3466 : -32 (bande plus large)	OH (groupes hydroxyles)
3375-3000	3006 : -31 (plus grand, plus large)	3006 : -28	<i>Cis</i> (étirement) Stretching
3000-2500	2852 : -7 (identiques)	2853 : -9	v CH ₃ symétrique
2500-2000		2683 2361 2332	
2000-1500	1741 : -6	1742 : -6 (plus large)	C=O (<i>esters</i> de TAG)
1500-1000	1457 : -35	1465 : -21 (plus large) 1416 1240 1099 1033	<i>Bending, Scissoring</i>
	1370 : -38	1378 : -30 (plus large)	
	1155 : -21	1164 : -15 (très large)	
1000-500	725 : -50	724 : -39 972 891	

NB : les fréquences issues du traitement thermo-oxydatif sont transcrites en *italique*.

La fraîcheur de l'huile de tournesol utilisée dans notre étude a, donc, été vérifiée par la faiblesse des intensités des pics à 3500 cm^{-1} et l'absence de pics intenses dans la région des faibles fréquences attribués respectivement aux produits primaires et secondaires d'oxydation. Ce résultat confirme la faible valeur de l'IP ainsi que l'absence de l'absorbance en UV-visible à 232nm de cette huile fraîche. Ainsi, cette huile testée n'est pas peroxydée et ne contient pas de CD.

Le traitement thermo-oxydatif appliqué à cette huile a, toutefois, induit des vibrations et rotations moléculaires dans la structure initiale des TAG et des AG constitutifs, ce qui explique l'apparition de nouveaux pics dans la zone des faibles fréquences du spectre infrarouge de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

Il a été admis que les AGPI, notamment à l'état libre, sont les principaux supports des réactions d'oxydation qui ont lieu lors du maintien d'une huile à une température élevée. L'action combinée de la chaleur et de l'oxygène génère des produits primaires et secondaires d'oxydation ; la nature de ces produits ainsi que leurs concentrations dépendent des conditions oxydatives appliquées.

GOBURDHUN et al., (2001) ont signalé que le spectre FT-IR de l'huile de soja a changé après l'avoir utilisé dans des essais de fritures à une température de 180°C et pendant 600 minutes. Le spectre IR de cette huile a montré une augmentation maximale des intensités des bandes comprise dans l'intervalle $3800\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$. Selon ces auteurs, ces bandes sont dues à la vibration d'élongation des groupements -OH des hydroperoxydes ou des AGL et à la formation de groupement carbonyle. Comme le processus hydrolytique est favorisé dans ces conditions, l'absorbance à ces longueurs d'ondes serait attribuée à l'accumulation des AGL. Néanmoins, les intensités des pics à 2922 cm^{-1} et à 2825 cm^{-1} ont diminué conséquent, selon ces auteurs, au raccourcissement des chaînes hydrocarbonées des AG. Ce résultat est conforté par l'augmentation de l'absorbance à 1740 cm^{-1} , attribuée aux aldéhydes que sont des composés secondaires d'oxydation à l'origine de l'apparition du défaut de rance aldéhydique.

Par ailleurs, *ROHMAN et MAN (2013)* ont remarqué une augmentation de l'intensité des pics à 3470 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} et 967 cm^{-1} dans les spectres IR des huiles de maïs, son de riz, soja et tournesol, pendant que les intensités des pics à 3008 cm^{-1} et 722 cm^{-1} ont diminué lorsque ces huiles ont été soumises à un traitement thermique sévère (160°C pendant 120h). L'augmentation de l'intensité de la bande à 3470 cm^{-1} pourrait être due, comme dans le cas de l'étude de *GOBURDHUN et al., (2001)*, à l'accumulation d'AGL libérés par la lipolyse favorisée durant la dégradation thermique.

Contrairement aux conditions expérimentales fixées par les auteurs précités, *ROHMAN et MAN (2013)* et *GOBURDHUN et al. (2001)* où l'altération thermique a été favorisée, l'insufflation de l'air dans « notre » huile de tournesol fraîche a favorisé son altération oxydative. C'est ainsi que les hydroperoxydes (produits primaires d'altération oxydative) s'accumulent en grande quantité, en témoigne la large bande d'absorption à 3466 cm^{-1} enregistrée dans le spectre IR de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

Un hydroperoxyde (ROOH) est un composé chimique contenant le groupe fonctionnel *hydroperoxyde* (H-O-O-); il s'agit d'un peroxyde particulier dont un des oxygènes est lié avec un atome d'hydrogène lui conférant ainsi une fonction acide. L'accumulation d'hydroperoxydes renseigne sur le déroulement de la peroxydation de l'acide linoléique contenu dans l'huile de tournesol soumise au traitement thermo-oxydatif.

Les hydroperoxydes, produits primaires d'oxydation se sont, donc, formés et se sont accumulés grandement dans l'huile de tournesol thermo-oxydée soumise à une température modérée avec disponibilité d'oxygène grâce à l'air insufflé, en témoigne la très haute et large bande d'absorbance enregistrée à 3466 cm^{-1} attribuée aux groupes OH des hydroperoxydes. Les hydroperoxydes sont considérés comme étant ceux qui fourniraient l'information la plus pertinente sur l'intensité de la lipoperoxydation. La mesure des hydroperoxydes est probablement l'approche ayant suscité le plus grand nombre de développements.

En effet, la formation d'hydroperoxydes est généralement observée lors de réactions d'auto-oxydation, c'est-à-dire de réactions de composés organiques avec le dioxygène de l'air. Les hydroperoxydes sont les premiers intermédiaires réactionnels suffisamment stables pour être suivis par des « méthodes classiques » d'analyse chimique, comme l'IP et l'extinction moléculaire à 232 nm pour lesquels l'huile de tournesol thermo-oxydée a enregistré les valeurs les plus élevées, par rapport à l'huile de tournesol fraîche.

Ainsi, l'accumulation d'hydroperoxydes renseigne sur le déroulement de la peroxydation. Les autres bandes aux voisinages de 2922 et 2852 cm^{-1} n'ont, par contre, pas été modifiées après avoir soumis « notre » huile au barème fixé; ces bandes correspondent aux vibrations d'élongation du groupe C-H aliphatique. Le changement du spectre IR au voisinage de ces fréquences se produit lors du traitement thermique sévère (cas de friture) induisant le raccourcissement de la chaîne hydrocarbonée de l'AGI se traduisant par la diminution de l'intensité des pics de cette région spectrale, comme a été signalés par les auteurs suscités.

Composés sans goût ni odeur, les hydroperoxydes sont relativement stables à température ambiante. En revanche, en présence de métaux ou aux températures élevées, ils se décomposent pour former des composés secondaires d'oxydation ; ces derniers sont responsables de la dégradation des qualités olfactives et gustatives des aliments (*CHOE et MIN, 2006*).

Une élévation de la température favorise l'oxydation des lipides. Cette réaction est d'autant plus rapide que la température est élevée : l'abstraction des hydrogènes *allyliques* (hydrogène attaché à un atome de carbone adjacent à une double liaison.) et la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires sont favorisées. Il est, cependant, à noter que la solubilité de l'oxygène dans un lipide pur est de l'ordre de 40 µg / g de lipides. Celle-ci diminue lorsque la température s'élève, rendant l'oxygène de moins en moins disponible pour les réactions ; un antagonisme existe, donc, entre ces deux facteurs d'influence que sont la température et l'oxygène (*CROGUENNEC, 2006*).

Sous des conditions de température modérées, *ROHMAN et al., (2011)* ont analysé les modifications du spectre de l'huile de coco vierge placée à l'étuve à une température de 63°C pendant 40 jours ; les intensités des bandes d'absorbance à des fréquences de 3300 cm⁻¹, 2922 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 1739 cm⁻¹ et 962 cm⁻¹ ont été analysées. Ces auteurs ont estimé que la seule bande ayant subi un changement maximal se situe à 1739 cm⁻¹ ; elle est attribuée aux composés carbonyliques (esters, aldéhydes, cétones, lactones).

En effet, le spectre IR de l'huile de coco chauffée pendant un temps très prolongé n'a pas montré de pics, comme d'ailleurs pour l'huile de coco fraîche, autour 3300 cm⁻¹ relatifs aux hydroperoxydes (*Annexe 2*). Compte tenu de ces résultats, et contrairement aux résultats de notre étude, l'huile de coco n'a pas été oxydée dans la mesure où il s'agit d'une huile saturée (17,1%) (*SHEN et al., 1999*) et par voie de conséquence cette bande à 3300 cm⁻¹ correspondant aux groupements hydroxyles néoformés au cours de l'oxydation n'apparaît pas dans le spectre IR de cette huile chauffée.

Comme pour toutes les réactions chimiques, la vitesse de décomposition des hydroperoxydes augmente considérablement à partir de 50-60°C (*TIMMS et ROUPAS, 1982*). D'après *CHAN et al. (1976)*, les hydroperoxydes commencent à se décomposer à 50°C et se décomposent spontanément au-dessus de 150°C. Les composés secondaires de la scission des hydroperoxydes sont représentés par des aldéhydes, acides carboxyliques, alcools et hydrocarbures (*KIM et MIN, 2008*).

PRAMOD KUMAR et ANUPAM SINGH, (2012) ont estimé qu'il est évident qu'après une diminution des produits primaires d'oxydation, les produits secondaires augmentent. Ainsi, l'augmentation des composés carbonylés coïncide avec la décomposition des hydroperoxydes. En effet, aux températures supérieures à 100°C, les produits primaires d'oxydation, les hydroperoxydes, n'existent que transitoirement ; ils se décomposent rapidement en une multitude de produits volatiles et non volatiles. Les alcools, aldéhydes saturés, aldéhydes insaturés et époxyde ont été considérés comme les produits secondaires majeurs d'oxydation (*FRANKEL et al., 1992*). Les aldéhydes et les cétones absorbent au voisinage de 1728 cm⁻¹ (*GUILLEN et CABO, 2002*). Le spectre IR de l'huile de tournesol thermo-oxydée n'a pas révélé une bande d'absorption à cette longueur d'onde. L'odeur rance de cette huile pourrait, donc, être due à la formation d'autres molécules de faible poids moléculaire, comme les hydrocarbures.

Ainsi et compte tenu de l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée, il est admis de conclure que les conditions de la thermo-oxydation fixées dans notre étude auraient favorisé l'accumulation des produits de hauts poids moléculaire. Les bandes d'absorption à 1465 cm⁻¹ et 1378 cm⁻¹ du spectre IR de l'huile thermo-oxydée sont plus large et de forte intensités que celles enregistrées à 1457 cm⁻¹ et 1370 cm⁻¹ dans le spectre IR de l'huile de tournesol fraîche. En plus de ces bandes, la thermo-oxydation a induit l'apparition de nouvelles bandes à 2683 cm⁻¹, 2361 cm⁻¹ et 2332 cm⁻¹ incluses dans la gamme 3000-2000cm⁻¹ attribuées par *SAFAR (1995)* et qui correspondent au groupement CH₂ des TAG et la vibration d'élongation asymétrique du groupe C-H.

Selon *SAFAR (1995)*, dans la région spectrale 1755-1700 cm⁻¹ deux types de vibrations distinctes sont observables : une élongation du groupe C=O des *esters* est visible vers 1745 cm⁻¹ et une deuxième bande entre 1721 et 1701 cm⁻¹ est attribuable à l'élongation du groupe C=O des acides. Le pic à 1745 cm⁻¹ est attribué aux TAG ; il correspond à la vibration de la liaison C=O de la fonction *ester* de ces molécules majoritaires des huiles. Ceci est confirmé par l'augmentation des pics à 3008 cm⁻¹ et à 1465 cm⁻¹, attribués respectivement, aux vibrations de liaisons C-H des groupements C=CH-C et CH₂, que l'on retrouve, également, dans les TAG (*BERTRAND et DUFOUR, 2000*). Par ailleurs, *WHITTINGHILL et al., (1999)* et *CONTRERAS et al., (2010)* ont attribué la bande d'absorption aux alentours de 1740 cm⁻¹ à la liaison *ester* (-C=O) des groupements carbonyles des mono-glycérides.

En outre, *KLAYPRADIT et al.*, (2010) ont employé la spectroscopie ATR-FTIR avec application d'un modèle mathématique (*artificial neural network analysis*) pour prévoir et évaluer la qualité oxydative de l'huile de poisson (*Menhaden fish oil*) stockée à la lumière et à température ambiante. Ces auteurs ont observé une bande d'absorbance à 1746 cm^{-1} (*Annexe 3*) qu'ils ont attribuée aux groupes *ester* des TAG.

De même, *SAFAR* (1995) a rapporté que le spectre IR du lait contient des bandes spécifiques des lipides, vers 2857 et 2924 cm^{-1} attribuables aux groupes C-H des TAG, ainsi que la bande à 1745 cm^{-1} attribuable à la vibration de valence du groupement carbonyle C=O des TAG.

PRAMOD KUMAR et ANUPAM SINGH, (2012) ont estimé qu'il est intéressant de suivre les modifications spectrales dans la région de C-O proche de 1746 cm^{-1} . Ils ont remarqué un élargissement de la bande (*Annexe 4*) pour les huiles de maïs chauffées. Selon ces auteurs, cette observation est due à la production de groupes fonctionnels aldéhyde saturés ou autres produits secondaires d'oxydation qui absorbent à 1728 cm^{-1} ; cette bande peut, toutefois, chevaucher avec la vibration d'élongation à 1746 cm^{-1} du groupe fonctionnel *ester* carbonyle des TAG. Selon ces auteurs, quand de nouveaux carbonyles se forment à partir de cétone et d'aldéhyde préexistants, l'absorbance maximale s'observe dans la région comprise entre 1700 et 1726 cm^{-1} ; ceci entraîne un élargissement de la bande à 1743 cm^{-1} correspondant aux basses longueurs d'ondes.

Le spectre IR de l'huile de tournesol fraîche utilisée dans notre étude a montré un pic à 1741 cm^{-1} . Un pic à cette fréquence indique plus précisément qu'il ne s'agit pas d'AGL, mais plutôt de lipides estérifiés de type di- et/ou TAG (*KEIRSSE*, 2003). Dans le spectre IR de l'huile de tournesol thermo-oxydée, un pic à 1742 cm^{-1} a été observé; ce pic, de même intensité, est toutefois plus large. *GOBURDHUN et al.*, (2001) ont, également, observé que l'intensité de la bande à 1740 cm^{-1} attribuée à la fonction carbonyle augmente dans l'huile de soja soumise à une oxydation thermique.

Ce changement dans la largeur de cette bande à 1742 cm^{-1} n'est pas accompagné, comme dans le cas des résultats de *GOBURDHUN et al.*, (2001), d'une diminution de l'intensité à 2922 cm^{-1} et 2825 cm^{-1} . Les pics à 2928 et 2852 cm^{-1} de l'huile fraîche ont la même intensité que les pics à 2924 et 2853 cm^{-1} de l'huile de tournesol thermo-oxydée. Cette différence serait due aux conditions expérimentales appliquées. L'insufflation d'air dans l'huile de tournesol portée à une température modérée de 100°C aurait favorisé la fixation de l'oxygène sur les doubles liaisons de l'acide linoléique sans rompre la chaîne hydrocarbonée de cet AGE. L'insertion de ces molécules d'oxygène crée des liaisons carbone-oxygène à

l'origine de l'augmentation du nombre de bandes attribuées aux groupes C=O et C-O, indicateurs du déroulement du processus oxydatif. De plus, il a été montré que la décomposition des hydroperoxydes peut avoir lieu, via la formation d'esters avec d'autres AG d'une huile maintenue, comme dans notre cas, à une température plus faible (60-120°C).

En effet, le spectre IR de l'huile de tournesol thermo-oxydée a montré un pic à 1164 cm^{-1} de forte intensité et plus large que le pic à 1155 cm^{-1} enregistré dans le spectre IR de l'huile de tournesol fraîche. Cette bande est attribuable à la vibration d'élongation du groupe C-O des esters ; comme pour le groupe C=O, l'intensité de cette bande est, également, liée au degré d'oxydation. Deux autres pics à 1240 et 1033 cm^{-1} ont été enregistrés uniquement dans l'huile de tournesol thermo-oxydée ; ils correspondent à l'étirement et inflexion du -C-O et -CH₂-. En somme, une augmentation du taux de l'estérification (visible au niveau des groupes C=O et C-O) est indicatif d'une augmentation du degré d'oxydation d'une huile, confirmé également par une diminution significative de la valeur de l'indice d'iode de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

En effet, SAFAR (1995) a attribué la bande à 1150 cm^{-1} aux vibrations d'élongation du groupe C-O ester. Selon cet auteur, la bande du groupe C-O est, en effet, déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement O-R. L'effet inductif, au sein d'un composé chimique, consiste en la propagation d'une polarisation électronique au fil des liaisons chimiques, due à la différence d'électronégativité des différents éléments liés entre eux.

Par ailleurs, l'augmentation du nombre de groupe C-O dans l'huile thermo-oxydée serait due à la fixation des molécules d'oxygène sur les doubles liaisons des AGPI estérifiés sur le glycérol pour former des TAG. La présence de doubles liaisons, siège de la polymérisation, sur les chaînes hydrocarbonées des AGPI a été exploitée par les chimistes pour synthétiser des matériaux polymères biosourcés (issus de sources renouvelables).

De plus, la position des doubles liaisons dans la chaîne hydrocarbonée d'un AGPI peut, également, affecter son taux d'oxydation. ZHANG et CHEN (1998) ont trouvé que l'acide linoléique conjugué s'oxyde plus rapidement que l'acide linoléique natif.

En effet, la présence de doubles liaisons conjuguées facilite l'introduction de groupements hydroxyle. Cette réaction d'addition est réalisée par oxydation directe des insaturations après remplacement d'un atome d'hydrogène par une molécule d'oxygène. Des polyols peuvent, ainsi, être préparés par polycondensation ou polymérisation d'AG possédant des groupes hydroxyle (-OH) donnant des composés de masse molaire élevée ; les huiles

contenant des AG hydroxylés (comme l'huile de ricin) ont une viscosité particulièrement élevée ; elles sont très utilisées dans la chimie des polymères (BOYER, 2010).

Les bandes comprises entre $3800-2700\text{ cm}^{-1}$ correspondent à la région des hydrogènes où des vibrations d'allongement des -OH peuvent se produire. Des acides hydroxylés se seraient formés dans l'huile thermo-oxydée, contribuant ainsi à l'élargissement de la bande enregistrée à 3466 cm^{-1} . Les AG hydroxylés englobent un nombre d'acides carboxyliques à chaîne droite contenant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Les huiles insaturées en contiennent de petites quantités après un stockage prolongé, probablement à cause du déroulement de l'oxydation (GUNSTONE *et al.*, 1986).

Ces composés secondaires d'oxydation non volatils sont principalement des TAG oxydés monomères comportant au moins un AG altéré porteur d'un groupement fonctionnel de type hydroxyle, carbonyle ou époxyde. Contrairement aux molécules volatiles (principalement des aldéhydes, hydrocarbures, alcools, acides, etc.) modifiant la saveur d'origine des CG, les produits non volatils s'accumulent dans l'huile thermo-oxydée.

PRAMOD KUMAR *et* ANUPAM SINGH, (2012) ont suggéré que le processus oxydatif peut être suivi dans une huile soumise à une température élevée et/ou exposée aux rayonnements UV grâce à la variation des spectres dans la région comprise entre 3050 cm^{-1} et 1745 cm^{-1} . Il importe de souligner que l'hexanal (hexanaldéhyde, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$), le pentanal et le 2,4-decadienal sont des produits d'oxydation de l'acide linoléique, tandis que l'octanal et le nonanal sont des produits de décomposition issus de l'oxydation de l'acide oléique (FRANKEL, 1985).

L'augmentation de l'absorbance à 1742 cm^{-1} a été attribuée, par KEIRSSE (2004), à la fonction C=O des TAG ; d'autres auteurs l'expliquent par la formation et l'accumulation de composés carbonyliques, comme les aldéhydes, cétones, esters et lactones consécutive au déroulement du processus oxydatif ; les composés carbonyliques sont, effet, les principaux produits secondaires formés suite à la décomposition des hydroperoxydes (SMITH *et al.*, 2005).

Le spectre IR de l'huile de tournesol thermo-oxydée a montré un pic à 1742 cm^{-1} plus large, mais de même intensité que celui de l'huile fraîche. Certains auteurs attribuent l'augmentation de l'intensité de cette bande à la vibration d'élongation des groupes carbonyles au déroulement de l'oxydation à haute température et le raccourcissement des chaînes hydrocarbonées d'AG. La thermo-oxydation de l'huile de tournesol selon nos conditions expérimentales, n'est pas suivie d'une diminution des intensités des bandes à 2924 cm^{-1} et 2853 cm^{-1} , attribuées aux vibrations d'élongation du CH_2 et CH_3 .

Il est à rappeler que les bandes observables dans la région 3000 cm^{-1} à 2800 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations d'élongation de la liaison C–H aliphatique des groupes CH_2 et CH_3 des TAG (SAFAR, 1995 ; KEIRSSE, 2003). Deux bandes intenses à 2924 cm^{-1} et à 2854 cm^{-1} sont attribués respectivement aux vibrations d'élongations asymétrique et symétrique du groupe CH_2 . Une autre bande d'intensité moyenne observable à 2953 cm^{-1} est due à la vibration d'élongation asymétrique du groupe CH_3 . Dans la région des basses fréquences, seule la vibration de déformation du groupe CH_2 est observable. Dans la même région des basses fréquences, la bande à 724 cm^{-1} présente est en relation avec la longueur de chaîne et le degré d'oxydation. Il a été montré que la longueur de la chaîne d'un AGL peut être caractérisée par la variation de l'intensité de la bande à 720 cm^{-1} . En effet, cette bande est attribuable à la vibration de la déformation du groupe CH_2 . La thermo-oxydation a entraîné une augmentation de l'intensité du pic à 724 cm^{-1} ; ce dernier est représentatif des vibrations de déformation de balancement du groupe $-(\text{CH}_2)_n-$, $\text{HC}=\text{CH}-$ (*cis*).

Selon CONTRERAS *et al.* (2010), les bandes d'absorbance à 2920 et 2850 cm^{-1} peuvent être attribuées respectivement à la vibration de valence asymétrique des deux liaisons C-H du groupement méthylène et la seconde à la vibration de valence symétrique dans laquelle les deux liaisons C-H subissent une extension et une contraction en phase. Par ailleurs, des études ont montré une relation entre la position des bandes situées autour de 2920 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} (vibration CH_2 asymétrique et symétrique des lipides) et la fluidité des membranes (LIU *et al.*, 2002).

PRAMOD KUMAR *et ANUPAM SINGH*, (2012) ont remarqué une augmentation de l'intensité de la bande d'absorbance à 2854 cm^{-1} lors de l'adultération de l'huile d'olive extra vierge par des huiles polyinsaturées, telles les huiles de tournesol, soja, sésame et de maïs. Par contre et contrairement à nos résultats, ces auteurs ont remarqué une nette réduction des intensités des bandes à 2925 cm^{-1} et 2854 cm^{-1} dans l'huile de maïs chauffée. Les intensités de ces bandes dans l'huile de tournesol fraîche et dans l'huile de tournesol thermo-oxydée sont identiques. Par ailleurs, ROHMAN *et al.*, (2011) ont enregistré les mêmes intensités à des fréquences de 2852 , 1739 , et 962 cm^{-1} sur l'huile de coco vierge étuvée avec ou sans incorporation d'antioxydants (Annexe 5).

Afin de quantifier la falsification, PRAMOD KUMAR *et ANUPAM SINGH*, (2012) ont calculé les hauteurs maximales des deux bandes à environ 3006 cm^{-1} et 2925 cm^{-1} . La bande à 2925 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation symétrique du groupe CH_2 aliphatique, tandis que la bande à 3006 cm^{-1} est attribuée à l'acide oléique. Le rapport calculé entre ces deux hauteurs des pics indique le pourcentage de la liaison hydrogène – carbone (C-H)

associée à la double liaison *cis* présente dans l'huile. De plus, le degré d'insaturation d'une huile est proportionnel au quotient de l'intensité de la bande à 3015 cm^{-1} et de celle de la bande à 2860 cm^{-1} . Cette bande est attribuable à la vibration de valence symétrique du groupe CH_2 (SAFAR, 1995).

Le processus oxydatif a conféré à l'huile de tournesol thermo-oxydée un goût de rance prononcé. Les composés secondaires volatils, déterminés par la mesure de l'indice de peroxyde et de l'absorbance aux faibles fréquences, ont pour substrat l'acide linoléique. Cet AGPI aurait subi, également, des réactions d'isomérisation avec formation d'isomères géométriques, les AGPI de configuration *trans*.

En spectrométrie FT-IR, les AG *trans* absorbent entre 945 et 990 cm^{-1} ; cette bande d'absorption n'apparaît pas dans les spectres des huiles végétales naturelles qui renferment des AGS et AGI ne contenant que des doubles liaisons *cis*, absorbant entre 3010 et 3035 cm^{-1} (WANGA *et al.*, 2011).

Les AG *trans* formés dans l'huile de tournesol thermo-oxydée sont des isomères de l'acide linoléique ; l'acide α -linoléique en est faiblement représenté. Néanmoins, l'isomérisation *cis-trans* est d'autant plus facile que l'AG est insaturé et que le traitement thermique est poussé (JUDD *et al.*, 1994).

La formation de l'isomère *trans* lors de la thermo-oxydation s'est traduite par l'apparition d'une bande de vibration de déformation du groupe $=\text{C-H}$ à 972 cm^{-1} dans le spectre de l'huile thermo-oxydée parallèlement à une diminution, même légère, de la largeur du pic de vibration d'élongation du groupe $=\text{C-H}$ à 3006 cm^{-1} relatif à l'isomère *cis*.

Par ailleurs, des études portant sur la structure de l'acide élaïdique (C18:1 *trans*) à l'état purifié n'ont pas remarqué de pic vers 3008 ou 3006 cm^{-1} . En revanche, vers 970 cm^{-1} une bande intense est observable ; elle est attribuable à la vibration de déformation du groupe $=\text{C-H}$ "*trans*" (Annexe 6). Les isomères *cis* de l'acide oléique_(a) (C18:1 *cis*), acide linoléique_(b) (C18:2 *cis*) et les AGS, à l'état purifié, n'ont pas montré de pic vers 970 cm^{-1} .

Il a été montré, également, que l'intensité des bandes de déformation de $=\text{CH}$ *cis* et *trans* sont proportionnelles au nombre de ces liaisons. Ainsi, cette bande correspond aux vibrations de déformation hors du plan des atomes dites vibration du *trans-CH* ; elle est par conséquent considérée comme un marqueur pour la détermination des MG *trans* (CONTRERAS *et al.*, 2010 ; KOCA *et al.*, 2010). De plus, WANGA *et al.*, (2011) ont montré que le nombre de doubles liaisons *cis* a diminué, tandis que le nombre de liaisons *trans* et le carbonyle ont augmenté avec le prolongement du temps d'entreposage de l'huile de poisson. La diminution du nombre de doubles liaisons *cis* a été vérifiée à l'aide de la CPG qui a révélé

un rétrécissement de la surface des pics d'AGPI dans les chromatogrammes de l'huile de poisson. Les résultats de ces auteurs confortent ceux obtenus dans notre étude.

En effet, la température modérée appliquée combinée à la richesse de l'huile de tournesol en molécules anti-oxydantes naturelles introduites en fabrication seraient, en partie, responsables de l'isomérisation partielle des doubles liaisons de conformation *cis* en isomère *trans* au cours du traitement thermo-oxydatif. Une partie de ces insaturations demeure à l'état natif (*cis*).

Les molécules anti-oxydantes naturellement présentes dans les graines oléagineuses ou ajoutées dans l'huile après raffinage ralentissent le phénomène d'oxydation ; ces molécules sont susceptibles d'arrêter la phase de propagation en bloquant les radicaux lipidiques, séquestrant et/ou complexant les catalyseurs d'oxydation comme les métaux (fer et cuivre), les enzymes ou les photo-sensibilisateurs. De plus, il a été admis que dans les TAG, l'oxydabilité des AGPI dépend, entre autres, de leur position sur le glycérol et de la longueur de chaîne des AG voisins (*ENDO et al. 1997*). Un TAG avec un AGI en position S_{n-1} ou S_{n-3} s'oxydera plus rapidement qu'un TAG avec un AGI en position S_{n-2} .

Après formation des peroxydes, les doubles liaisons non conjuguées ($C=C-C-C=C$) présentes naturellement dans les lipides insaturés sont converties en doubles liaisons conjuguées ($C=C-C=C$). Les CD, produits primaires d'oxydation, absorbent fortement le rayonnement ultra-violet à 232 nm et dans le MIR. En outre, les changements dans les bandes d'absorption dans la région spectrale $980-965\text{ cm}^{-1}$ indique une isomérisation *cis-trans* et probablement la formation de liaisons conjuguées (*SHAHIDI et WANASUNDARA, 2002*).

L'huile de tournesol fraîche raffinée est d'aspect fluide. Cette fluidité, native, est liée à l'abondance des AGPI de la configuration normale, *cis*. Cependant, la formation et l'accumulation d'AG *trans* isolés (absorbant entre $977-957\text{ cm}^{-1}$) ainsi que les AG *trans* conjugués des TAG polyinsaturés (absorbant entre $995-983\text{ cm}^{-1}$) ont contribué, également, à l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée. En effet, les AG *cis* et *trans* ont une conformation dans l'espace différente : les AG *trans* ont une forme plutôt linéaire alors que les AG *cis* sont courbés. Cette particularité rend les AG *trans* moins fluides (plus rigides). Ils sont plus à l'état solide à température ambiante et possèdent une température de fusion (passage de l'état solide à l'état liquide) plus élevée que la forme *cis*.

Par ailleurs, *ASSUMPCAO et al.*, (2004) ont rapporté que pendant l'hydrogénation, l'emplacement des doubles liaisons dans la chaîne hydrocarbonée d'un AG des TAG change, ce qui produit des isomères géométriques de conformation *trans*. *MAYNERIS-PERXACHS et al.*, (2010) ont signalé que les isomères *trans* prédominants dans les produits traités industriellement sont dominés par l'acide élaïdique (C18:1, *trans*-9) ; selon *LICHTENSTEIN* (2000), cet isomère de configuration *trans* est dérivé de l'hydrogénation partielle des huiles. Cependant, le chauffage des huiles végétales pendant la désodorisation et lors des fritures et la cuisson génère davantage le C18 :2, *trans* (*KEMNENY et al.*, 2001).

La formation et l'accumulation de l'isomère *trans* de l'acide linoléique mis en évidence par un pic de moyenne intensité à 972 cm⁻¹ serait, en partie, à l'origine de l'altération de l'aspect organoleptique de l'huile de tournesol thermo-oxydée. De nouveaux pics à 972 cm⁻¹, 891 cm⁻¹ et 1099 cm⁻¹ ont, également, apparu dans le spectre IR de cette huile thermo-oxydée de texture épaisse.

Par ailleurs, la majorité des produits de décomposition des AG de l'huile sont des composés polaires non volatils et des dimères et polymères de TAG. Les dimères et les polymères sont formés par la combinaison de liaisons C-C, C-O-C et C-O-O-C et leur formation augmente la viscosité de l'huile (*CHOE et MIN*, 2007).

Une diminution significative du contenu d'une huile en acides linoléique et oléique, consécutive au déroulement de l'oxydation, se traduit par la formation de composés polaires et des polymères de TAG (*BILLEK et al.*, 1978). Il a été montré précédemment qu'une accumulation significative des composés polymères indique une oxydation avancée (*MARQUEZ-RUIZ et al.*, 1996 ; *MARTIN POLVILLO et al.*, 2004). Par ailleurs, *GARRIDO-POLONIO et al.*, (2004) ont montré que la teneur en composés polaires a augmenté ($P < 0,001$) dans l'huile de fritures (27,7g/100g d'huile) comparativement à celle contenue dans l'huile fraîche (4g/100g d'huile) ; les composés issus de l'altération thermo-oxydative, tels que les polymères de TAG, les dimères de TAG et les TAG oxydés ont, également, augmenté ($P < 0,001$) dans l'huile de fritures.

C'est ainsi que *DOBARGANES et al.* (1993) ont énuméré les types de TAG, le niveau des composés polaires ainsi que leur répartition entre l'huile de bain de fritures et l'huile adsorbée sur la frite ; ils ont conclut que les composés polaires se répartissent indistinctement entre ces deux milieux. Pour rappel, une teneur en composés polaires supérieure à 20% et/ou en polymères de TAG supérieure à 14% rend cette huile impropre à la consommation humaine.

La formation de ces divers composés se fait au détriment des AGPI de la structure triglycéridique. A des températures basses (60–100°C) et en présence d'oxygène, correspondant aux conditions fixées dans notre étude, la disparition des doubles liaisons peut se produire selon deux mécanismes : la formation d'époxydes et l'addition des radicaux libres formés sur les doubles liaisons conjuguées avec déroulement possible de la voie de réticulation ; ces réactions pourraient être à l'origine de l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

I.2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

L'avantage de l'analyse chromatographique, notamment la CPG par rapport aux analyses classiques, dans l'évaluation de la peroxydation d'une huile est lié à l'instabilité des peroxydes formés lors du traitement thermique du CG.

Les AG sont les constituants les plus prédominants dans les huiles alimentaires. Dans les CG, les AGS et les AGI se trouvent généralement sous forme de TAG. L'oxydation des CG affecte les AGE et génère des composés toxiques et des polymères oxydés. Ainsi, l'oxydation altère le goût, diminue la qualité alimentaire et induit la toxicité des huiles de table (*KAMAL-ELDIN et al., 2003*).

Ainsi, l'étude des profils en AG de l'huile de tournesol à l'état frais et après avoir subi le traitement thermo-oxydatif permet de déterminer et d'estimer la perte en acide linoléique, principal AGPI contenu dans cette huile. Les AG dosés à l'aide de la CPG dans l'huile de tournesol thermo-oxydée sont ceux non altérés par le traitement thermo-oxydatif appliqué. Leur analyse semble être intéressante dans l'évaluation des changements chimiques des AG au cours du chauffage ou la friture (*DOBARGANES et PEREZ-CAMINO, 1985*).

L'analyse des chromatogrammes lipidiques obtenus, nous ont permis d'établir le *tableau IV* où sont consignées les valeurs chiffrées des principaux AG détectés dans les deux échantillons d'huile de tournesol, fraîche et thermo-oxydée.

On constate une augmentation significative ($p = 0,006$) de la teneur en acides palmitique et oléique et une diminution très hautement significative ($p = 0,000$) du taux d'acide linoléique dans l'huile de tournesol thermo-oxydée. La sensibilité des doubles liaisons, notamment, des AGPI à l'action combinée de la chaleur et de l'oxygène serait à l'origine de l'augmentation de la saturation de l'huile chauffée.

Tableau IV : Variation de la teneur en principaux AG dans les deux échantillons d'huiles (% d'AG totaux).

Acides gras	Huile fraîche	Huile thermo-oxydée
C16 :0	6,14 ± 0,451	9,48 ± 0,367
C18 :1, n-9	33,500 ± 2,317	46,040 ± 3,939
C18 :2, n-6	58,140 ± 2,475	40,590 ± 0,829

Valeurs, une moyenne ± standard de déviation de cinq déterminations

L'oxydabilité des AGPI est plus élevée que celle des AGMI (acide α -linoléique > acide linoléique > acide oléique). L'influence de la composition en AG sur la stabilité d'une huile à l'oxydation a déjà été mise en évidence au préalable dans plusieurs études (*PARKER et al. 2003* ; *MARTIN-POLVILLO et al. 2004*).

KOWALSKI, (2007) suggère qu'un traitement thermique et pendant un temps prolongé exerce un effet délétère sur la composition quantitative en AG d'une huile ; ceci a une implication directe sur l'utilisation des huiles dans la cuisson. Cet auteur a remarqué une diminution de la concentration en AG des huiles d'olive et tournesol chauffées à 90°C et 120°C pendant 72 heures ; cette réduction est proportionnelle au temps de chauffage.

Les diminutions enregistrées respectivement pour l'huile d'olive et l'huile de tournesol ont été approximativement de 11% et 15% après un chauffage de 72 heures et approximativement de 18% et 20% après 120 heures de chauffage (relative aux concentrations initiales). La faible perte en AG totaux de l'huile d'olive par rapport à l'huile de tournesol semble être due, d'une part, à sa faible teneur en acide linoléique ; cet AGPI est aisément oxydé et son haut contenu en acide oléique, moins rapidement oxydé d'autre part (*KONOPKA et al., 2003*).

Ainsi, l'huile d'olive était plus résistante à ces conditions expérimentales que l'huile de tournesol. *KONOPKA et al., (2003)* estiment que l'huile d'olive, à forte proportion en AGMI, est légèrement meilleure en cuisson que l'huile de tournesol, particulièrement riches en AGPI.

Les résultats portés dans le *tableau IV* révèlent une diminution considérable de la teneur de l'huile de tournesol en C18 :2, ω 6 après avoir subi un barème de chauffage nettement inférieur à celui appliqué au niveau culinaire, notamment durant les fritures. La dévalorisation de l'huile de tournesol serait due à l'insertion des molécules d'oxygène incluses dans l'air insufflé sur les doubles liaisons de configuration *cis* de l'acide linoléique. L'agitateur du réacteur utilisé dans notre étude a favorisé le contact entre l'oxygène et les

liaisons insaturées de conformation *cis*, Cette réaction s'accompagne de la formation de groupement -OH facilitant, ainsi, la fixation de nouveaux fragments de molécules, c'est la polymérisation.

En effet, les AGPI sont les principaux supports des réactions d'oxydation et de polymérisation dans une huile maintenue à une température élevée (GUILLAUMIN *et al.*, 1977). Comme pour les réactions d'oxydation, les AGPI sont plus susceptibles de subir des réactions d'hydrogénation que les AGMI ; il semble qu'une concentration élevée en acide linoléique et autres AGPI inhibe la conversion de C18 :1, 11-*trans* en acide stéarique (CHILLIARD *et FERLAY*, 2004). Dans leur étude sur les effets de l'incorporation de l'huile de poisson sur la production, *in vitro*, des isomères de CLA par le fluide ruminal, HOUA *et al.*, (2011) ont remarqué une diminution significative de la teneur en acide oléique et une augmentation du taux d'acide stéarique dans tous les lots expérimentaux durant l'incubation à 39°C pendant 24h. Cependant, le traitement du fluide *ruminal* avec l'huile de poisson a atténué la chute de cet AGMI et a ralenti significativement l'augmentation du taux de cet AGS. Ainsi, la nature du régime alimentaire est susceptible d'affecter cette voie métabolique (hydrogénation) durant la fermentation (MAIA *et al.*, 2009).

Ainsi, la détermination de la teneur en AGPI, tel que l'acide linoléique, permet d'estimer le degré d'oxydation thermique. WESSELS (1983) a rapporté que la dégradation oxydative génère des TAG oxydés contenant des hydroperoxydes, *époxy*, *hydroxy* et groupements cétones et des AG ou TAG dimérisés. En revanche, les produits volatiles d'oxydation sont généralement des *hydroxy* saturés et monoinsaturés aldéhydiques, cétoniques et des acides dicarboxyliques, hydrocarbures, alcools, aldéhydes, cétones et des composés aromatiques (PERKINS, 1996). Par définition, les composés secondaires d'oxydation non volatils sont principalement des TAG oxydés monomères comportant au moins un AG altéré porteur d'un groupement fonctionnel de type hydroxyle, carbonyle ou époxyde.

L'augmentation du taux d'AGS et d'AGMI de l'huile de tournesol après avoir subi le traitement thermo-oxydatif pourrait être due à leur synthèse à partir de l'acide linoléique, principal AG de cette huile. La fixation de l'oxygène, insufflé dans l'huile, sur les doubles liaisons de configuration *cis* aurait écourté la chaîne hydrocarbonée de quelques molécules de cet AGE.

Selon MARMESAT *et al.*, (2009), dans l'huile de tournesol classique riche en acide linoléique, c'est le groupement *linoleyl* des TAG qui est oxydé, alors que la perte de groupement *oleyl* était minime durant toute la période d'oxydation. Cependant, dans l'huile de

tournesol oléique, la diminution de l'acide oléique était semblable à celle enregistrée pour l'acide linoléique. Ces auteurs ont remarqué qu'après 154 heures de traitement thermique à 40°C et à l'obscurité, les pertes d'AG de l'huile initiale étaient de 0,8 et 10,1 g/100g pour les acides oléique et linoléique, respectivement, dans l'huile de tournesol, alors que les pertes dans l'huile de tournesol-oléique étaient de 0,8 et 0,8 g/100g.

Par ailleurs, *CRAPISTE et al.*, (1999) ont remarqué que la composition en AG des lipides apolaires (neutres) de l'huile de tournesol obtenue par pression a changé pendant le stockage à différentes températures. Une perte continue en AGI, en particulier l'acide linoléique, était plus prononcée à température élevée avec l'augmentation du niveau d'altération. Cette perte se traduit par une augmentation du rapport acide oléique / acide linoléique (O/L) ; ceci renseigne sur la sensibilité particulière de l'acide linoléique dans des réactions d'oxydation ; l'acide oléique, mono-insaturé, en semble plus résistant.

Le traitement thermo-oxydatif appliqué dans notre étude a induit une augmentation du rapport O/L ; celui-ci est de 0,576 dans l'huile fraîche, tandis que dans l'huile thermo-oxydée ce rapport est de 1,134. La force des liaisons carbones-hydrogènes dans les molécules d'AG justifient les différences de l'ampleur d'oxydation des acides stéarique, oléique, linoléique et α -linoléique pendant l'oxydation thermique (*MARQUEZ-RUIZ et DOBARGANES, 1996*).

Une réduction significative des niveaux d'acides oléique et linoléique a été rapportée pendant la thermo-oxydation d'huiles (*ROMERO et al.*, 1998) et pendant la friture (*CHOE et MIN, 2007*)

Il était observé que la progression de la friture a induit une perte progressive en acide linoléique (C18 : 2, ω 6) dans l'huile et que le rapport acide linoléique / acide palmitique (L/P) diminue (*FAUZIAH et al.*, 2000). La thermo-oxydation de l'huile de tournesol, utilisée dans notre étude, a provoqué une diminution du rapport L/P ; les valeurs enregistrées respectivement pour l'huile fraîche et thermo-oxydée sont de 9,469 à 4,281.

Les changements dans la composition en AG des huiles pendant la friture, en particulier la diminution du contenu en acide linoléique et du rapport acide linoléique / acide palmitique est considéré comme des indicateurs valides du niveau de détérioration (*ALEXANDRE et al.*, 1983 ; *THOMPSON et RAE, 1983*).

L'auto-oxydation des AG, à 20°C, est accrue dans des huiles hautement riches en AGPI, notamment dans celles où des rapports acide oléique / stéarique et acide linoléique / stéarique sont très élevés, soit 100:1 et 1200:1 respectivement (EVANS, 1997). Cette évolution a, également, été observée dans l'étude menée par CRAPISTE *et al.*, (1999) dans des huiles pressées et autres extraites puis stockées, séparément, à 47°C dans des flacons ouverts et couverts. En effet, après 35 jours de stockage, le rapport acide oléique / acide linoléique a augmenté de 0,31 à 0,34 dans l'huile pressée et de 0,26 à 0,31 dans l'huile extraite.

Dans son étude comparative, KOWALSKI, (2007) a enregistré des diminutions en AG de l'ordre de 11% et 15% après un chauffage de 72h et de 18% et 20% après 120h de chauffage par rapport aux concentrations initiales, respectivement pour l'huile d'olive et l'huile de tournesol. Cette perte, jugée légère, en AG totaux semble être due à la faible teneur en acide linoléique dans l'huile d'olive. Le contenu en cet AGE s'épuise donc rapidement suite à sa sensibilité à l'oxydation ; l'acide oléique, abondant dans cette huile monoinsaturée, est par contre moins aisément oxydé (COSGROVE *et* CHURCH, 1987 ; KONOPKA *et al.*, 2003). Ainsi, en raison de sa richesse en AGMI, l'huile d'olive est jugée légèrement meilleure pour son utilisation dans la cuisson que l'huile de tournesol, abondante en AGPI.

II. Analyse par la chromatographie en phase gazeuse des lipides tissulaires

Le foie joue un rôle crucial dans le contrôle des AG et le métabolisme des TAG par la synthèse, le stockage, la sécrétion et l'oxydation des AGL. Environ 60 et 80% des lipides hépatiques ont pour origine les AGL du tissu adipeux transportés dans le plasma (DONNELLY *et al.*, 2005).

L'huile oxydée alimentaire peut représenter une source directe du stress oxydant pour l'organisme vivant. Les membranes biologiques adaptent leur composition selon celle de la MG alimentaire (YAMAOKA *et al.*, 1988 ; CHARNOCK *et al.*, 1992 ; QUILLES *et al.*, 2002). Les AG alimentaires peuvent influencer la susceptibilité des cellules au stress oxydant à travers des changements de la composition en AG de leurs membranes (NAKBI *et al.*, 2010).

A la vue des résultats obtenus, il semble que le traitement thermo-oxydatif appliqué à l'huile eut induit des modifications de la composition en AG des tissus analysés. Il ressort de l'analyse des chromatogrammes lipidiques des tissus analysés (foie, intestins et tissu adipeux) une diminution de la teneur en acide linoléique des lipides extraits de rats recevant de l'huile de tournesol thermo-oxydée comparée aux rats du lot témoin (Tableaux V et VI).

Tableau V. Composition en acides gras (% d'AG totaux) des lipides neutres extraits de foies et de tissus adipeux de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche (TF) ou à l'huile de tournesol thermo-oxydée (TOx)

Acide gras	Tissu adipeux			Foie		
	TF	TOx	p	TF	TOx	p
C10 : 0	0,80±0,17	ND	-	0,25±0,07	ND	-
C12 : 0	0,16±0,08	0,22±0,14	0,4430	ND	0,20±0,00	-
C14 : 0	1,74±1,06	2,13±1,29	0,6176	1,44±0,13	2,18±0,31	0,0002
C15 : 0	ND	0,11±0,10	-	ND	0,17±0,00	-
C16 : 0	27,57±1,93	30,11±1,24	0,0355	25,05±1,20	30,52±0,87	0,0000
C16 : 1, ω9	0,82±0,26	0,81±0,25	0,9068	0,87±0,10	0,89±0,56	0,7707
C16 : 1, ω7	6,20±0,84	7,75±1,11	0,0389	4,70±2,38	7,26±0,10	0,0564
C18 : 0	6,43±0,42	5,41±1,20	0,1129	11,27±0,97	5,68±0,82	0,0000
C18 : 1, ω9	48,40±2,12	46,72±1,73	0,2057	40,91±1,38	47,77±0,60	0,0000
C18 : 1, ω7	2,83±0,19	3,50±0,96	0,1684	2,87±0,64	3,16±0,02	0,3636
C18 : 2, ω6	4,98±1,33	2,27±0,48	0,0026	7,44±1,48	0,99±0,00	0,0000
C18 : 3, ω3	ND	ND	-	0,26±0,11	ND	-
C20 : 0	0,10±0,10	0,10±0,01	0,8610	ND	ND	-
C20 : 1, ω9	0,16±0,15	0,55±0,19	0,0079	0,14±0,07	0,99±0,04	0,0000
C20 : 4, ω6	0,25±0,05	ND	-	4,09±0,86	ND	-
C20 : 3, ω3	ND	ND	-	ND	ND	-
C20 : 5, ω3	ND	ND	-	0,19±0,04	ND	-
C22 : 0	ND	ND	-	ND	ND	-
C22 : 4, ω6	ND	ND	-	ND	ND	-
ΣAGS	36,20±2,67	38,15±3,08	0,5004	38,22±0,66	38,83±0,67	0,1380
ΣAGMI	58,41±2,22	59,33±3,28	0,6262	49,63±2,44	60,08±0,02	0,0000
ΣAGPI	5,41±1,33	2,55±0,48	0,0017	12,59±2,26	1,09±0,00	0,0000

Valeurs, moyenne ± standard déviation de cinq déterminations

Tableau VI : Profils en acides gras des lipides intestinaux

Teneurs en AG intestinaux (% des acides gras totaux)			
Rats nourris à l'huile de tournesol :			
	fraîche	thermo-oxydée	p
C10 : 0	0,190±0,034	0,120±0,109	0,210
C12 : 0	ND	0,130±0,075	-
C14 : 0	1,380±0,192	1,260±0,347	0,518
C15 : 0	0,162±0,079	0,120±0,025	0,293
C16 : 0	24,770±1,054	27,000±1,224	0,014
C16 : 1, ω9	0,662±0,089	0,622±0,114	0,556
C16 : 1, ω7	4,080±1,583	6,260±1,350	0,047
C18 : 0	11,180±1,382	8,480±0,742	0,004
C18 : 1, ω9	35,840±2,761	42,590±0,538	0,000
C18 : 1, ω7	2,560±0,364	2,550±0,570	0,974
C18 : 2, ω6	6,590±1,192	5,600±1,111	0,211
C18 : 3, ω3	ND	ND	-
C20 : 0	0,494±0,417	ND	-
C20 : 1, ω9	0,420±0,329	ND	-
C20 : 3, ω6	0,408±0,437	ND	-
C20 : 4, ω6	3,770±0,888	2,668±0,581	0,048
C20 : 3, ω3	6,710±0,270	2,480±1,573	0,000
C20 : 5, ω3	ND	ND	-
C22 : 0	0,320±0,376	ND	-
C22 : 1, ω9	0,130±0,115	ND	-
C22 : 4, ω6	0,320±0,238	ND	-
ΣAGS	38,496±0,673	37,110±1,384	0,078
ΣAGMI	43,692±1,961	52,022±1,270	0,000
ΣAGPI	17,820±1,623	10,748±2,203	0,000

Valeurs, une moyenne ± standard de déviation de cinq déterminations

La faible teneur des lipides tissulaires en acide linoléique est due, en partie, à la perte excessive en cet AGPI dans l'huile thermo-oxydée incorporée dans le régime des rats « tests » dans laquelle on a enregistré une perte de 32% par rapport à l'huile fraîche.

En effet, il a été admis que la proportion d'acide linoléique dans les tissus augmente de façon linéaire à mesure que l'apport alimentaire augmente (WOOD, 1984). TEYE *et al.* (2006_a ; 2006_b) ont montré que le C18: 2, ω6 du tissu adipeux est entièrement dérivé du régime alimentaire. À l'inverse, le C16 :0 et C18 :0 et les AGMI sont essentiellement des produits de synthèse endogène.

Par ailleurs, il semble que, cet AGE apporté en grande quantité par les concentrés d'aliments (céréales et oléagineux), se dégrade en AGMI et AGS dans le rumen chez les ruminants par bio-hydrogénation microbienne et seule une faible proportion, environ 10%, est incorporée dans les tissus lipidiques. Chez les ovins et les bovins, cet AGE se concentre plus dans le muscle que dans le tissu adipeux (WOOD *et al.*, 2008).

Une constatation similaire à celle relative à l'acide linoléique, a été faite pour l'acide arachidonique, produit terminal du métabolisme de C18: 2, ω6. La conversion de l'acide linoléique en ses dérivés supérieurs, tels que l'acide arachidonique dans l'organisme vivant nécessite la présence de deux types d'enzymes, deux désaturases (Δ6 et Δ5) et une élongase (WOODS and FEARON, 2009). Il semble que les produits d'oxydation et les isomères de l'acide linoléique interfèrent avec le métabolisme de cet AGE en inhibant l'activité de la Δ6-désaturase, notamment (PRIVET *et al.*, 1967).

Comme les AG oxydés peuvent être absorbés et incorporés, une consommation accrue d'huiles oxydées peut altérer la composition lipidique des tissus. L'incorporation d'huile de tournesol thermo-oxydée dans le régime pour rats (à 15%) pendant 45 jours, a augmenté considérablement les concentrations de 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, et 18:2 dans les phospholipides hépatiques, tandis que le taux de 20:4 a diminué significativement (KODE *et al.*, 2005).

Nos résultats ont confirmé ceux obtenus par EDER *et STANGL* (1999). Ces auteurs ont montré que l'ingestion d'un mélange d'huile de carthame et de saindoux thermo-oxydées a induit une diminution des rapports C20 :4, ω6 / C18 :2, ω6 et C20 :4, ω6 / C20 :3, ω6 dans les phospholipides du foie de rats. Ils ont justifié ce résultat par une réduction de la désaturation de l'acide linoléique par les Δ4, 5 et 6-désaturases. Par ailleurs, ils ont remarqué une diminution du rapport entre les AGMI totaux et les AGS totaux des lipides hépatiques ; ils ont attribué ces résultats à une réduction de l'activité de la Δ9-désaturase.

L'altération oxydative des lipides alimentaires et tissulaires adopte un même modèle à trois étapes séquentielles : initiation, propagation et arrêt. Le métabolisme des AG et des lipides est perturbé suite à l'ingestion de lipides oxydés chez le rat ; on en cite d'une part une inhibition de la désaturation de l'acide linoléique et de l'acide α -linoléique par la $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ -, et $\Delta 6$ -désaturases dans les microsomes et une diminution du rapport AGMI / AGS dans le foie suite à une chute de l'activité de la $\Delta 9$ -désaturase (*EDER et STANGL, 1999*).

L'autre fait marquant de notre étude est la désaturation de l'acide palmitique en C16:1, $\omega 7$ et C16:1, $\omega 9$ dans la matrice tissulaire des rats recevant l'huile de tournesol thermo-oxydée ; cette constatation a, également, été faite par *RUIZ- GUTIERREZ et MURRIANA (1992)*. Ces auteurs suggèrent que les huiles alimentaires chauffées altèrent l'activité des désaturases dans les microsomes hépatiques de rat avec un changement concomitant dans la composition en AG des membranes. Ils ont remarqué une activation de la conversion de C16:0 en C16:1 suite à l'activation de la $\Delta 9$ -désaturase et une diminution de la conversion de l'acide linoléique en acide arachidonique suite à l'inhibition de la $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -désaturases dans les microsomes du foie.

Nos résultats confirment, également, ceux obtenus par ces *auteurs*. Ceux-ci ont montré que l'administration d'huile de tournesol thermo-oxydée aux rats a modifié la composition en AG de foie ; l'analyse des profils en AG a montré une augmentation significative de la concentration en C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 et C18:2, et une importante diminution de la concentration en C20:4.

Par ailleurs, des études récentes suggèrent de multiples mécanismes pouvant associer des AG *trans* aux CVD (*ASCHERIO, 2002*) : les AG *trans* influencent l'équilibre des prostaglandines ; ces hormones favorisent, à leur tour, la thrombogénèse (*KINSELLA et al., 1981*) et empêchent la conversion de l'acide linoléique en acide arachidonique et autres AGPI $\omega 6$. Ainsi, le métabolisme des AGE est perturbé, ce qui modifie la composition en AG des phospholipides de l'aorte (*KUMMEROW et al., 2004*).

Ainsi, l'insaturation globale des lipides tissulaires a diminué sensiblement chez les rats soumis au régime à base d'huile thermo-oxydée. Cette variation dans les proportions d'AGPI est un marqueur de l'oxydation des lipides de ces tissus (*MANIAK et al. 2009*). Les AGPI à longue chaîne sont oxydés prioritairement. Les proportions d'AGMI et d'AGS sont statistiquement identiques ($p > 0,05$) dans les tissus excepté pour le foie où la proportion des AGMI totaux est statistiquement plus élevée ($p = 0,000$) chez les rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée.

En effet, l'analyse des chromatogrammes des lipides hépatiques de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée a montré une diminution de la teneur en acide stéarique et une augmentation de celle de l'acide oléique par rapport aux lipides extraits des rats nourris à l'huile de tournesol fraîche sans pour autant augmenter l'insaturation globale des lipides tissulaires. *DE GOMEZ DUMM et BRENNER, (1975)* ont montré que les microsomes du foie de l'homme sont capables de désaturer l'acide stéarique en acide oléique selon le même mécanisme décrit chez le rat ; néanmoins, cette activité de désaturation est moins prononcée comparée aux autres mammifères.

De plus, nos résultats corroborent ceux obtenus par *MORGADO et al. (2000)* ; ces derniers ont étudié l'effet de l'ingestion de l'huile de poisson hydrogénée sur le profil en AG de divers tissus de rat. Il a été admis que l'acide oléique (18:1 *9cis*) prédomine dans les lipides neutres de la viande ovine et bovine ; cet AGMI est formé à partir de l'acide stéarique (C18:0) grâce à la stéaroyl Co-A désaturase, l'enzyme lipogénique majeure ; cette enzyme intervient, également, dans la conversion de l'acide linoléique en CLA dans le tissu adipeux des ruminants (*WOOD et al., 2008*).

Par ailleurs, il ressort clairement des chromatogrammes lipidiques, une « carence » des lipides des tissus adipeux en AGPI par rapport aux lipides hépatiques et intestinaux. Ceci pourrait être dû au fait que dans le tissu adipeux, les TAG ou lipides neutres prédominent (> 90%), tandis que dans le muscle cardiaque existe une proportion significative de phospholipides contenant des AGPI ; ceux-ci jouent un rôle de constituant de la membrane cellulaire (*WOOD et al., 2008*).

La peroxydation des lipides est un processus de la dégradation oxydative des AGPI ; le déroulement de ce processus dans des membranes biologiques cause la modification de leur fonction, l'altération de son intégrité structurale, la diminution de sa fluidité et l'inactivation de plusieurs enzymes y attachées (*GUTTERIDGE et HALLIWEL, 2000*). La diffusion des AG *trans* dans les membranes cellulaires réduit sa fluidité et altère leur fonctionnement normal. Ceci favorise davantage la production d'espèces réactives de l'oxygène justifiant ainsi l'augmentation de la peroxydation des lipides hépatiques de rats alimentés avec le régime apportant des AG *trans* (*DHIBI et al., 2011*).

III. Analyse macroscopique et microscopique des tissus d'organes

Il a été rapporté que lorsque les mécanismes antioxydants de la cellule sont débordés (*over whelmed*), le stress oxydant s'installe (*BROWNING et HORTON, 2004 ; VIDELA et al., 2004*). Ainsi, l'accumulation des produits de peroxydation de l'acide linoléique pourrait être à l'origine des modifications histologiques observées sur des échantillons de tissus d'organes analysés dans cette étude, à savoir le foie, les intestins et la MG entourant l'intestin grêle.

GARIBAGAOGLU et al., (2007) ont montré, lors de l'administration d'huile de tournesol chauffée à des rats, une toxicité hépatique par la dégénérescence des lipides cellulaires, l'occlusion des veines et une nécrose tissulaire. Cette toxicité se traduit généralement par une hypertrophie de foie. En outre, l'oxydation non contrôlée des lipides dans les systèmes biologiques aboutit à de nombreux types de lésions cellulaires. Dans les membranes, l'oxydation des lipides et la réaction des produits d'oxydation avec les autres constituants membranaires altèrent certaines fonctions biologiques cruciales, telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'activité de récepteurs et d'enzymes (*LAGUERRE et al., 2007*).

L'analyse macroscopique des échantillons d'organes prélevés de rats nourris au régime supplémenté avec l'huile de tournesol thermo-oxydée (état d'altération avancé) révèle, effectivement, une augmentation de leurs épaisseurs par rapport aux échantillons prélevés à partir de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche (*Tableau VII*). *EDER et STANGL (1999)* ont remarqué une augmentation même légère du poids du foie, une diminution de la concentration de tocophérols dans le foie et le plasma, chez les rats ayant ingéré un mélange d'huiles de carthame et de saindoux thermo-oxydées.

De plus, la présence significative (2,6%) des produits secondaires d'oxydation administrés par voie orale (polymères, composés riches en endoperoxydes et composés de faibles poids moléculaire), révélés par l'élévation du taux de TBARS, et l'hypertrophie même légère du foie indiquent l'absorption et le dépôt des produits secondaires d'hydroperoxydes linoléique dans des organes éloignés (*CHOW, 2008*).

Ainsi, la consommation de l'huile de tournesol thermo-oxydée aurait induit une augmentation de volumes des échantillons d'organes analysés. Cette comparaison « macroscopique » nous a permis d'effectuer des observations intéressantes sur la structure tissulaire des organes étudiés par la microscopie optique.

Tableau VII : Résultats de l'analyse macroscopique des échantillons d'organes analysés

Longueur × largeur des échantillons d'organes de rats nourris à l'huile de tournesol :		
Organes	fraîche	thermo-oxydée
Tissu adipeux	2,5 × 1cm	1,5 × 0,7cm
Foie	3cm × 1cm	1,5cm × 1,5cm
Intestins	2cm × 0,4cm (couleur blanche, paroi plus fine)	3cm × 0,5cm (paroi plus épaisse, fibreuse)

Une vue d'ensemble des photos obtenues (*figures 10-18*) montre que le foie de rat blanc présente des lobules nettement individualisés. Chaque lobule de forme polyédrique est entouré par une cloison conjonctive. Chez les rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée, cette atmosphère conjonctive est plus épaisse. Ces lobules sont, également, d'une couleur foncée par rapport à ceux des rats nourris à l'huile de tournesol fraîche. La réaction des produits de peroxydation de l'acide linoléique avec le colorant utilisé lors de la préparation des lames pourrait être à l'origine de cette coloration foncée du tissu hépatique.

Par ailleurs, l'observation des micrographies montre une augmentation du volume des lobules hépatiques des rats « tests » ; les septums de tissu conjonctif inter-lobulaires, ont augmenté de volume ; les hépatocytes, agencés en travées dans les lobules hépatiques, sont séparés entre elles par une membrane très fine. Enfin, les noyaux des hépatocytes, se trouvant au centre de la cellule, sont d'un diamètre plus élevé et ont un nucléole bien visible.

Une étude similaire à la notre a été effectuée par *BITAM (2005)*. Les rats nourris à un régime supplémenté à 10% par l'huile de tournesol thermo-oxydée ont accusé un retard de croissance de 23%. Par ailleurs, l'indice hépatosomatique a augmenté ce qui témoigne de l'hypertrophie du foie de ces rats « tests ». Les coupes histologiques réalisées ont montré des cellules avec des adénocarcinomes, signe de toxicité due à l'ingestion de l'huile de tournesol thermo-oxydée. Par ailleurs, *AMMOUCHE et al., (2002)* ont remarqué que l'ingestion de cette huile a induit une accumulation de substances réactives (TBARS) dans le foie de ces rats, signe de la toxicité de cette huile thermo-oxydée. De plus, l'incorporation de la vitamine E dans le régime ne permet pas, à elle-seule, d'assurer la protection de l'organisme contre les effets néfastes des radicaux libres.

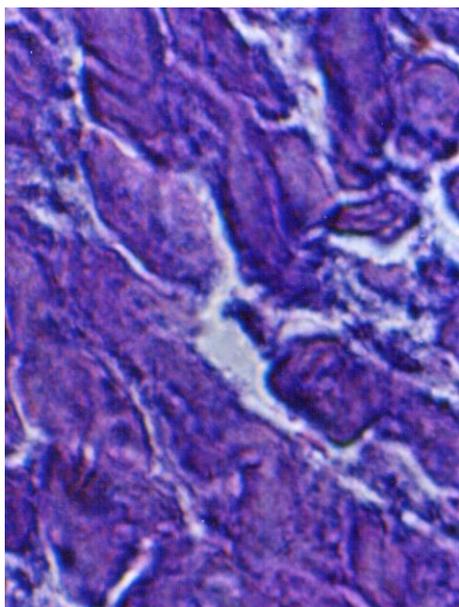


Figure 10: Micrographie du foie de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche (x 1000)

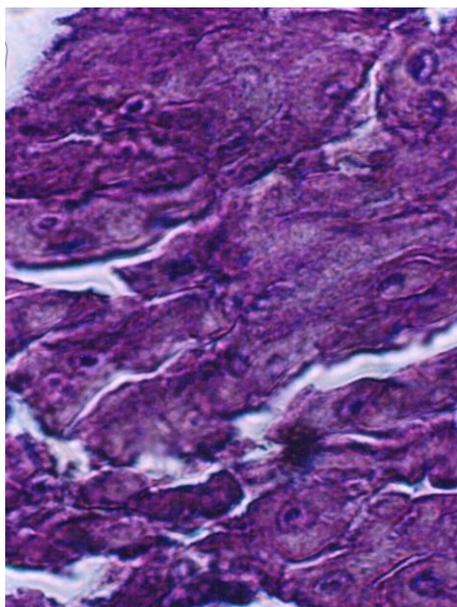


Figure 11: Micrographie de foie de rats ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée (x 1000)

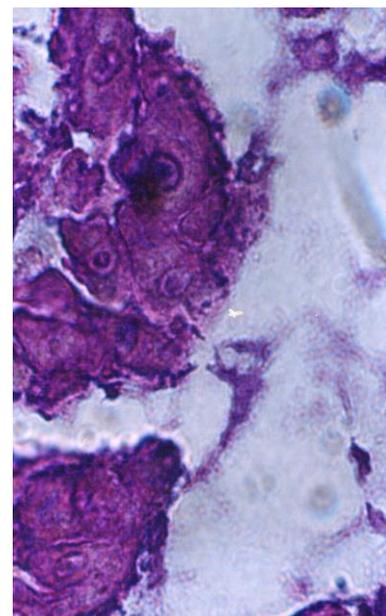


Figure 12: Mirographie d'hépatocytes de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée (x 1000)

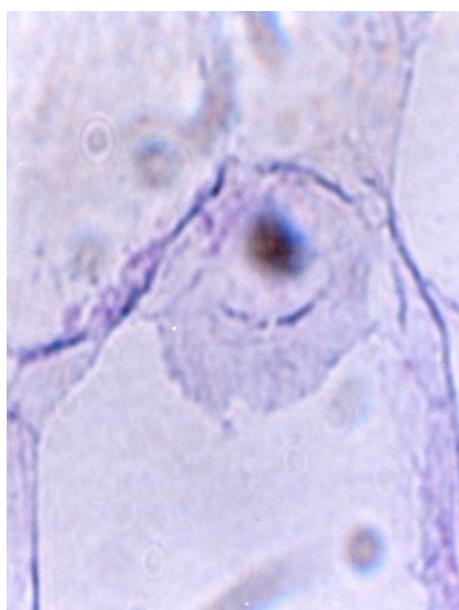


Figure 13: Micrographie d'un adipocyte montrant un noyau périphérique chez le rat ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée (x 1000)

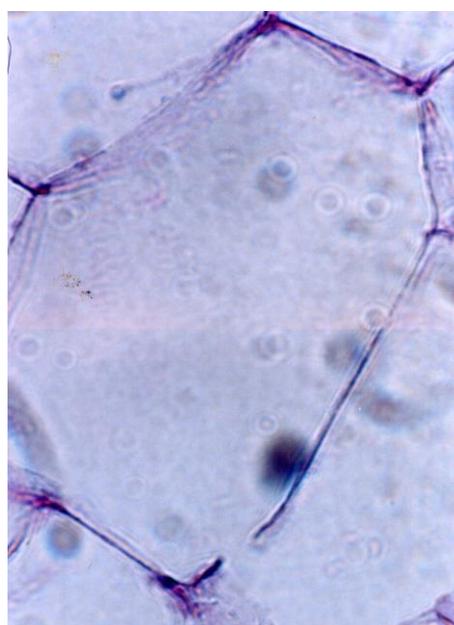


Figure 14: Micrographie montrant la rupture de la membrane d'un adipocyte chez le rat nourri à l'huile thermo-oxydée (x 1000)

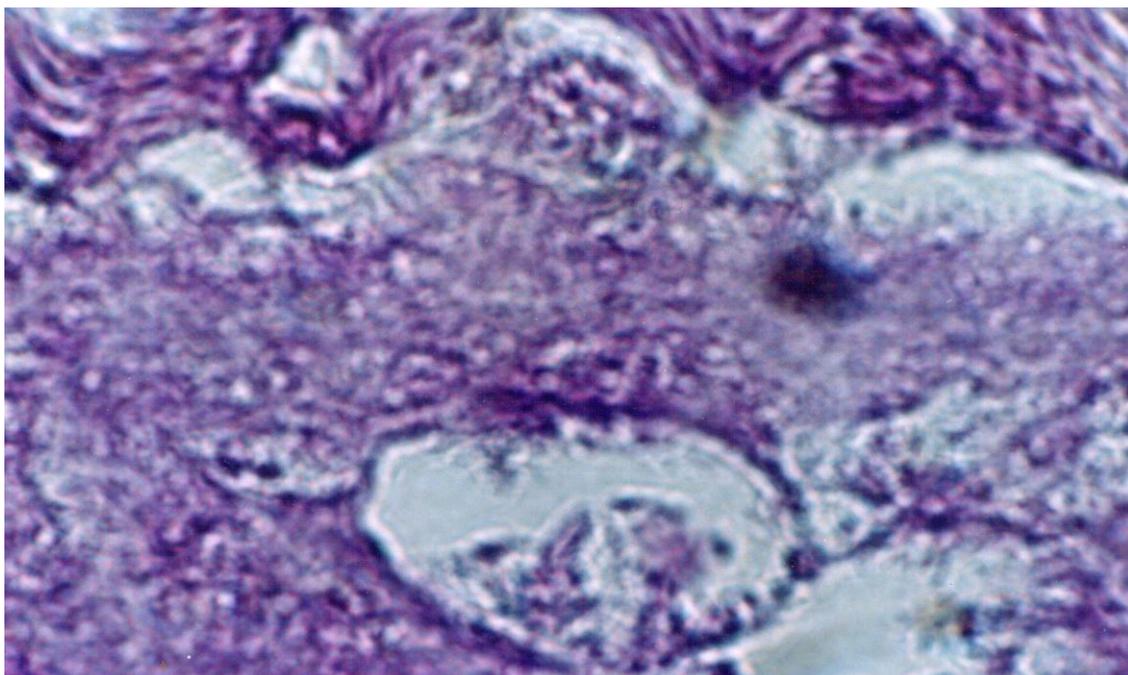


Figure 15: Photomicrographie du tissu intestinal de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche (x 1000)

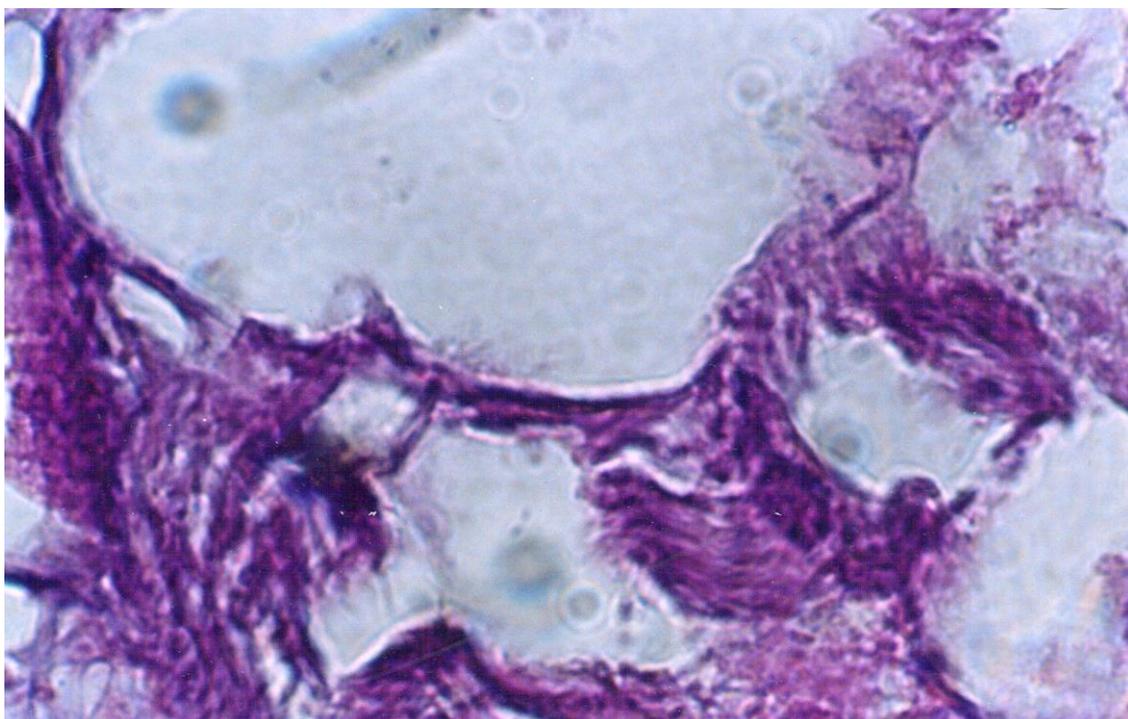


Figure 16 : Photomicrographie du tissu intestinal de rats ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée (x 1000)

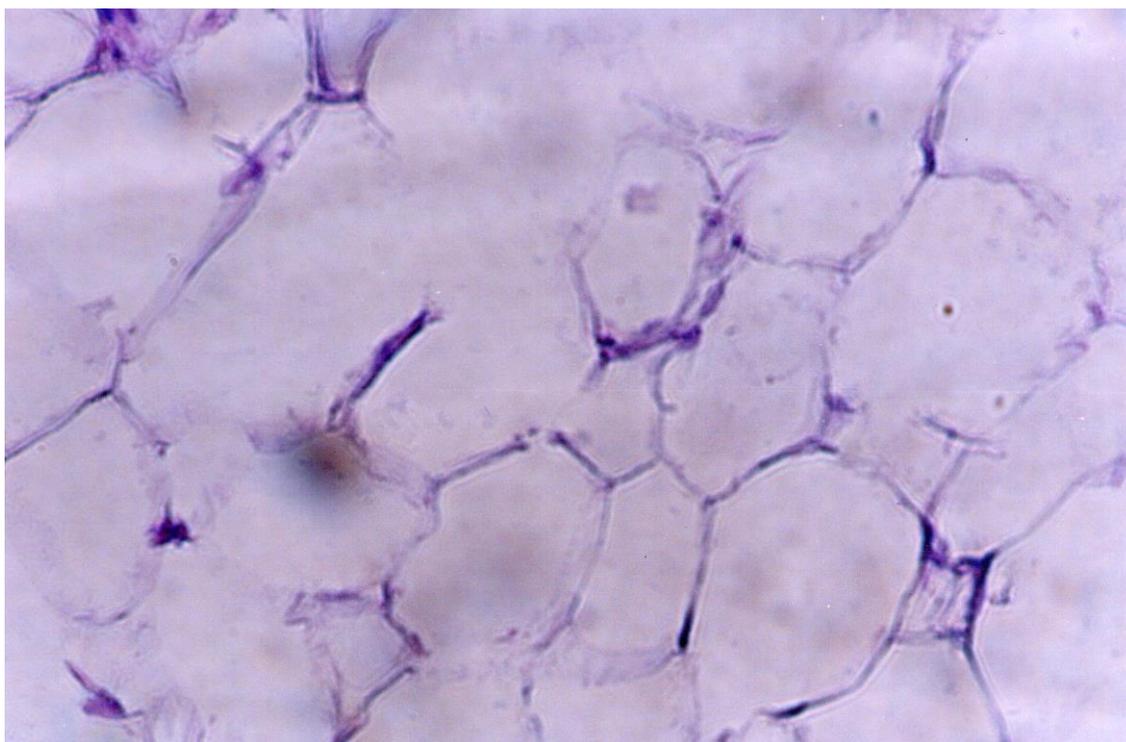


Figure 17: Photomicrographie du tissu adipeux de rats nourris à l'huile de tournesol fraîche (x 400)

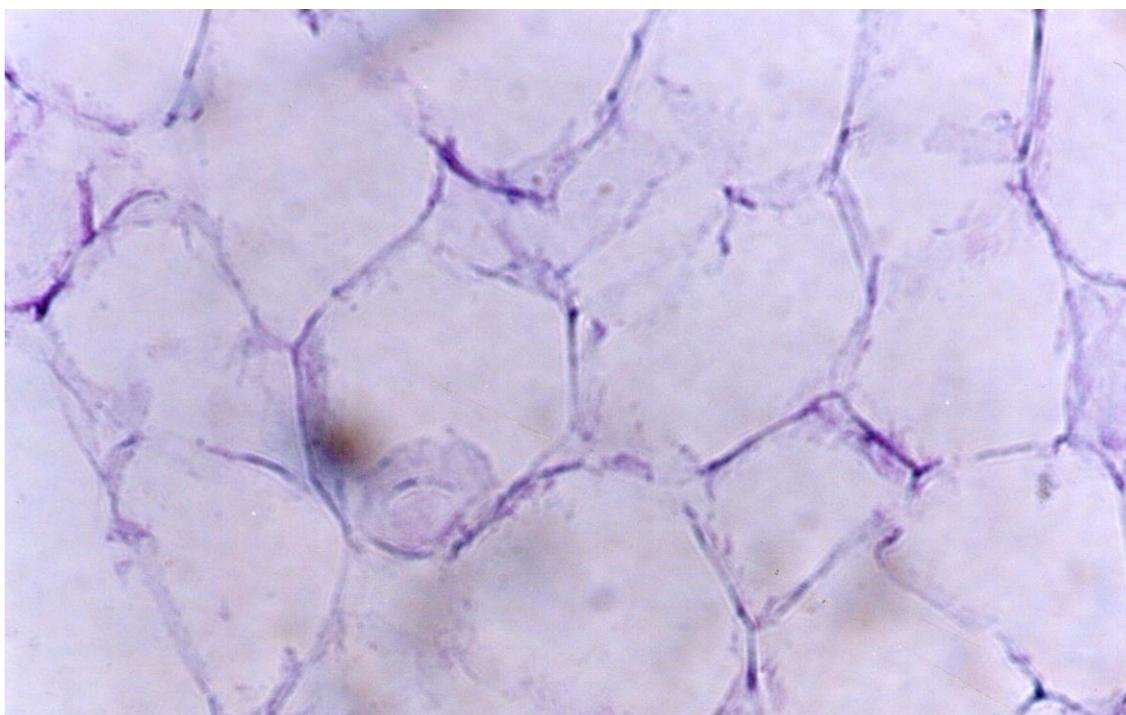


Figure 18: Photomicrographie montrant des adipocytes hypertrophiés chez le rat ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée (x 400)

Dans leur étude sur les effets des AG sur les paramètres sériques, compositions en AG des œufs et la viande ainsi que les changements morphologiques du foie chez le canard, *LIU et al.*, (2011) ont mis en évidence une hypertrophie des hépatocytes et de leurs noyaux chez les canards nourris au régime supplémenté avec le mélange huile de palme et suif du bœuf ; ces noyaux, de forme irrégulière, ont migré à la périphérie de la cellule. Ces auteurs attribuent la migration périphérique du noyau ainsi que la formation de grosses gouttelettes lipidiques visibles dans le cytoplasme au phénomène d'adaptation du foie au régime hyperlipidique.

Ces auteurs ont souligné une forte accumulation de MDA, produit d'oxydation des lipides, dans le sérum des canards nourris au régime palme et suif du bœuf par rapport aux autres régimes. Ainsi, selon ces auteurs, l'altération du foie de ces canards pourrait être due à la peroxydation des lipides sanguins. Cependant, les foies de canard nourris au régime additionné d'huile de tournesol montrent les mêmes caractéristiques histologiques que ceux de sujets nourris au régime témoin ; les hépatocytes recèlent un noyau large, volumineux, sphérique en position central avec un nucléole visible (*nucleoli proéminent*).

Dans leur étude sur les effets des régimes hyperlipidiques à différents taux d'AG *trans* sur le stress oxydant et le dysfonctionnement du foie de rat, *DHIBI et al.*, (2011) ont montré que l'ingestion du régime à base d'huile de soja oxydée, pendant quatre semaines, a induit une forte hypertrophie des hépatocytes de foie de rats, un dépôt de lipides et une infiltration de nombreuses cellules inflammatoires dans le foie, ainsi que d'autres anomalies dans les hépatocytes comme leur gonflement et « vidange » de leur cytoplasme (milieu cellulaire vide) montrant une nécrose de ces cellules.

Quand l'hépatocyte se blesse, le fonctionnement de la membrane plasmique est perturbé ; le liquide enzymatique est susceptible de diffuser vers le milieu extracellulaire et par conséquent des enzymes peuvent être détectées à des niveaux anormaux dans le sérum (*ROBBINS, 1974*). Des études antérieures ont montré que les MG *trans* affectent le métabolisme des lipides selon plusieurs voies. In vitro, les AG *trans* altèrent la sécrétion, la composition des lipides et modifient la taille de l'apolipoprotéine B100 (apoB100) produites par les cellules hépatiques (*DASHTI et al.*, 2002 ; *MITMESSER et CARR, 2005*).

Ainsi, le foie ne peut pas synthétiser l'apolipoprotéine nécessaire permettant l'extraction et l'évacuation de la MG de cet organe. Par conséquent, les TG s'accumulent dans le foie (BRODY, 1994). Comme rapporté par MENSINK *et al.*, (2003), les MG *trans* augmentent les niveaux de TG dans le sang comparativement à la consommation d'autres MG. Dans cette étude, des niveaux de TG les plus élevés sont enregistrés chez les rats ayant consommé le régime hyperlipidique, suivis de ceux du lot « huile de soja oxydée » et enfin du lot « huile de soja fraîche » (DHIBI *et al.*, (2011).

L'analyse des « photos » de l'intestin montre, également, une augmentation de volume des entérocytes des rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée. Par ailleurs, les cellules présentent des noyaux de volume enflé, en situation basale ; leur cytoplasme est clair. Entre ces cellules sont répartis de larges faisceaux de fibres collagènes très denses par rapport aux tissus prélevés de rat nourris à l'huile de tournesol fraîche.

Comme pour le foie et les entérocytes, les cellules adipeuses de forme hexagonale des rats recevant l'huile thermo-oxydée ont augmenté de volume ; leurs noyaux en situation basale a, également, augmenté de volume suite à l'ingestion de l'huile de tournesol thermo-oxydée ayant atteint un stade d'altération avancé. Ces observations ont, également, été faites par LEMONNIER (1975) dans le cas de l'obésité nutritionnelle de la souris. Par ailleurs, CASTELL *et al.*, (1972) ; TAKENCHI *et* WATANABE, (1982), ont observé une hypertrophie de foie (pâle) chez certains jeunes poissons consommant des régimes pauvres en AGE.

L'autre anomalie révélée dans les adipocytes de rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée est la rupture de la membrane cytoplasmique de ces cellules (*figure 14*). Il a été admis que la peroxydation des phospholipides des lipides pariétaux provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète.

Ces différentes anomalies dans les tissus de rat nourris à l'huile de tournesol rance confirment les résultats obtenus par d'autres auteurs sur d'autres organes d'animaux de laboratoire soumis à des tests de toxicité, on cite les travaux de TEBOURBI *et al.*, (2006) ; ALIGON *et al.*, (2010) sur la toxicité des pesticides. En effet, le noyau est considéré comme la structure la plus importante de la cellule ; c'est le centre de contrôle de l'activité de la cellule.

Compte tenu des résultats des différents auteurs, on suggère que les produits de l'altération thermo-oxydative de l'huile de tournesol thermo-oxydée (radicaux libres, peroxydes, hydroperoxydes, aldéhydes et cétones) et/ou la perte en acide linoléique seraient à l'origine de l'augmentation du volume des tissus analysés. L'accumulation de ces produits primaires et secondaires d'oxydation de l'acide linoléique de l'huile de tournesol a fait réagir la cellule, comme dans le cas de la manifestation du goitre endémique.

Cependant, l'étude menée par *MESEMBE et al.*, (2004) a montré que le volume des cellules sanguines (globules rouges et globules blancs) de rat nourris à l'huile de palme thermo-oxydée était significativement inférieur à celui des cellules de rat nourris à l'huile de palme fraîche.

Par ailleurs, ces auteurs ont montré que l'ingestion d'huile de palme thermo-oxydée par des rats a induit des variations des paramètres physiologiques, comme l'hématocrite, l'hémoglobine, le nombre de globules rouges et de globules blancs. La diminution significative du nombre de globules rouges chez des rats nourris à l'huile thermo-oxydée peut être due à l'effet délétère (suppressive) des constituants toxiques générés lors de l'oxydation de l'huile de palme sur *the bone marrow*. Les résultats de ces auteurs ont confirmé ceux obtenus par *O'SARA et al.*, (1979), *FRANKEL* (1980) et *MEREDITH* (1984).

Ces auteurs ont rapporté que les radicaux libres d'oxygène et les *esters* dihydroxy produits et accumulés dans les huiles oxydées ingérées causent des dommages aux cellules, aux tissus et aux organes. Ainsi, l'hypertrophie des cellules hépatiques et adipeuses observée dans notre étude chez les rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée pourrait être due à ces molécules actives. Ces constituants auraient, selon ces auteurs, entravé le processus de croissance et différenciation dans la moelle osseuse.

La faible concentration en hémoglobine chez les rats du lot oxydé comparée à celle des rats nourris avec l'huile de palme fraîche peut, également, être la conséquence de la faible assimilation du fer au niveau de la muqueuse intestinale endommagée réduisant ainsi la disponibilité biologique de fer dans le système. *IGIRI et al.*, (1994) ont, en effet, montré que la muqueuse intestinale des rats a été sévèrement endommagée par une consommation chronique d'un régime supplémenté par l'huile de palme thermo-oxydée. La diminution de la concentration en hémoglobine peut, aussi, être attribuée au faible stockage de fer dans le foie altéré par ce régime. Le foie stocke le fer sous forme de *ferritine* et *hémosydérine* (*FINLAYSON et al.*, 1999).

En outre, l'arrêt de la production d'érythropoïétine (*erythropoietin*) peut, également, causer la diminution du nombre de globules rouges chez les rats du lot expérimental. Le rein est la source principale de l'érythropoïétine celle-ci est produite par les cellules peritubulaires (*peritubular cells*) interstitielles (DAVIDSON *et al.*, 1999). OSIM *et al.*, (1994) ont montré que le régime huile de palme thermo-oxydée endommage le tissu rénal, comme l'atrophie partielle du tubulaire. En fait, les patients présentant le dysfonctionnement rénal sont anémiques à cause de l'arrêt de la production d'érythropoïétine (EDELSTEIN *et al.*, 1997).

L'augmentation du nombre de globules blancs chez des rats du lot palme thermo-oxydée constitue, selon ces auteurs, une réponse physiologique normale après introduction d'un corps étranger dans l'organisme vivant. OSIM *et al.*, (1994) ont signalé des dommages de foie après consommation de l'huile de palme thermo-oxydée. Ainsi, l'atteinte des cellules hépatiques pourrait expliquer cette augmentation des globules blancs. En effet, FINLAYSON *et al.*, (1999) ont rapporté que la leucocytosis pourrait se produire suite à des dommages hépatiques.

Pour leur part, OSIM *et al.*, (1994) ont observé une congestion des sinusoides hépatiques et des changements dégénératifs des lobules hépatiques chez des rats nourris chroniquement avec l'huile de palme thermo-oxydée. Dans le foie endommagé, la quantité de fer stockée est épuisée, ce qui a induit des taux d'hémoglobines inférieurs. La diminution du volume des cellules, la diminution des taux de globules rouges et la faible concentration en hémoglobine observés chez les rats alimentés en huile thermo-oxydée indiquent que les rats étaient anémiques.

MESEMBE *et al.*, (2004) ont estimé que si les résultats obtenus dans leur étude s'appliquent s'appliqueraient chez l'homme, qu'il y ait aurait raison de s'inquiéter sur les conséquences hématologiques défavorables observés suite à une consommation chronique de l'huile de palme thermo-oxydée. La consommation de cette huile de façon prolongée peut être dangereuse pour la santé puisqu'elle peut avoir pour conséquence l'anémie et la leucocytose. Ainsi, il est déconseillé de consommer et de façon chronique l'huile de palme thermo-oxydée.

Cette recommandation a, également, été faite par d'autres auteurs ; ceux-ci estiment que la consommation de beaucoup d'aliments frits n'est pas recommandée, quelque soit l'huile ou la MG utilisée en friture. Ces auteurs conseillent d'utiliser, en friture, la plus petite quantité possible d'huile adaptée.

Par ailleurs, *DHIBI et al.*, (2011) ont observé des altérations histologiques dans le foie de rats nourris au régime hautement riche en MG. Comme rapporté précédemment par *SAMUHASANEETO et al.*, (2007), le régime hyperlipidique (100% MG) a causé la mobilisation des AGL du tissu adipeux vers les hépatocytes. Ces anomalies sont, selon *DHIBI et al.*, (2011), le résultat de l'augmentation de la peroxydation des lipides hépatiques et de la diminution des activités enzymatiques anti-oxydantes hépatiques, telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Dans le plasma, par contre, ces auteurs ont enregistré des niveaux de peroxydation de lipides plus élevés et une concentration en antioxydants inférieure par rapport aux rats ayant ingéré le régime « huile de soja fraîche ».

Selon *DHIBI et al.*, (2011), il semble exister une relation hautement étroite entre la consommation d'AG *trans*, générés et accumulés dans les huiles oxydées, la peroxydation des lipides et l'affection hépatique grasse non alcoolique (NAFLD). L'ampleur de la peroxydation, dans le foie, était également différente et dépend de la nature (source) de la MG ; la consommation de la margarine apportant un taux élevé d'AG *trans* (1% et 2% de la MG totale) peut constituer une source du stress oxydant pour l'organisme. Ces auteurs ont mis en évidence l'effet direct des AG *trans* sur le dysfonctionnement de foie et dans la survenue de la NAFLD et/ou la progression de la maladie. Les AG *trans* peuvent influencer les facteurs de risque de la CVD. Dans le foie, la réponse inflammatoire la plus élevée a été induite par ce régime hyperlipidique. L'histopathologie du foie des rats du lot « huile de soja oxydée » et du lot « riche en MG » a montré respectivement des états de vacuolisation du cytoplasme allant de modéré à grave, une hypertrophie des hépatocytes de forme arrondie et une nécro-inflammation.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Notre étude s'est assignée deux objectifs ; le premier en a trait à l'évaluation du traitement thermo-oxydatif sur la qualité de l'huile de tournesol ; cette huile, largement utilisée en cuisson et friture, a été soumise à une température, jugée modérée ($99 \pm 2^\circ\text{C}$) avec une insufflation d'air à un débit de 9 litres / seconde pendant une période de 52 heures, en continue ; ce temps correspond à la période où un maximum de molécules d'oxygène se fixe sur les acides gras insaturés pour former des peroxydes.

La température appliquée dans notre étude a permis une forte accumulation de ces produits primaires d'oxydation en témoigne la valeur significativement très élevée de l'indice de peroxyde enregistrée par l'huile de tournesol thermo-oxydée. Cette méthode est très largement utilisée pour déterminer l'oxydation lipidique. L'oxygène se fixe par addition sur l'atome de carbone α du système des doubles liaisons après l'abstraction initiale d'un atome d'hydrogène.

L'accumulation des hydroperoxydes après ce traitement thermo-oxydatif a, également, été mise en évidence par l'analyse spectrométrique infrarouge à transformée de Fourier. Le spectre infrarouge de l'huile thermo-oxydée a révélé une large bande à 3466 cm^{-1} . L'insufflation d'air a, donc, favorisé le processus oxydatif au dépend de la dégradation thermique des hydroperoxydes formés. Cette bande correspond à des groupements hydroxyles néoformés au cours de l'oxydation. La spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge constitue, en effet, un outil d'identification des types de liaisons chimiques existantes au sein d'une molécule.

Ces molécules intermédiaires de l'oxydation des acides gras polyinsaturés sont thermiquement instables. Aux températures élevées ($>180^\circ\text{C}$), la vitesse de leur décomposition en composés secondaires est nettement supérieure à la vitesse de leur formation. Des radicaux *alcoxyles* se forment, alors, par scission de la liaison O-O en de multiples produits secondaires dont la nature et les proportions dépendent de différents paramètres. Parmi ces produits, apparaissent des molécules volatiles (principalement des aldéhydes, hydrocarbures, alcools, acides...) qui modifient la saveur d'origine de l'huile. Les composés secondaires d'oxydation non volatils sont principalement des triglycérides oxydés monomères comportant au moins un acide gras altéré porteur d'un groupement fonctionnel de type hydroxyle, carbonyle ou époxyde.

Il semble que Le traitement appliqué dans notre étude n'a pas favorisé la formation de composés secondaires à fonction carbonyle ; les huiles de tournesol fraîche et thermo-oxydée ont, en effet, enregistré des bandes à 1742 cm^{-1} de même intensité. L'insufflation d'air aurait, cependant, favorisé l'addition de molécules d'oxygène et la formation de groupement -OH , très absorbant au voisinage de la bande d'absorption des hydroperoxydes, soit entre 3750 et 3375 cm^{-1} . Ainsi, la largeur de la bande à 3466 cm^{-1} est liée à la formation simultanée d'hydroperoxydes et de TAG contenant des AG hydroxylés.

L'accumulation des hydroperoxydes et les TAG porteurs de fonctions hydroxyles auraient favorisé le déroulement des réactions de polymérisation, à l'origine de l'épaississement de l'huile de tournesol thermo-oxydée.

C'est ainsi que l'analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile de tournesol thermo-oxydée a confirmé la sensibilité particulière de l'acide linoléique à l'action de l'oxygène. Le taux de cet acide gras essentiel a chuté très significativement, tandis que les teneurs en acides oléique et palmitique ont augmenté très significativement.

Le deuxième objectif de cette étude concerne l'effet nutritionnel de l'huile de tournesol thermo-oxydée ; cette huile a été incorporée dans le régime alimentaire pour rats en croissance ; la composition en acides gras des tissus de foie, d'intestins grêles et de la matière grasse entourant les intestins ainsi que les modifications histologiques induites sur ces organes ont été analysées puis comparées aux tissus de rats ayant ingéré l'huile de tournesol fraîche.

L'analyse des profils d'acides gras des tissus d'organes a montré une diminution significative de l'insaturation globale et une augmentation significative des taux d'AGS et l'acide oléique des lipides tissulaires chez les rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée. Ces changements ont, également, été notés dans l'huile de tournesol thermo-oxydée introduite dans le régime, confirmant ainsi l'influence de la qualité des lipides alimentaires sur le profil en acides gras des lipides tissulaires.

Ainsi, la « carence » des lipides tissulaires en acide linoléique pourrait être due, en partie, à son faible apport par l'aliment ingéré, confirmant ainsi la sensibilité particulière des doubles liaisons de configuration *cis* de l'acide linoléique à l'action de l'oxygène catalysée par la température.

Par ailleurs, l'acide arachidonique, dérivé supérieur de l'acide linoléique, n'a pas été détecté dans les lipides tissulaires de rats ayant ingéré l'huile de tournesol thermo-oxydée. La non-conversion de l'acide linoléique en ses dérivés supérieurs de la série des $\omega 6$ dans les tissus de nourris à cette huile pourrait être due à l'action délétère des produits d'oxydation de l'acide linoléique au cours de la thermo-oxydation de l'huile de tournesol incorporée dans le régime.

En effet, de nombreux auteurs ont montré l'inhibition du système enzymatique du métabolisme des acides gras par les produits d'oxydation des lipides. Dans les conditions normales, l'acide linoléique est converti en ses dérivés supérieurs, l'acide arachidonique notamment grâce au concours de désaturases et d'élongases. Il semble que l'enzyme clé du métabolisme lipidique, la $\Delta 6$ -désaturase, est inactivée par ces produits d'oxydation, ce qui a empêché la conversion de cet AG essentiel.

L'autre fait marquant de cette étude est l'augmentation de la teneur des lipides tissulaires en acide palmitoléique, le C16 :1, $\omega 7$ notamment. Cet acide gras monoinsaturé n'était pas détecté, ni dans l'huile de tournesol fraîche, ni dans l'huile thermo-oxydée, ce qui confirme sa synthèse endogène ; ainsi, les produits néoformés auraient stimulé l'activité de la $\Delta 9$ -désaturase. Il est connu, l'acide palmitoléique (16:1) résulte de la désaturation par la $\Delta 9$ désaturase de l'acide palmitique (16:0).

De plus, l'accumulation des produits d'oxydation des lipides dans les organes analysés dans notre étude pourrait être à l'origine de leur épaissement et l'apparition de la structure fibreuse dans les tissus intestinaux des rats nourris à l'huile de tournesol thermo-oxydée. L'observation des micrographies de tissus d'organes enflés a montré clairement une augmentation des volumes de cellules de tous les tissus, une hypertrophie des noyaux en position centrale avec prééminence des nucléoles des hépatocytes et migration des noyaux des adipocytes à la périphérie des cellules. En plus de ces anomalies, la membrane de certains adipocytes a été détruite.

Il a été admis que les peroxydes lipidiques alimentaires engendrent l'accumulation de radicaux libres dans les parois cellulaires. Ces molécules chimiques, instables, « cherchent » à stabiliser leur structure par arrachement d'un atome d'hydrogène sur des acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes cellulaires. La destruction de certaines de ces molécules et des vitamines liposolubles, comme la vitamine E, sous l'effet de radicaux libres peut se traduire, à long terme, par une destruction de la membrane cytoplasmique.

Une « contamination » chronique par ces xénobiotiques fait réagir l'organisme vivant en augmentant le volume des cellules, comme dans le cas du goitre endémique, consécutif d'une carence alimentaire en iode. Néanmoins, l'organisme vivant recèle un système d'autodéfense composé d'antioxydants (vitamines A, C et E) contre des effets potentiellement destructeur de ces produits d'oxydation des lipides.

Ainsi, dans le souci de se prémunir contre l'action néfaste des peroxydes lipidiques alimentaires et de préserver la santé du consommateur, il est impératif de sensibiliser les industriels à enrichir les huiles de table destinées à la cuisson et aux fritures avec des molécules anti-oxydantes d'origine naturelle, comme les composés phénoliques. Ceci constitue une perspective de recherche à envisager pour améliorer la stabilité thermo-oxydative des huiles de tables.

Les huiles végétales brutes sont, certes, riches en tocophérols, mais une grande partie de ces molécules lipophiles est perdue durant le raffinage industriel, d'où la nécessité de restaurer ces huiles de tables avant leur conditionnement et commercialisation et par voie de conséquence les protéger contre le rancissement. Les tocophérols, solubles dans les lipides, ont une double action bénéfique ; ils jouent le rôle de vitamine (E) et agit comme anti-oxygène. Ces molécules anti-oxydantes empêchent l'avancement de l'oxydation en ralentissant la phase de propagation où des composés secondaires d'oxydation des lipides se forment et s'accumulent.

Il semble, en effet, que l'espérance de vie la plus longue est enregistrée chez les végétariens, lesquels possèdent une réserve adéquate en antioxydants. Une alimentation riche en fruits et légumes est particulièrement abondante en antioxydants ; ceux-ci réduisent le risque de l'infarctus du myocarde et d'autres maladies cardio-vasculaires, les cancers de la bouche, du pharynx, du larynx, estomac, côlon, etc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIME-GENTY N., BUSSERAU-PLUNIAN F. et DUBERTRET G., (1996). Problèmes corrigés de Biologie Cellulaire. DUNOD. 2^{ème} édition, p.140.

ADACHI S., ISHIGURO T., and MATSUNO R., (1995). Autoxidation kinetics for fatty acids and their esters. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **72**(5): 547–551.

ADDIS PB., (1986) Occurrence of lipid oxidation products in food. *Fd. Chem. Toxic* **24**:1021-1030.

ADDIS PB., and WARNER GJ. (1991). The potential health aspects of lipid oxidation products in food. In *Free Radicals and Food Additives: 77-119* [O.1. Arouma and B. Halliwell, editors]. London: Taylor and Francis.

ADRIAN J., DAN VILLIER P., POIFFAIT A., et POTUS J., (1997). Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Edition : Tec & Doc, Lavoisier, Paris: 47-57 et 165-171.

AHRO, M., HAKALA, M., KAUPPINEN, J., KALLIO, H., (2002). Headspace FT-IR analysis of rapeseed oil oxidation. *Appl. Spec.* **56**, 217–222.

AKOH CC., and MIN DB., (2002). Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel, p.1014.

ALARY, J., BRAVAIS, F., CRAVEDI, J.P., DEBRAUWER, L., RAO, D. and BORIES, G. (1995). Mercapturic acid conjugates as urinary and metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 34–39.

ALBI, T., LANZON A., GUINDA A., LEON M., and PEREZ-CAMINO M.C., (1997). Microwave and Conventional Heating Effects on Thermoxidative Degradation of Edible Fats, *J. Agric. Food Chem.* **45**:3795–3798.

ALEXANDER, JC., CHANIN, BE., and MORAN, ET., (1983). Nutritional effect of fresh, laboratory heated and pressure deep fry fats. *J. Food Sci.*, **48**:1289-1292.

ALIGON D., BONNEAU J., GARCIA J., GOMEZ D., and LE GOFF., (2010). Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : les organochlorés, les organophosphorés et les Pyréthrinoides. IGS PERSAN 2009-2010, 1-78. Document consulté sur le site <http://ressources.Ensp.fr/memoires/2010/person...>

AMMOUCHE A., ROUAKI F., BITAM A., and BELLAL M., (2002). Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. *Ann Nutr Metab.* **46**:268-75.

ANTHEA M., HOPKINS J., McLAUGHLIN CW., JOHNSON S., WARNER MQ., LaHART D. and WRIGHT JD., (1993). Human Biology and Health. Engleword Cliffs, New Jersey, USA : Prentie Hall. ISBN 0-13-981176-1. Oclc. 32308337.

AOAC., (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed., AOAC, Arlington, VA, sec. 956.33

- AOCS., (1998).** Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 18–90. *Champaign, IL: AOCS.*
- AOCS., (1989).** Official and Recommended Practices of the American oil Chemists Society, 5th eds. Champaign, I.L :48-62.
- ARROYO, R., CUESTA C., GARRIDO-POLONIO C., LOPEZ-VARELA S., and SANCHEZ-MUNIZ F.J., (1994).** High-Performance Size-Exclusion Chromatographic Studies on Polar Components Formed in Sunflower Oil Used for Frying, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:557-563.
- ARROYO, R., CUESTA, C., GARRIDO-POLONIO, C., LOPEZ-VARELA, S., and SANCHEZ-MUNIZ, FJ., (1992).** High-performance size-exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:557.
- ARTMAN NR., (1969).** The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. In *Advances in Lipid Research*, 7: 245-330 [R. Paoletti and D. Kritchevsky, editors]. London: Academic Press.
- ASCHERIO A., (2002).** Epidemiologic studies on dietary fats and coronary heart disease. *Am J Med*, 113(9):9-12.
- ASCHERIO A., RIMM EB., GIOVANNUCCI EL. et al., (1996).** Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow-up study in the United States. *BMJ*, 313: 84-90.
- ASSUMPCAO RP., DOS SANTOS FD, ANDRADE PMM., BARRETO GF., and DO CARMO MGT., (2004).** Effect of Variation of Trans-Fatty Acid in Lactating Rats' Diet on Lipoprotein Lipase Activity in Mammary Gland, Liver, and Adipose Tissue. *Nutrition*, 20:806-811.
- AUGUSTIN MA. and BERRY SK., (1983).** Efficacy of the Antioxidants BHA and BHT in Palm Olein during Heating and Frying. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 60: 1520-1522.
- BASAGA H., TEKKAYA C., and ACIKEL F., (1997).** Antioxidative and Free Radical Scavenging Properties of Rosemary Extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 30: 105-108.
- BEDRANI S., (2008).** Algérie. L'agriculture, l'agro-alimentaire, la pêche et le développement rural. Les monographies de CIHEAM (Centre international de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes). INA. El-Harrach. Alger.
- BELURY MA., NICKEL KP., BIRD CE., and WU Y., (1996).** Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumour promotion. *Nutr. Cancer*, 26, 149–157.
- BERSET C., (2006).** Antioxydants phénoliques. Structure, propriétés, sources végétales. In *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed T. a. Doc. Lavoisier: 265-294.
- BERTRAND D. et DUFOUR D., (2000).** La spectroscopie et ses applications analytiques. Ed. Tec et Doc, Paris, 150.

BILLEK G., (1980). Heated oil: Chemistry and nutritional aspects. *Nutr. Metab*, 42, 200-210.

BILLEK G., GUHR G., and WAIBEL J., (1978). Quality assessment of used frying fats: a comparison of four methods. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 55: 728-733.

BINKOSKI, A. E., KRIS-ETHERTON, P. M., WILSON, T. A., MOUNTAIN, M. L., and NICOLSI, R. J. (2005). Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. *J. Am. Diet Assoc.* 105(7): 1080–1086.

BITAM A., (2005). Effets nutritionnels des huiles thermo-oxydées sur certains paramètres structuraux et fonctionnels chez le rat en croissance. Thèse de Doctorat en Sciences alimentaires. Institut National Agronomique (INA) d'El-Harrach, p.95.

BLANC-GONDARMDARY P., REVOL A., and PACHECO H., (1989). Chronical ingestion of oxidized oil in young rat. Effect on lipid composition and cytidyl transferase activity. Biomembranes et nutrition, colloque INSERM. Paris, 12-14 juin 1989, nutriments affectant la composition lipidique et les propriétés des membranes cellulaires. INSERM 195: 481.

BLANKSON H., STAKKESTAD JA., FAGERTUN H., THOM E., WADSTEIN J., and GUDMUNDSEN O., (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.*, 130, 2943-2948.

BOLEDA MD., SAUBI N., FARRE´S J., and PARE´S X., (1993). Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 85-90.

BONNEFIS C.S. (2005). Effets biologiques des peroxydes et approche de la participation des aliments composés à leur apport chez le chien et le chat. Thèse de doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse, France.

BOVER F., (2009). Le marché des oléagineux. Oil world, France Agri Mer. USDA. Commission européenne.

BOYER A., (2010). Design de nouveaux synthons dérivés de l'acide oléique : application à la synthèse de polyuréthanes. Thèse de Doctorat en Chimie. Spécialité Polymères. Université de Bordeaux 1, p.201.

BREVEDAN MIV., CARELLI AA., and CRAPISTE GH., (2000). "Changes in composition and quality of sunflower oils during extraction and degumming". *Grasas Y Aceites* 51 (6): 417-423.

BRODY T., (1994). *Nutritional biochemistry*. 2nd edition. San Diego: Academic Press, p.171.

BROWNING JD., and HORTON JD., (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114:147-152.

BRYANT RW., and BAILEY JM., (1980). Altered lipoxygenase metabolism and decreased glutathione peroxidase activity in platelets from selenium-deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 268-276.

BURTON GW and INGOLD KU., (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. NY. Acad Sci.*, 570 : 7-22.

CARELLI, A.A., BODNARIUK P., and CRAPISTE G.H., (1998). Effectiveness of Antioxidants in Sunflower Oil, in *Advances in Oils and Fats, Antioxidants, and Oilseed By-Products, Volume II in the Proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing*, edited by S.S. Koseoglu, K.C. Rhee, and R.F. Wilson, AOCS Press, Champaign :258-261.

CASTELL JD., SINNHUBER RD., WALES JH., and LEE DJ., (1972). Essential fatty acids in the diet of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Growth, feed and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.*; 102: 77-86.

CERA KR., MAHAN DC., and REINHART GA., (1989). Apparent fat digestibilities and performance responses of postweaning swine fed diets supplemented with coconut oil, corn oil and tallow. *Journal of Animal Science*, 67: 2040-2047.

CERA KR., MAHAN DC., and REINHART GA., (1988). Weekly digestibilities of diets supplemented with corn oil, lard or tallow by weanling swine. *Journal of Animal Science*, 66:1430-1437

CHAN H., PRESCOTT F., and SWOBODA P., (1976). Thermal decomposition of individual positional isomers of methyl linoleate hydroperoxide: Evidence of carbon-oxygen bond scission. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **53**(9), p. 572-576.

CHARNOCK JS., McLENNAN PL., ABEYWARDENA MY., (1992). Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart. *Mol Cell Biochem*, 116:19-25.

CHILLIARD Y., and FERLAY A., (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Develop.*, 44: 467-492.

CHIN SF., STORKSON JM., LIU W., ALBRIGHT KJ ., and PARIZA MW., (1994). Conjugated linoleic acid (9, 11- and 10, 12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J. Nutr.*, 124: 694-701.

CHOE E., and MIN DB., (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* 72: R77-R86.

CHOE E., and MIN DB., (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**(4), p. 169-186.

CHOW CK., (2008). Biological Effects of Oxidized Fatty Acids. CRC Press. Taylor & Francis group. Third edition :855-878

- CHOW CK., (2008).** Fatty acids in foods and their health implications. 3rd edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Rato London New york, p.1281
- CILLARD J., and CILLARD P., (1980).** Pro-oxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. *Ann. Nutr. Alim.* 34: 579-592.
- CLARK WL et SERBIA GW., (1991).** Safety aspects of frying fats and oils. *Food Tech.* 45:84.
- COHN J.S. (2002).** Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 19–24.
- CONTRERAS MP., AVULA RY., and SINGH RK., (2010).** Evaluation of Nano Zinc (ZnO) for Surface Enhancement of ATR-FTIR Spectra of butter and Spread. *Food bioprocess Technol.* 3: 629-635.
- CORONGIU FP., and BANNI S., (1994).** Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology* 233 303-313.
- CORONGIU FP., and MILIA A., (1983).** An improved and simple method for determining diene conjugation in autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Chem. Biol. Interactions.* 44:289–297.
- COSGROVE JP., and CHURCH DF., (1987).** The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22(5): 299-304.
- CRAPISTE GH., BREVEDAN MIV., and CARELLI AA., (1999).** Oxidation of Sunflower Oil During Storage. *JAACS*, 76, 1437-1443.
- CROGUENNEC T., (2006).** Oxydation des lipides. In *Science des aliments*. Ed Tec&Doc., Jeantet R., Croguenec T., Schuck P. et Brule G. :95-120.
- CUVELIER ME., RICHARD, H., and BERSET C., (1992).** Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 56 : 324-325.
- CZERNICHOW S., THOMAS D., and BRUCKERT E., (2011).** Acides gras oméga-6 et maladies cardiovasculaires. Recommandations en matière d'apport alimentaire. *Med Sci (Paris)*; 27 : 614-618
- DANGLES O., (2006).** Propriétés chimiques des polyphénols. In *Polyphénols en agroalimentaire*. Ed Tec&Doc, Paris: Lavoisier : 29-54.
- DANGLES O., and DUFOUR C., (2008).** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In *Recent Advances in Polyphenol Research*. Wiley-Blackwell, p. 416.
- DASHTI N., FENG Q., FREEMAN MR., GANDHI M., FRANKLIN FA., (2002).** Trans polyunsaturated fatty acids have more adverse effects than saturated fatty acids on the concentration and composition of lipoproteins secreted by human hepatoma HepG2 cells. *J Nutr*, 132:2651-2659.

DAVIDSON AM., CUMMING AD., SWAINSON CP., and TURNER N., (1999). Diseases of the Kidney and Urinary system. In: Davidson's principles and practice of Medicine. Eds. Haslet C, Chilvers E. R, Hunker J. A, Boon N. A. 18th ed. Churchill Living Stone, Edinburgh: 417-470.

DE GOMEZ DUMM IN., and BRENNER RR., (1975). Oxidative desaturation of alpha-linoleic, linoleic, and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids*;10 :315-317.

DE GREYT W., PETRAUSKAITE V., KELLENS MJ., and HUYGHEBAERT AD., (1998). Analysis of tocopherols by gas-liquid and high-performance liquid chromatography : a comparative study. *Food/Lipid* 100 (11): 503-507.

DELANY JP., BLOHM F., TRUETT AA., SCIMECA JA., and WEST DB., (1999). Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am. J. Physiol.*, 276, R1172-R1179.

DHIBI M., BRAHMI F., MNARI A., HOUAS Z., CHARGUI I., BCHIR L., GAZZAH N., ALSAIF MA., and HAMMAMI M., (2011). The intake of high fat diet with different *trans* fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutrition & Metabolism*, 8: 1-12.

DOBARGANES MC., and VELASCO J., (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 420-428.

DOBARGANES, CM., MARQUEZ-RUIZ, G., and PEREZ-CAMINO M., (1993). Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils. *J. Agric. Food Chem.* 41:678.

DOBARGANES, M.C., PEREZ-CAMINO M.C., and MARQUEZ-RUIZ G., (1988). High Performance Size Exclusion Chromatography of Polar Compounds in Heated and Non-Heated Fats, *Fat Sci. Technol.* 90:308–311.

DOBARGANES MC and PEREZ-CAMINO MC., (1985). Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. III. Evolución de los ácidos grasos e influencia de su posición en la molécula de triglicéridos, *Grasas y Aceites*, 36, 186, 1985.

DOLDE D., VLAHAKIS C., and HAZEBROEK J., (1999). Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 76: 349-355.

DONNELLY KL., SMITH CL., SCHWARZENBERG SJ., JESSURUN J., BOLDT MD., and PARKS EJ., (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.*, 115:1343-1351.

DRAPER HH., POLENSEK L., HADLEY M., and MCGIRR LG., (1984). Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids* 19, 836-843.

DRONNE Y., (2001). Les marchés oléagineux de l'Europe dans le contexte international. *OCL*. 8, 183–190.

DROZDOWSKI B., and SZUKALSKA E., (1984). A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 64: 1008-1011.

DUBOIS J., VAN de VOORT FR., SEDMAN J., ISMAIL AA., and RAMASWAMY HR., (1996). Quantitative fourier transform infrared analysis for anisidine value and aldehydes in thermally stressed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 787–794.

DURAND G., GUESNET P., CHALON S., ALESSANDRI JM., RIZKALLA S., et LEBRANCHU Y., (2002). Importance nutritionnelle des acides gras polyinsaturés. In : ROBERFROID M. Ed. Aliments fonctionnels. Paris : Edition Tec & Doc. Lavoisier : 193-219.

ECKEL RH., BORRA S., LICHTENSTEIN AH., and YIN-PIAZZA SY., (2007). Understanding the complexity of *trans* fatty acid reduction in the American diet: American Heart Association Trans Fat Conference 2006: report of the Trans Fat Conference Planning Group. *Circulation*, 115:2231-2246.

EDER K., and STANGL GI., (1999). Plasma Thyroxine and Cholesterol Concentrations of Miniature Pigs Are Influenced by Thermally Oxidized Dietary Lipids. *J. Nutr.* 130: 116–121.

EL ANANY AM., (2007). Influence of Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on the stability of sunflower oil during deep-fat frying process. *Electronic Journal of Food and Plants Chemistry* 2, 14-19

EDELSTEIN CL., LING H., and SCHRIER RN, (1997). The nature of renal cell injury *Kidney International* 5: 1341-1351.

EDER K., (1999). The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids*, 34 :717-725.

EL-SHAMI SM., ZAKI SELEM I., EL-ANWAR IM., and EL-MALLAH H., (1992). Dielectrique properties for monitoring the quality of heated oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69: 872-875.

ENDO Y., HOSHIZAKI S., and FUJIMOTO K., (1997). Oxidation of synthetic triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effect of oxidation system and triacylglycerol structure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 1041-1045.

ESTERBAUER H., SCHAUR RJ., and ZOLLNER H., (1991). *Free Radical Biol. Med.* 11, 81–128.

ESTERBAUER H., ECKL P., and ORTERER A., (1990). *Mutat Res*, 238: 223-233.

EVANS RJ., (1997). Optimizing Lipids Stability with Natural Inhibitors, in *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, edited by F. Shahidi, AOCS Press, Champaign, pp. 224–244.

FARHOOSH R. and MOOSAVI SMR., (2009). Evaluating the Performance of Peroxide and Conjugated Diene Values in Monitoring Quality of Used Frying Oils. *J. Agric. Sci. Technol*, 11: 173-179.

FAUZIAH A., RAZALI I., and NOR AINI S., (2000). Frying Performance of Palm Olein and High Oleic Sunflower Oil During Batch Frying of Potato Crisps. *Palm Oil Developments*, 33:1-7.

FERIOLI F., (2007). Application of chromatographic and spectroscopic techniques in the evaluation of the lipid fraction of animal products. *AMS Tesi di Dottorato. ALMA MATER STUDIORUM* - Università di Bologna,

FINLAYSON NDC., HAYES PC., and SIMPSON KJ., (1999). Diseases of the liver and biliary system. in: Davidson's principles and practice of medicine. *Eds. Haslet C, Chilvers E. R, Hunker J. A. A. Boon N. A., 18th ed. Churchill Living Sone, Edinburgh* : 683-736.

FIRESTONE D., (1993). Oxidative stability index (OSI): Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed. *American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, Cd 12b-92.*

FOLCH J., LEES M., and STANLEY GHS., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497-509.

FORSYTHE CE., PHINNEY SD., FERNANDEZ ML., QUANN EE., WOOD RJ., BIBUS DM., KRAEMER WJ., FEINMAN RD., and VOLEK JS., (2008). Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. *Lipids.* 43(1): 65-77.

FRANCOIS R., (1974). Les industries des corps gras : Biochimie extraction, raffinage, Nuisances et réglementation. *Ed : Lavoisier, Paris* ; ISBN : 2880200075.

FRANKEL EN., (2005). Methods to determine the extent of oxidation. In Lipid Oxidation, 2nd Edition. *The Oily Press, England*, 99-127.

FRANKEL EN., (1998). Methods to determine extent of oxidation. *in lipid oxidation.* Frankel E N Ed, the oily press, Glasgow: 79-98.

FRANKEL EN., (1993). In Search of Better Methods to Evaluate Natural Antioxidants and Oxidative Stability in Food Lipids, *Trends Food Sci. Technol.* 4:220-225.

FRANKEL EN., SELKE E., NEFF WE., and MIYASHITA K., (1992). Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. IV. Volatile decomposition products from triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids* 27 (6), 442-446.

FRANKEL EN., (1985). Chemistry of Autoxidation: Mechanism, Products and Flavor Significance, in *Flavor Chemistry of Fats and Oils*, edited by D. Min and T.H. Smouse, *American Oil Chemists' Society, Champaign.*

FRANKEL EN., and NEFF WE., (1983). Formation of malondialdehyde from lipid oxidation products. *Biochim. Biophys. Acta.* 754: 264-270.

FRANKEL EN., (1980). Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* 19:1-22.

FRANKEL G., and FRIEDMAN SC., (1957). Vitamins and Hormones: 15-73.

- FREI B., STOCKER R., and AMES BM., (1988).** Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 85: 9748-9152.
- FRENCH, P., STANTON, C., LAWLESS, F., O'RIORDAN, E.G., MONAHAN, F.J., CAFFREY, P.J. & MOLONEY, A.P. (2000).** Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.*, 78, 2849–2855.
- FRIDOVICH, I., (1989).** Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem*, 264: 7761-7764.
- FRITSCH CW, (1981).** Measurements of frying fat deterioration: A Brief View. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, p.272.
- GAMEL TH., KIRITSAKIS A., and PETRAKIS C., (1999).** Effect of phenolic extracts on *trans* fatty acid formation during frying. *Grasas y Aceites*, 50, 421.
- GARCIA-LLATAS G., LAGARDA MJ., ROMERO F., ABELLAN P., and FARRE R., (2007).** A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. *Food Chem.* 101(3): 1078–1086.
- GARIBAGAOGLU M., ZLYBEK U., ERDAMAR S., CEVIK A., and ELMACIOGLU., (2007).** The hepatotoxic effects of deep fried sunflower oil on rat livers. *Advances in molecular medicine. International journal of molecular biology, biochemistry and gene technology*, 3(1) : 35-40.
- GARRIDO-POLONIO C, GARCÍA-LINARES MC, GARCÍA-ARIAS MT, LÓPEZ-VARELA S, GARCÍA-FERNÁNDEZ MC, TERPSTRA AH, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ., (2004).** Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr.* 92:257-265.
- GASPARDO B., PROCIDA G., TOSO B., and STEFANON B., (2008).** Determination of volatile compounds in San Daniele ham using headspace GC-MS. *Meat Sci.* 80(2): 204–209.
- GERTZ C., and KOCHAAR P., (2001).** A new method to determine oxidative stability of vegetable fat and oil at simulated frying temperature. *OCL.* 8, pp: 82 – 91.
- GERTZ C., KLOSTERMANN S., and KOCHHAR SP., (2000).** Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102 (8-9): 543-551.
- GIUFFRIDA F., DESTAILLATS F., SKIBSTED LH., and DIONISI F., (2004).** Structural analysis of hydroperoxy- and epoxy-triacylglycerols by liquid chromatography mass spectrometry. *Chem. Phys. Lipids.* 131(1): 41–49.

GOBURDHUN D., JHAUMEER-LAULLO SB. and MUSRUCK R., (2001). Evaluation of soybean oil quality during conventional frying by FTIR and some chemical indexes. *International Journal Food Science and Nutrition* 52: 31-42.

GORDON MH., PAIVA-MATINS F., ALMEIDA M., (2001). Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2480-2485.

GORDON, M.H., and MURSI E.A., (1994). Comparison of Oil Stability Based on the Metrohm Rancimat with Storage at 20°C, *Ibid.* 71:649–651.

GORNAY J, (2006). Transformation par voie thermique de triglycérides et d'acides gras. Application à la valorisation chimique des déchets lipidiques. *Thèse de Doctorat. Spécialité : Génie des Procédés. Institut national polytechnique de Lorraine (I.N.P.L). Ecole doctorale RP2E E.N.S.I.C. – Nancy. Département de chimie physique des réactions, p.309*

GRAY JL., and MONAHAN FJ., (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trend in Food Sciences and Technology.* 3 315-318.

GRAY JL., (1978). Measurement of Lipid Oxidation: A Review, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55:539–546.

GROMPONE MA., (2005). Sunflower Oil. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright John Wiley & Sons, Inc. 655-730.

GROMPONE MA., PAGANO T., and PINCHAK Y., (2000). in Proceedings of the International Workshop on Fats. *Oils and Oil seeds Analysis (IUPAC):*46-61.

GUILLAUMIN R., GENTE M., et BARBATI C., (1977). Etude sur les huiles chauffées, dégradation des composés non volatils formés lors des fritures. *R.F.C.G,* 10 :477-479.

GUILLAUMIN R, (1969). Composés non volatils formés lors des fritures. *R.F.C.G,* 16: 189-204.

GUILLEN MD., and GOICOECHEA E., (2007). Detection of primary and secondary oxidation products by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and 1H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage. *J. Agric. Food Chem.* 55(26): 10729-10736.

GUILLEN MD., and CABO N., (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.* 77, 503-510.

GUILLEN MD., and CABO N., (1999). Usefulness of the frequency data of the Fourier transform infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. *J. Agric. Food Chem.* 47(2): 709–719.

GUILLEN-SANS R., and GUZMAN-CHOZAS (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food science and Nutrition.* 38 315-330.

GUNSTONE F., (2007). Oils and fats in the food industry. *Food Industry Briefing Series*. Ed Wiley-Blackwell, Blackwell Publishing : 71-87.

GUNSTONE FD., HARWOOD JL., and PADLEY FB. (1986). Epoxy and furanoid acids. In *The Lipid Handbook* (F.D. Gunstone, J.L. Harwood, and F.B. Padley, eds.), Chapman & Hall, New York, sec. 1.10: 21–22.

GUTTERIDGE JM., and HALLIWELL B., (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899:136-147.

HA YL., STORKSON J., and PARIZA MW., (1990). Inhibition of benzo(a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50, 1097–1101.

HACHEMI N., (2006). Impact prévisible de l'intégration de l'Algérie à la zone de libre échange Union Européenne et Organisation Mondiale du Commerce sur la filière huile alimentaire. Magister en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique – El Harrach – Alger.

HALES N., (2002). Algeria oil seed and products annual 2001. *Foreign Agricultural Service. Gain report. Global Agriculture Information Network (USDA).*

HALLIWELL B., and CHIRICO S., (1993). Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (suppl.): 714S-725S.

HALLIWELL B., and GUTTERIDGE JMC., (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : Clarendon Press.

HALLIWELL B., and GUTTERIDGE JMC., (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1: 1396-1398.

HAMM DL., HAMMOND EG., PARVANAH V., and SNYDER HE., (1965). The determination of peroxides by the Stamm method. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 42:920–922.

HARRY-O'KURU RE., HOLSER RA., ABBOTT TP., and WEISLEDER D., (2002). Synthesis and characteristics of polyhydroxy triglycerides from milkweed oil. *Ind. Crop. Prod.* 15(1): 51–58.

HARWOOD JL., CRYER A., GURR MI., DODDS P., (1994). Medical and agricultural aspects of lipids. In: Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B. (Eds.), *The Lipid Handbook, second ed.* Chapman & Hall, London, UK, p. 665.

HAYAMI I., COGAN U., and MOKADY S., (1994). *J. Nutr. Biochem.*, 4, 563.

HAYEK MG., HAN SN., WU D., WATKINS BA., MEYDANI M., DORSEY JL., SMITH DE., and MEYDANI SN., (1999). Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J. Nutr.*, 129, 32-38.

HEADLAM HA., and DAVIES MJ., (2003). Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radical Bio. Med.* 34(1): 44–55.

- HODGES DM., DeLONG JM., FORNEY CF., and PRANGE RK., (1999).** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207(4): 604–611.
- HOFMANOVA J., SOUCEK K., VACULOVA, A., and KOZUBIK A., (2008).** Fatty acids in the modulation of reactive oxygen species balance in cancer. In: *Oxidants in Biology: A Question of Balance*: 129-153. Springer, Amsterdam.
- HOPIA A., HUANG S., and FRANKEL EN., (1996).** Effect of alpha-tocopherol and Trolox on the decomposition of methyl linoleate hydroperoxides. *Lipids*. 31(514): 357–365.
- HOPIA N., (1993a).** Analysis of Lipid Oxidation Products Using High Performance Size Exclusion Chromatography. I. Changes During Autoxidation, *Lebensm.-Wiss. Technol.* 26:563–567.
- HOPIA N., (1993b).** Analysis of Lipid Oxidation Products Using High Performance Size Exclusion Chromatography. II. Changes During Processing, *Ibid.* 26:568–571.
- HOLSER RA, ISBELL TA., (2000).** Effect of Processing Condition on Oxidative Stability of Meadow Foam Press Oil. *J. Ame Oil Chem Soc*; 79: 1051-1052.
- HOUA J., WANGA F., and RENC D., (2011).** Effect of the supplementation of fish oil on the conjugated linoleic acid production, especially accumulation of trans-11 C18:1 and trans-10 C18:1 fatty acids: An in vitro rumen fermentation study. Available online 22 April 2011.
- HOUHOULA DP., OREOPOULOU V. and TZAI C., (2002).** A Kinetic Study of Oil Deterioration during Frying and a Comparison with Heating. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 79: 133-137.
- HOUSEKNECHT KL., VANDEN HEUVEL JP., MOYA-CAMARENA SY., PORTOCARRERO CP., PECK LW., NICKEL KP., and BELURY MA., (1998).** Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *falfa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244, 678-682.
- HSIEH RJ., and KINSELLA JE., (1989)** Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and Nutrition Research*. 33 233-341.
- HUANG CJ., CHEUNG NS., and LU VR., (1988).** Effects of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1796–1803.
- HUSVÉTH F., GALAMB E., FARKAS V., WÁGNER L., JOLÁNKAI R., and PÁL L., (2011).** Conjugated linoleic acid and other C18 fatty acid composition of muscle and adipose tissues in lambs fed on diets containing vegetable oil supplementations or grass silage. *Acta Alimentaria*, 40 : 345–355.
- IGIRI AO., IBEGBU AO., OSIM EE., (1994).** The Morphological and histological changes in the small intestines induced by Chronic consumption of palm *Journal for Applied Sciences*.3and 4:144-153.

- IIO T., and YODEN K. (1987).** Fluorescence formation and heme degradation at different stages of lipid peroxidation. *Life Sci.* 40(27): 2297–2302.
- IP C., JIANG C., THOMPSON HJ., and SCIMECA JA., (1997).** Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18: 755-759.
- IP C., SCIMECA JA., and THOMPSON H., (1995).** Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer*, 24, 241-247.
- IP C., SINGH M., THOMPSON HJ., and SCIMECA JA., (1994).** Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.*, 54: 1212-1215.
- IP C., CHIN SF., SCIMECA JA., and PARIZA MW., (1991).** Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, 51, 6118–6124.
- IQBAL S., and BHANGER MI., (2007).** Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100: 246–254.
- IQBAL, S., BHANGER, M. I., and ANWAR, F. (2005).** Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem.* 93(2): 265–272.
- IUPAC, (1992).** *Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th edn., edited by C. Paquot and A. Hautfenne, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford.
- IVAN M., MIR PS., KOENIG KM., RODE LM., NEILL L., ENTZ T., and MIR Z., (2001).** Effects of sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rum. Res.*, 41, 215-227.
- IZAKI Y., YOSHIKAWA S., and UCHIYAMA M., (1984).** Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. *Lipids* 19:324-331.
- JADOT G., (1982).** Le rat de laboratoire. Réactif biologie. Paris Masson.
- JAIMAND K., and REZAEI MB., (1995).** Studies on the Storage Quality of Sunflower Oil, *Agrochimica* 39:177–183.
- JENSEN PN., and RISBO J., (2007).** Oxidative stability of snack and cereal products in relation to moisture sorption. *Food Chem.* 103(3): 717–724.
- JENSON H., GUTHENBERG C., ALIN P., and MANNERVIK B., (1986).** *FEBS Lett.* 203, 207–209.
- JIMOH FO., and ODUTUGA AA., (2004).** Histological changes of selected rat tissues following the ingestion of thermally oxidized groundnut oil. *BIOKEMISTRI*, 16: 1-10.

JUDDE A., (2004). Prevention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications, *OCL*, 11 : 415-418.

JUDD JT., CLEVIDENCE B., MUESING RA., WITTES J., SUNKIN ME., PODCZASY JJ., (1994). Dietary trans fatty acids: Effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 861-868.

KALUA CM., Jr BEDGOOD D., and PRENZLER PD., (2006). Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Anal. Chim Acta.* 556(2): 407–414.

KAMAL-ELDIN A., MÄKINEN M., and LAMPI A., (2003). The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism. In: Kamal-Eldin A (ed.), *Lipid Oxidation Pathways*. Champaign Illinois: AOCS Press. pp. 1-35.

KAMAL-ELDIN A., MARQUEZ-RUIZ G., DOBARGANES C., and APPELQVIST LÅ., (1997). Characterisation of aldehydic acids in used and unused frying oils. *Journal of Chromatography.* 776 (2) : 245-254.

KAMAL-ELDIN A., and APPELQVIST LA., (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocophérols and tocotriénols. *Lipids*.31: 671-701.

KANAZAWA A., SAWA T., AKAIKE T., and MAEDA H., (2002). Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 439–447.

KANAZAWA K., and ASHIDA H., (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* 288, p. 71.

KANAZAWA K., KANAZAWA E., and NATAKE M., (1985). Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat. *Lipids* 20: 412-419.

KANSCI G., GENOT C., MEYNIER A., and GANDEMER G., (1997). The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation. *Food Chemistry* 60: 165-175.

KARLESKIND A., (1992). Propriétés des corps gras. In « Manuel des corps gras » Ed Tec et Doc, Lavoisier. Paris. Lavoisier.

KELLEY DS., TAYLOR PC., RUDOLPH IL., BENITO P., NELSON GJ., MACKAY BE., and ERICKSON KL., (2000). Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy women. *Lipids*, 35, 1065-1071.

KELLY ML, KOLVER ES., BAUMAN DE., VAN AMBURGH ME., and MULLER LD., (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 81, 1630–1636.

KEIRSSE J., (2004). Spectroscopie infrarouge déportée : Mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique. *Thèse pour l'obtention du grade Docteur de l'université de Rennes 1. Chimie. Science de la matière*, p.138.

KEMNENY Z., RECSEG K., HENON G., KOVARI K., and ZWOBADA F., (2001). Deodorization of vegetable oils: prediction of *trans* polyunsaturated fatty acid content. *J. Ain Oil Chem Soc*, **78**:973-979.

KIM HJ., and MIN DB., (2008). Tocopherol stability and prooxidant mechanisms of oxidized tocopherols in lipids. In *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Ed C. Press, pp. 435-447.

KINSELLA JE., BRUCKNER G., MAI J., and SHIMP J., (1981). Metabolism of *trans* fatty acids with emphasis on the effects of *trans*, *trans*-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. *Am J Clin Nutr*, **34**:2307-2318.

KISHIDA. E., ORIBE M., and KOJO S., (1990). Relationship among malondialdehyde, TBA-reactive substances, and tocopherols in the oxidation of rapeseed oil. *J Nutr Sci Vitaminol*, **36**: 619-23.

KITTS DD, (1996) in Hui YH, ed., *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 5th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 215–280.

KLAYPRADIT W., KERDPIBOON S., and SINGH RK., (2010). Application of Artificial Neural Networks to Predict the Oxidation of Menhaden Fish Oil Obtained from Fourier Transform Infrared Spectroscopy Method. *Food Bioprocess Technol* DOI 10.1007/s11947-010-0386-5.

KLEIN RA., (1970). The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochemistry and Biophysic Acta*, **210**, p. 486-489.

KOCA N., KOCAOGLU-VURMA NA., HARPER WJ., and RODRIGUEZ-SAONA LE., (2010). Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. *Food Chemistry*. **121**:778-782.

KODE A., RAJAGOPALAN R., PENUMATHSA SV., and MENON VP., (2005). Effect of ethanol and thermally oxidized sunflower oil ingestion on phospholipid fatty acid composition of rat liver: protective role of *Cuminum cyminum* L. *Ann. Nutr. Metab.* **49**: 300–303.

KONOPKA I., TANSKA, M., ROTKIEWICZ D., and ZACHODNA M., (2003). *Bromat. Chem. Toksykol., Supplement*, 343.

KORTENSKA VD., YANISHLIEVA NV., KASAIKINA OT., TOTZEVA IR., BONEVA ML., and RUSSINA IF., (2002) Phenol antioxydant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds. *European Journal of Lipid Sciences and Technology* **104**: 513-519.

KOWALSKI R., (2007). GC analysis of changes in the fatty acid composition of sunflower oil and olive oils heated with quercetin, caffeic acid, protocatechuic acid and butylated hydroxyanisole. *Acta chromatographica* N°18, presented at the 5th International Symposium on Chromatography of Natural Products ISCNP 2006, Lublin (Poland), June 19th-22nd, 2006.

KUBOW, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid peroxidation products in foods. *Free Radical Biol. Med.* 12: 63–81.

KUMMEROW FA., ZHOU Q., MAHFOUZ MM., SMIRICKY MR, GRIESHOP CM., and SCHAEFFER DJ., (2004). Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. *Life Sci*, 74:2707-2723.

LAGARDE M., CALZADA C., and VERICEL E., (2003). *Lipids* 38, 465-468.

L'AEUBLI MW., and BRUTTEL PA., (1986). Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 63(6): 792–795.

LAGUERRE M., LOPEZ-GIRALDO LJ., LECOMTE J., PINA M., and VILLENEUVE P., (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*; 14 (5): 278-92.

LAMPI AM., and KAMAL-ELDIN A., (1998). Effect of alpha- and gamma-Tocopherols on Thermal Polymerization of Purified High-Oleic Sunflower Triacylglycerols. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 75: 1699-1703.

LAVIALLE M., et LAYE S., (2010). Acides gras poly-insaturés (omega 3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central. *Innovations Agronomiques* 10: 25-42

LEA CH., (1946). The determination of the peroxide values of edible fats and oils: the iodometric method. *Journal of the Society of Chemical Industry* 65, 286-290.

LEE Y., OH S., CHANG J., and KIM I., (2004). Chemical Composition and Oxidative Stability of Safflower Oil Prepared from Safflower Seed Roasted with Different Temperatures. *Food Chem*, 84: 1-6.

LEE KN., KRITCHEVSKY D., and PARIZA MW., (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108 : 19-25.

LEGOFF-L, (2003). Aliments dénaturés, raffinage des céréales, sucres, sels et huiles ; <http://www.biogassendi.com>.

LEITZMANN MF., STAMPFER MJ., MICHAUD DS., and AUGUSTSSON K., (2004). Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 80(7): 204–216.

LEMONNIER D. (1975). Augmentation du nombre et de la taille des cellules adipeuses dans l'obésité nutritionnelle de la souris. *Cellular and molecular life sciences*, 26 : 974–975.

LI H., VAN DE VOORT FR., ISMAIL AA., SEDMAN J., and COX R., (2002). Trans Determination of Edible Oils by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 77: 1061-1067.

LICHTENSTEIN AH., (2000). Dietary trans fatty acid. *J Cardiopuhin Rehabil*, 20:143-146.

- LINDEN G., et LORIENT D., (1994).** Biochimie agro-industrielle. Ed. Masson.
- LIU WM., LAI SJ., LU LZ., SHI FX., ZHANG J., LIU Y., YU B., ZHENG-RONG TAO ZR., SHEN JD., LI GQ., WANG DQ., LI JJ., and TIAN Y., (2011).** Effect of dietary fatty acids on serum parameters, fatty acid compositions, and liver histology in Shaoxing laying ducks. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 12(9):736-743.
- LOPEZ-GARCIA E., SCHULZE MB., MEIGS JB., MANSON JE., RIFAI N., and STAMPFER MJ., (2005).** Consumption of *trans* fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr*, 135:562-566.
- LUTHER M., PARRY J., MOORE J., MENG J., ZHANG Y., CHENG Z., and YU LL., (2007).** Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chem.* 104(3): 1065–1073.
- MAIA MRG., BESSA RJB., and WALLACE RJ., (2009).** Is the trans-10 shift that sometimes occurs in the ruminal biohydrogenation of linoleic acid caused by low pH or starch? XIth International Symposium on Ruminant Physiology. Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on Reproduction and Welfare.
- MALVY JM., PREZIOSI P., and GALAN P., (1999).** La consommation de lipides en France: contribution à l'équilibre nutritionnel (données de l'étude Su. Vi. Max, supplémentation en Vitamines, Minéraux et Antioxydants). *Oléagineux Corps gras Lipides*, 6: 21-25.
- MANIAK B., SZMIGIELSKI M., PIEKARSKI W., and MARKOWSHA A., (2009).** Physics-chemical changes of post-frying sunflower oil. *International agro-physics*, 23: 243-8.
- MARKUS WL., and PETER AB., (1986).** Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12–57) and the rancimat method. 63(6): 792–795.
- MARMESAT S., MORALES A., VELASCO J., RUIZ-MENDEZ M.V. and DOBARGANES M.C. (2009).** Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *GRASAS Y ACEITES*, 60 (2), 155-160.
- MARCUSE R., and JOHANSSON L., (1973).** Studies on the TBA test for rancidity grading: II. TBA reactivity of different aldehyde classes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50(10): 387–391.
- MARQUEZ-RUIZ G., and DOBARGANES MC., (1997).** Analysis of Lipid Oxidation Products by Combination of Chromatographic Techniques, in *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*, edited by R.E. McDonald and M.M. Mossoba, AOCS Press, Champaign, pp. 217–233.
- MÁRQUEZ-RUIZ G., and DOBARGANES C., (1996).** Short fatty acid formation during thermoxidation and frying. *J. Sci. Food Agric.* 70: 120-126.

MARQUEZ-RUIZ G., MARTIN-POLVILLO M., and DOBARGANES MC., (1996). Quantitation of oxidized triglyceride monomers and dimers as an useful measurement for early and advanced stages of oxidation. *Grasas y Aceites*, **47**, 48-53.

MARTIN-POLVILLO M., MARQUEZ-RUIZ G., and DOBARGANES MC., (2004). Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 577-583.

MASKAN M. and BAGCI HI., (2003). The Recovery of Used Sunflower Seed Oil Utilized in Repeated Deep-fat Frying Process. *Eur. Food Res. Technol.*, 218: 26-31.

MASSON O., (2002). Biochimie : Les bases biochimiques de la diététique. Edition : Tec & Doc, Lavoisier, Paris : 81-83.

MAYNERIS-PERXACHS J., BONDIA-PONS I., MOLTO-PUIGMARTI C., MAR PAIRO AI., CASTELLOTE M., and LOPEZ-SABATER C., (2010). Diet and plasma evaluation of the main isomers of conjugated linoleic acid and trans-fatty acids in a population sample from Mediterranean north-east Spain. *Food Chem* 2010, 123:296-305.

MAZLIAK P., (1968). Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures. Masson et Cie, p. 224.

MELTON SL., JAFAR S., SYKES D. and TRIGIANO MK., (1994). Review of Stability Measurements for Frying Oils and Fried Food Flavor. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 71: 1301-1308.

MENDEZ E., SANHUEZA J., SPEISKY H., and VALENZUELA A., (1996). Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *J.Am. Oil Chem. Soc.* 73(8): 1033–1037.

MENSINK RP., ZOCK PL., KESTER AD., KATAN MB., (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, **77**:1146-1155.

MEREDITH S., (1984). Free radicals: Friend or foe ? *Medicine Digest* 10 (4): 23-25.

MERRIEN A. (1992). Tournesol. In : Manuel des corps gras. Edition : Tec & Doc, Lavoisier, Paris: 116-122.

MESEMBE OE., IBANGA I., and OSIM EE., (2004). The effects of fresh and thermoxidized palm oil diets on some haematological indices in the rat. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 19: 86-91

MILLER LA., and WHITE PJ., (1988). High temperature stabilities of low-linolenate, high-stearate and common soybean oils. *J.A.O.C.S*; 8: 1324-1326.

MINEMOTO Y., KOMETANI T., PIAO J., and ADACHI S., (2006). Oxidation of oleoyl residue of its esters with ethylene glycol, glycerol and erythritol. *LWT – Food Science and Technology*. 39(1): 1–5.

- MINEMOTO Y., HAKAMATA K., ADACHI S., and ANDMATSUNO R., (2002).** Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum Arabic or maltodextrin by spray-drying. *J. Microencapsul.* 19(2): 181–189.
- MINAMOTO S., KANAZAWA K., ASHIDA H., and NATAKE M., (1988).** *Biochim. Biophys. Acta*, 958, p. 199.
- MINAMOTO S., KANAZAWA K., ASHIDA H., DANNO G., AND NATAKE M., (1985).** *Agric. Biol. Chem.*, 49: 27-47.
- MIRGHANI MES., CHE MAN YB., JINAP S., BAHARIN BS., BAKAR J., (2002).** Rapid method for determining malondialdehyde as secondary oxidation product in palm olein system by Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 13, 195–201.
- MITCHELL DY., and PEDERSEN DR., (1987).** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 403-410.
- MITMESSER SH., and CARR TP., (2005).** Trans fatty acids alter the lipid composition and size of apoB-100 containing lipoproteins secreted by HepG2 cells. *J Nutr Biochem*, 16:178-183.
- MORDERET F., (1992).** Analyse des corps gras. In Manuel des corps gras. Tec & Doc. Lavoisier (Ed). Paris :1147-1182.
- MORGADO N., SANHUEZA J., GALLEGUILLOS A., GARRIDO A., NIETO S., and VALENZUELA A., (2000).** Effet de l'huile de poisson hydrogénée sur le profil des lipoprotéines plasmatiques et sur la composition en acides gras des différents tissus du rat. *Annales de la nutrition et le métabolisme*, 43(5): 310-318.
- MORRISON W., and SMITH L., (1964).** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.* (4); 5: 600-608.
- MOZAFFARIAN D., KATAN MB., ASCHERIO A. et al., (2006).** Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 354 : 1601-1613.
- MOZAFFARIAN D., PISCHON T., HANKINSON SE. et al., (2004).** Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am. J. Nutr.*, 79: 606-612.
- NAKBI A., TAYEB W., GRISSA A., ISSAOUI M., DABBOU S., CHARGUI I., ELLOUZ M., MILED A., and HAMMAMI M., (2010).** Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition & Metabolism*.
- NARUSZEWICZ M., WOZNY E., MIRKIEWICZ E., NOWICKA G., and SZOSTAK WB. (1987).** The effect of thermally oxidized soyabean oil on metabolism of chylomicrons: increased uptake and degradation of oxidized chylomicrons in cultured mouse macrophages. *Atherosclerosis* 66: 45-53.
- NICOLOSI RJ., ROGERS EJ., KRITCHEVSKY D., SCIMECA JA., and HUTH PJ., (1997).** Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, 22: 266-277.

- NIKI E., YOSHIDA Y., SAITO Y., and NOGUCHI N., (2005).** Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 338(1): 668–676.
- NOLEN GA., (1973).** A feeding study of used, partially hydrogenated soybean oil, frying fat in dogs. *J. Nutr.* 103: 1248–1255.
- NOLEN GA., ALEXANDER JC., and ARTMAN NR., (1967).** Long term rat feeding study with used frying fats. *J. Nutr.* 93: 337-348.
- NWANGUMA B., ACHEBE A., EZEANYIKA L., AND EZE L., (1999).** *Food Chem. Toxicol.*, 37, 413.
- NZIKOU JM., MATOS L., MOUSSOUNGA JE., NDANGUI CB., PAMBOU-TOBI NP., BANDZOUZI EM., KIMBONGUILA A., LINDER M., and DESOBRY S., (2009).** Study of oxidative and thermal stability of vegetable oils during frying. *Res. J. Appl. Sci.*, 4, 94–100.
- OARADA M., MIYAZAWA Z., and KANEDA T., (1986).** Distribution of ¹⁴C after oral administration of (U-¹⁴C) labeled methyl linoleate hydroperoxides and their secondary oxidation products in rats. *Lipids* 21: 150–154.
- OBARA N., FUKUSHIMA K., UENO Y., WAKUI Y., KIMURA O., TAMAI K., KAKAZU E, INOUE J., KONDO Y., OGAWA N., SATO K., TSUDUKI T., ISHIDA K, and SHIMOSEGAWA T., (2010).** Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J. Hepatol*, 53:326-334.
- ODUTUGA AA., and OLOGAN FO., (1999).** Effect of thermally oxidized soyabean oil on alkaline and acid phosphatases in rat liver and serum. *Biosci.. Res. Commun*, 11: 281-285.
- ODUTUGA AA., OBALEYE JA., and OLOGAN FO (1997).** Thermoxidized soybean oil: Spectroscopic investigation and effects on selected rat tissues. *Biokemistri*, 1: 45-58.
- OH K., HU FB., and MANSON JE., (2005).** Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol*, 161: 672-679.
- OHLROGGE JB., (1983).** Distribution in human tissues of fatty acid isomers from hydrogenated oils. In *Dietary Fats and Health*. Edited by Perkins EG. Champaign, IL: *American Oil Chemist's Society*: 359-376.
- OLLE M., (2002).** Analyse des corps gras. DGCCRF, Laboratoire interrégional de Montpellier. France. Techniques de l'ingénieur : 33-25.
- OLOGAN FO., (2002).** Some physicochemical properties of thermally oxidized groundnut oil and their toxicological effects on selected rat tissues. Ph. D thesis, University of Ilorin, Ilorin, Nigeria.
- OKIEIMEN FE., PAVITHRAN C., and BAKARE IO., (2005).** Epoxidation and hydroxlation of rubber seed oil: one-pot multi-step reactions. *Eur.J. Lipid. Sci. Tech.* 107(5): 330–336.

OOMEN C., OCKE M., and FESKENS E., (2001). Association between *trans* fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-used study. *Lancet*, 357: 746-751.

O’SARA RW., STEWART L, BROWN J., and HARPH WC., (1979). Carcinogenicity of heated fats and fractions. *J Natl. Cancer Inst.* 42: 275-278.

OSIM EE., OWU DU., ISONG EU., and UMOH IB., (1994). Influence of Chronic consumption of thermoxidized and fresh palm oil diets on basal metabolic rate, body weight and Morphology of tissues in rats. *Discov Innov.* 6:389-396.

PAMPEO C., (1989). Les produits de l’évolution des hydroperoxydes. *R.F.C.G.* 36: 317-323.

PARADIS AJ., and NAWAR WW., (1981). Evaluation of new methods for assessment of used frying oils. *J. Food Sci.* 46:449.

PARDINI RS., (2006). Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem-Biol Interact.* 162(2): 89–105.

PARKER TD., ADAMS DA., ZHOU K., HARRIS M. and YU L., (2003). Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Cold-pressed Edible Seed Oils. *Journal of Food Science*, 68(4), p. 1240-1243.

PARODI PW., (1994). Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Austr. J. Dairy Technol.*, 49: 93-97.

PATTERSON HBW., (1989). Handling and Storage of Oil seeds. *Oils, Fats and Meal*, Elsevier, New York.

PAZ I., and MOLERO M., (2000). Catalytic Effect of Solid Metals on Thermal Stability of Olive Oils. *J.Amer. Oil Chem. Soc.* 77: 127-130.

PERKINS EG., (1996). Lipid oxidation of deep fat frying. In: *Food Lipids and Health* (McDonald RE et Min DB, eds.). Dekker, New York, p. 139.

PERRIN JL., (1992). Evolution des corps gras au cours de leurs utilisations alimentaires. In KARLESKIND A. “Manuel des corps gras” Tec & Doc Ed. Lavoisier. Paris.

PERSAUD R., (2008). Inhibition of proliferation to omega-3 fatty acids in chemoresistant pancreatic cancer cells: Mechanism of action may be more complex. *Ann. Surg. Oncol.* 15(7): 2057.

PIETINEN P., ASCHERIO A., and KORHONEN P., (1997). Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am. J. Epidemiol.*, 145: 876-877.

PIKUL J., LESZCZYNSKI DE., and KUMMEROW FA., (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* 37(5): 1309–1313.

- PINCEMAIL J., DEFRAIGNE JO., MEURISSE M., and LIMET R., (1998).** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires. 2ème partie: la vitamine E. *J. Clin. Pathology*; 50: 269-70.
- POKORNY J., (1989).** Flavor chemistry of deep fat frying in oil. In: *Flavor Chemistry of Lipid Foods* (D. B. Min and T. H. Smouse, eds.). American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, p.113–115.
- POLLET S., ERMIDOU S., LeSAUX F., MONGE M., and BAUMANN N., (1978).** Microanalysis of brain lipids : Multiple two dimensional thin-layer chromatography. *J. Lipid. Res.*, 19: 916–921.
- PRAMOD KUMAR B., and ANUPAM SINGH B., (2012).** Use of Fourier Transform Infrared spectroscopy to cooking oils. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences (IJPCBS)*; 2: 670-680.
- PRIVETT OS., STEARNS EM., and NICKELL EC., (1967).** Metabolisme of the geometric isomers of linoleic acid in the rat. *J. Nutr.*, 92 : 303-310.
- QUILES JL., HUERTAS JR., BATTINO M., RAMIREZ-TORTOSA MC., CASSINELLO M., MATAIX J., LOPEZ-FRIAS M., MANNAS M., (2002).** The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative e stress in rat liver microsomes. *Br J Nutr.*, 88:57-65.
- RAFIK R., (1986).** The fatty acids of indigenous ressources for possible industrial application. *J.S.I.R.*, 29, p.193.
- RAJALAKSHMI D., and NARASIMHAN S., (1996).** Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. In: *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* (D. L. Madhavi, S. S. Desphande, and D. K. Salunkhe, eds.). Dekker, New York, p. 65.
- REHAB FMA., (2010).** Improvement the stability of fried sunflower oil by using different levels of Pomposia (*Syzygium Cumini*). *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 9, 396–403.
- ROBBINS SL., (1974).** *Pathologic basic of disease*. London: W. B. Saunders.
- ROHMAN A., and MAN YBC., (2013).** Application of FTIR Spectroscopy for Monitoring the Stabilities of Selected Vegetable Oils During Thermal Oxidation. *International Journal of Food Properties*, 16: 1594-1603
- ROHMAN A., CHE MAN YB., ISMAIL A., and HASHIM P., (2011).** Monitoring the oxidative stability of virgin coconut oil during oven test using chemical indexes and FTIR spectroscopy. *International Food Research Journal* 18: 303-310.
- ROJO J., and PERKINS E., (1987).** Cyclic fatty acid monomer formation in frying fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64:414.

- ROMERO A., CUESTA C., and SÁNCHEZ-MUNIZ FJ., (2000).** *Trans* fatty acid production in deep fat frying of frozen foods with different oils and frying modalities. *Nutr. Res.*, 20, 599.
- ROMERO A., CUESTA C., SANCHEZ-MUNIZ FJ., (1998).** Effect of replenishment during deep-fat frying of frozen foods in a sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 161-167.
- ROMEU-NADAL M., CHAVEZ-SERVIN JL., CASTELLOTE AI., RIVERO M., and LOPEZ-SABATER MC., (2007).** Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chem.* 100(2): 756–763.
- RUIZ–GUTIERREZ V., and MURRIANA FJG., (1992).** Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on desaturase activities and fluidity in rat–liver microsomes. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 3(2): 75-9.
- RUIZ MEDINA, A., AYORA CANADA, M.J., LENDL, B., (2001).** A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *Analyst* 126, 242–246.
- SAAD B., WAI WT., LIM BP. and SALEH MI., (2006).** Flow Injection Determination of Peroxide Value in Edible Oils Using Triiodide Detector. *Analytica Chimica Acta.*, 565: 261–270.
- SAFAR M., (1995).** Comparaison des plages spectrales de l’infrarouge proche et moyen pour l’étude des produits agro-alimentaires. Thèse de doctorat: Spécialité : physico-chimie des bioproduits. Université de Nantes, Faculté des sciences et des techniques.
- SALIH AM., SMITH DM., PRICE JF., and DAWSON LE., (1987).** Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry science*, 66 1483-1488.
- SAMUHASANEETO S., THONG-NGAM D., KULAPUTANA O., PATUMRAJ S., KLAIKEAW N., (2007).** Effects of N-Acetylcysteine on Oxidative Stress in Rats with Non-alcoholic Steatohepatitis. *J Med Assoc Thai*, 90:4.
- SANCHEZ-MUNIZ FJ., (2004).** Oils and fats: Changes due to culinary and industrial processes. *International Journal For vitamin and Nutrition Research*, 76 :230-237
- SCRIMGEOUR C., (2005).** *Chemistry of Fatty Acids.* Bailey’s Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright © John Wiley & Sons, Inc.
- SEBEDIO JL., and JUANEDA P., (2007).** Isomeric and cyclic fatty acids as a result of frying. In: “Deep fat frying”, Erickson M. (ed). AOCS Press, Champaign (IL), 57-86.
- SEDMAN J., ISMAIL AA., NICODEMO A., KUBOW S., and VAN de VOORT FR., (1996).** Application of FTIR/ATR differential spectroscopy for monitoring oil oxidation and antioxidant efficiency. In: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health, and Applications* (F. Shahidi, ed.). AOCS Press, Champaign, IL: 358–378.

SHAHIDI F., and WANASUNDARA UN., (2002). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils (14). **In:** Food Lipids-Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, pp. 465-487. Akoh, C. and Min, D. B., Eds., Marcel Dekker, New York.

SHAHIDI F., JANITHA PK., and WANASUNDARA PD., (1992). Phenolic antioxydant. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1): 67-103.

SHEEHY PJA., MORRISSEY PA., and FLYNN A., (1994). Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces a-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *British Journal of Nutrition*, 71: 53-65.

SHEEN LY., CHEN HW., KUNG YL., LIU CT., and LII CK., (1999). Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr. Cancer.*, 35, 160-166.

SHEN N., DUVICK S., WHITE P., and POLLAK L., (1999). Oxidative stability and AromaScan analyses of corn oils with altered fatty acid content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 : 1425-1429.

SIES H., (1991). Oxidative, stress, oxidants and antioxidants. New York : Academic Press.

SINELLI N., COSIO MS., GIGLIOTTI C., and CASIRAGHI E., (2007). Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin oil "freshness. *Analytica Chimica Acta*, 598, 128–134.

SINELLI N., COSIO MS., GIGLIOTTI C., and CASIRAGHI E., (2008). Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil "freshness". *Anal. Chim. Acta.* 598(1): 128–134.

SMITH SA., KING RE., and MIN DB., (2005). Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry* 102: 1208-1213.

SNYDER JM., FRANKEL EN., SELKE E., and WARNER K., (1988). Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1617–1620.

SPITELLER G., (2005). The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: A new theory on atherogenesis. *Molecular nutrition & food research*, 49, 999-1013.

SPITELLER G., (2003). The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiologia plantarum*, 119, 5-18.

STAN K., (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine.*, 12: 63-81.

STAPRANS I., HARDMAN DA., PAN XM., and FEINGOLD KR., (1999). Effect of Oxidized Lipids in the Diet on Oxidized Lipid Levels in Postprandial Serum Chylomicrons of Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 22:300–306.

STAPRANS I., RAPP JH., PAN XM., HARDMAN DA., and FEINGOLD KR., (1996). Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 16(4): 533-8.

STAPRANS I., RAPP JH., PAN XM., and FEINGOLD KR., (1996a). Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J. Lipid Res.* 37 (2), 420–430.

STAPRANS I., RAPP JH., PAN XM., HARDMAN DA., and FEINGOLD KR., (1996b). Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscl. Throm. Vas.* 16 (4), 533–538.

STAPRANS I., RAPP JH., PAN XM., KIM KY., (1994). Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler Thromb.*, 14(12): 1900-1905.

STRAYER D., (2006). Fats and oils. Publication by Institute of shortening and Edible oils 175. New York Avenue; NW, SUITE 120. Washington DC, 9th Edition.

SUGIHARA T., RAWICZ W., EVANS EA., and HEBBEL RP., (1991). Lipid hydroperoxides permit deformation-dependente leak of monovalent cation from erythrocytes. *Blood*, 77: 2757-2763.

SUN YE., WANG WD., CHEN HW., and LI C., (2011). Autoxidation of Unsaturated Lipids in Food Emulsion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:453–466.

SUN Q., FAUSTMAN C., SENEAL A., WILKINSON AL., and FURR H., (2001). Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerates storage. *Meat Science* 57: 55-60.

SUN Q., MA J., CAMPOS H., HANKINSON SE., MANSON JE., and STAMPFER MJ., (2007). A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. *Circulation*, 115:1858-1865.

TAKENCHI et WATANABE., (1982). Pathologie nutritionnelle des poisons. Signes morphologiques des carences et intoxications alimentaires chez les poissons d'élevage. Archives de documents de la FAO, ID : 59973 : p.7

TASAN M., and DEMIRCI M., (2005). "Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining". *European Food Research and Technology* 220 (3-4): 251-254.

TEBOURBI O., DRISS M., SAKLY M., and BEN RHOUMA K., (2006). Metabolism of DDT in different tissues of young rats. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants and agricultural wastes*, 41 (2): 167-176.

TEYE GA., SHEARD PR., WHITTINGTON FM., NUTE GR., STEWART A., and WOOD JD. (2006a). Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Science*, 73, 157–165.

- TEYE GA., WOOD JD., WHITTINGTON FM., STEWART A., and SHEARD PR., (2006b).** Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 2. Effects on properties of fat and processing characteristics of bacon and frankfurter-style sausages. *Meat Science*, 73, 166–177.
- THOMPSON H., ZHU Z., BANNI S., DARCY K., LOFTUS T., and IP C., (1997).** Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.*, 57, 5067-5072.
- THOMPSON LU., and RAE A., (1983).** Lipid changes in French fries and heated oils during commercial deep frying and their nutritional and toxicological implications. *J. Can. Inst. Food Sci. Tec.*, 16:46-253.
- TIMMS RE and ROUPAS P., (1982).** The Application of Chemiluminescence to Study of the Oxidation of Oils and Fats, *Lebensm.-Wiss. Technol.* 15, 372–377.
- TOPALLAR H., BAYRAK Y., and ISCAN M., (1997).** A Kinetic Study on the Autoxidation of Sunflower seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1323–1327.
- TUREK JJ., LI Y., SCHOENLEIN IA., ALLEN KGD., and WATKINS BA., (1998).** Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio. *J. Nutr. Biochem.*, 9, 258-266.
- ULU H., (2004).** Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. *Meat Sci.* 67(4): 683–687.
- UZZAN A., (1992).** Olive et huile d'olive. In : Manuel des corps gras. Edition : Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp : 221-228.
- VALERA G., BENDER AK., and MORTON ID., (1988).** Frying of Food: Principles, Changes, New Approaches, Ellis Horwood, Chichester.
- VAN de VIJVER LP., KARDINAAL AF., COUET C., ARO A., KAFATOS A., STEINGRIMSDOTTIR L., AMORIM CRUZ JA., MOREIRAS O., BECKER W., VAN AMELSVOORT JM., VIDAL-JESSEL S, SALMINEN I., MOSCHANDREAS J., SIGFUSSON N., MARTINS I., CARBAJAL A., YTTERFORS A., POPPEL G., (2000).** Association between trans fatty acid intake and cardiovascular risk factors in Europe: the TRANSFAIR study. *Eur J Clin Nutr.* 54:126-135.
- VAN KUIJK FJ., HOLTE LL., and DRATZ EA., (1990).** *Biochim. Biophys. Acta* 1043, 116-118
- VAN de VOORT FR., and SEDMAN J., (2000).** FTIR spectroscopy: The next generation of oil analysis methodologies ? *Inform* 11:614–620.
- VAN de VOORT FR, ISMAIL A.A., SEDMAN J., and EMO G., (1994).** Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (3), 243–253.

- VAN de VOORT FR., (1992).** Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.* 25:397–403.
- VAN KUIJK FJ., HOLTE LL., and DRATZ EA., (1990).** *Biochim. Biophys. Acta* 1043, 116–118.
- VARELTZIS K., KOUFIDIS D., GAVRIILIDOU E., PAPAVERGOU E., and VASILIADOU S., (1997).** Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205 93-96.
- VASANTHA RUPASINGHE HP., and YASMIN A., (2010).** Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin. *Molecules*, 15 : 251–257.
- VELASCO J., BERDEAUX O., MARQUEZ-RUIZ J., and DOBARGANES MC., (2002).** Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas–liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 982, 145–152.
- VERLEYEN T., (2002).** Stability of minor components during vegetable oil refining. Applied biological sciences: chemistry. University of Gent. Gant. 277.
- VIDELA LA., RODRIGO R., ARAYA J., and PONIACHIK J., (2004).** Oxidative stress and depletion of hepatic longchain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:1499-1507.
- VIOLA P., and AUDISIO M., (1987).** L’huile d’olive et la santé, Ed : COI Madrid, Espagne.
- VINCKE, W. (1970).** Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm* 72 1084-1096.
- VINAIXA M., VERGARA A., DURAN C., LLOBET C., BADIA C., BREZMES J., VILANOVA X., and CORREIG X., (2005).** Fast detection of rancidity in potato crisps using enoses based on mass spectrometry or gas sensors. *Sensors and Actuators*, 106: 67-75.
- WANGA H., LIUA F., YANGA L., ZUA Y., WANGA H., QUB S., and ZHANGA Y., (2011).** Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, 128 : 93–99
- WANG B., PACE RD., DESSAI AP., BOVELL-BENJAMIN A., and PHILLIPS B., (2002).** Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of Food Science* 67 :2833-2836.
- WARNER K., and ESKIN N., (1995).** Methods to Assess Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods, AOCS Press, Champaign.
- WARNER K., FRANKEL EN, and TL., (1989).** Mounds, Flavor and Oxidative Stability of Soybean, Sunflower and Low Erucic Acid Rapeseed Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:558–564.

WATANABE Y., FANG X., ADACHI S., FUKAMI H., and MATSUNO R., (2004). Oxidation of 6-O-arachidonoyl -ascorbate microencapsulated with a polysaccharide by spray-drying. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 37(4): 395–400.

WARNER K., FRANKEL EN., and MOUNTS TL., (1989). Flavor and Oxidative Stability of Soybean, Sunflower and Low Erucic Acid Rapeseed Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:558–564.

WESSELS H., (1983). Determination of polar compounds in frying fats. *Pure Appl. Chem.* 55: 1381.

WEST DB., DELANY JP., CAMET PM., BLOHM F., TRUETT AA., and SCIMECA J., (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.*, 275, R667-R672.

WHITE PJ., (1991). Methods for Measuring Changes in Deep-fat Frying Oils. *Food Technol.*, 5: 75-80.

WHITTINGHILL JM., NORTON J., and PROCTOR A., (1999). A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Effect of Temperature on Soy Lecithin-Stabilized Emulsions. *JAACS*. 76 (12): 1393-1398.

WIJESUNDERA, (2008). Docosahexaenoic Acid is More Stable to Oxidation when Located at the *sn*-2 Position of Triacylglycerol Compared to *sn*-1(3). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 543-548

WILLEMSSEN LWM., KOETSIER M., BALVERS M., BEERMANN C., STAHL B., and VAN TEA., (2008). Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *Eur.J. Nutr.* 47(4): 183-191.

WINTER BL., YEH SME., and YEH YY., (1994). Linolenic acid provides a source of docosahexaenoic acid for artificially reared rat pups. *J. Nutr.*; 124: 1654–1659.

WOLFF SP., (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology* 233 182-189.

WOOD JD., ENSER M., FISHER AV., NUTE GR., , SHEARD PR., RICHARDSON RI., HUGHES SI., and WHITTINGTON FM., (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78, 343-358.

WOODS VB., and FEARON AM., 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: a review. *Livest. Sci.*, 126:1-20.

WOOD JD., (1984). Fat deposition and the quality of fat tissue in meat animals. In J. Wiseman (Ed.), *Fats in animal nutrition*. London: Butterworths: 407-435.

WONG MW., CHEW BP., WONG TS., HOSICK HL., BOYLSTON TD. and SHULTZ TD., (1997). Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res.*, 17, 987-993.

XIAO M., and OU ZQ., (2005). Research progress of the physiological function and mechanism of two kinds of fatty acid (EPA and DHA) in the fish oil of deep sea. *Food Science*, 26: 522-526.

YAMANE M., (2002). High-performance liquid chromatography-thermospray ionization-mass spectrometry of the oxidation products of polyunsaturated fatty acids. *Anal. Chim. Acta.* 465: 227-236.

YAMAOKA S., URADE R., and KITO M., (1988). Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr*, 118:290-296.

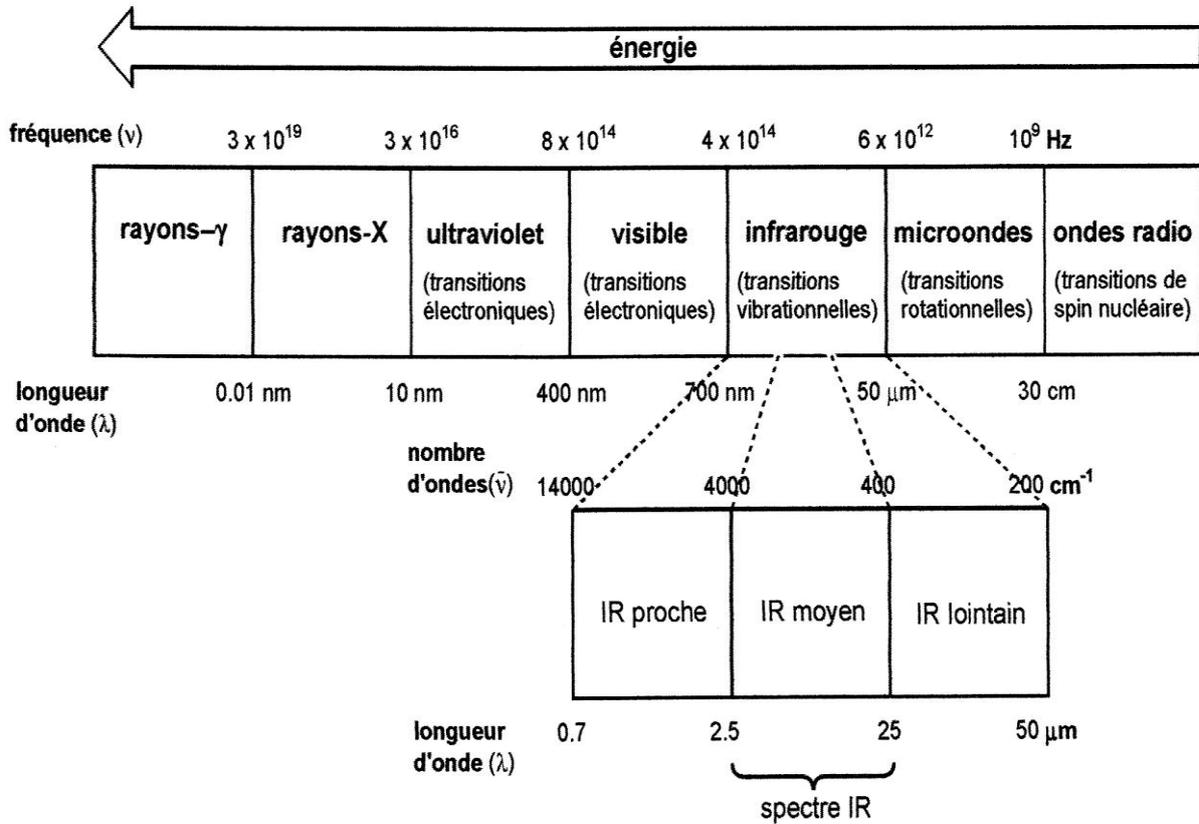
YANG H., IRUDAYARAJ J., and PARADKAR MM., (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*. 93: 25–32.

YANG M., PARIZA MW., and COOK ME., (2000). Dietary conjugated linoleic acid protects against end stage disease of systemic lupus erythematosus in the NZB/W F1 mouse. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 22, 433-449.

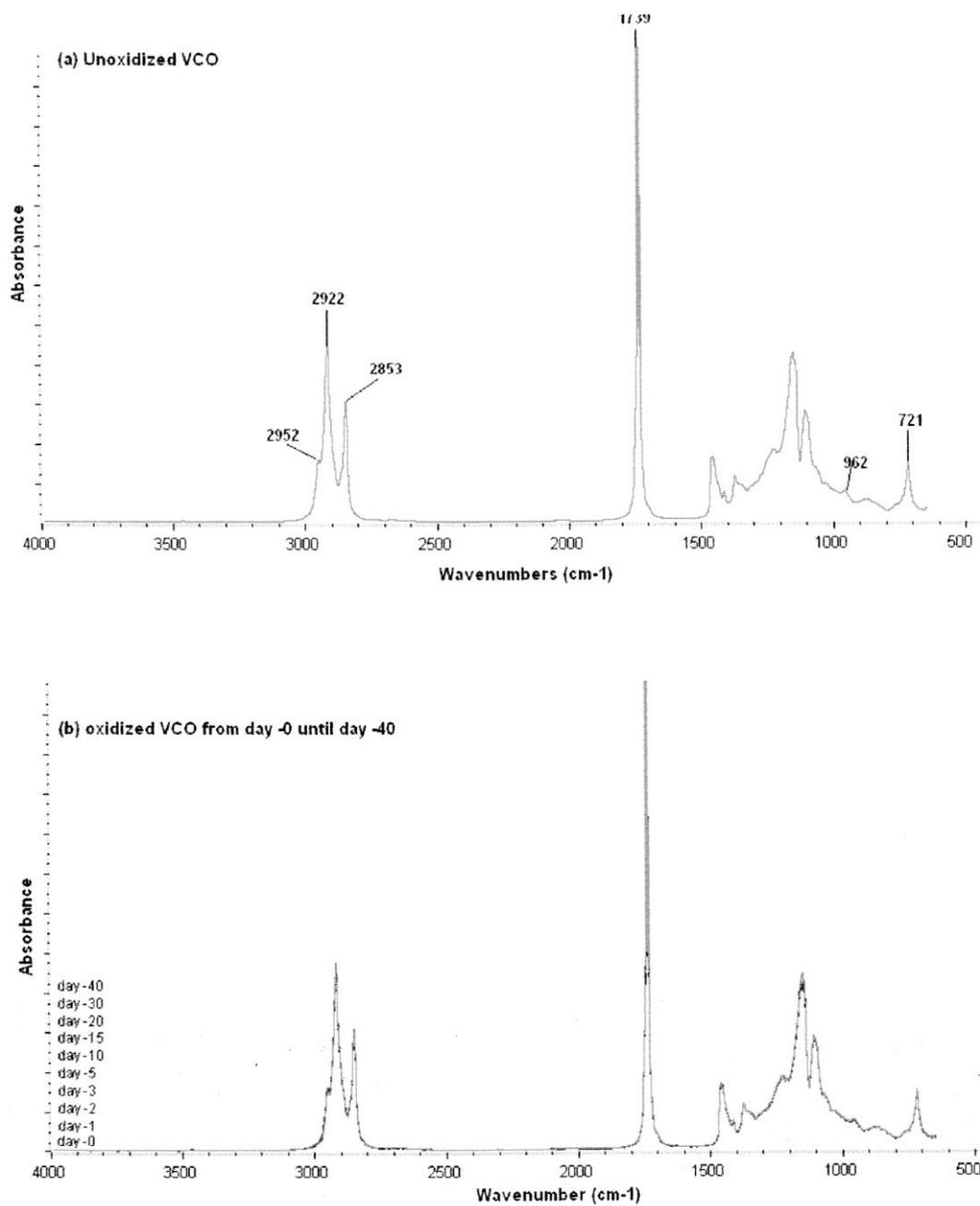
YILDIZ G., WEHLING RL., and CUPPETT SL., (2001). Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (5), 495–502.

ZHANG A., and CHEN Z.Y., (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1611–1613.

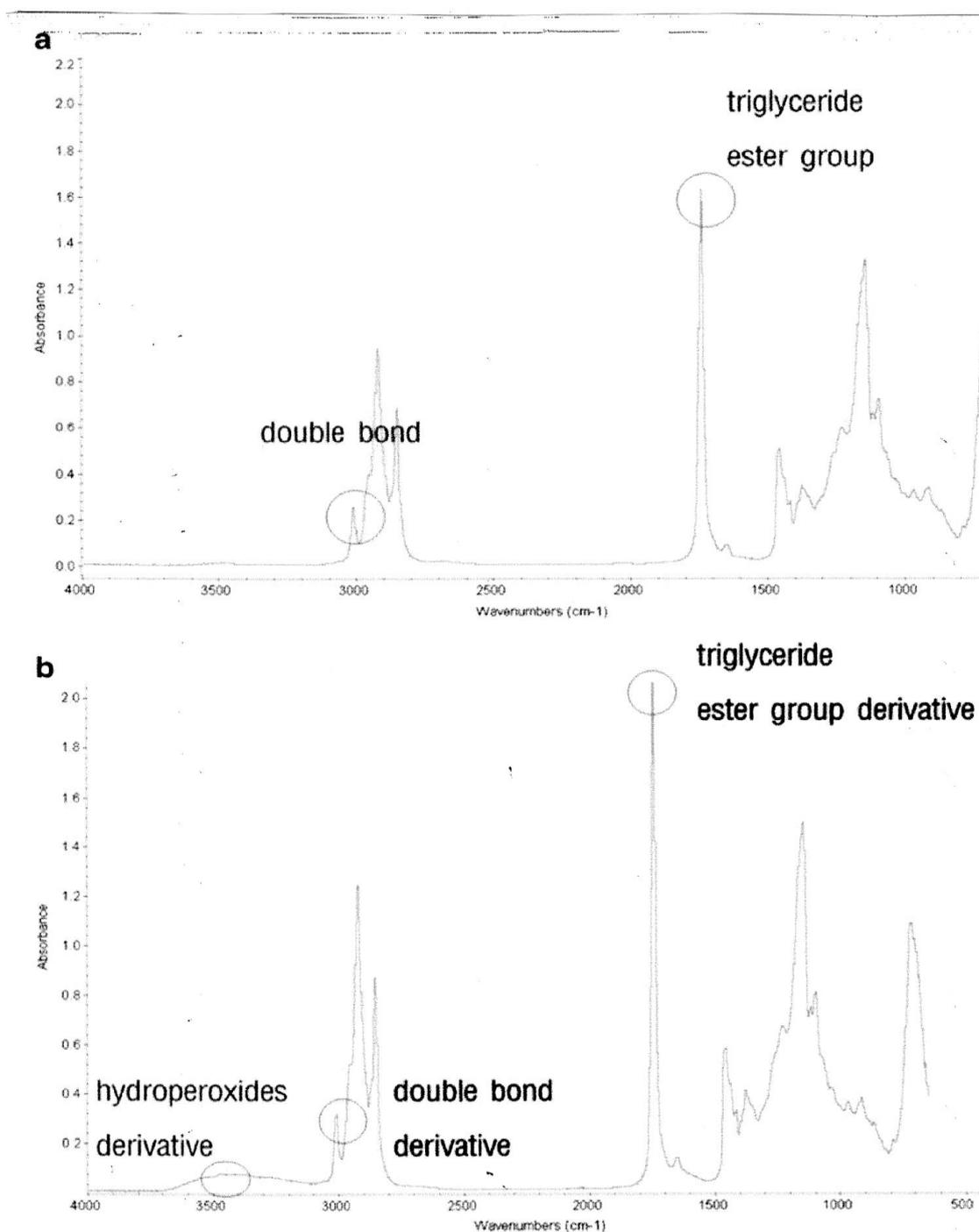
ANNEXES (Figures)



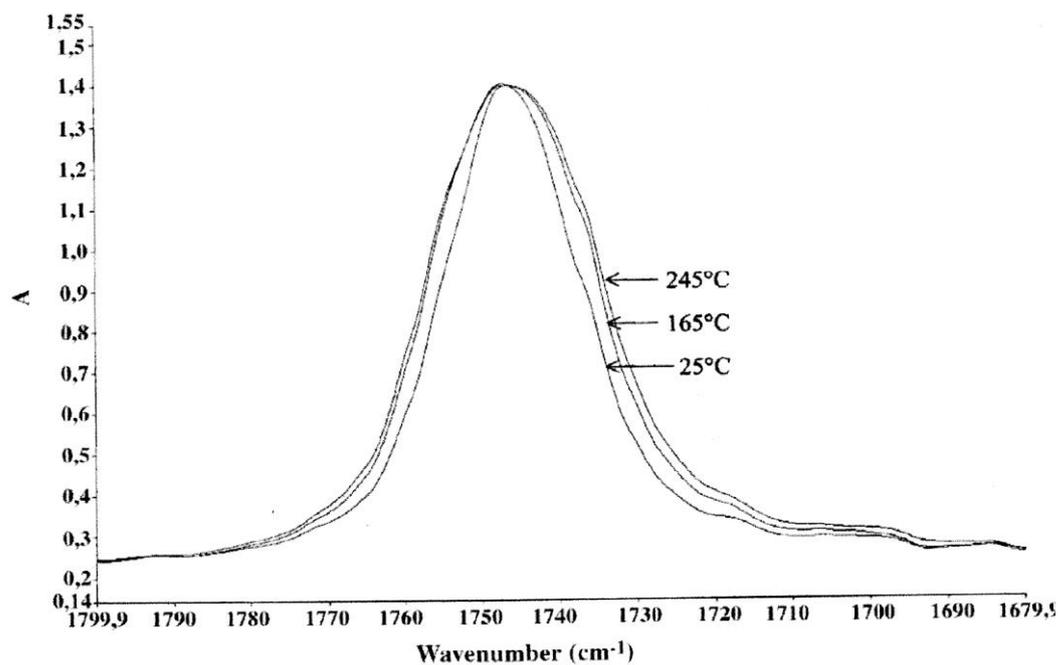
Annexe 1: Spectre électromagnétique



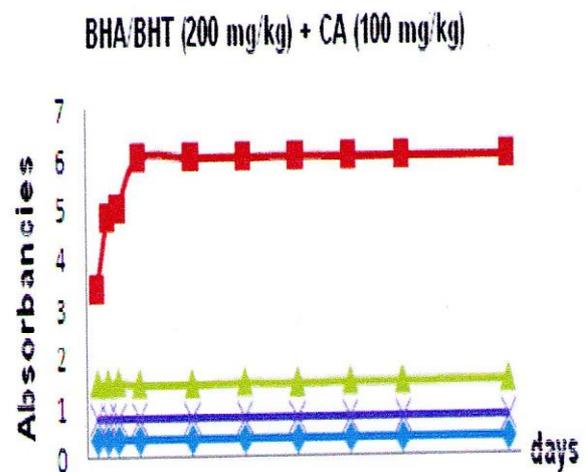
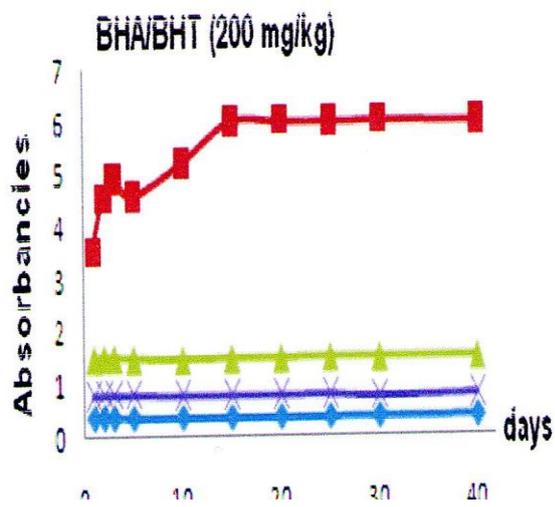
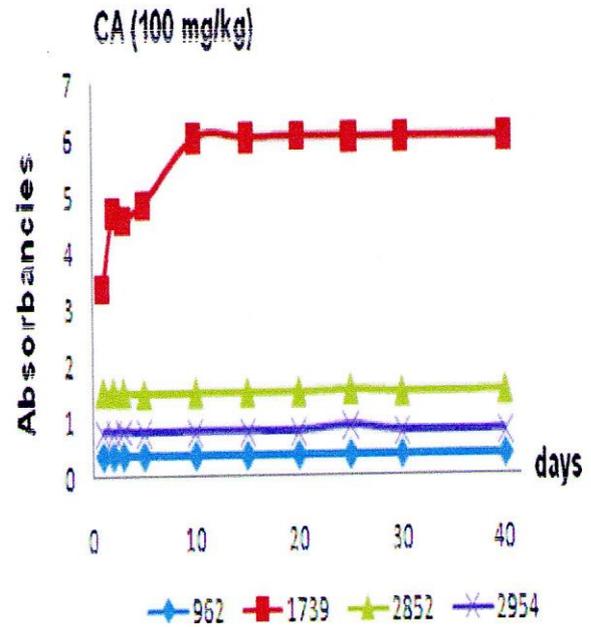
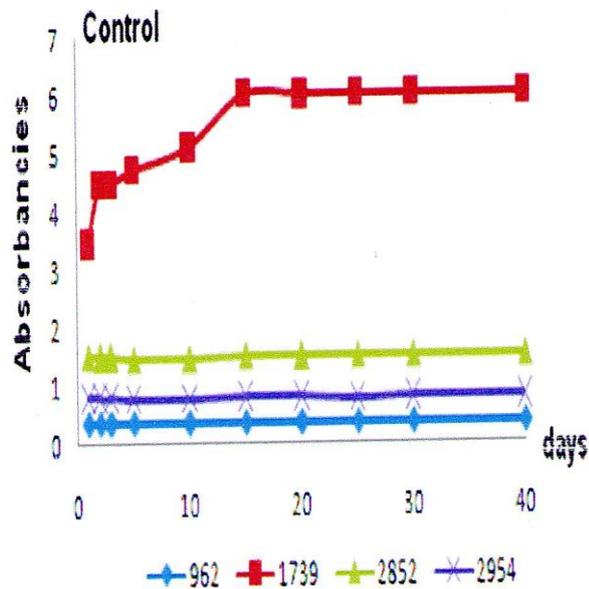
Annexe 2: Spectres IR des huiles de coco vierge fraîche et thermo-oxydée (ROHMAN *et al.*, 2011)



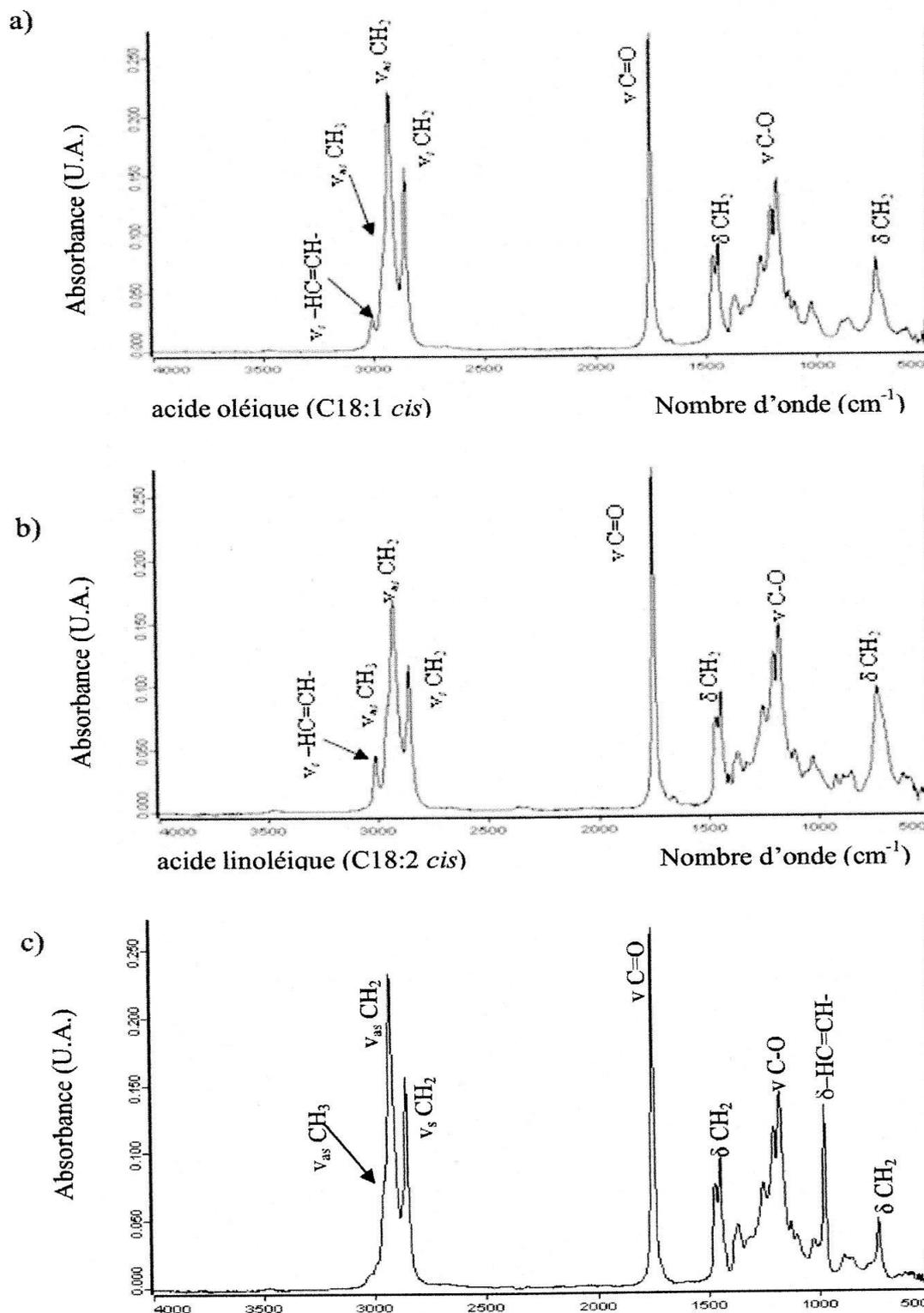
Annexe 3: Spectres FTIR des huiles de poisson fraîche (a) et oxydée (b)
(KLAYPRADIT et KERDPIBOON, 2010)



Annexe 4: Spectres des échantillons d'huiles de maïs chauffés à 165°C et 245°C en comparaison au spectre de cette huile à température ambiante (*PRAMOD KUMAR et al., 2012*)



Annexe 5: Changements de spectre FTIR de l'huile de coco fraîche et après incorporation d'antioxydants (ROHMAN *et al.*, 2011)



Annexe 6 : Spectres MIR enregistrés en ATR : acide oléique (C18:1 *cis*) (a), acide élaïdique (C18:1 *trans*) (b) et acide linoléique (C18:2 *cis*) (c)

ANNEXES

Publication 1

African Journal of Agricultural Research

Full Length Research Paper

Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and histological alteration of rat liver and adipose tissue in development

Sadoudi R.^{1*}, Ammouche A.² and Ali Ahmed D.¹

¹Département d'Agronomie, Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Université de Tizi-Ouzou, Algérie.

²Département de Technologie alimentaire et de Nutrition Humaine, Ecole nationale supérieure agronomique (ENSA, Ex.

INA). Hassen badi, El-Harrach (Alger), Algérie.

Accepted 14 June, 2013

The effect of ingestion of thermoxidized sunflower oil (TOS) on fatty acids composition and histological alteration was investigated in rats. The animals were divided into 2 groups, the first group fed on fresh sunflower oil (FSO) diet and a second group fed on TOS diet during 9 weeks. This oil was heated at $99 \pm 2^\circ\text{C}$ with incorporation of 9 L of oxygen/second during 52 h continuously. Changes that occurred in oil fatty acid composition were similar to those found in tissues (liver and adipose tissue) of rat, nourished with oxidized oil. Indeed, our results showed a change in the tissues profile of the fatty-acids; the rates of saturated and monounsaturated fatty-acids increased with the detriment of the linoleic acid and its higher derivative, arachidonic acid. Thus, the total unsaturation of the tissues lipids decreased. In addition, unlike linoleic acid, the palmitic acid is converted into C16:1 n-7. Probably, this was due to the activation of $\Delta 9$ -desaturase and the reduction of the $\Delta 6$ - and $\Delta 5$ -desaturases by the generated products in thermoxidized sunflower oil. Microscopic examination of the test group showed a significant histological change, when compared with the control, such as increase in cell size.

Key words: Thermoxidized sunflower oil, rat, fatty acid composition, histology, tissues.

INTRODUCTION

Sunflower oil, derived from the seeds of *Helianthus annuus linnaeus* is the most widely used frying and cooking oil in Algeria. It is considered by some as desirable as olive oil. In our study, sunflower oil was selected due to its high use in food as it is a rich source of linoleic acid (essential fatty-acid). Furthermore, it is light in taste and appearance and has a high vitamin E content (Shahidi et al., 1992). Lastly, this oil contains more vitamin E than any other vegetable oil. Although the high level of unsaturation of fatty acids (FA) contained in vegetable oils is appreciated by nutritionists, it causes severe technological problems, because of their high susceptibility to oxidation. The fats oxidation degrades the organoleptic quality of food, reduces its nutritional value. Moreover, products of the oxidation processes can contribute in the aging of an organism and in the aetiology of cardiovascular diseases and cancer (Yoshikawa et al., 2000). Indeed, at high temperature in the presence of air, many chemical reactions are able to be observed in

oil: hydrolysis, polymerization, oxidation and isomerization (Rossell, 2001). Thus, new and unstable compounds potentially toxic at low concentrations may be generated after destroy of the linoleic acid (C18:2 n-6) (Nawar, 1996; Min and Boff, 2001).

*Corresponding author. E-mail: Sadoudirab@yahoo.fr. Tel : 213 93 27 79 73. 3108 Afr. J. Agric. Res.

The safety of thermally-abused fats and oils that are destined for human and animal consumption has been the subject of research over many years. Feeding oxidized lipids to different species can engender wide variety of symptoms including appetite reduction, growth of depression, diarrhea, histological changes in tissues and even death (Izaki et al., 1984). Jimoh and Odutuga (2004) had studied the effect of ingestion of dietary oxidized groundnut oil on the histology of *Wistar* rat brain (cerebral cortex), liver, and kidney. These

authors showed mild to severe distortion of the normal architecture in animals fed with replenished and not replenished thermoxidized groundnut oil, respectively. There is limited information on the effect of other dietary oxidized oils on the histology of other tissues. In this study, therefore, we have investigated histological changes in the liver and adipose tissue due to dietary thermoxidized sunflower oil (TOS) ingestion by growing *Wistar* rats. The objective of this project is double. After evaluating the deterioration level of sunflower oil submitted at the thermoxidative treatment (in the absence of foodstuff), we studied the effect of consumption of this oil on tissues FA composition and histological alteration.

MATERIALS AND METHODS

In our study, the oxidation of the sunflower oil was carried out according to the laboratory technical developed by Drozdowski and Szukalska (1987), and modified by Blanc-Gondardmary et al. (1989). Sunflower oil was selected due to its high use in food as it is a rich source of linoleic acid. Moreover, thanks to its high unsaturation degree, it can easily undergo rancidity (Shahidi et al., 1992). The sunflower oil was heated at $99 \pm 2^\circ\text{C}$ with incorporation of 9 liters of oxygen/second during 52 h continuously. The oil oxidation degree was monitored through several physicochemical analysis. Following parameters were studied: free-fatty acid (FFA) contents, peroxide value (PV), refractive index (RI), humidity, iodine value (IV), saponification value (SV) density (AOCS, 1989) and fatty acid (FA) composition (AOAC, 1999).

Animals, experimental protocol and diets

Male *Wistar* rats ($n = 10$) were obtained at the age of 3 weeks from the Pasteur institute (Kouba, Algeria). They were housed at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ with $60 \pm 20\%$ relative humidity, with a 12 h light-dark cycle, and fed with a commercial non purified diet for 4 weeks. After acclimation to the housing conditions, rats were allotted to two groups of 5 animals each. Rats received a diet which was supplemented with (5 /100 g) fresh sunflower oil (FSO) for (control group) or TOS for (test group). Each group was fed for 9 consecutive weeks. All diets were prepared once per week and stored at $+4^\circ\text{C}$ until needed. The composition by weight as percent of total was: sucrose 21.94; com starch 44.9; casein 20; DL-Methionine 0.16; agar-agar 2; vitamin mixture 2; salt mixture 4, and fat 5. Every morning, fresh portions sufficient for 1 day supply were fed to the animals. Each rat was fed 25 g/day (one rat per cage) of the experimental diet. Then, rats were maintained in cages with free access to water and the experimental diets until they were killed. After 6 weeks of receiving their respective diets (9 week old animals), the rats (food deprived for 24 h) were sacrificed and the liver and adipose tissue were rapidly dissected as previously described by Winter et al. (1994). It has established that, the liver detoxifies a large number of lipid oxidation products by a complex series of chemical reactions. Mitchell and Petersen (1989) showed that, rat hepatic microsomal aldehyde dehydrogenase (ALDH) may serve a biological role for detoxification of reactive aldehydes produced by lipid peroxidation of microsomal membranes. Hodson et al. (2008) suggested that, adipose tissue is a suitable

biomarker of dietary fatty acid intake. Ideally, adipose tissue and dietary questionnaires should complement, rather than substitute for each other in epidemiologic studies. Extraction of total lipids from the tissues was carried out following the method of Folch et al. (1957) modified by Pollet et al. (1978). The lipids were then methylated following the method of Morrisson and Smith (1964). For histological study, permanent preparations using routine methods were made. The livers and adipose tissues were fixed in 10% buffered formalin (10 ml formalin in 100 ml normal saline). Sections were cut at $5 \mu\text{m}$ on a rotator microtome. They were flattened on warm water and mounted onto albuminized slides and dried overnight. The sections were dewaxed in xylene and hydrated through descending grades of ethanol to water. They were initially stained in Harris haematoxylin and differentiated in acid alcohol and thereafter stained with methylene blue. Then, they were dehydrated in 95% alcohol, stained in 10% alcohol eosin, dehydrated in absolute alcohol, cleaned in xylene and mounted in Canada balsam. The resulting slides are then viewed under the light microscope.

Statistical analysis

Statistical comparison between the tissues' fatty acids contents were performed using Student's *t*-test, with $P < 0.05$ considered significantly different.

RESULTS AND DISCUSSION

From the results of various investigated parameters, we concluded that, the treatment applied in our study caused a high level of deterioration to this oil (Table 1). FFA content, AV, PV, density and moisture of the TOS increased significantly ($p = 0.000$); the IV and SV were found to decrease significantly ($p = 0.000$); lastly the RI remained constant ($p = 0.475$). All of these modifications conferred a thick texture and faded flavor to the thermoxidized sunflower oil. In addition, this applied treatment had an adverse effect on the quantitative FA composition of this oil. The most significant effects were on C18:2 n-6, C18:1 n-9 and palmitic acid (C16:0) contents. A decrease in linoleic acid ($p = 0.000$) and an increase in oleic acid ($p = 0.006$) were noted in TOS. It engendered an increase in the oleic acid to linoleic acid ratio (O/L), indicating a preferential use of C18:2 n-6 in oxidation reactions. Decrease of linoleic acid content is used as an indicator of lipid oxidation (Maniak et al., 2009). Our results corroborate those obtained by Morgado et al. (1999). Oxidation of the oils or fats destroys essential fatty acids and produces toxic compounds and oxidized polymers. Thus, oxidation is very important in terms of palatability, nutritional quality

Sadoudi et al. 3109

Table 1. Physico-chemical properties of fresh and TSO.

Characteristic	Fresh oil	Thermodioxidized oil
Physical state at room temperature	Fluid	Thick
texture, flavor	texture, flavor faded	
Peroxide value (meq/Kg)	5.83 ± 0.76	152.5 ± 5.33
Acid value (mg KOH/g)	0.182 ± 0.04	2.51 ± 0.11
Free Fatty Acids (%)	0.093 ± 0.02	1.25 ± 0.07
Iodine value (g I/100g)	125.84 ± 1.59	80.51 ± 1.37
Saponification value (mg KOH/g)	192.60 ± 2.91	183.79 ± 1.32
Refraction index	1.461 ± 0.037	1.476 ± 0.023
Density at 20°C (g/ml)	0.910 ± 0.018	0.985 ± 0.010
Moisture (%)	0.100 ± 0.012	2.006 ± 0.221
C16 :0 content (%)	6.14 ± 0.451	9.48 ± 0.367
C18 :1 n-9 content (%)	33.500 ± 2.317	46.040 ± 3.939
C18 :2 n-6 content (%)	58.140 ± 2.475	40.590 ± 0.829

Values are mean ± standard deviation of triplicate determinations.

and toxicity of edible oils (Kamal-Eldin et al., 2003). The effect of feeding TOS on the FA composition of rat tissues was also investigated. Significant decreases ($p = 0.001$ and $p = 0.000$) in total polyunsaturated FA (PUFA) of neutral lipids of liver and adipose tissue were observed between the two groups; however, total saturated FA (SFA) and monounsaturated FA (MUFA) increased even slightly ($p > 0.05$) (Table 2). Nevertheless, high changes were observed in the proportions of principally SFA and MUFA (palmitic and oleic acids) in both tissues. C16:0 was more abundant than C18:0. The content of C18:1 n-9 increased significantly ($p = 0.000$) in neutral lipids of liver, while in adipose tissue it remained constant ($p = 0.205$). Oleic acid is formed from stearic acid by the enzyme stearoyl Co-A desaturase, a major lipogenic enzyme. Reduction of PUFA, particularly linoleic acid and an increase in oleic acid led to an increase O/L ratio in both lipids tissues of rat that was nourished with thermoxidized sunflower oil. Lastly, a very significant increase ($p < 0.05$) in the proportion of palmitoleic acid (C16:1 n-7 not detected in oils incorporated to diet) was observed in neutral lipids of both tissues analysed in rats fed TSO compared with control group, as well as a decrease in PUFA like arachidonic acid, long chain products of linoleic acid. These PUFA are indispensables for physiological functions; they are metabolized to produce bioactive substances called eicosanoids (Russo, 2009). The results are consistent with the concept that, heating PUFAs causes a greater degree

of lipid peroxidation than heating SFA or MUFA. The tissue content in FA depends on the lipids proportion contained in the diets; it is likely that tissue FA compositions of rats fed on FSO would differ more substantially from those of rats fed on the thermoxidized sunflower oil. Indeed, chronic consumption of TOS diet by rats has been observed to cause modification in tissues FA composition. Comparatively to rats nourished with fresh sunflower oil, all tissues of rats feeding diet containing oxidized sunflower oil showed a significant increase in MUFA and a reduction in total PUFA contents, particularly linoleic acid. The lower tissues' content in linoleic acid of the rat that was nourished with oxidized oil was caused by a diet containing a lower ratio of oxidized oil. One possible reason may explain the limited accumulation of linoleic and arachidonic acids in both tissues. Indeed, C18:2 n-6 was readily oxidized during thermoxidative treatment. Thus, the total unsaturation of tissue-lipid fractions was significantly decreased in adipose tissue ($p = 0.001$) and liver ($p = 0.000$) of rats fed this TOS containing diet. Indeed, Wood et al. (2008) suggested that, linoleic acid derive entirely from the diet. It passes through the pig's stomach unchanged and is then absorbed into the blood stream in the small intestine and incorporated from there into tissues. Two clear trends emerge from the present study. It is apparent that, the TOS suppressed the formation of arachidonic acid in both tissues and increased the conversion of C16:0 to C16:1 n-7 ($p = 0.038$) in adipose tissue and C18:0 to C18:1 n-9 ($p = 0.000$) in lipids liver of rats fed thermoxidized sunflower oil. Components coming from oxidation of oil may be responsible for the effects. Indeed, reduction in the activity of several enzymes has been reported as one of the consequences of oxidized oil ingestion (Oduyaga et al., 1997; Oduyaga and Ologan, 1999). Conversion of linoleic acid to arachidonic acid equires elongase and desaturase. Decrease in C20:4 n-6 content of both tissues may be due to the suppressive effect of the hazardous constituents of the mally oxidized sunflower oil on enzymatic activity. This was supported by experiments of many authors (Mesembe et al., 2004). Ruiz-Gutierrez and Muriana (1992) suggested that, the heated edible oils deteriorate the activity of the

3110 Afr. J. Agric. Res.

Table 2. Fatty acid composition, as mean% of total fatty acids of neutral lipids extracted from organs of rats fed fresh oil (FO) or (TOS).

Fatty acid	Adipose tissues	Liver
	FO	TOS
C10 : 0	0.80 ± 0.17	ND - 0.25 ± 0.07
	ND -	

C12 : 0 0.16 ± 0.08 0.22 ± 0.14 0.4430 ND 0.20 ± 0.00 -
 C14 : 0 1.74 ± 1.06 2.13 ± 1.29 0.6176 1.44 ± 0.13 2.18 ± 0.31 0.0002
 C15 : 0 ND 0.11 ± 0.10 - ND 0.17 ± 0.00 -
 C16 : 0 27.57 ± 1.93 30.11 ± 1.24 0.0355 25.05 ± 1.20 30.52 ± 0.87 0.0000
 C16 : 1, ω9 0.82 ± 0.26 0.81 ± 0.25 0.9068 0.87 ± 0.10 0.89 ± 0.56 0.7707
 C16 : 1, ω7 6.20 ± 0.84 7.75 ± 1.11 0.0389 4.70 ± 2.38 7.26 ± 0.10 0.0564
 C18 : 0 6.43 ± 0.42 5.41 ± 1.20 0.1129 11.27 ± 0.97 5.68 ± 0.82 0.0000
 C18 : 1, ω9 48.40 ± 2.12 46.72 ± 1.73 0.2057 40.91 ± 1.38 47.77 ± 0.60 0.0000
 C18 : 1, ω7 2.83 ± 0.19 3.50 ± 0.96 0.1684 2.87 ± 0.64 3.16 ± 0.02 0.3636
 C18 : 2, ω6 4.98 ± 1.33 2.27 ± 0.48 0.0026 7.44 ± 1.48 0.99 ± 0.00 0.0000
 C18 : 3, ω3 ND ND - 0.26 ± 0.11 ND -
 C20 : 0 0.10 ± 0.10 0.10 ± 0.01 0.8610 ND ND -
 C20 : 1, ω9 0.16 ± 0.15 0.55 ± 0.19 0.0079 0.14 ± 0.07 0.99 ± 0.04 0.0000
 C20 : 4, ω6 0.25 ± 0.05 ND - 4.09 ± 0.86 ND -
 C20 : 3, ω3 ND ND - ND ND -
 C20 : 5, ω3 ND ND - 0.19 ± 0.04 ND -
 C22 : 0 ND ND - ND ND -
 C22 : 4, ω6 ND ND - ND ND -
 ΣAGS 36.20 ± 2.67 38.15 ± 3.08 0.5004 38.22 ± 0.66 38.83 ± 0.67 0.1380
 ΣAGMI 58.41 ± 2.22 59.33 ± 3.28 0.6262 49.63 ± 2.44 60.08 ± 0.02 0.0000
 ΣAGPI 5.41 ± 1.33 2.55 ± 0.48 0.0017 12.59 ± 2.26 1.09 ± 0.00 0.0000
 Values are mean ± standard deviation of five determinations.

desaturases in the hepatic microsomes. Products of oxidation and isomerization of the linoleic acid inhibit metabolism of essential FA by reducing the activities of Δ6-désaturase and Δ5-désaturase. However, the activity of Δ9-désaturase was promoted, other possible reasons may explain the limited accumulation of PUFA observed in our study. Otherwise, these products may be responsible for the severe alterations in hepatocytes and adipose cells of rats fed oxidized sunflower oil diet. Indeed, for the histological examination, the results indicate that, structural abnormalities had occurred in the rats that were fed with TSO. The livers and adipose tissues from rats that fed on the TSO diet had different histological characteristics as those fed with the FSO diet, such as increase in cell size. Histological examination of thick sections of liver specimens showed that liver cells were swollen. The liver showed widening of the liver sinusoids (Figures 1 and 2). Hepatocytes showed large and spherical nuclei that were centrally located, with one or two prominent nucleolus (Figure 3). Adipose cells had nuclei that migrated to the cell periphery (Figure 4); the cell membrane was destroyed (Figure 5).

Consumption of peroxidized lipids has been shown to be injurious to health (Frankel, 1980; Kubow, 1992). There is a paucity of information on this aspect. Jimoh and Odutuga (2004) showed disintegration of alveoli membrane and collapse of alveoli spaces in the lungs of rats fed oxidized groundnut oil. These authors also showed disorganization of the spatial arrangement of the heart cells which might lead to weakness of the cardiac muscle which may consequently lead to cardiac failure. This same authors (Jimoh and Odutuga, 2004) showed structural abnormalities in brain (cerebral cortex), liver, and kidney in animals fed with same the moxidized groundnut oil. The liver showed mild to severe distortion of the normal architecture, as well as prominence and widening of the liver sinusoids.

Conclusion

The aimed of this study is to, first, determine the physical and chemical characteristics of TSO. Second, show the

effects that come out from feeding diet containing this heated oil on the FA composition and histopathology of rat tissues (liver and adipose tissue). Results obtained showed a high loss in linoleic acid of oxidized oil and modification of FA composition of both tissues analyzed. The decrease in total PUFA observed in these tissues was in agreement with the observed increase in total SFA and MUFA.

Figure 1. Photomicrograph of liver tissues of rats fed fresh sunflower oil containing diet (x 1000).

Figure 2. Photomicrograph of liver tissues of rats fed thermoxidized sunflower oil containing diet (x 1000).

Sadoudi et al. 3111

Figure 3. Photomicrograph of liver hepatocyte of rats fed TSO containing Diets (x 1000).

Figure 4. Photomicrograph of adipose cell with migrated nuclei in rats fed TSO containing diet (x 1000).

3112 Afr. J. Agric. Res.

Figure 5. Photomicrograph showed destroyed membrane of adipose cell in rats fed TSO containing diet (x 1000).

Liver and adipose tissue histology were adversely affected by the inclusion of TSO. Hypertrophy of cells and cores have been observed in rats fed with TSO. If the results are applicable to man, they suggest that, there is reason for concern regarding adverse biochemical and histological consequences that comes out from a chronic consumption of the thermally oxidized sunflower oil diets, what may be dangerous to health since may engender an inactivation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases and a liver damage. Therefore, eating a lot of fried foods is not a good idea. If a food is to be fried, one should use as few amount of oil as possible.

REFERENCES

- AOAC (1999). Official Methods of Analysis (16th ed) International, Gaithersburg.
- AOCS (1989). Official and Recommended Practices of the American oil Chemists Society (5th ed) Champaign, IL. pp. 48-62.
- Blanc-Gondard Mary P, Revol A, Pacheco H (1989). Chronical ingestion of oxidized oil in young rat. Effect on lipid composition and cytidyl transferase activity. Biomembranes et nutrition, colloque INSERM, Paris, Nutriments affectant la composition lipidique et les propriétés des membranes cellulaires. Insem (eds), 195:481.
- Drozdowski B, Szukalska EA (1987). Rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. J. Am. Oil. Chem. Soc. 64:1008-1011.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.
- Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. Prog. Lipid Res. 47:348-380.
- Izaki Y, Yoshikawa S, Uchiyama M (1984). Effect of ingestion of the thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. Lipids 19:324-331.
- Jimoh FO, Odutuga AA (2004). Histological changes of selected rat tissues following the ingestion of the thermally oxidized groundnut oil. BIOKEMIS TRI 16:1-10.
- Kamal-Eldin A, Mäkinen M, Lampi A (2003). The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism. In Kamal-Eldin A (eds) Lipid Oxidation Pathways, Champaign Illinois, AOCS Press. pp. 1-35.
- Maniak B, Szmigielski M, Piekarski W, Markowsha A (2009). Physicochemical changes of post-frying sunflower oil. Int. Agro-Phys. 23:243-248.
- Mesembe OE, Ibang I, Osim EE (2004). The effects of fresh and thermoxidized palm oil diets. Niger. J. Physiol. Sci. 19:86-91.
- Min DB, Boff JF (2001). Lipid oxidation of edible oil. In C Akoh, DB Min (eds) Food lipids, New York, Marcel Dekker. pp. 335-363.
- Mitchell DY, Peterson DR (1989). Oxidation of aldehydic products of

- lipid peroxidation by rat liver microsomal aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 269:11-17.
- Morgado N, Sanhueza J, Galleguillos A, Garrido A, Nieto S, Valenzuela A (1999). Effet de l'huile de poisson hydrogénée sur le profil des lipoprotéines plasmatiques et sur la composition en acides gras des différents tissus du rat. *Annales de la nutrition et le métabolisme.* 43:310-318.
- Morrisson W, Smith L (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.* 5:600-608.
- Nawar WW (1996). *Lipids OR.* In Fennema (eds) *Food chemistry* (3rd ed), New York, Marcel Dekker. pp. 225-319.
- Odutuga AA, Obaleye JA, Ologan FO (1997). The oxidized soybean oil: Spectroscopic investigation and effects on selected rat tissues. *Biokemistri* 1:45-58.
- Odutuga AA, Ologan FO (1999). Effect of the mally oxidized soybean oil on alkaline and acid phosphatases in rat liver and serum. *Biosci. Res. Commun.* 11:281-285.
- Pollet S, Ermidou S, LeSaux F, Monge M, Baumann N (1978). Microanalysis of brain lipids: Multiple two dimensional thin-layer chromatography. *J. Lipid. Res.* 19:916-921.
- Rossell JB (2001). *Frying. Improving quality.* In JB Rossell (eds) Cambridge England, Woodhead Publishing Limited. P. 369.
- Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJG (1992). Effect of ingestion of the mally oxidized frying oil on desaturase activities and fluidity in rat-liver microsomes. *J. Nutr. Biochim.* 3:75-79.
- Russo GL (2009). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* 77:937-946.
- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992). Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32:67-103.
- Winter BL, Yeh SME, Yeh YY (1994). Linolenic acid provides a source of docosahexaenoic acid for artificially reared rat pups. *J. Nutr.* 124:1654-1659.
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality. *A Rev. Meat Sci.* 78:343-358.
- Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y (2000). Free radicals in Chemistry Biology and Medicine, OICE International, Saint Lucin, London. P. 580.