



**HAL**  
open science

**Enrichissement d'huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés, par des composés phénoliques d'origine naturelle, afin de les protéger de la peroxydation lipidique, en vue d'une encapsulation pour augmenter la durée de conservation de ces huiles**

Aurélien Dagmey

► **To cite this version:**

Aurélien Dagmey. Enrichissement d'huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés, par des composés phénoliques d'origine naturelle, afin de les protéger de la peroxydation lipidique, en vue d'une encapsulation pour augmenter la durée de conservation de ces huiles. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2020. Français. NNT : 2020COMP2553 . tel-03178353

**HAL Id: tel-03178353**

**<https://theses.hal.science/tel-03178353v1>**

Submitted on 23 Mar 2021

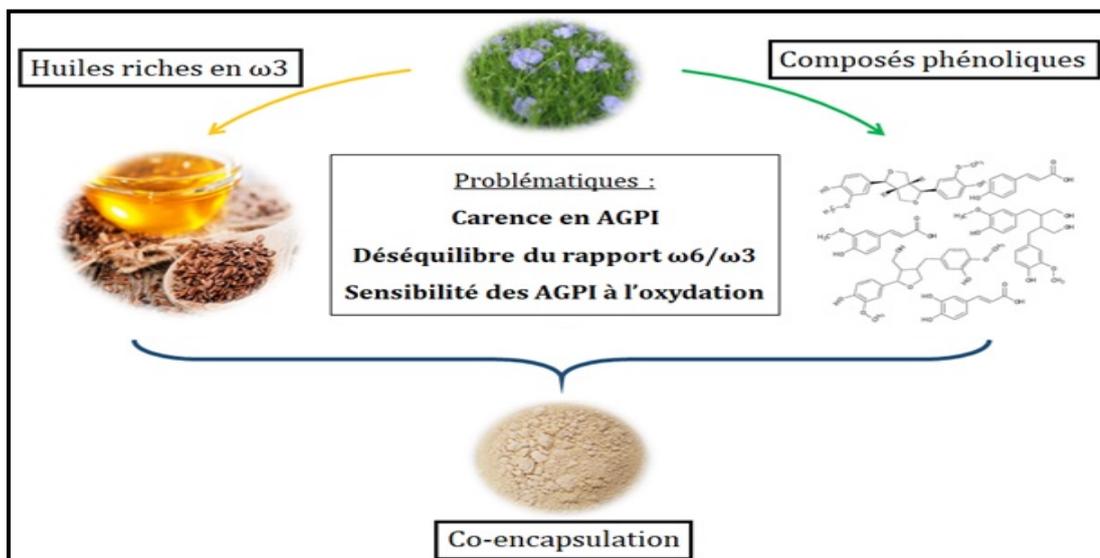
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par Aurélien DAGMEY

*Enrichissement d'huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés, par des composés phénoliques d'origine naturelle, afin de les protéger de la peroxydation lipidique, en vue d'une encapsulation pour augmenter la durée de conservation de ces huiles*

Thèse présentée  
pour l'obtention du grade  
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 10 juillet 2020

**Spécialité :** Biotechnologie : Unité de recherche Génie Enzymatique et Cellulaire - GEC (UMR-7025)

D2553

# **Université de Technologie de Compiègne**

## **Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne**

Ecole Doctorale : Sciences Pour l'Ingénieur (ED 71)

Spécialité : Biotechnologie

**Par Aurélien DAGMEY**

**Enrichissement d'huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés, par des composés phénoliques d'origine naturelle, afin de les protéger de la peroxydation lipidique, en vue d'une encapsulation pour augmenter la durée de conservation de ces huiles**

Soutenue publiquement le 10 juillet 2020 devant le jury composé de :

Pr. Michel LINDER, Université de Lorraine, Nancy, France	(Rapporteur)
Dr. Jérôme LECOMTE, CIRAD – Montpellier, France	(Rapporteur)
Dr. Brigitte THOMASSET, DR CNRS, UT de Compiègne, France	(Présidente de jury)
Pr. Marie-Noëlle MAILLARD, AgroParisTech, Massy, France	(Examinatrice)
Dr. Sandrine MORANDAT, UT de Compiègne, France	(Directrice de thèse)
Dr. Jérôme LE NOTRE, SAS PIVERT, France	(membre invité)

## Résumé en Français :

Les acides linoléique (LA) et  $\alpha$ -linoléique (ALA) sont deux acides gras polyinsaturés. Ils sont indispensables à l'Homme car nous sommes incapables de les synthétiser *in situ*. Ces deux acides gras sont les représentants des oméga-6 (LA) et oméga-3 (ALA). Bien qu'ils soient indispensables et donc nécessaires, l'enjeu du *ratio* oméga-6/oméga-3 entre ces deux familles est également important à prendre en compte dans l'alimentation. Les habitudes de consommation des Français, ces trente dernières années, ont fait évoluer la balance en défaveur des oméga-3 par rapport aux oméga-6. Or un rééquilibrage de la balance oméga-6/oméga-3 tend à diminuer les risques cardiovasculaires. Les huiles de lin et de cameline sont des cultures endémiques en France extrêmement riches en ALA. Elles sont les plus adaptées à une complémentation en oméga-3 d'origine végétale.

Cependant, les hautes teneurs en acides gras polyinsaturés de ces huiles sont responsables de leurs faibles stabilités oxydatives. La consommation d'huiles ou de graisses oxydées n'est pas recommandée car elle peut apporter des molécules toxiques. Ainsi l'enjeu de ce projet était d'améliorer la durée de conservation d'huiles riches en acides gras polyinsaturés en valorisant les antioxydants extraits des tourteaux obtenus après trituration des graines. Parmi les molécules étudiées, l'acide gallique, l'acide caféique, le gallate de propyle ainsi que les pinorésinol et laricirésinol purifiées du lin ont montré un réel intérêt pour ralentir l'oxydation, tandis que le sécoisolaricirésinol s'est montré inefficace.

**Key words :** Antioxydants, flaxseed oil, phenolic compounds, sunflower oil, oxydative stability, Rancimat, lignans.

## **Summary in English :**

**Title : Enrichment of edible oils rich in PUFA, with natural phenolic compounds, in order to protect them from lipid peroxidation, with a view to co-encapsulation to increase the shelf life of these oils.**

Linoleic (LA) and  $\alpha$ -linolenic (ALA) acids are two polyunsaturated fatty acids. They are essential for humans because we are unable to synthesize them in situ. These two fatty acids are the representatives of omega-6 (LA) and omega-3 (ALA). Although they are essential and therefore necessary, the issue of the omega-6 / omega-3 ratio between these two families is also important to take into account in the diet. The consumption habits of the French over the past thirty years have shifted the balance against omega-3s compared to omega-6s. Or a rebalancing of the omega-6 / omega-3 balance tends to reduce cardiovascular risks. Linseed and camelina oils are endemic crops in France extremely rich in ALA. They are the most suitable for supplementation with omega-3 of plant origin.

However, the high contents of polyunsaturated fatty acids in these oils are responsible for their low oxidative stabilities. The consumption of oxidized oils or fats is not recommended because they can contribute toxic molecules. The aim of this project was to improve the shelf life of oils rich in polyunsaturated fatty acids by enhancing the antioxidant extracts of the cakes obtained after crushing the seeds. Among the molecules studied, gallic acid, caffeic acid, propyl gallate as well as pinoresinol and lariciresinol purified from flax showed a real interest in slowing down oxidation, while secoisolariciresinol was ineffective.

**Mots clés :** Antioxydants, huile de lin, composés phénoliques, huile de tournesol, stabilité oxydative, Rancimat, lignanes.

*« J'ai appris que la voie du progrès n'était ni rapide ni facile. »*

*Maria Skłodowska-Curie*

## Remerciements

*Ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour sans l'appui de nombreuses personnes à qui je souhaite témoigner toute ma gratitude ici.*

*En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame Sandrine MORANDAT, qui m'a témoigné de sa confiance en me choisissant pour mener à bien ces travaux de recherche, qui a su m'encadrer par ses conseils dispensés, sa rigueur, ses échanges, son expérience et avec qui j'ai, à ses côtés, énormément appris. Je voudrais aussi lui témoigner ma reconnaissance pour sa bienveillance et ses encouragements dans les moments difficiles.*

*Je voudrais remercier l'ensemble des membres du jury et plus particulièrement M. Michel LINDER professeur à l'Université de Lorraine et M. Jérôme LECOMTE maître de conférences au Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Mme Marie-Noëlle MAILLARD professeure à l'école d'ingénieurs AgroParisTech et Mme Brigitte THOMASSET directrice du CNRS à l'Université de Technologie de Compiègne d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse.*

*Je souhaite remercier l'ensemble des collaborateurs du projet CAPSOIL, Mme Nathalie VOUILLON et M. Jérôme Le Nôtre et plus largement la SAS PIVERT pour son soutien financier, M. François MESNARD de l'Université de Picardie Jules Verne d'avoir mis à ma disposition des échantillons dès que j'en avais besoin, M. Karim EL KIRAT, M. Khashayar SALEH et Mme Alla NESTERENKO, encadrants de Lorine Le Priol pour leurs conseils lors des réunions de pilotage du projet, mais également le Service d'Analyses Physicochimiques de l'Université de Technologie de Compiègne et plus particulièrement M. François OUDET pour son engagement lors de nos comités de suivi scientifique.*

*Je remercie Yannick, Sébastien, Adrian, Franck, Luminita, Morgane, Carol et les Valérie(s) ainsi que l'ensemble des membres du laboratoire GEC de l'UTC, personnels permanents comme*

*doctorants et post-doctorants passés ou encore présents, pour leur aide et leur bonne humeur pendant ces années de thèse.*

*Ces remerciements seraient incomplets si je ne m'adressais à l'ensemble des personnes qu'il m'ait été donné de rencontrer au sein de l'UTC, je les remercie pour les bons moments passés ensemble. Et parmi eux Larissa, Laurine, Hélène, Jolanthe, Han, Aurélien, Nesrine, Cédric, Bilal, Florian, Mounir, Félix, Nicolas, Yancie, Lilandra, Grégoire, Lorine, ...*

*Mes remerciements vont enfin à celles et ceux qui me sont les plus chers, ma famille et plus particulièrement ma mère et mes frères et mes amis Ophélie, Guillaume, Doriane, Raquel et tous les autres, sans vous et votre soutien je n'y serais jamais parvenu.*

*Je terminerai par une pensée pour tous ceux qui ne pourront assister à cette soutenance et qui me manquent beaucoup... Ce travail est aussi un peu le vôtre, Henriette, Jean-Jacques mais surtout toi papa. Toi qui as toujours cru en moi et qui m'as toujours soutenu, je te dédie ce travail.*

*Merci à vous tous.*

# Table des matières

Remerciements.....	VI
Liste des abréviations.....	XIV
Liste des figures.....	XVII
Liste des tableaux.....	XXIII
Introduction générale.....	1
Contexte bibliographique.....	4
Chapitre I. Les matières grasses en France.....	4
I.1 La consommation de matières grasses en France.....	4
I.2 Étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA).....	7
I.3 Recommandations nutritionnelles des agences de santé.....	7
I.4 Le rapport oméga-6/oméga-3.....	8
I.5 Effets sur la santé humaine.....	11
I.5.1 Maladies cardiovasculaires.....	11
I.5.2 Cancers.....	12
I.5.3 Réponse inflammatoire.....	12
I.6 L'huile de tournesol et l'huile de lin : deux exemples d'huiles riches en acides gras polyinsaturés.....	13
I.6.1 Généralités.....	14
I.6.2 Composition des huiles et durées de conservation.....	15
I.6.3 L'intérêt économique.....	16

Chapitre II.	Les mécanismes généraux de l'oxydation lipidique.....	18
II.1	L'auto-oxydation .....	18
II.2	La photo-oxydation.....	20
II.3	Aspect cinétique de l'oxydation lipidique.....	22
II.4	Génération des produits primaires de l'oxydation .....	23
II.4.1	Acide gras mono-insaturé.....	23
II.4.2	Acide gras polyinsaturés .....	24
II.5	Dégradation des hydroperoxydes et formation des produits secondaires.....	26
II.6	Les principales méthodes de suivi de l'oxydation des lipides .....	30
Chapitre III.	L'oxydation des huiles insaturées .....	32
III.1	Les facteurs qui vont influencer l'oxydation des huiles .....	32
III.1.1	La composition en acides gras .....	32
III.1.2	Les associations colloïdales dans les huiles brutes.....	32
III.1.3	Les procédés industriels.....	37
III.1.4	La pression partielle en dioxygène .....	37
III.1.5	La température et la luminosité.....	38
III.2	Les moyens de protection des huiles.....	38
III.2.1	Les modes de conservations des huiles .....	38
III.2.2	Les formulations industrielles .....	39
III.2.3	L'ajout d'antioxydants .....	40
Chapitre IV.	Les composés phénoliques .....	41
IV.1	Généralités.....	41
IV.1.1	Les classes de composés phénoliques .....	41

IV.1.2	Modes d'action des composés phénoliques .....	43
IV.1.3	Effets sur la santé humaine d'une consommation d'antioxydants .....	47
IV.2	Les antioxydants en agroalimentaire .....	52
IV.2.1	Réglementations françaises/européennes.....	52
IV.2.2	Les antioxydants d'origine naturelle.....	52
IV.2.3	Les antioxydants synthétiques .....	53
IV.2.4	Le marché des antioxydants .....	53
IV.3	Etude comparative des antioxydants sélectionnés.....	54
IV.3.1	L'α-tocophérol.....	54
IV.3.2	L'acide gallique.....	55
IV.3.3	Le gallate de propyle (E310) .....	56
IV.3.4	Les extraits de thé vert.....	56
IV.3.5	L'acide rosmarinique .....	57
IV.3.6	Le resvératrol.....	57
IV.3.7	La curcumine.....	58
IV.3.8	Le rutoside .....	58
IV.3.9	Les antioxydants du lin .....	59
Chapitre V.	Le projet CAPSOIL.....	61
V.1	La problématique du projet.....	61
V.2	Les objectifs du projet.....	61
V.3	CAPSOIL : un projet pluridisciplinaire .....	62
V.4	Les objectifs de la thèse.....	63
	Matériel et Méthodes.....	64

Chapitre I. Matériel .....	64
I.1 Réactifs et solvants.....	64
I.2 Huiles alimentaires .....	64
I.3 Antioxydants.....	64
Chapitre II. Méthodes.....	66
II.1 Caractérisation des huiles .....	66
II.1.1 Caractérisation par GC-FID .....	66
II.1.2 Caractérisation par LC-HRMS .....	67
II.1.3 Dosage de la vitamine E.....	68
II.2 Méthodes d'addition des antioxydants dans l'huile .....	70
II.2.1 Extraction liquide-liquide des antioxydants par les huiles.....	70
II.2.2 Addition d'antioxydants par solution de propylène glycol et d'éthanol .....	70
II.3 Détermination de la concentration ajoutée en antioxydant dans les huiles .....	71
II.4 Formulation des lots d'huiles enrichies en antioxydants.....	72
II.5 Détermination de la stabilité oxydative des huiles.....	72
II.5.1 Analyse des produits primaires de l'oxydation .....	72
II.5.2 Analyse des produits secondaires de l'oxydation.....	74
II.6 Analyse des paramètres cinétiques.....	79
II.7 Méthode d'analyse statistique.....	80
Résultats .....	81
Chapitre I. Caractérisation des huiles commerciales de lin et de tournesol. ....	81
I.1 Composition des huiles.....	81
I.1.1 Répartition des différentes classes de lipides dans les huiles.....	81

I.1.1	Composition en acides gras.....	82
I.1.2	Teneur en vitamine E.....	86
I.2	Stabilité oxydative des huiles commerciales.....	86
I.3	Conclusion.....	92
Chapitre II.	Mise au point de l'enrichissement des huiles en antioxydants.....	94
II.1	Choix du solvant pour enrichir les huiles en antioxydants .....	94
II.1.1	Extraction des antioxydants par les huiles.....	95
II.1.2	Bilan de l'enrichissement en antioxydant des huiles par solution aqueuse .....	106
II.1.3	Enrichissement par ajout des antioxydants en solution de propylène glycol et d'éthanol.....	107
II.1.4	Bilan sur le choix du solvant pour l'enrichissement des huiles .....	115
II.2	Etude du stockage des huiles enrichies en antioxydants par solution de propylène glycol et éthanol.....	115
II.2.1	Enrichissement des huiles en acide gallique.....	116
II.2.2	Enrichissement des huiles en $\alpha$ -tocophérol.....	124
II.2.3	Bilan sur l'enrichissement des huiles en conditions de stockage .....	127
II.3	Conclusion.....	128
Chapitre III.	Sélection de nouvelles molécules anti-oxydantes naturelles pour la protection des huiles.....	130
III.1	Antioxydants naturels commerciaux.....	131
III.2	Antioxydants purifiés de la graine de lin.....	133
III.2.1	Les acides hydroxycinnamiques .....	134

III.2.2	Les lignanes et les flavonoïdes.....	135
III.3	Bilan de la sélection des antioxydants.....	137
III.4	Activité anti-oxydante dans l'huile de lin, des molécules sélectionnées.....	140
III.4.1	Analyse des produits primaires de l'oxydation .....	141
III.4.2	Analyse des produits secondaires de l'oxydation.....	144
III.5	Bilan et conclusion sur l'enrichissement de l'huile de lin par les molécules sélectionnées.....	148
Chapitre IV.	Co-encapsulation de molécules anti-oxydantes et d'huiles polyinsaturées..	150
IV.1	Conditions de formation des poudres .....	150
IV.2	Stabilité oxydative des huiles microencapsulées en présence d'antioxydants .....	152
IV.2.1	Stabilité oxydative et cinétiques de vieillissement .....	152
IV.2.2	Application de la formulation à la protection de l'huile de lin .....	153
Discussion	.....	155
Perspectives	.....	169
Communications scientifiques	.....	173
Bibliographie	.....	174
ANNEXES	.....	189

# Liste des abréviations

## A

AA : acide arachidonique (*Arachidonic acid*)

AC : acide caféique

Acétyl-COA : acétyl-coenzyme A

ACP : protéine porteuse d'acyle (*Acyl Carrier Protein*)

AG : acide gallique

AGPI : acide gras polyinsaturé (PUFA : *polyunsaturated fatty acid*)

AGMI : acide gras mono-insaturé (MUFA : *monounsaturated fatty acid*)

AGS : acide gras saturé (saturated)

ALA : acide  $\alpha$ -linoléique ( *$\alpha$ -linolenic acid*)

Anses : agence nationale de sécurité sanitaire et de l'alimentation de l'environnement et du travail

AO : radical phénoxy

AOH<sup>+</sup> : radical phénoxy cationique

Aox : antioxydant

## B

BDE : énergie de dissociation de liaison (*bond dissociation enthalpy*)

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

## C

Caff G : acide caféique glucosylé

COA : coenzyme A

Coum G : acide coumarique glucosylé

COX : cyclo-oxygénase

cSt : centiStokes

Ctrl : contrôle

## D

$\Delta$  : delta

DHA : acide docosahexaénoïque (*docosahexaenoic acid*)

DMAPP : diméthyl-allyl-pyrophosphate

## E

EDTA : éthylène diamine tétra acétate

EGCG : gallate d'épigallocatechine

EPA : acide eicosapentaénoïque (*eicosapentaenoic acid*)

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ESI : électrospray

eV : electron-volt

## F

FAK : focal adhesion kinase

Fer G : acide férulique glucosylé

FTIR : infra-rouge à transformée de Fourier

## **G**

g : gramme

GC : chromatographie gazeuse (*gas chromatography*)

GC-FID : chromatographie gazeuse à détecteur à ionisation de flamme

GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse

## **H**

H : atome d'hydrogène

H<sup>+</sup> : proton

HAT : transfert d'atome d'hydrogène (*hydrogen atom transfer*)

HDL : lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*)

HLB : balance hydrophile-lipophile (*Hydrophilic-lipophilic balance*)

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*high performance liquid chromatography*)

HO· : radical hydroxyle

## **I**

IP : Indice de peroxydes

IPP : Isopentenyl pyrophosphate

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée (*international union of pure and applied chemistry*)

## **K**

kcal : kilocalorie

kg : kilogramme

kJ : kilojoule

## **L**

L : radical lipidique

LA : acide linoléique (linoleic acid)

LC - HRMS : chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie de masse à haute résolution

LDG : larisirésinol di-glucoside

LDL : lipoprotéine à faible densité (*low density lipoprotein*)

LH : lipide

LO· : radical alcoxyle

LOO· : radical peroxyde

LOOH : hydroperoxyde

LOX : lipo-oxygénase

## **M**

MTPT : N-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydroperoxyde

μ : micro

## **N**

NAD(P) : nicotinamide adénine di-nucléotide

(phosphate)

n.d. : non déterminé

nm : nanomètre

## **O**

O<sub>2</sub> : dioxygène moléculaire

<sup>3</sup>O<sub>2</sub> : dioxygène triplet

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : dioxygène singulet

OMS : organisation mondiale de la santé

OSI : Indice de stabilité oxydatif

## **P**

*p*-AV : Indice de *para*-anisidine

PDG : pinorésinol di-glucoside

PKC : protéine kinase C

## **Q**

QToF : quadripôle à temps de vol de haute

résolution

## **R**

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique

électronique

## **S**

SDG : sécoisolaricirésinol di-glucoside

Sens : sensibilisateur

Sens\* : sensibilisateur excité

SOD : superoxyde dismutase

## **T**

TBARS assay : dosage des substances réactives aux acides thiobarbituriques

TMAH : tétra méthyl ammonium hydroxyde

TPP : tri-phényl phosphine

TPSA : Surface polaire topologique  
(*Topological Polar Surface Area*)

## **U**

UV : ultra-violet

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Répartitions des ventes d'huile pour l'année 2015, d'après FranceAgriMer [2].....	4
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des configurations cis et trans. ....	5
<b>Figure 3</b> : Voies de synthèse des acides gras à moyenne et longue chaîne, d'après Bistrain [12]..	9
<b>Figure 4</b> : Devenir des acides gras polyinsaturés par oxydation (COX et LOX) lors de la réponse immunitaire. ....	13
<b>Figure 5</b> : Excitation d'un photo-sensibilisateur par irradiation lumineuse, schématisée par un photon.....	20
<b>Figure 6</b> : Mécanismes de type I (radicalaire) et de type II (non radicalaire) de la photo-oxydation des lipides.....	21
<b>Figure 7</b> : Exemple de la réaction ène mise en application dans les mécanismes non radicalaires de la photo-oxydation.....	21
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de l'évolution de l'oxydation des lipides au cours du temps. D'après Finley [43].....	22
<b>Figure 9</b> : Représentation des différents hydrogènes présents à proximité d'une double liaison. ....	23
<b>Figure 10</b> : Mécanisme de génération des radicaux par auto-oxydation sur les acides gras mono-insaturés.....	23
<b>Figure 11</b> : Hydroperoxydes générés par auto-oxydation d'acides gras mono-insaturés.....	24
<b>Figure 12</b> : Mécanisme d'oxydation par photo-oxydation de type II selon la réaction ène, exemple de l'acide oléique.....	24
<b>Figure 13</b> : Mécanisme de génération des radicaux par auto-oxydation sur la position d'hydrogène doublement allylique des acides gras polyinsaturés. ....	25
<b>Figure 14</b> : Hydroperoxydes générés par auto-oxydation à partir d'acides gras polyinsaturés..	25
<b>Figure 15</b> : Voies de décompositions possibles des hydroperoxydes lipidiques [44]. ....	27

<b>Figure 16</b> : Schéma de synthèse des produits secondaires de l'oxydation des huiles à partir des hydroperoxydes comme produits primaires et source des radicaux peroxy et alcoxy d'après K. M. Schaich [44].	28
<b>Figure 17</b> : Représentation schématique des groupements fonctionnels phényle, hydroxyle et phénol.	41
<b>Figure 18</b> : Présentation des différentes classes de composés phénoliques et leurs structures carbonées générales.	42
<b>Figure 19</b> : Mécanisme de cession d'un atome d'hydrogène direct et indirect.	44
<b>Figure 20</b> : Potentiels standard ( $E^0$ ) de radicaux oxygénés et d'origine lipidique.	45
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique des groupements catéchol et galloyle retrouvés dans de nombreux composés phénoliques.	46
<b>Figure 22</b> : Noyau flavonol dihydroxylé en position 3' et 4' (cycle B) montrant les sites de liaisons de coordination des complexes antioxydants-métaux [101].	47
<b>Figure 23</b> : Balance entre les espèces pro- et anti-oxydantes et développement du stress oxydant.	48
<b>Figure 24</b> : Structure de l' $\alpha$ -tocophérol.	54
<b>Figure 25</b> : Structure de l'acide gallique.	55
<b>Figure 26</b> : Structure du gallate de propyle.	56
<b>Figure 27</b> : Structure de l'acide rosmarinique.	57
<b>Figure 28</b> : Structure du resvératrol.	58
<b>Figure 29</b> : Structure de la curcumine.	58
<b>Figure 30</b> : Structure du rutoside.	59
<b>Figure 31</b> : Droite d'étalonnage de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'heptane : isopropanol (98,5 : 1,5) par la technique de chromatographie liquide à haute performance en phase normale.	69
<b>Figure 32</b> : Réaction de condensation entre les aldéhydes et cétones et la p-anisidine avec formation d'une base de Schiff.	75

<b>Figure 33</b> : Droite d'étalonnage du 2,4 d'écadiénal dans l'huile de lin afin d'obtenir l' $\epsilon$ de la molécule par spectrophotométrie UV-visible.....	76
<b>Figure 34</b> : Schémas de la technique Rancimat et de l'implication du flux d'air dans l'entraînement des molécules volatiles vers les récipients de mesure de conductivité.....	78
<b>Figure 35</b> : Chromatogrammes des huiles de tournesol (A) et de lin (B) obtenus par LC-MS, où chaque couleur correspond à un échantillon d'huile (n=3).....	82
<b>Figure 36</b> : Répartition des différents TAG présents dans l'huile de tournesol obtenue par LC-HRMS.....	83
<b>Figure 37</b> : Répartition des différents TAG présents dans l'huile de lin obtenue par LC-HRMS..	84
<b>Figure 38</b> : Courbes de conductivité en fonction du temps des huiles de silicone, par traitement thermique au Rancimat.....	87
<b>Figure 39</b> : Courbes expérimentales de détermination des OSI de l'huile de lin (A) et de tournesol (B) par l'oxydation accélérée induite par le traitement thermique au Rancimat.....	88
<b>Figure 40</b> : Courbes de conductivité en fonction du temps de l'huile de lin (A) et de tournesol (B) à différentes températures d'analyse au Rancimat. ....	90
<b>Figure 41</b> : Courbes des enthalpies libres de Gibbs ( $\Delta G$ ) en fonction des températures (en K) pour les huiles de lin et de tournesol. ....	93
<b>Figure 42</b> : Concentration en acide gallique (A) et acide rosmarinique (B) dans les huiles en mg d'antioxydant par kg d'huile en fonction du ratio huile/solution aqueuse, déterminée par HPLC. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons $\pm$ écart-type de trois échantillons. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ ). ....	96
<b>Figure 43</b> : Concentration en acide gallique (A) et acide rosmarinique (B) dans les huiles de tournesol et de lin en mg d'antioxydant par kg d'huile en fonction de la concentration initiale de la solution aqueuse, déterminée par HPLC.....	97
<b>Figure 44</b> : Concentration des acides gallique (A et B) et rosmarinique (C et D) dans les huiles de tournesol (A et C) et de lin (B et D) en fonction de la concentration initiale et du volume total, déterminée par HPLC. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons $\pm$ écart-type de trois	

échantillons. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ )..... 98

**Figure 45 :** Courbes de conductivités obtenues au Rancimat, en fonction du temps d'analyse, pour les huiles de silicone émulsionnées et enrichies ou non en antioxydants, chauffées à 100 °C. 100

**Figure 46 :** Courbes des conductivités obtenues au Rancimat, en fonction du temps pour les huiles de tournesol (A) et de lin (B) chauffées respectivement à 100 °C et à 90 °C..... 101

**Figure 47 :** Courbes de conductivité en fonction du temps d'analyse des échantillons d'huiles de lin (A et B) et de tournesol (C et D) en présence d'acide rosmarinique (A et C) et d'acide gallique (B et D) à différents volumes totaux et concentrations initiales..... 104

**Figure 48 :** Courbes de conductivité en fonction du temps pour étudier l'influence des solvants et des antioxydants sur la mesure de conductivité du Rancimat avec les huiles de silicone 50 cSt (A) et 100 cSt (B)..... 108

**Figure 49 :** Courbes de conductivité en fonction du temps pour l'huile de tournesol (A et B) et de lin (C et D) en présence et absence d'antioxydants par la méthode au propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D), obtenues au Rancimat. .... 110

**Figure 50 :** Concentration en acide gallique (A et B) et acide rosmarinique (C et D) en mg d'antioxydant par kg d'huile, déterminée par HPLC, pour un enrichissement avec les méthodes au propylène glycol et à l'éthanol. .... 113

**Figure 51 :** Photographie de l'émulsion d'huile de tournesol après addition de propylène glycol (A) et éthanol (B)..... 114

**Figure 52 :** Turbidité de l'émulsion huile de tournesol/propylène glycol en fonction du temps. .... 114

**Figure 53 :** Courbes des IP (A et B) et  $\Delta IP$  (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de tournesol par propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D). .... 118

<b>Figure 54</b> : Courbes des OSI (A et B) et des $\Delta$ OSI (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de tournesol avec le propylène glycol (A et C) et l'éthanol (B et D).....	120
<b>Figure 55</b> : Courbes des IP (A et B) et $\Delta$ IP (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de lin par propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D).....	122
<b>Figure 56</b> : Courbes des OSI (A et B) et des $\Delta$ OSI (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de lin avec le propylène glycol (A et C) et l'éthanol (B et D). .....	123
<b>Figure 57</b> : Courbes des $\Delta$ IP (A et B) et $\Delta$ OSI (C et D) de l'huile de tournesol pour l'échantillon d' $\alpha$ -tocophérol par addition avec le propylène glycol (A et C) ou l'éthanol (B et D) en fonction du temps de stockage.....	125
<b>Figure 58</b> : Courbes des $\Delta$ IP (A et B) et $\Delta$ OSI (C et D) de l'huile de lin pour l'échantillon d' $\alpha$ -tocophérol par addition avec le propylène glycol (A et C) ou l'éthanol (B et D) en fonction du temps de stockage.....	127
<b>Figure 59</b> : Résultats des gains de stabilité (%) des antioxydants commerciaux incorporés dans l'huile de tournesol par la technique du Rancimat.....	132
<b>Figure 60</b> : Résultats des gains de stabilité (%) des antioxydants commerciaux incorporés dans l'huile de lin par la technique du Rancimat. ....	132
<b>Figure 61</b> : Résultats des gains de stabilité (%) des fractions d'acides hydroxycinnamiques incorporées dans l'huile de tournesol et de lin par la technique du Rancimat.....	135
<b>Figure 62</b> : Résultats des gains de stabilité (%) des fractions de lignanes et flavonoïdes incorporés dans l'huile de tournesol et de lin par la technique du Rancimat. ....	136
<b>Figure 63</b> : Graphiques représentant les indices de peroxydes (IP) (A) et les variations d'indices de peroxydes ( $\Delta$ IP) (B) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage, par dosage iodométrique.....	143

**Figure 64 :** Graphiques représentant les indices d'anisidine (**A**) et les variations d'indices d'anisidine (**B**) (en équivalent en milligramme de 2,4 décadiénal par gramme d'huile) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage..... 145

**Figure 65 :** Graphiques représentant les OSI (**A**) en heure et les  $\Delta$ OSI (**B**) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage..... 147

**Figure 66 :** Graphiques représentant l'inhibition de la production des peroxydes (**A**) et des aldéhydes non volatiles (**B**) en fonction du logP des molécules..... 161

**Figure 67 :** Graphiques représentant l'inhibition de la production des peroxydes (**A**) et des aldéhydes non volatiles (**B**) en fonction du TPSA des molécules..... 162

**Figure 68 :** Graphiques représentant les LogP ( $\blacklozenge$ ) et TPSA ( $\blacktriangle$ ) des molécules en fonction du pourcentage d'inhibition des peroxydes (**A**) et des aldéhydes (**B**)..... 164

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Profils lipidiques (saturés, mono-insaturés et polyinsaturés des principales huiles commerciales [8]) en pourcentage massique.....	6
<b>Tableau 2</b> : Répartitions des principaux constituants des grains de tournesol et de lin.....	15
<b>Tableau 3</b> : Profil en acides gras des huiles de tournesol et de lin, leurs teneurs en tocophérol (entre parenthèses la forme majoritaire) et leur rapport oméga-6/oméga-3 [8].....	16
<b>Tableau 4</b> : Pourcentages et répartition des mono-hydroperoxydes par auto-oxydation et photo-oxydation des acides oléique, linoléique et $\alpha$ -linoléique [46].....	26
<b>Tableau 5</b> : Production possible des produits secondaires d'oxydation à partir des acides oléique, linoléique et $\alpha$ -linoléique.....	27
<b>Tableau 6</b> : Principales méthodes de routine de caractérisation de l'oxydation des huiles. ...	31
<b>Tableau 7</b> : Détermination par RMN des fractions purifiées des graines de lin. Les huit fractions obtenues sont numérotées de 1 à 8, en partant des temps de rétention les plus faibles vers les plus élevés.....	64
<b>Tableau 8</b> : Gamme étalon de l' $\alpha$ -tocophérol.....	68
<b>Tableau 9</b> : Lots formulés et testés pendant le projet.....	72
<b>Tableau 10</b> : Compositions relatives en acides gras des huiles de tournesol et de lin obtenues par GC-FID, la littérature [153] et les données fournisseur.....	84
<b>Tableau 11</b> : Comparaison des teneurs en vitamine E contenue dans les huiles de tournesol et de lin obtenues par HPLC, la littérature [153] et les données fournisseurs.....	86
<b>Tableau 12</b> : OSI des échantillons de la figure 48.....	91
<b>Tableau 13</b> : Paramètres cinétiques des huiles de lin et de tournesol calculés à partir des OSI.....	91
<b>Tableau 14</b> : Résultats du test de stabilité des huiles émulsionnées par la solution aqueuse en présence d'antioxydants.....	103

<b>Tableau 15</b> : Résultats des gains de stabilité à l'oxydation par la technique du Rancimat, suite à l'enrichissement en acides gallique et rosmarinique par la méthode d'addition par solution aqueuse pour les huiles de tournesol et de lin. ( $n=3$ ).....	105
<b>Tableau 16</b> : Résultats des gains de stabilité à l'oxydation par la technique du Rancimat, suite à l'addition d'acides gallique et rosmarinique par la méthode d'addition au propylène glycol et à l'éthanol pour les huiles de tournesol et de lin.....	111
<b>Tableau 17</b> : Conditions de stockage recommandées pour les huiles de tournesol et de lin. ....	116
<b>Tableau 18</b> : Concentrations initiales, volumes prélevés et masse d'huile pour chaque antioxydants commerciaux avant traitement au Rancimat.....	131
<b>Tableau 19</b> : Concentrations initiales, volumes prélevés et masse d'huile pour chaque antioxydant purifié du lin avant traitement au Rancimat.....	134
<b>Tableau 20</b> : Valeurs des logP et TPSA des catéchines des extraits de thé vert, d'après Molinspiration cheminformatics software.....	138
<b>Tableau 21</b> : Valeurs des logP et TPSA des molécules étudiées, d'après Molinspiration cheminformatics software. ....	139
<b>Tableau 22</b> : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et de différents polysaccharides <i>par Lorine Le Priol</i> .....	151
<b>Tableau 23</b> : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et à différentes concentrations de pectine <i>par Lorine Le Priol</i> .....	151
<b>Tableau 24</b> : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et de pectine, renforcée par ajout d'antioxydants et comparés au $\Delta$ OSI de l'échantillon sans antioxydant (contrôle) <i>par Lorine Le Priol</i> .....	153
<b>Tableau 25</b> : Conversion des concentrations massique (80 et 200 mg/kg d'huile) en concentrations molaires (mol d'antioxydant/kg d'huile).....	160
<b>Tableau 26</b> : Gains de stabilité (%) des différentes molécules testées comparés aux gains théoriques (%) relatif à l'efficacité de l'acide gallique. ....	160

# **Introduction générale**

# Introduction générale

Les êtres vivants sont constitués de quatre grandes classes de biomolécules. Les lipides en sont l'une d'elles. Ils possèdent des rôles extrêmement variés tels que des rôles structuraux, énergétiques en passant par le trafic cellulaire. Bien que les lipides soient une classe très hétéroclite, ils sont tous constitués par une base commune : les acides gras.

Certains de ces acides gras sont essentiels aux humains car nous ne possédons pas les enzymes nécessaires à leurs synthèses. Il s'agit par exemple des acides linoléique (LA) oméga-6 (*Annexe 6*) et  $\alpha$ -linoléique (ALA) oméga-3 (*Annexe 8*). La synthèse d'acides gras à longue chaîne tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA) (*Annexe 9*) et docosahexaénoïque (DHA) (*Annexe 10*), deux acides gras essentiels, sont obtenus par élongation de l'ALA, tandis que l'acide arachidonique (AA) (*Annexe 7*) est lui obtenu à partir du LA.

Comme les enzymes utilisées pour la biosynthèse, de l'un ou l'autre, sont les mêmes il peut y avoir compétition pour la prise en charge des acides gras. En effet, de nos jours, les habitudes de consommation ont réduit la prise d'oméga-3 au profit des oméga-6.

Depuis une trentaine d'années, de nombreuses recherches sont à l'origine d'une prise de conscience d'un effet délétère de nos modes de consommation sur notre santé. De manière générale, les habitudes de consommation sont responsables de nombreux effets sur la santé, tels que l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, d'hypertension, de réponse inflammatoire disproportionnée ou chronique ou bien encore l'augmentation du risque de cancers ou de diabète de type II.

C'est la raison pour laquelle les chercheurs et les agences de santé préconisent de modifier notre façon de nous nourrir. Ils recommandent de réduire les graisses saturées, de rééquilibrer la balance oméga-6/oméga-3 et de consommer plus d'acides gras oméga-3 à longue chaîne pour leurs vertus sur la santé humaine.

Néanmoins, ces préconisations soulèvent un autre problème : l'oxydation des lipides. Il existe un facteur qui accélère l'oxydation des lipides, il s'agit du nombre d'insaturations.

## Introduction

Or une huile riche en ALA comme le lin ou en EPA/DHA comme les huiles de poisson s'oxydera d'autant plus vite qu'une huile riche en oméga-6, oméga-9 ou graisses saturées.

Bien que les risques sur la santé ne soient ni complètement confirmés ni écartés, il convient d'être prudent sur la consommation de graisse oxydée de par sa composition en molécule toxique pour les cellules. Ainsi, afin de réduire les effets de l'oxydation, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux phénomènes intervenant dans l'oxydation des huiles et graisses. De nombreux paramètres influent sur l'oxydation, on peut citer la température, la lumière, les métaux ou bien encore la présence ou l'absence de molécule anti-oxydante.

Ces molécules particulières ont la capacité de ralentir ou de prévenir l'oxydation en étant préférentiellement oxydées plutôt que les acides gras. De plus, une fois oxydés, les antioxydants forment des molécules plus ou moins stables qui ne vont pas ou très peu réagir avec les molécules qu'ils protègent. Parmi ces molécules, les composés phénoliques naturels sont un groupe très varié de par leurs structures, leur physico-chimie et leurs modes d'action. Ces molécules sont capables, suite à de nombreuses études, de prévenir voire de réduire de nombreuses pathologies neurales, cardiovasculaires ou tumorales.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes principalement intéressés à protéger la formulation d'un aliment riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) grâce à des composés phénoliques extraits du lin (*linum usitatissimum*) (acides hydroxycinnamiques et lignanes) ainsi qu'un certain nombre de molécules commerciales avec l'objectif de permettre une meilleure conservation des huiles. La démarche scientifique de ce projet était de valoriser un ensemble de coproduits agricoles régionaux (huiles, protéines, polysaccharides, extraits de composés phénoliques).

Le projet global dans lequel s'inscrit cette thèse, intitulé CAPSOIL, financé par la SAS PIVERT, vise à présenter un moyen novateur pour stabiliser des huiles riches en AGPI par la co-encapsulation d'huiles enrichies en antioxydants dans des microparticules constituées de biopolymères végétaux (protéines, polysaccharides, ...). L'avantage de cette co-encapsulation sera premièrement de protéger les huiles de l'oxydation tout en encapsulant des antioxydants

## Introduction

afin de renforcer la protection apportée par l'encapsulation et d'augmenter la biodisponibilité d'extraits phénoliques naturels d'intérêts. Si son bénéfice sur la santé humaine est avéré, ce produit pourra faire l'objet d'allégations de santé et être commercialisé comme complément alimentaire ou nutraceutique. À l'aide de trois méthodes d'étude de l'oxydation des acides gras (indices de peroxydes, indices d'anisidine et indices de stabilité oxydative au Rancimat), nous avons étudié l'effet sur la stabilité oxydative des huiles, d'une supplémentation ou non de ces composés phénoliques ainsi qu'une compréhension de leurs modes d'action dans un milieu hydrophobe.

Ce manuscrit de thèse s'organise de la façon suivante :

Une première partie sera consacrée au contexte bibliographique et se divisera en trois grandes sous-parties. La première présentera le contexte socio-économique des matières grasses en France. La deuxième s'intéressera aux éléments concernant les phénomènes d'oxydation des acides gras et des huiles polyinsaturées. Enfin, la troisième exposera les éléments nécessaires à la compréhension des modes d'action des antioxydants et marquera une section comparative des antioxydants sélectionnés (abondance, disponibilité, coût, ...). Une seconde partie décrira les protocoles expérimentaux et les matériels utilisés. Dans une troisième partie, nous présenterons nos résultats sous la forme de quatre chapitres. Le premier se concentrera sur les étapes de caractérisation des huiles. Le deuxième présentera les méthodes d'addition utilisées et les solvants de vectorisation choisis. Le troisième chapitre s'intéressera quant à lui, à la sélection des antioxydants et à l'étude des molécules les plus prometteuses en stockage. Enfin, un dernier chapitre se proposera d'afficher les résultats de notre partenaire sur l'encapsulation des huiles.

Nos résultats seront discutés dans une troisième partie. Et enfin, nous proposerons plusieurs perspectives sur la valorisation de nos résultats dans l'industrie agroalimentaire.

# **Contexte bibliographique**

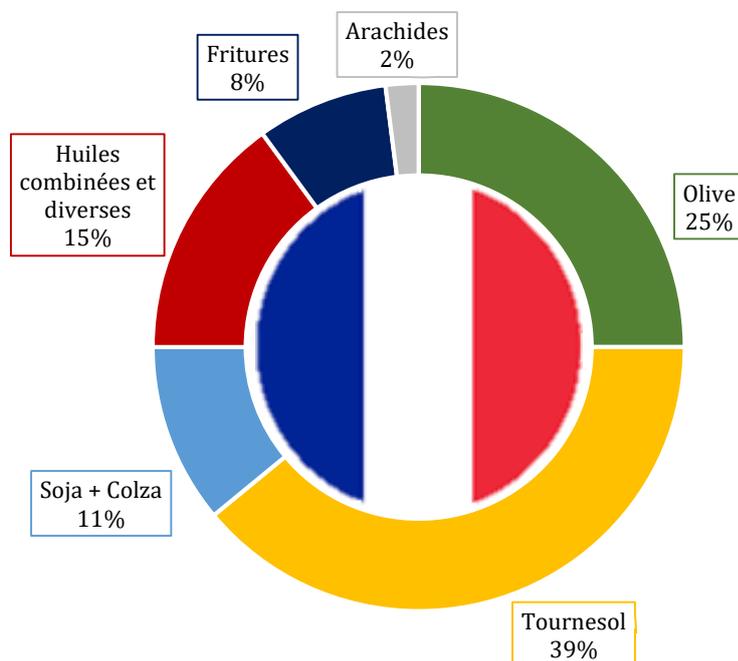
### Chapitre I. Les matières grasses en France

La France est le premier producteur européen d'oléagineux. Le colza (5 000 000 de tonnes), le tournesol (1 500 000 tonnes de graines) et le soja (400 000 tonnes de graines) représentent 99% de la production d'oléagineux en France [1]. Cependant, la vente et la consommation des huiles sont bien différentes en comparaison avec la production.

#### I.1 La consommation de matières grasses en France

Selon FranceAgriMer, sur la période de 2008 à 2017, les Français ont consommé une moyenne de 8,3 litres d'huile et 6 kg de beurre en dehors des produits préparés [2], [3]. Ces chiffres représentaient pour 2015 un volume de 287 millions de litres d'huile vendu et un chiffre d'affaires sur l'année de 795 millions d'euros [4].

Les ventes pour l'année 2015, en France, se répartissent de la manière suivante :



**Figure 1** : Répartitions des ventes d'huile pour l'année 2015, d'après FranceAgriMer [2].

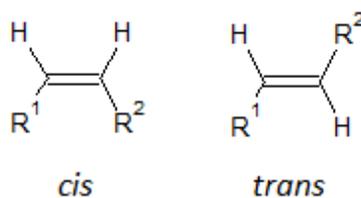
Nous remarquons que 64 % des ventes d'huile se concentrent sur l'huile de tournesol (39%) et l'huile d'olive (25%) (**Figure 1**). La consommation d'huile d'olive est d'ailleurs, selon l'association française interprofessionnelle de l'olive (AFIDOL), de l'ordre de 105 000 tonnes

## Contexte bibliographique

contre une production de 4 300 tonnes [5]. À titre de comparaison, les huiles de colza et de soja ne représenteraient que 11 % de la consommation des huiles alimentaires alors que les graines de colza représentaient la majorité des oléagineux produits sur notre territoire. D'autre part, la consommation française des matières grasses est régionalisée. Une importante consommation de beurre et de margarine s'observe dans le Nord de la France tandis que les régions du bassin méditerranéen privilégient l'huile d'olive [6].

Le tableau 1 résume les profils lipidiques des principales huiles alimentaires (**Tableau 1**). Certaines huiles végétales vont être riches en acides gras saturés (AGS) comme les huiles de palme (50 %) et de coco (jusqu'à 85 %). D'autres en revanche seront riches en acide gras mono-insaturés (AGMI), comme les huiles d'olive (> 65%) ou de colza (> 50%) ou encore en acide gras polyinsaturés (AGPI). Dans le groupe des AGS, nous retrouvons l'acide laurique (C12:0) (*Annexe 1*), l'acide myristique (C14:0) (*Annexe 2*), l'acide palmitique (C16:0) (*Annexe 3*) ou bien encore l'acide stéarique (C18:0) (*Annexe 4*). Le principal représentant des AMGI est l'acide oléique (C18:1) (*Annexe 5*), tandis que les deux principaux représentants des AGPI sont l'acide linoléique (C18:2) (*Annexe 6*) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3) (*Annexe 8*).

Les acides gras présentant au minimum une insaturation sont retrouvés sous la forme de deux isomères (**Figure 2**). La majorité des acides gras sont naturellement sous la forme *cis* ou *Z*, bien qu'il soit possible de retrouver des acides gras *trans* de façon naturelle dans les matières grasses animales produites par le microbiote des ruminants [7]. Cependant, après la découverte de l'hydrogénation partielle des huiles végétales, les acides gras *trans* ont vu leur consommation s'accroître grâce à leurs propriétés conservatrices et stabilisatrices dans des aliments comme certaines margarines (passage de l'état liquide à l'état solide), les viennoiseries et produits de panifications industrielles ou encore les aliments frits.



**Figure 2** : Représentation schématique des configurations *cis* et *trans*.

## Contexte bibliographique

Les huiles végétales sont majoritairement riches en AGMI et AGPI et nous observons que chaque huile alimentaire montre d'ailleurs dans son profil lipidique une seule classe de lipide de façon majoritaire (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : Profils lipidiques (saturés, mono-insaturés et polyinsaturés des principales huiles commerciales [8]) en pourcentage massique.

	Saturés	Mono-insaturés	Polyinsaturés	Dont oméga-3
Riche en AGS				
Huile de palme	37-54%	36-44%	6-12%	-
Huile de coco	80-93%	5-10%	2%	-
Riche en AGMI – Oméga-9				
Huile d'olive	12-22%	63-82%	-	-
Huile de colza	4-9%	52-67%	26-35%	10%
Huile d'arachide	13-27%	33-67%	-	-
Huile de noisette	6-10%	72-85%	6-22%	-
Huile d'avocat	9-21%	58-81%	10-14%	-
Riche en AGPI – Oméga-6				
Huile de tournesol	6-20%	13-41%	17-85%	-
Huile de soja	12-22%	18-29%	59-65%	5-11%
Huile de pépins de raisins	4-20%	12-29%	40-78%	-
Huile de Maïs	8-24%	20-42%	45-46%	2%
Huile de coton	21-42%	14-40%	53-62%	>1%
Huile de noix	4-12%	17-22%	50-80%	3-16%
Riche en AGPI – Oméga-3				
Huile de lin	6-25%	18-20%	51-80%	35-66%
Huile de cameline	6-13%	12-24%	45-66%	33-43%

### I.2 Étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA)

Il existe une différence entre la production des oléagineux et la consommation des ménages en France. Pour cette raison l'Anses (*Agence nationale de sécurité sanitaire et de l'alimentation, de l'environnement et du travail*) a lancé une étude individuelle nationale sur les consommations alimentaires [9].

C'est en 2017 que l'Anses a publié sa troisième étude individuelle nationale des consommations alimentaires (*INCA 3*), concernant la période 2014 – 2015. Cette étude prend en compte toutes les catégories énergétiques (glucides, protéines, lipides) consommées par les Français.

Nous nous intéressons, ici, uniquement aux apports énergétiques des lipides, ils représentent 34% des apports énergétiques totaux de la population française majeure (18-79). Il est également important de noter que ces 34% se subdivisent par la suite à 48% en saturés (AGS), 38% en mono-insaturés (AGMI) et enfin à 14% en polyinsaturés (AGPI). De plus, ce rapport souligne que le *ratio* oméga-6/oméga-3 de cette population est de l'ordre de 7 pour 1 en faveur des oméga-6 et la consommation quotidienne en acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) est de 280 mg/j.

En revanche, les données disponibles sur la consommation d'acides gras *trans* tendent à montrer qu'elle est comprise entre 1 et 2% des apports énergétiques totaux [10].

### I.3 Recommandations nutritionnelles des agences de santé

Les agences nationales de santé (américaine, britannique, française et européenne) recommandent un équilibre dans les apports énergétiques chez l'Homme. L'Anses conseille pour un adulte de consommer environ 2 000 kcal/j soit 8 368 J/j. La répartition de l'apport énergétique total quotidien devrait également être équilibrée entre la part glucidique (40-55%), protéique (10-27%) et lipidique (30-40%). L'Anses recommande pour les lipides une répartition entre chacune des classes d'acides gras, avec un maximum de 12% d'AGS (dont au plus 8% d'acide laurique /myristique/palmitique), entre 15 et 20% d'AGMI (acide oléique) et 5% d'AGPI

à chaîne moyenne réparti avec 4% de LA et 1% d'ALA sans oublier 250 mg d'EPA et 250 mg de DHA [11]. De plus, la consommation d'acides gras *trans* ne devrait pas dépasser 2% des apports énergétiques totaux.

Ces recommandations et les résultats de l'étude INCA 3 montrent que la population française consomme trop d'AGS et a une carence en AGPI à longue chaîne tels que le DHA et l'EPA.

### I.4 Le rapport oméga-6/oméga-3

Il existe parmi les AGPI des acides gras indispensables car incapable d'être synthétisés par l'Homme, il s'agit des acides linoléique (C18:2  $\omega$ -6) (LA) et  $\alpha$ -linoléique (C18:3  $\omega$ -3) (ALA). Ces deux acides gras doivent être apportés par l'alimentation car les mammifères ne possèdent pas les  $\Delta$ 12 et  $\Delta$ 15 désaturases nécessaires à leurs biosynthèses (**Figure 3**). L'Homme est cependant capable de les prendre en charge comme substrat pour permettre cette fois la synthèse des DHA et EPA essentiels, en faisant intervenir les mêmes enzymes [12]. Puisque les enzymes synthétisant les acides arachidonique (C20:4  $\omega$ 6) (AA), eicosapentaénoïque (EPA) et docohexaénoïque (DHA) sont les mêmes, il existe une compétition pour la prise en charge de l'un ou l'autre des substrats (LA ou ALA).

Ainsi, l'Anses préconise un rapport oméga-6/oméga-3 proche de 4 pour 1 afin de ne pas surconsommer l'un ou l'autre de ces deux acides indispensables. En effet, une surabondance en LA entraînera sa prise en charge préférentielle. Or cette surabondance de LA peut donc mener à une biosynthèse réduite en DHA/EPA, une carence qui n'est pas aujourd'hui compensée par notre alimentation, comme le souligne l'étude INCA 3.

Simopoulos va même plus loin en considérant que ce *ratio* est un facteur important d'obésité et que le rapprocher d'un rapport 2 pour 1 voire 1 pour 1 réduirait sa prévalence [13].

De nos jours, de nombreuses études tendent à démontrer que le passage d'un régime alimentaire de chasseur-cueilleur à celui d'un régime alimentaire basé sur l'agriculture, en plus des modes de consommation actuels, nous a conduit à augmenter ce rapport d'un facteur 10, facteur qui était proche de 1 [14]. Or, si l'on se réfère aux données disponibles auprès des

## Contexte bibliographique

résultats de l'INCA 3 de l'Anses, ce *ratio* est de l'ordre de sept molécules de LA pour une molécule d'ALA.

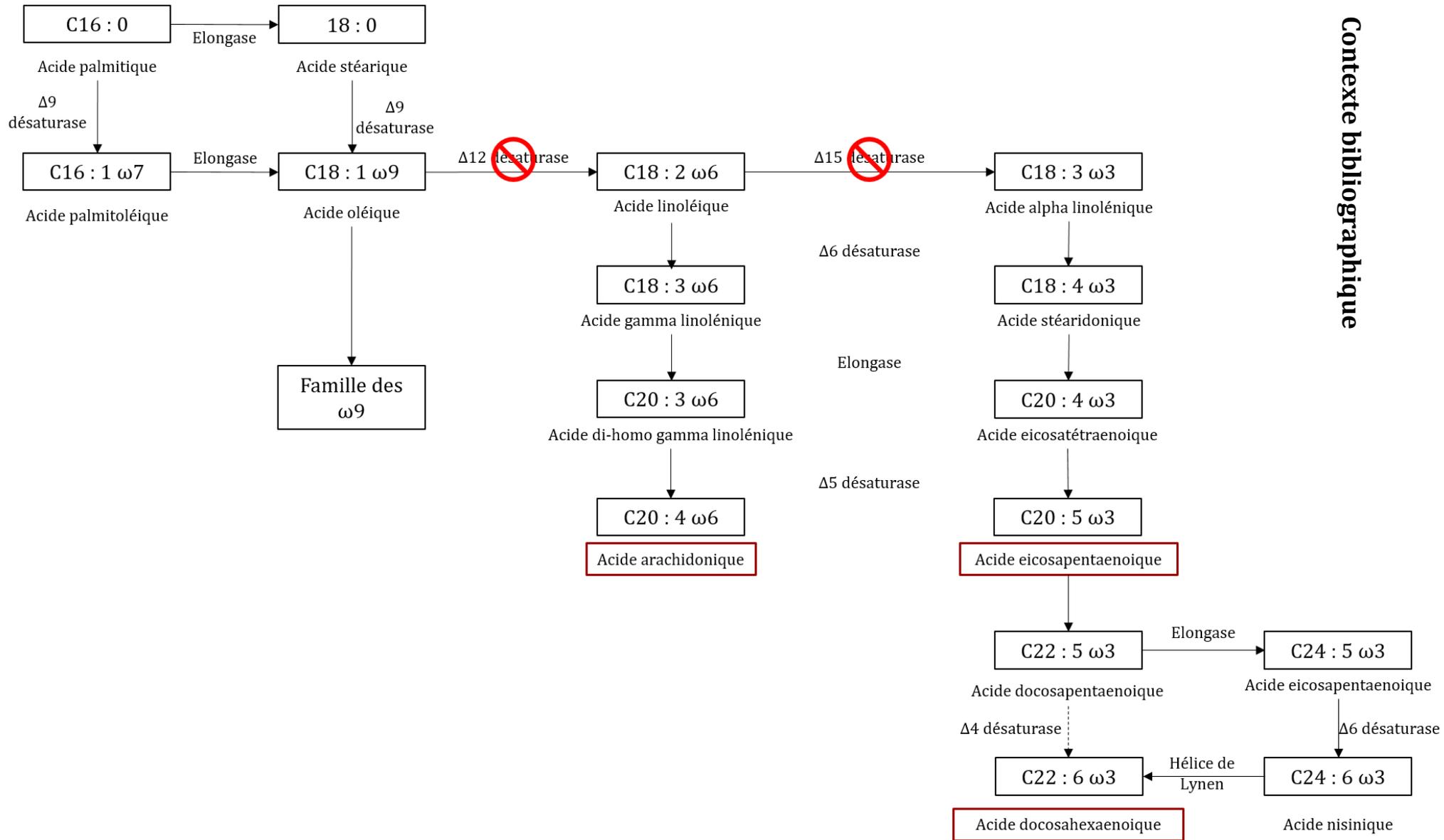


Figure 3 : Voies de synthèse des acides gras à moyenne et longue chaîne, d'après Bistrain [12].

### I.5 Effets sur la santé humaine

L'ensemble de ces recommandations est le fruit de nombreuses recherches *in vitro*, *in vivo* ou encore épidémiologiques. Une consommation de lipides qui tend à s'écarter des recommandations est un facteur de risque pour la santé humaine. Notre régime alimentaire peut, ainsi conduire à augmenter notre risque d'apparition de maladies cardiovasculaire, de diabète, de développer des cancers ou à dérégler la réponse inflammatoire.

#### I.5.1 Maladies cardiovasculaires

Selon Santé Publique France, plus d'un million de français sont atteints de complications cardiovasculaires et 150 000 décès par an sont imputables aux maladies cardiovasculaires or une mauvaise alimentation est un facteur de risque [15].

La cholestérolémie et la triglycéridémie sont des marqueurs de risque puisqu'elles sont en partie responsables de l'augmentation du risque d'athérosclérose [16], [17]. Physiologiquement, la cholestérolémie est régulée par les lipoprotéines. Les lipoprotéines de basse densité (LDL *low density lipoproteins*) sont impliquées dans le transport du cholestérol du foie vers les autres tissus périphériques et les lipoprotéines de haute densité (HDL *high density lipoproteins*) font le chemin inverse afin d'éliminer le cholestérol grâce à la bile.

Une surconsommation de graisses saturées, comme *trans*, augmente la cholestérolémie [7], [18], [19]. De façon complémentaire, une étude de 41 individus sains [20] soulignait les effets délétères d'un régime riche en AGS. Cette étude a comparé ce régime avec un régime pauvre en graisses (mais riche en glucides) et un troisième riche en AGMI. Les conclusions de l'étude étaient claires la cholestérolémie et les LDL-cholestérol se trouvaient supérieurs dans le cas du régime AGS plutôt qu'avec les deux autres.

Bien que les graisses saturées ne montrent pas d'influence sur l'insulinorésistance et le diabète de type II, une étude confirme qu'un régime trop riche en graisse, c'est-à-dire au moins composé de 40% de l'apport énergétique et riche en AGS, est sujet à augmenter l'insulinorésistance [21]. La surconsommation de graisses entraîne l'augmentation du taux

## Contexte bibliographique

d'acides gras libres plasmatique et il a été démontré que plus ce taux est élevé plus fort est le risque d'insulinorésistance [22].

En revanche les AGMI sont très intéressants. Ils ont montré leur intérêt dans la diminution du taux de cholestérol plasmatique et leurs bienfaits en comparaison à un régime pauvre en graisses (riche en glucides) [20]. Cependant, les AGMI ne sont pas essentiels car l'acide oléique est très prolifique dans la nature et il est synthétisable par l'Homme à partir de l'acide stéarique. Cette faculté que nous possédons à métaboliser l'acide stéarique en acide oléique pourrait expliquer la non influence de l'acide stéarique sur la cholestérolémie décrite par Bonanome et Mensink [23], [24].

### I.5.2 Cancers

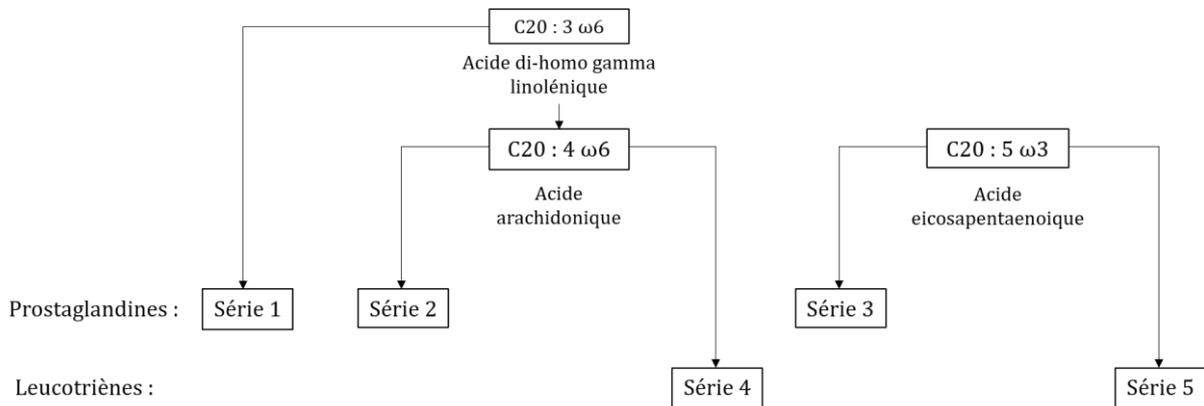
Par le passé, plusieurs études ont cherché à démontrer un lien entre la consommation de graisses et le développement de cancers. De nos jours, il semble probable que la consommation de graisses ait une incidence sur l'augmentation du risque de développer un cancer du côlon [25], du sein [26] ou de la prostate [27]. Néanmoins, bien que les résultats des études épidémiologiques montrent l'accroissement du risque de cancer, celui-ci n'est que très rarement significatif et comme le rapporte Willett, ces différences sont retrouvées dans le cas de la consommation de graisses animales et non avec les graisses végétales [28]. Ce qui conduit à être très prudent sur l'influence des graisses sur le développement de cancers.

### I.5.3 Réponse inflammatoire

L'inflammation est un phénomène qui peut se manifester par le développement d'une rougeur, une sensation de chaleur, un œdème ou encore une douleur. Il s'agit d'un moyen de lutte contre une agression. Ainsi l'inflammation a pour but d'éliminer l'agent pathogène et/ou de réparer le tissu lésé. Pour y parvenir, l'organisme va produire de nombreux médiateurs afin d'augmenter l'afflux de sang et la perméabilité capillaire dans la région concernée, ce qui lui permettra d'acheminer les anticorps ou encore les cellules immunitaires plus efficacement.

## Contexte bibliographique

Parmi ces médiateurs, certains sont d'origine lipidique et ils peuvent intervenir dans l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire. Il s'agit des eicosanoïdes [29] (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Devenir des acides gras polyinsaturés par oxydation (COX et LOX) lors de la réponse inflammatoire.

Pendant l'inflammation, la phospholipase A2 est capable de libérer les acides gras en position 2 des phospholipides des membranes cellulaires. De manière générale sur cette position il y a la présence d'un AGPI. Les acides gras ainsi libérés seront des acides gras oméga-6 ou oméga-3 et seront pris en charge par des lipo-oxygénases (LOX) et cyclo-oxygénases (COX). L'oxydation de ces acides gras par ces oxydoréductases va former respectivement des leucotriènes et prostaglandines. Comme résumé dans la figure 4, l'AA (*Annexe 7*) lorsqu'il est pris en charge produit des leucotriènes de série 4 et des prostaglandines de série 2 [30]. Au contraire l'EPA (*Annexe 9*) est connu pour produire des médiateurs réduisant la réponse inflammatoire [31], grâce aux prostaglandines de série 3 et leucotriènes de série 5 moins pro-inflammatoires voire anti-inflammatoires [30]. Ces capacités ont pu être mises en avant chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde [32].

### 1.6 L'huile de tournesol et l'huile de lin : deux exemples d'huiles riches en acides gras polyinsaturés

Nous venons de montrer que les effets des lipides sur la santé sont nombreux et que notre consommation d'acides indispensables et essentiels conditionne notre santé. Il existe des huiles

alimentaires plus qu'intéressantes par leurs compositions et leurs utilisations par l'Homme. C'est le cas du tournesol et plus encore du lin.

### I.6.1 Généralités

#### I.6.1.1 Le tournesol

Le tournesol (*Helianthus annuus*) est une dicotylédone annuelle originaire du continent américain (Amérique du nord) et fait partie de la famille des *Asteraceae*. Le tournesol a été importé en Europe par les Espagnols durant le XVIème siècle principalement comme plante ornementale. Cependant, elle devient une plante oléagineuse en Russie à partir du XIXème à la suite des restrictions du clergé orthodoxe sur la consommation de matières grasses lors du carême. En effet, ces restrictions ne prenaient pas en compte la plante de tournesol.

Aujourd'hui on cultive toujours le tournesol en Europe et surtout en France pour son huile mais également pour ses protéines (tourteaux). En effet, sa composition particulière le rapproche du soja et en fait un protéoléagineux pouvant substituer l'utilisation de ce dernier pour l'alimentation animale. Son aire de production va du Sud-Ouest jusqu'en Poitou-Charentes en passant par le Centre de la France [33].

#### I.6.1.2 Le lin

Le lin est une plante herbacée annuelle autogame, originaire du continent eurasiatique. Cette dicotylédone de la famille des *linaceae* compte plus de 200 espèces dont la plus connue : *Linum usitatissimum* est cultivée depuis l'Antiquité pour ses fibres ou son huile. Des traces d'une utilisation du lin datant de plus de 30 000 ans en Géorgie ont fait l'objet d'une publication scientifique [34], cependant sa domestication et son utilisation par l'homme ne fait aucun doute depuis 9 000 ans avant JC en Asie Mineure (actuelle Turquie) [35].

L'aire de production du lin en France est partagée en deux zones. La zone du lin textile est concentrée sur le nord de la France dans une large bande côtière qui s'étend de la Normandie jusqu'aux Pays-Bas [36]. La France est le premier pays producteur de lin textile avec une

## Contexte bibliographique

production annuelle de 595 000 tonnes (120 000 tonnes de fibres longues) pour une surface d'exploitation d'un peu plus de 98 000 hectares [37].

L'aire de production du lin oléagineux est surtout présente dans le Centre et la Vallée de la Loire, l'Ouest-Atlantique et le Nord de la France [38]. La production de ce lin oléagineux a une surface cultivée moindre avec une superficie comprise entre 20 000 et 28 000 hectares et une production annuelle de 40 000 tonnes de graines [37].

Les longues fibres du lin textile sont utilisées aujourd'hui pour la confection de vêtements et de textiles de maison comme à l'antiquité, mais également dans les matériaux composites grâce à leurs propriétés mécaniques. Le lin oléagineux est lui principalement utilisé sous sa forme de graine en complément de l'alimentation animale et humaine. Sous la forme d'huile, le lin est surtout utilisé dans les domaines des peintures pour ses propriétés siccatives [39], toutefois depuis 2007, l'huile de lin est autorisée à la consommation humaine ce qui lui ouvre de grandes perspectives d'avenir [40].

### 1.6.2 Composition des huiles et durées de conservation

Les graines de tournesol et de lin sont constituées de matières grasses, protéines, glucides (cellulose comprise), d'eau et d'autres composés dans les proportions indiquées dans le tableau suivant :

**Tableau 2** : Répartitions des principaux constituants des grains de tournesol et de lin.

Graine	Matières grasses (%)	Protéines (%)	Glucides (%)	Eau (%)	Autres (%)
Tournesol	44	16	17	7	16
Lin	34	22	14	9	21

Les huiles sont obtenues par trituration des graines. La littérature indique que la composition de l'huile tournesol (non oléique) est une source importante de LA et l'huile de lin une source importante d'ALA (**Tableau 3**).

Les compositions en acides gras dans la littérature sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 3** : Profil en acides gras des huiles de tournesol et de lin, leurs teneurs en tocophérol (entre parenthèses la forme majoritaire) et leur rapport oméga-6/oméga-3 [8].

Huile	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	Tocophérol (mg/kg)	Rapport $\omega 6/\omega 3$
Tournesol	7,5	2,0	13,3	76,0	-	400-950 ( $\alpha$ -tocophérol)	-
Lin	4-9,3	2-16,0	17-20,0	15-16,0	35-66,0	440-588 ( $\gamma$ -tocophérol)	0,2-0,5

Les durées de conservation des huiles de tournesol et de lin sont respectivement de 6 mois à température ambiante et 3 mois au réfrigérateur, selon les recommandations des agences de santé.

### I.6.3 L'intérêt économique

Le tournesol est le second oléagineux produit et l'huile la plus vendue en France. Cela en fait un excellent modèle d'étude d'une huile riche en AGPI oméga-6. Il existe également, un regain d'intérêt dans la région Haut de France et auprès des acteurs industriels du secteur, à s'intéresser à la filière du lin.

#### I.6.3.1 La filière tournesol

Selon Terres Univia, entre 2010 et 2014, la production de graines de tournesol a représenté 1 650 000 tonnes (20% de la production européenne et 4% mondiale), ce qui correspond à 500 000 tonnes d'huile pour 700 000 tonnes de tourteaux, sur une superficie de 710 000 hectares. Les principaux atouts du tournesol et de son huile sont : sa forte teneur en tocophérol et sa richesse en oméga-6, ainsi que sa capacité, malgré sa richesse en AGPI, d'être relativement stable à l'oxydation. Cette stabilité la rend utilisable en friture. Il existe également une huile de tournesol oléique riche à plus de 80% en acide oléique (oméga-9) se rapprochant de la composition lipidique d'une huile d'olive et augmentant par la même occasion sa protection par rapport à l'oxydation.

## Contexte bibliographique

Son prix moyen étant compris entre 1 et 2 €/L, son poids économique représente entre 112-224 millions d'euros de chiffres d'affaires pour agroalimentaire.

Cependant, sa richesse en LA et sa première place sur le marché des huiles, ne permet pas de rééquilibrer le *ratio* oméga-6/oméga-3.

### I.6.3.2 La filière lin

La France produit environ 40 000 tonnes de graines de lin destinées à être triturées. En 2008, suite à l'autorisation de vendre de l'huile de lin pour l'alimentation humaine, certains industriels ont lancé un bilan de la filière. Ce rapport, disponible depuis 2011, pointe certaines difficultés de la filière du lin oléagineux, comme par exemple les rendements [41].

Néanmoins, le lin a de nombreux atouts. C'est une plante très bien acclimatée en France et qui ne demanderait que peu d'intrant par rapport à d'autres cultures. Son principal avantage économique vient de sa richesse en ALA (oméga-3) avec des pourcentages compris entre 55 et 65 % des acides gras totaux. C'est d'ailleurs l'une des raisons de l'utilisation de ses tourteaux dans l'alimentation animale pour enrichir les viandes, œufs ou produits laitiers en oméga-3.

Toujours d'après le rapport de 2011, il existe un vrai engouement pour l'huile de lin en Europe. Les besoins, dans l'Union Européenne, avoisinent les 500 000 à 600 000 tonnes de graines par an. Or seulement 20% proviennent de sa production. Il y a donc une forte dépendance vis-à-vis du Canada, de la Russie ou encore de l'Ukraine pour son approvisionnement.

En France, seule 660 tonnes d'huile de lin ont été produites en 2014 et c'est pourquoi elle se négocie à 22€/L dans les enseignes de produits bio.

Les problèmes évoqués suite à la troisième étude INCA de l'Anses, lui sont également un avantage pour rétablir un *ratio* oméga-6/oméga-3 proche des recommandations.

Cependant, sa très faible stabilité vis-à-vis de l'oxydation, la rend extrêmement fragile et l'empêche donc d'être consommée aujourd'hui, d'une autre manière qu'en assaisonnement.

### Chapitre II. Les mécanismes généraux de l'oxydation lipidique

L'oxydation lipidique est l'une des principales causes de la détérioration nutritionnelle des huiles et graisses alimentaires. Ce phénomène est spontané, irréversible et altère les acides gras qui composent les graisses. L'oxydation qui conduit à la destruction des acides gras a pour conséquence la dégradation des qualités organoleptiques, sensorielles (rancidité) et physiques (changement de couleur). L'implication des produits d'oxydation sur la santé humaine n'a pas encore été totalement élucidée. Malgré tout, les scientifiques ont mis en évidence l'augmentation de taux sanguin de composés toxiques tels que le malondialdéhyde après la consommation de graisse oxydée.

#### II.1 L'auto-oxydation

L'auto-oxydation est un phénomène d'oxydation radicalaire en chaîne. La génération du premier radical lipidique correspond à l'étape dite de l'initiation (*eq.1*). La génération de ce radical lipidique ( $L\cdot$ ) est obtenu suite au départ d'un atome d'hydrogène directement sur le lipide de départ (LH). La rupture homolytique s'effectue avec un hydrogène adjacent à une double liaison, un hydrogène allylique. L'initiation est l'étape d'amorçage de l'auto-oxydation, en produisant la première espèce radicalaire.



La génération de ce radical ( $L_1\cdot$ ) entraîne l'établissement de la réaction en chaîne. Le radical alkyle est capable de fixer l'oxygène triplet ( $^3O_2$ ) présent dans l'huile (*eq.2*).



Le peroxyde ( $L_1OO\cdot$ ) qui vient de se former est capable lui aussi d'arracher un hydrogène d'un autre acide gras insaturé (*eq.3*). Les produits formés sont alors un hydroperoxyde et un nouveau radical alkyle.

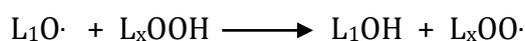
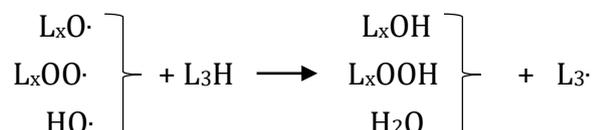
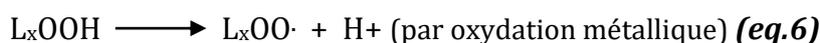
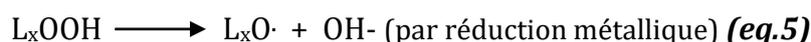
## Contexte bibliographique



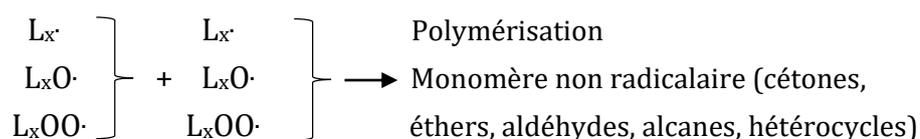
La génération d'un nouveau radical à partir du premier est considérée comme l'étape de propagation des réactions d'oxydation. Ce phénomène conduit à la production de nouveaux radicaux à partir du premier de manière autonome et ces derniers pourront réagir avec le dioxygène triplet présent dans l'huile (eq.4).



Lors des processus de propagation, les hydroperoxydes qui sont formés (eq.3) ; (eq.4) peuvent réagir avec leur environnement proche et être réduits (eq.5) ou oxydés (eq.6) par des métaux ou simplement subir une rupture homolytique de la liaison oxygène-oxygène du peroxyde (eq.7).

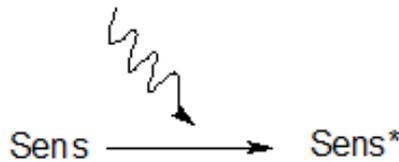


Enfin, l'étape de terminaison, concerne le réarrangement des espèces radicalaires entre-elles et conduit à la synthèse d'autres espèces oxydées non radicalaire.



### II.2 La photo-oxydation

Le phénomène de photo-oxydation intervient dans l'oxydation des acides gras lorsque les lipides sont en présence de photo-sensibilisateur, d'une source d'énergie suffisante (lumière UV) et d'oxygène. Une espèce est photo-sensibilisatrice lorsqu'elle est capable d'emmagasiner l'énergie par excitation lumineuse (**Figure 5**). Les potentiels photo-sensibilisateurs dans les huiles et les aliments sont les hémoprotéines ou certains pigments comme la chlorophylle.

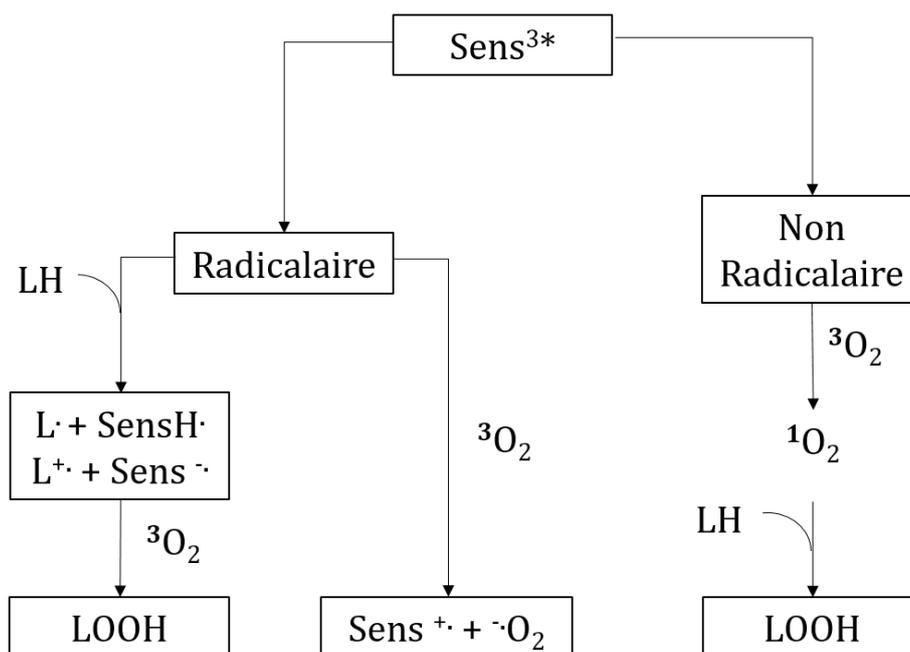


**Figure 5 :** Excitation d'un photo-sensibilisateur par irradiation lumineuse, schématisée par un photon.

L'excitation lumineuse entraîne le passage du photo-sensibilisateur d'un état singulet fondamental (Sens) à un état singulet excité (Sens\*). Afin de revenir à son état fondamental plusieurs voies sont possibles :

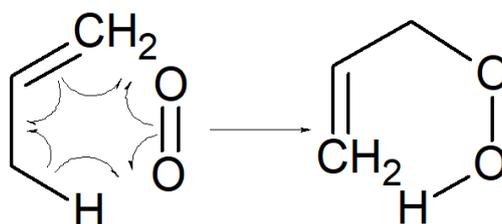
- Émettre de la lumière en produisant de la fluorescence
- Émettre de la chaleur par convection interne
- Transférer cette énergie à une autre espèce.

Le transfert d'énergie est le résultat du passage du photo-sensibilisateur de l'état singulet excité à un état intermédiaire triplet excité. Plus bas en énergie, l'état triplet excité peut réagir selon deux types présentés figure 6 [42].



**Figure 6 :** Mécanismes de type I (radicalaire) et de type II (non radicalaire) de la photo-oxydation des lipides.

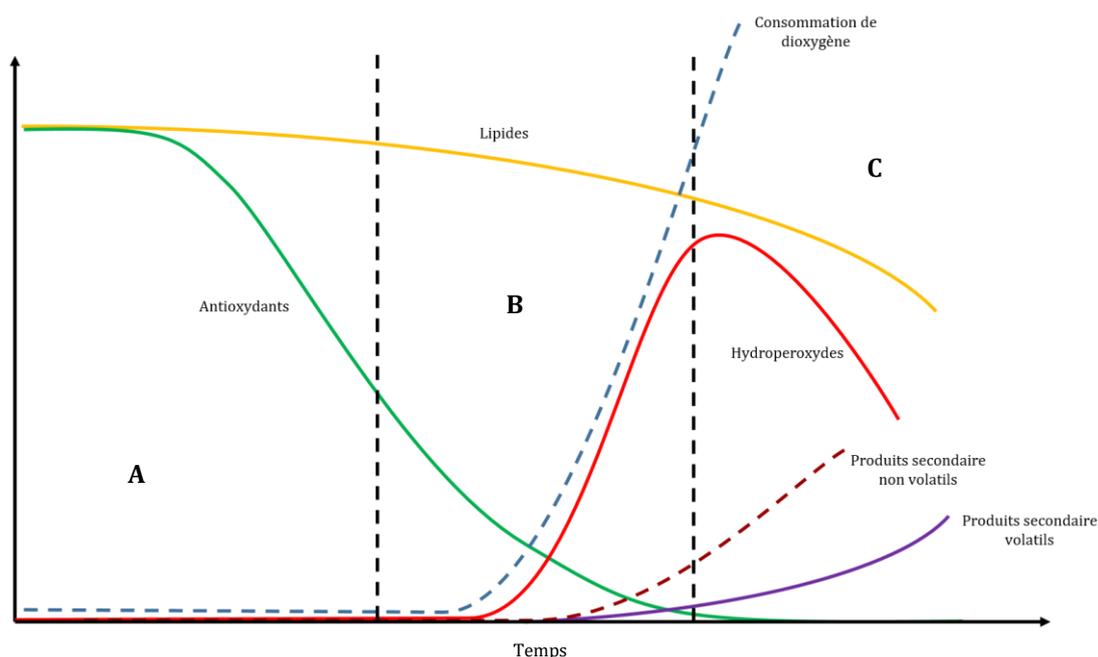
Le premier type (type I) fait intervenir un intermédiaire radicalaire. En comparaison, le second type (type II) ne nécessite pas d'intermédiaire radicalaire, il transfère son excès d'énergie au dioxygène triplet afin de former du dioxygène singulet, molécule très réactive. La génération des hydroperoxydes à partir du mécanisme de type I est commune à celle de l'auto-oxydation puisqu'il y a formation d'un intermédiaire radicalaire. Dans le mécanisme de type 2, le dioxygène singulet est capable de réagir directement sur les lipides insaturés selon une réaction de type ène (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Exemple de la réaction ène mise en application dans les mécanismes non radicalaires de la photo-oxydation.

### II.3 Aspect cinétique de l'oxydation lipidique

La cinétique d'oxydation des lipides peut être décrite suivant trois grandes étapes :



**Figure 8 :** Représentation schématique de l'évolution de l'oxydation des lipides au cours du temps. D'après Finley [43].

**A :** Une phase de latence où il y a diminution de la concentration d'antioxydant actif, formation de faibles quantités de radicaux libres. Sa durée dépend de nombreux éléments (composition de l'huile, disponibilité en dioxygène, présence de composés pro- ou antioxydant, etc.).

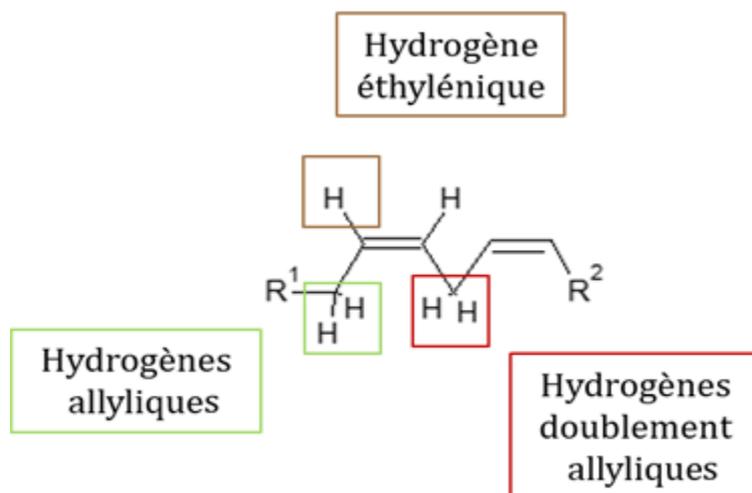
**B :** Une phase de production et d'accumulation des hydroperoxydes.

**C :** Une phase de production des produits secondaires par décomposition des hydroperoxydes.

Le taux d'oxydation va dépendre du degré d'insaturation des acides gras qui composent l'huile. En effet, la liaison C-H sur le carbone adjacent d'une double liaison C=C est thermodynamiquement faible. Le départ d'un atome d'hydrogène sera favorisé par la faible énergie d'activation d'un hydrogène labile.

### II.4 Génération des produits primaires de l'oxydation

Il existe deux types d'hydrogène labile. Les hydrogènes allyliques ( $E = 315 \text{ kJ/mol}$ ) qui sont positionnés en alpha d'une seule double liaison et les hydrogènes doublement allyliques ( $E = 210\text{-}250 \text{ kJ/mol}$ ) [44] portés par un carbone entre deux doubles liaisons (**Figure 9**).

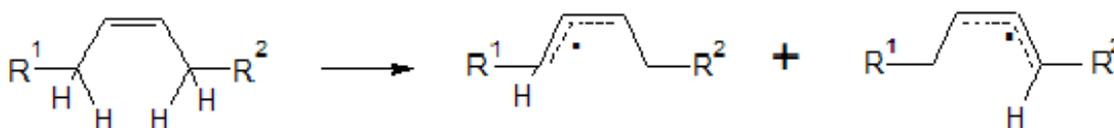


**Figure 9 :** Représentation des différents hydrogènes présents à proximité d'une double liaison.

L'énergie nécessaire au départ d'un hydrogène peut être apportée par l'élévation de la température, une irradiation lumineuse ou encore par catalyse métallique. Cependant les hydroperoxydes produits par auto-oxydation dépendent principalement de la température et de la disponibilité de l'oxygène [45].

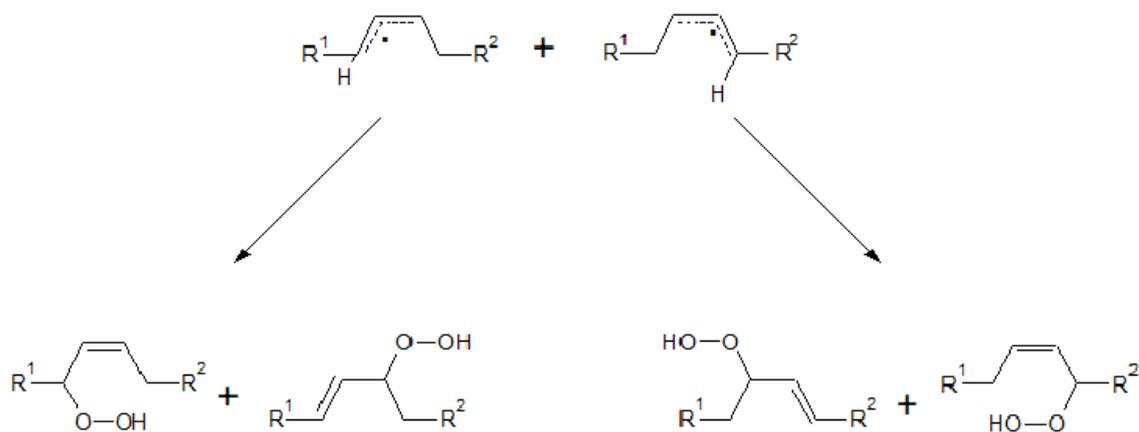
#### II.4.1 Acide gras mono-insaturé

Il existe sur les AGMI deux positions d'hydrogènes labiles. Il s'agit des carbones C8 et C11. Ces hydrogènes sont des hydrogènes allyliques. Lors de l'auto-oxydation, le départ d'un de ces hydrogènes entraîne la formation d'un intermédiaire radicalaire stabilisé au sein d'un système à trois atomes de carbone (**Figure 10**).



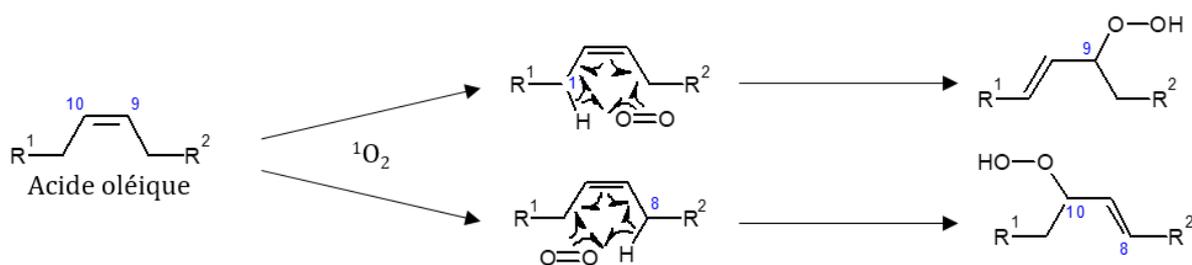
**Figure 10 :** Mécanisme de génération des radicaux par auto-oxydation sur les acides gras mono-insaturés.

Puisque le départ est possible sur les deux positions, deux intermédiaires réactionnels sont possibles et vont conduire à deux isomères chacun. La stabilisation entraîne, en effet, une déficience électronique sur deux positions pouvant être attaquée par l'oxygène sans distinction stérique (**Figure 11**).



**Figure 11** : Hydroperoxydes générés par auto-oxydation d'acides gras mono-insaturés.

En ce qui concerne la photo-oxydation des AGMI, le dioxygène singlet peut attaquer directement une insaturation selon deux positions. Dans le mécanisme de type II deux isomères peuvent se former (**Figure 12**).



**Figure 12** : Mécanisme d'oxydation par photo-oxydation de type II selon la réaction ène, exemple de l'acide oléique.

### II.4.2 Acide gras polyinsaturés

En comparaison avec les AGMI, les AGPI possèdent deux positions d'hydrogènes allyliques mais également au minimum une position d'hydrogènes doublement allyliques. Or l'énergie d'activation d'un hydrogène doublement allylique étant inférieure à un hydrogène allylique lors

## Contexte bibliographique

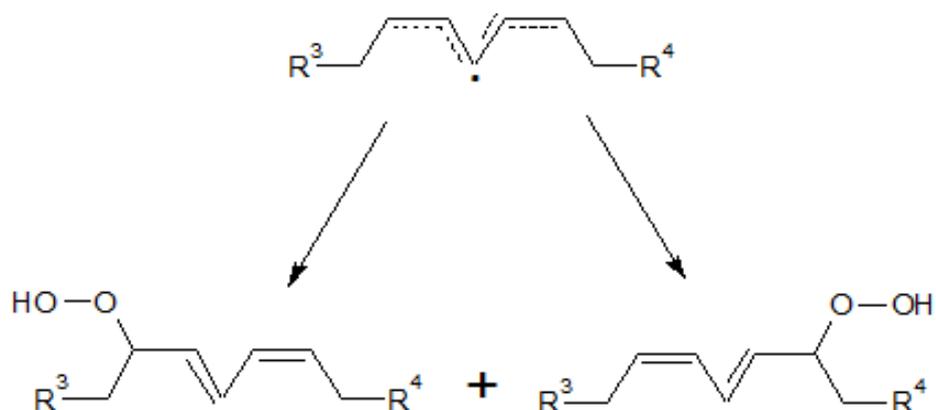
de l'auto-oxydation les liaisons entre ces hydrogènes et leur carbone seront plus faciles à rompre.

L'acide linoléique (*Annexe 6*) compte une seule position de ce type tandis que l'acide  $\alpha$ -linoléique (*Annexe 8*) en compte deux. Le départ d'un hydrogène doublement allylique entraîne la formation d'intermédiaires radicalaires stabilisés par un système à cinq atomes de carbone (*Figure 13*).



**Figure 13** : Mécanisme de génération des radicaux par auto-oxydation sur la position d'hydrogène doublement allylique des acides gras polyinsaturés.

Tout comme pour l'acide oléique ce système se retrouve déficient en électrons et l'oxygène sera capable de réagir sur l'une ou l'autre des extrémités. Il y a formation de deux isomères pour l'acide linoléique et quatre pour l'acide  $\alpha$ -linoléique (*Figure 14*).



**Figure 14** : Hydroperoxydes générés par auto-oxydation à partir d'acides gras polyinsaturés.

Le mécanisme d'oxydation par photo-oxydation de type II pour les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique est exactement le même que celui présenté figure 12 avec la production de deux isomères par double liaison.

La production des hydroperoxydes par auto-oxydation et photo-oxydation peut être résumée dans le tableau suivant :

**Tableau 4** : Pourcentages et répartition des mono-hydroperoxydes par auto-oxydation et photo-oxydation des acides oléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique [46].

Acide gras	Hydroperoxyde en	Pourcentage moyen (%)	Type de double liaisons
<b>Par auto-oxydation</b>			
Acide oléique	C8	26 ~ 28	-
	C9	22 ~ 25	
	C10	22 ~ 25	
	C11	26 ~ 28	
Acide linoléique	C9	48 ~ 53	Conjugués
	C13	48 ~ 53	
Acide $\alpha$ -linoléique	C9	28 ~ 35	Conjugués
	C12	8 ~ 13	
	C13	10 ~ 13	
<b>Par photo-oxydation</b>			
Acide oléique	C9	48	-
	C10	52	
Acide linoléique	C9	32	Conjugués
	C10	17	Non conjugué
	C12	17	Non conjugué
	C13	34	Conjugués
Acide $\alpha$ -linoléique	C9	23	Conjugués
	C10	13	Non conjugué
	C12	12	Conjugués
	C13	14	Conjugués
	C15	13	Non conjugué
	C16	25	Conjugués

### II.5 Dégradation des hydroperoxydes et formation des produits secondaires

Les hydroperoxydes sont capables de se dégrader par action de métaux, de la chaleur ou les radiations lumineuses (*eq.5*) ; (*eq.6*) ; (*eq.7*). Ces nouveaux produits, les produits secondaires de l'oxydation (*Figure 15*), vont être responsables de l'odeur rance et d'une dégradation organoleptique des huiles.

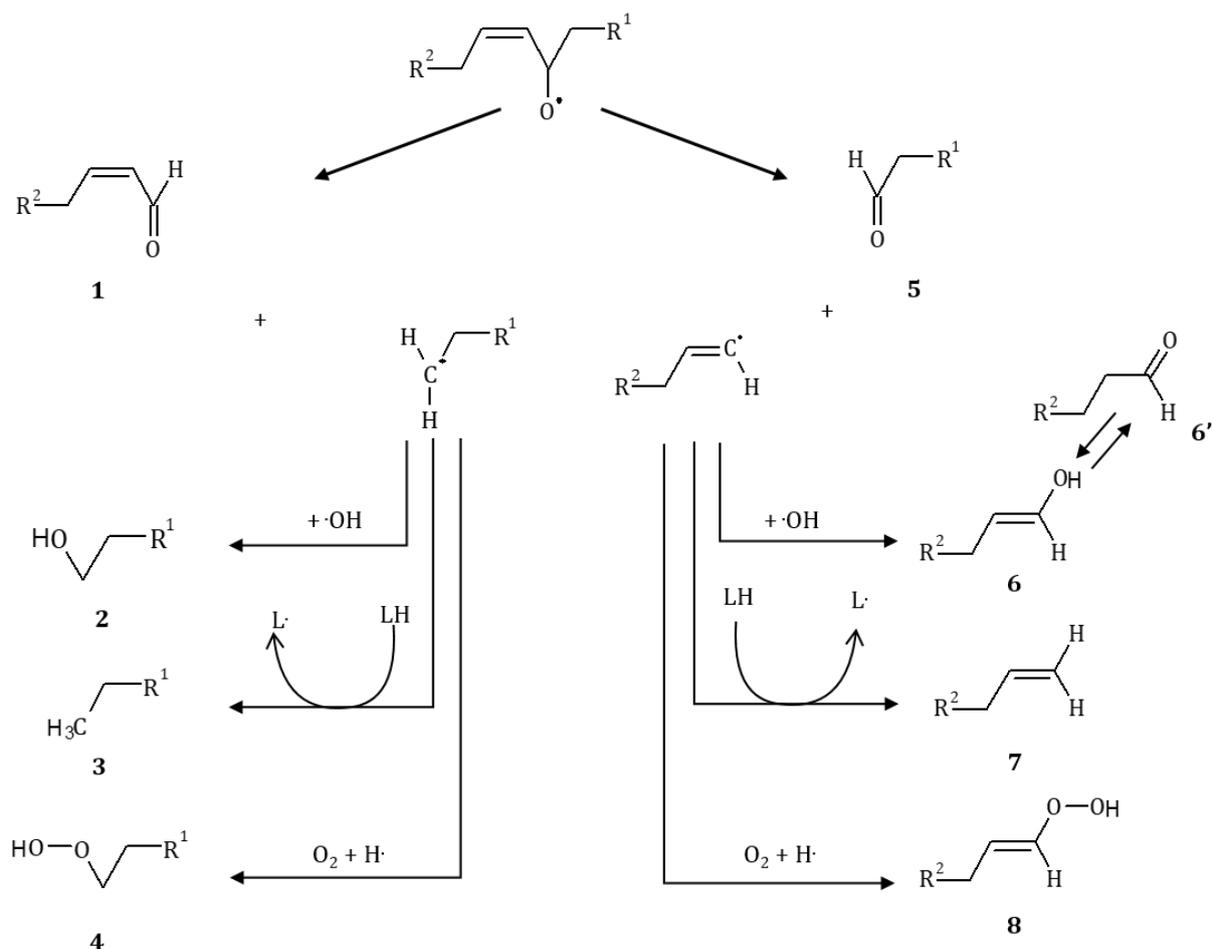


Figure 15 : Voies de décompositions possibles des hydroperoxydes lipidiques [44].

Tableau 5 : Production possible des produits secondaires d'oxydation à partir des acides oléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique.

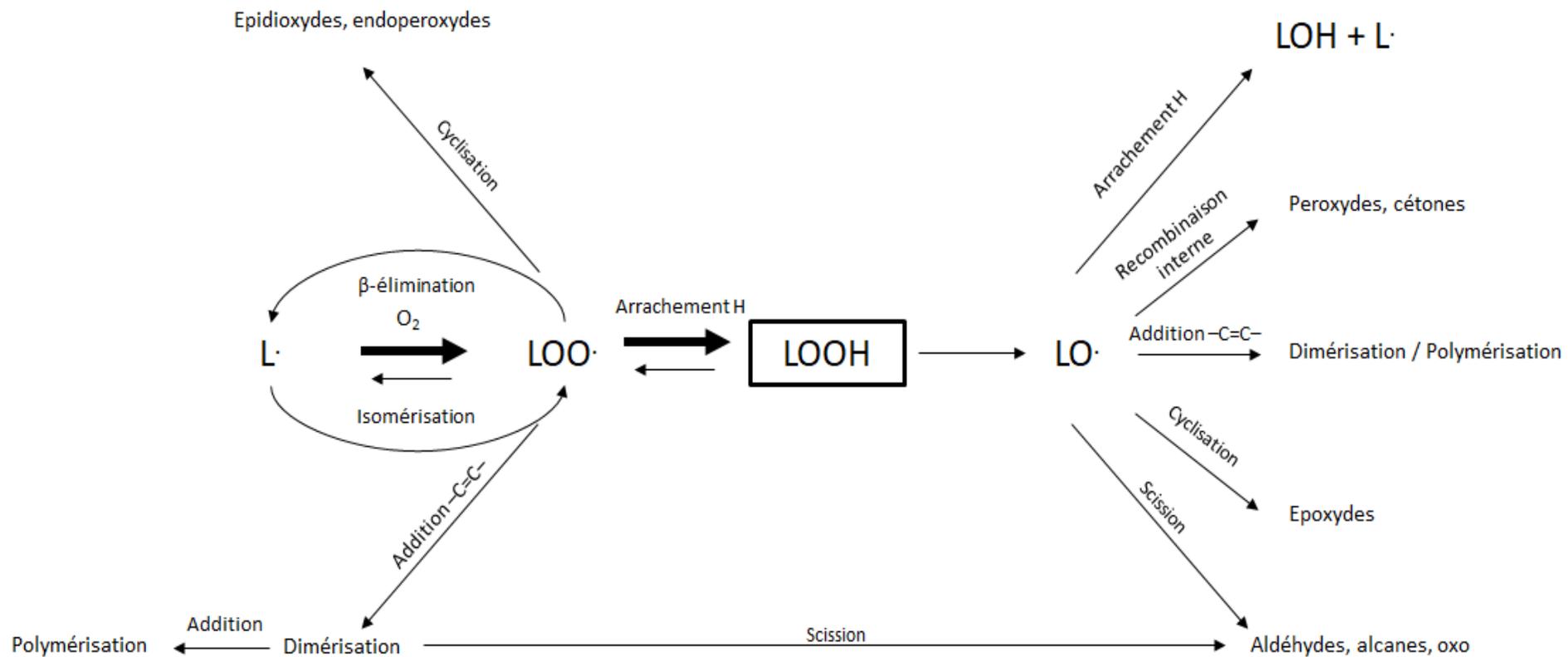
	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
R <sup>1</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>
R <sup>2</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>
1	2-décénal	2,4-décadienal	2,4,7-décatrienal
2	Acide 8-hydroxy-octanoïque		
3	Acide octanoïque		
4	Acide 8-hydroperoxy-octanoïque		
5	Acide 9-oxo-nonanoïque		
6	Nonen-1-ol	1,3-nonadien-1-ol	1,3,6-nonatrien-1-ol
6'	Nonanal	3-nonéanal	3,6-nonadiénal
7	Non-1-ène	1,3-nonadiène	1,3,6-nonatriène
8	1-hydroperoxy-nonène	1-hydroperoxy-nondiène	1-hydroperoxy-nontriène

## Contexte bibliographique

Les représentations précédentes et les travaux de E. N. Frankel [46] sur la distribution des hydroperoxydes produits par auto-oxydation et photo-oxydation sont admis dans la communauté scientifique. Ils permettent d'expliquer d'une manière simple les mécanismes. Cependant, de récentes études ont mis en avant que ces réactions sont bien plus complexes et sont bien plus interconnectées que ce qui est proposé depuis trois décennies. Pour K. M. Schaich, les hydroperoxydes sont des réservoirs pour la production de produits secondaires de l'oxydation [44].

La liaison O-H des hydroperoxydes possède une énergie d'activation plus forte que la liaison O-O des peroxydes (= 170-185 contre 375 kJ/mol) [47]. Toutefois malgré la faiblesse de la liaison O-O, les hydroperoxydes sont des espèces relativement stables à température ambiante et sont donc capables de s'accumuler, ceci explique qu'ils ont été les premiers produits d'oxydation observés [48]. C'est la raison pour laquelle, K. M. Schaich définit les radicaux peroxy ( $\text{LOO}\cdot$ ) et alcoxy ( $\text{LO}\cdot$ ) comme les deux espèces clés de l'oxydation [44].

Ces radicaux sont les entités qui vont subir des cyclisations, des  $\alpha$ - et  $\beta$ -scissions, l'addition de doubles liaisons, des recombinaisons ou encore de nouvelles oxygénations et produire diverses espèces telles que des polymères, des aldéhydes, des cétones, des alcanes, des époxydes, ou encore d'autres peroxydes (**Figure 16**). Ces radicaux sont donc à l'origine de la synthèse des produits secondaires de l'oxydation.



**Figure 16** : Schéma de synthèse des produits secondaires de l'oxydation des huiles à partir des hydroperoxydes comme produits primaires et source des radicaux peroxy et alcoxy d'après K. M. Schaich [44].

### II.6 Les principales méthodes de suivi de l'oxydation des lipides

Un grand nombre de méthodes permettent le suivi de l'oxydation. Nous pouvons citer par exemple :

- des méthodes analytiques (Chromatographie, ...)
- des méthodes chimiques (Dosage colorimétrique, dosage redox, ...)
- des méthodes physiques (RMN, RPE, ...)

Classiquement ces méthodes d'analyse cherchent à évaluer l'état d'avancement de l'oxydation des huiles en se focalisant sur un substrat particulier. En effet, il n'est pas possible de trouver une méthode qui puisse mesurer tous les changements à la fois.

Ce sont, en général, des méthodes standardisées. Il est possible de détecter l'absorption d'oxygène, la disparition d'un réactif, la formation de radicaux libres, la formation de produits primaires de l'oxydation ou la formation de produits secondaires de l'oxydation (**Tableau 6**).

**Tableau 6** : Principales méthodes de routine de caractérisation de l'oxydation des huiles.

Détection		Analyse	Principe
Réactifs	Dioxygène	Absorption	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure de la diminution de la pression de dioxygène par GC.</li> <li>Mesure électrochimique.</li> </ul>
		Gain de masse	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure de l'augmentation de la masse gagnée par fixation du dioxygène.</li> </ul>
	Acides gras	Perte d'acides gras insaturés	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analyse chromatographique (composition en acide gras).</li> <li>Indice d'iode.</li> </ul>
Produits primaires de l'oxydation	Hydroperoxydes	Dosage iodométrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduction des hydroperoxydes en présence d'ion iodure. Mesure du diode formé par thiosulfate de sodium.</li> </ul>
		Complexation des ions ferrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduction des hydroperoxydes par les ions Fe<sup>2+</sup>. Complexation des ions Fe<sup>3+</sup> par thiocyanate d'ammonium</li> </ul>
		Infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduction des hydroperoxydes en présence de TPP. Mesure quantitative de la formation de TPP=O à 542 cm<sup>-1</sup></li> </ul>
		Chimioluminescence	<ul style="list-style-type: none"> <li>Détection des produits de chimioluminescence entre le luminol et les hydroperoxydes.</li> </ul>
		GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dosage des alcools générés par réduction des hydroperoxydes</li> </ul>
	Diènes/triènes	Spectroscopie UV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure des absorbances à 233 nm (diènes) / 268 nm (triènes)</li> </ul>
	Radicaux libres	RPE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Absorption d'énergie microonde de l'échantillon placé dans un champ magnétique</li> </ul>
Produits secondaires de l'oxydation	Dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique	TBARS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Génération d'un complexe coloré par réaction entre l'acide thiobarbiturique et les dérivés d'oxydation (ex : malondialdéhyde)</li> </ul>
	Aldéhydes	<i>p</i> -Anisidine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Génération d'un complexe coloré entre la <i>p</i>-anisidine et les aldéhydes (ex : 2-décenal ; 2,4 décadienal ; 2,4,7 décatrienal)</li> </ul>
	Carbonyles	Taux de carbonyles	<ul style="list-style-type: none"> <li>Carbonyles totaux ou spécifique par différentes techniques spectrométriques et HPLC</li> </ul>
	Indice de stabilité oxydatif (OSI)	Rancimat	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure automatique de changements rapide de conductivité</li> </ul>
	hydrocarbures	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Détection des carbonyles et hydrocarbures volatiles</li> </ul>

### Chapitre III. L'oxydation des huiles insaturées

Nous présentions dans le chapitre précédent, les mécanismes responsables de l'oxydation des lipides. Toutefois les huiles, bien que composées en très grande majorité de triglycérides (> 95%), ne sont pas exemptes de composés mineurs et encore moins dans le cas d'huiles non raffinées comme l'huile de lin. En effet, la présence d'eau, de phospholipides, de métaux ou d'antioxydants peut avoir pour conséquence d'accélérer ou ralentir l'oxydation des huiles.

#### III.1 Les facteurs qui vont influencer l'oxydation des huiles

##### III.1.1 La composition en acides gras

Les huiles sont composées à plus de 95% en masse de triglycérides. Les acides gras qui composent les triglycérides vont pouvoir influencer la stabilité des huiles. Plus le degré d'insaturation d'une huile est important, plus elle est sujette à l'oxydation. Il a été reporté que les taux relatifs d'auto-oxydation des acides oléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique sont respectivement de 1 : 40 à 50 : 100 par rapport à l'absorption d'oxygène ou 1 : 12 : 25 par rapport au développement des peroxydes [49], [50].

##### III.1.2 Les associations colloïdales dans les huiles brutes

Les huiles contiennent des quantités diverses et variées de composés mineurs, tels que des phospholipides, des acides gras libres, des mono- ou di-glycérides, des produits d'oxydation, des stérols, des antioxydants, des protéines ainsi que de l'eau à l'état de trace.

Séparément chacun des composés mineurs est capable d'avoir une influence sur la stabilité des huiles. Les phospholipides sont connus pour avoir une activité anti-oxydante, bien qu'ils soient eux-mêmes des esters d'acides gras. L'activité anti-oxydante des phospholipides est attribuée à la chélation métallique, leur capacité à décomposer les hydroperoxydes ou encore à piéger des radicaux [51], [52]. Cependant, ils peuvent également être responsables d'une activité pro-oxydante lorsqu'ils sont présents à de fortes concentrations par diminution de la tension de

surface de l'huile. Ce phénomène permet une plus grande diffusion de l'oxygène dans l'huile [51], [52].

Les acides gras libres sont également connus pour être des espèces pro-oxydantes par leurs facultés à former des complexes avec les métaux. Ces complexes augmentent la solubilité des métaux [53]. De plus, ils sont capables de rompre les hydroperoxydes par catalyse acide [53]–[55].

Les composés phénoliques, la vitamine E ou encore les phytostérols sont connus pour avoir des propriétés anti-oxydantes plus qu'intéressantes pour protéger les huiles.

La vitamine E est composée de huit isomères (quatre tocophérols et quatre tocotriénols). Il s'agit d'une vitamine liposoluble comportant un groupement phénolique. C'est l'antioxydant le plus répandu à l'état naturel dans les huiles et les graisses alimentaires. L'huile de tournesol, par exemple, possède l'une des concentrations en tocophérol ( $\alpha$ ) parmi les plus importantes des huiles végétales avec une valeur moyenne comprise entre 400 et 900 mg/kg d'huile [8]. Ainsi une huile de tournesol raffinée présente une teneur en  $\alpha$ -tocophérol, proche de 600 mg/kg d'huile [56]. En revanche, dans l'huile de lin, bien que sa concentration soit moindre, elle est aussi importante avec des concentrations moyennes comprises entre 300 et 500 mg/kg de  $\gamma$ -tocophérol cette fois [8], [56].

Les stérols représentent, eux, un large groupe de composés naturels. Ceux, d'origine végétale, sont des analogues structuraux du cholestérol, principal stérol animal. Leurs sources varient selon l'huile étudiée [57]. Les campestérol, stigmastérol ou encore sitostérol sont connus pour être des molécules avec un certain pouvoir antioxydant [58], [59]. Les phytostérols présentent, de plus, un intérêt certain pour la santé humaine en réduisant le risque de maladies cardiovasculaires (action antagoniste au cholestérol) [60], [61], mais sont aujourd'hui reconnus comme de possibles perturbateurs endocriniens. La concentration en phytostérols dans l'huile de tournesol est parmi les plus faibles, puisque cette huile ne contient que 2 500 mg/kg et majoritairement du  $\beta$ -sitostérol [62]. Dans l'huile de lin, les proportions sont plus importantes et sont comprises entre 4 000 et 4 700 mg/kg d'huile, majoritairement du campestérol et du  $\beta$ -

## Contexte bibliographique

sitostérol [62], [63]. Enfin, les composés phénoliques vont pouvoir protéger les huiles de l'oxydation grâce à leur activité anti-oxydante. En revanche, ce sont des molécules le plus souvent glycosylées ce qui les rend encore plus hydrophiles que ne le sont leurs équivalents non glycosylés (aglycones). Par conséquent, les quantités de composés phénoliques sont faibles et leur nature dépend des huiles étudiées. Les graines de tournesol sont riches en acide chlorogénique avec des concentrations comprises entre 9 500 et 12 200 mg/kg de matière sèche [64]. En revanche, les acides vanillique (69 µg/kg d'huile) et caféique (49 µg/kg d'huile) sont, selon une autre étude, les deux principaux composés phénoliques retrouvés dans l'huile de tournesol [65]. Ce sont les lignanes qui sont présents majoritairement dans les graines de lin, comme le sécoisolaricirésinol diglucoside (86,7 - 109,7 µg/g de graines) par exemple et des acides hydroxycinnamiques (acides férulique, coumarique et caféique) en quantités moins importantes [66]. Ces faibles concentrations en comparaison avec la le tocophérol et leurs faibles solubilités dans les huiles ont questionné les chercheurs sur leur capacité à protéger les huiles.

Pour y répondre il faut tout d'abord comprendre comment ces composés mineurs s'organisent dans les huiles brutes. Puisque l'eau et l'huile sont quasiment non miscible, elles vont se repousser l'une de l'autre. L'eau peut être obtenue lors des étapes d'extraction et de raffinage. Les teneurs en eau des huiles vont néanmoins varier pendant le stockage. L'eau atmosphérique peut être apportée par l'ouverture des contenants, tandis que celle présente dans l'huile peut, elle, s'échapper. Selon Chaiyasit et ses collaborateurs, la détermination par titration au Karl Fisher indique que les huiles fraîches contiendraient des teneurs en eau proche de 0,02% massique tout en précisant que l'huile d'olive vierge peut avoir une concentration plus importante de l'ordre 0,1% massique [67]. Selon Xenakis *et al.*, l'huile d'olive peut même atteindre des valeurs proches de 0,3% massique [68]. Ces observations soulignent donc que les huiles vierges peuvent être pourvues d'un taux d'humidité plus important que les huiles raffinées. Wold et ses collaborateurs ont mis en évidence un taux d'humidité dans l'huile de lin de 0,5% massique avec la même technique qui sera confirmé par une autre étude menée par

## Contexte bibliographique

Choo *et al.*, qui indiquait que pour sept huiles de lin commerciales les taux d'humidité atteignaient des valeurs comprises entre 0,5 et 1,1% massique [69], [70]. En revanche, sur cette dernière étude, la technique pourrait surestimer la teneur en eau car elle utilisait la méthode A.O.C.S Ca 2C-25 [71] qui prend en compte la perte de masse d'un échantillon par évaporation, donc l'humidité mais également d'autres espèces volatiles.

La présence de composés mineurs dans les huiles alimentaires, en plus de l'eau, va permettre la formation d'associations colloïdales. Nous pouvons alors parler d'agents de surfaces et la balance hydrophile/lipophile (HLB *hydrophobic-lipophilic balance*) est une grandeur caractéristique des agents de surface. Grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les phospholipides (HLB  $\approx 8,0$ ), acides gras libres (HLB  $\approx 1,0$ ) ou encore mono- (HLB  $\approx 3,4-3,8$ ) et di-glycérides (HLB  $\approx 1,8$ ) font partie de ces agents de surfaces et vont entraîner la formation de micelles inverses ou de structures lamellaires par auto-assemblage [67].

Ces organisations vont être thermodynamiquement plus stables que chaque molécule dispersée dans l'huile et c'est aux interfaces de ces colloïdes que vont se produire les phénomènes d'oxydation car ils sont le lieu privilégié de rencontre des molécules hydro- et liposolubles, de la solvataion d'ions métalliques ou de la présence des hydroperoxydes lipidiques [67].

Les micelles inverses, par exemple, sont des formes sphériques nanométriques qui, contrairement aux micelles directes, vont s'organiser autour de gouttelettes d'eau entourées des surfactants le tout dans un milieu lipophile.

Les surfactants vont servir à stabiliser les micelles inverses où les parties polaires seront dirigées vers les gouttelettes d'eau tandis que les parties hydrophobes seront quant à elles dirigées vers l'huile. La concentration micellaire critique (CMC) est une grandeur physico-chimique extrêmement importante dans la formation des micelles inverses, puisque les micelles ne se forment que lorsque la concentration du surfactant est supérieure à la CMC. Chaque molécule possède sa CMC propre, dépendante du solvant [72]. C'est pourquoi la formation des micelles inverses est gouvernée par la nature et la teneur des phospholipides et la composition

des huiles. Cependant, les hydroperoxydes, les acides gras libres ainsi que les mono- et diglycérides sont eux aussi capables de former des micelles inverses.

Les micelles inverses peuvent se définir comme des bioréacteurs où vont se jouer la majorité des phénomènes d'oxydation dans les huiles.

Des études ont démontré que dans des émulsions du type huile dans l'eau, l'oxydation lipidique est dépendante des propriétés physiques des colloïdes. Des interfaces d'émulsions chargées positivement sont capables de réduire les interactions entre le fer et les hydroperoxydes, ce qui participe à l'inhibition de l'oxydation lipidique [73].

Chaiyasit *et al.*, a précédemment démontré que les concentrations en eau, acides gras ou encore en phospholipides ont une influence sur la taille des micelles inverses. En effet, ils ont observé la concentration d'une sonde fluorescente amphiphile, la 5-dodécanylaminofluorescéine, aux interfaces eau-huile des agrégats, en faisant varier les teneurs des différents composés (phospholipides, eau, acides gras libres). Plus la concentration en di-oléoyl-phosphatidylcholine (DOPC) augmentait et plus l'intensité de l'émission de fluorescence était importante. Selon Chaiyasit cette particularité est à mettre au profit de la DOPC qui favorise, soit l'augmentation de la concentration, soit modifie l'emplacement physique de la sonde au niveau de l'interface eau-huile [73].

Une autre étude faite par Chen et son équipe a démontré que des micelles inverses produites artificiellement dans de l'huile de soja, également à partir de DOPC, sans la présence du moindre antioxydant réduisait la stabilité oxydative de l'huile. En revanche, l'ajout de tocophérol ( $\alpha$ -tocophérol) ou de Trolox, son équivalent synthétique hydrophile, à la concentration de 10  $\mu$ M était préférable en présence de micelles de DOPC, qu'aux conditions sans DOPC [74]. Cette étude a montré que l'utilisation de Trolox est plus efficace pour protéger les huiles que le tocophérol quelles que soient les conditions (avec ou sans DOPC). L'utilisation de NBD-PE une sonde fluorescente dérivée de phosphatidyléthanolamine, a montré que la fluorescence était plus affectée dans le cas du Trolox que du tocophérol. Cela a permis à Chen et ses collaborateurs d'en

déduire que la plus grande solubilité du Trolox pour l'eau permet une meilleure partition dans la phase aqueuse que le tocophérol [74].

C'est l'une des raisons du développement de la théorie de Porter sur le paradoxe polaire [75]. En effet, si l'oxydation des lipides se fait préférentiellement au niveau des micelles inverses, un antioxydant hydrophile qui va se retrouver préférentiellement dans la gouttelette d'eau pourra être plus efficace qu'un antioxydant liposoluble, comme le tocophérol, solubilisé préférentiellement dans l'huile et donc agir moins efficacement.

### III.1.3 Les procédés industriels

Nous venons de voir que les composés mineurs peuvent être responsables d'une diminution de la stabilité des huiles. Des procédés industriels sont utilisés afin de réduire leur présence dans les huiles. Il s'agit des étapes de raffinage des huiles. Généralement, deux voies sont possibles, le raffinage par voie chimique ou par voie physique.

Parmi les étapes de raffinage, le dégommeage permet de s'affranchir de la présence des phospholipides, la neutralisation de celle des acides gras libres, la décoloration va permettre d'éliminer des pigments (chlorophylles, caroténoïdes) potentiellement pro-oxydants et enfin l'injection de vapeur sous vide permet la désodorisation des huiles [76]. Tous ces traitements nécessitent l'utilisation d'acides et de bases, d'eau à des températures importantes (230-250°C) qui ne sont pas sans effets pour les substances bioactives d'intérêt comme la vitamine E (tocophérols/tocotriénols) (*Annexe 48*), les stérols ou encore (poly)phénols. Bien que ces étapes soient utilisées pour améliorer la stabilité des huiles, il n'est pas rare de voir une stabilité inférieure dans le cas d'une huile raffinée plutôt que vierge [77].

### III.1.4 La pression partielle en dioxygène

L'oxydation nécessite, bien évidemment, de l'oxygène. La présence de dioxygène dans l'huile est dépendante de la pression partielle en oxygène. De manière logique plus cette pression est importante, plus grandes seront les quantités de dioxygène dissous dans l'huile. Il est à noter qu'une grande quantité de dioxygène dissous dans l'huile est un facteur positif d'oxydation [78].

Le rapport de la surface sur le volume d'huile est un paramètre influençant également la stabilité. Plus ce rapport est élevé et plus l'huile est sensible à l'oxygène. Dans ce cas l'oxydation relative est moins dépendante de la teneur en dioxygène.

### III.1.5 La température et la luminosité

Une étude sur de l'huile de poisson stockée dans le noir à 0°C, 20°C ou 50°C a montré deux phénomènes inverses. Alors que pour l'huile à 0°C et 20°C, une accumulation d'hydroperoxydes était observée, l'huile stockée à 50°C indiquait que les taux de produits de la décomposition des hydroperoxydes étaient supérieurs à ceux de leur formation [79]. Ces résultats prouvent qu'à température ambiante, la production d'hydroperoxydes est capable de s'accumuler jusqu'à un certain stade, mais qu'une élévation de la température va accélérer l'oxydation des lipides et la décomposition des hydroperoxydes. Cependant à faible température (0°C) la production d'hydroperoxyde en est réduite.

Les lumières de faible longueur d'onde sont plus néfastes sur l'oxydation d'une huile que celles de grandes longueurs d'onde. Bien qu'il soit prouvé que la température peut agir sur la production de  $^1O_2$ , la production de dioxygène singulet par rayonnements lumineux est bien plus importante. L'influence de la température tend à diminuer celle de la lumière et l'influence de cette dernière sur l'oxydation lipidique est surtout observable à faible température et lorsque l'huile est stockée dans un récipient transparent. En effet, l'emballage contenant l'huile revêt une grande importance sur la stabilité de l'huile puisque l'incorporation d'absorbants UV dans une bouteille plastique peut améliorer la stabilité vis-à-vis de la photo-oxydation [80].

## III.2 Les moyens de protection des huiles

### III.2.1 Les modes de conservations des huiles

L'un des premiers moyens de protection des huiles va être la façon dont elles sont conservées. Puisque la température et la luminosité peuvent accélérer l'oxydation des huiles alimentaires, il est conseillé de les conserver à l'abri de la lumière mais également loin de toutes sources de chaleur voire même au réfrigérateur, comme c'est le cas pour l'huile de lin [79].

Limiter la présence d'oxygène est également une action protégeant les plus fragiles telles que l'huile de lin, qui est conditionnée dans une bouteille sous atmosphère inerte à savoir du diazote (N<sub>2</sub>), ainsi tant que la bouteille n'est pas ouverte il n'y a pas de présence d'oxygène provenant de l'air ambiant.

### III.2.2 Les formulations industrielles

Au niveau industriel, les moyens de conservation ne suffisent pas toujours à améliorer considérablement la protection des huiles. Des projets de recherche se sont alors penchés sur de nouvelles formulations pour augmenter la stabilité oxydative des huiles brutes ou protéger les acides gras indispensables (LA et ALA).

La formulation de margarine (une émulsion eau dans huile) est l'un des moyens mis en place par les industriels pour augmenter les apports en oméga-3, 6 et 9 pour la population tout en permettant une durée de conservation accrue. En France, ces margarines font d'ailleurs l'objet de certaines allégations nutritionnelles grâce à leurs compositions particulières, comme c'est le cas pour la margarine Fruit d'Or® du groupe Unilever [81]. Il n'est pas rare non plus qu'elles soient enrichies en phytostérols pour leurs activités hypocholestérolémiantes. Une autre formulation relativement simple à mettre au point au niveau industriel est le mélange d'huiles afin de concourir à une composition lipidique plus qu'intéressante pour les consommateurs tout en montrant une stabilité correcte (ISIO 4 de Lesieur® [82] ou plus particulièrement de la marque Vigean® [83]).

D'autres techniques, comme les procédés d'encapsulation des huiles se sont développés principalement afin de les protéger des conditions extérieures (oxydation, lumière). En effet, les formulations par atomisation (spray drying) permettent d'obtenir des poudres où les taux d'humidité et la distribution des particules vont être optimisés par les paramètres de la formulation. C'est dans ce contexte que de nombreuses poudres contenant des huiles de poisson ont vu le jour sur le marché, comme par exemple *Omega-3 Powder ZP* [84], *MEG-3®* [85] ou encore *Dry n-3® omega-3 powders* [86]. Ces produits obtenus par séchage par atomisation sont

commercialisés pour protéger les huiles et/ou empêcher les odeurs désagréables des huiles de poisson [87].

### III.2.3 L'ajout d'antioxydants

Un antioxydant est une espèce chimique qui possède la capacité d'inhiber ou simplement ralentir l'oxydation d'une autre espèce chimique. Ces molécules sont donc capables d'accroître la stabilité des huiles. Le ralentissement de l'oxydation peut alors être obtenu, soit par le piégeage de radicaux, soit en amont par une inactivation des molécules sensibilisatrices et de l'oxygène singulet. Certaines huiles vont être naturellement riches en molécules anti-oxydantes.

Cependant comme nous le présentions précédemment, les études de Porter, sur le paradoxe polaire, pourraient permettre une meilleure protection des huiles tout en utilisant de faibles ou très faibles concentrations d'antioxydants. L'huile d'olive extra vierge, par exemple, est naturellement riche en composés phénoliques hydrophiles tels que l'hydroxytyrosol ou l'oleuropéine. D'autre part, il semble que le surdosage du tocophérol peut être néfaste pour la santé humaine ou avoir des effets pro-oxydants, or de nos jours elle est utilisée dans de nombreux produits, grâce à son faible coût. Ce qui pourrait engendrer une surconsommation par les consommateurs.

Pour cette raison, la recherche se penche de plus en plus sur des méthodes d'extraction qui permettraient aux composés phénoliques naturellement présents dans les graines d'oléagineux, d'être co-extraits ou bien d'enrichir les huiles avec les extraits phénoliques issus des tourteaux ou d'autres plantes, comme les extraits de thé vert ou de romarin.

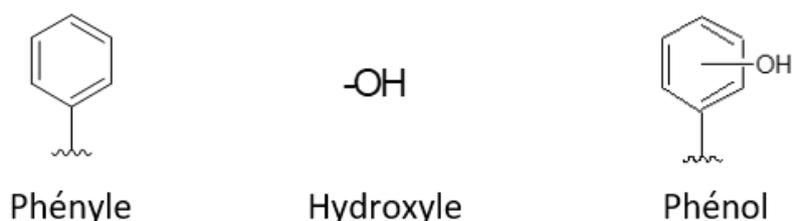
## Chapitre IV. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires retrouvés chez les plantes et les champignons [88]. Ils vont remplir de nombreux rôles physiologiques tels que la pigmentation [89] ou encore la défense de la plante [90]. La pigmentation peut également avoir différents rôles, comme le biomimétisme ou l'attraction d'insectes pollinisateurs.

### IV.1 Généralités

#### IV.1.1 Les classes de composés phénoliques

Comme leur nom l'indique, les composés phénoliques possèdent au minimum un cycle phényle substitué par au minimum un hydroxyle, nous parlons alors de groupement phénolique (*Figure 17*).



**Figure 17** : Représentation schématique des groupements fonctionnels phényle, hydroxyle et phénol.

Le squelette carboné est un moyen de classer les composés phénoliques en sept grandes catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, les stilbènes, les naphtoquinones et les lignanes (*Figure 18*). Les acides phénoliques vont eux-mêmes se subdiviser en deux classes (les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques), les tannins en deux classes (tannins condensés et hydrolysables) et enfin les flavonoïdes en sept classes (flavonols, flavanonols, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanes) (*Figure 18*). Les composés phénoliques sont tous issus de la voie de l'acide shikimique (*Annexe 13*) [91]. L'acide shikimique étant lui-même synthétisé par des intermédiaires de la glycolyse (phosphoenolpyruvate (*Annexe 14*)) et de la voie des pentoses phosphate (érythrose-4-phosphate (*Annexe 15*)) [92].

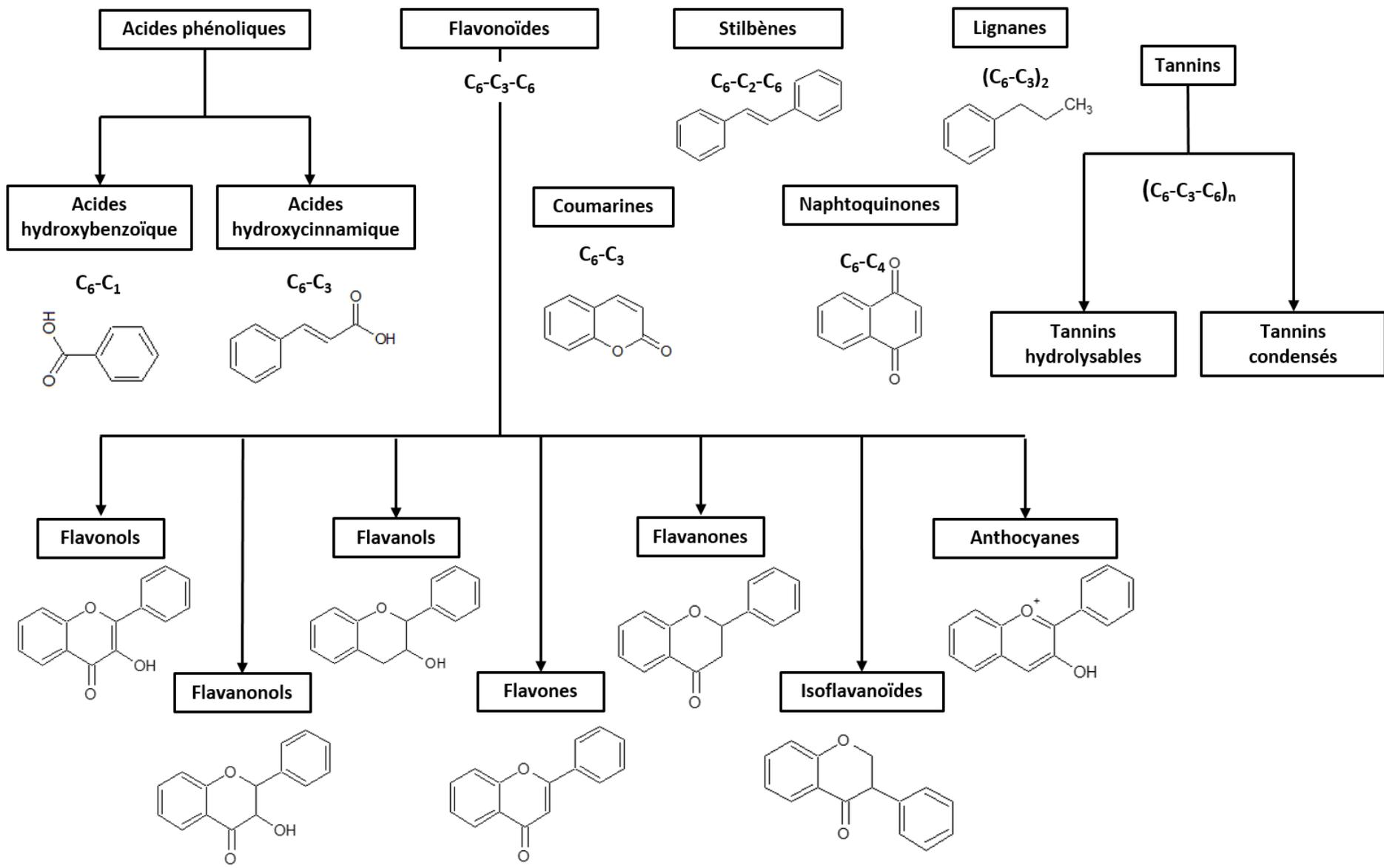


Figure 18 : Présentation des différentes classes de composés phénoliques et leurs structures carbonées générales

### IV.1.2 Modes d'action des composés phénoliques

#### IV.1.2.1 Piégeurs de radicaux

L'un des principaux mécanismes d'inhibition de l'oxydation est le piégeage des radicaux. Lors de l'auto-oxydation lipidique, la génération de radicaux libres est à mettre au crédit des lipides eux-mêmes. Les radicaux tels que lipidiques ( $L\cdot$ ), peroxy ( $LOO\cdot$ ) ou alcoxy ( $LO\cdot$ ) vont être les principales cibles des antioxydants de ce type. Le piégeage de radicaux libres se fait soit grâce au transfert d'atome d'hydrogène ou HAT (*H-Atom Transfer*), soit par le mécanisme de transfert d'électron [93], [94].

Bien que dans les deux cas il y a transfert d'un hydrogène et d'un électron, le HAT intervient de manière directe tandis que le mécanisme du transfert d'électron intervient de manière indirecte. Le HAT consiste au transfert d'un atome d'hydrogène (à savoir un électron et un proton) par rupture homolytique de la liaison oxygène-hydrogène (**Figure 19**).

Dans un transfert indirect, deux étapes sont nécessaires. L'ordre de départ conduit à deux possibilités de transfert. Le premier mécanisme consiste au départ de l'électron pour le radical ( $L\cdot$ ). Il se forme alors l'anion ( $L^-$ ) correspondant et le radical phénoxy sous sa forme cationique ( $AOH^+$ ). Ce cation peut par la suite se dissocier en radical phénoxy ( $AO\cdot$ ) et proton ( $H^+$ ) capable de réagir avec l'anion ( $L^-$ ) pour former une espèce neutre non radicalaire (LH).

Le second mécanisme commence par le départ d'un proton ( $H^+$ ). Il se forme dans ce cas un anion ( $AO^-$ ). Cet anion transfère ensuite un électron au radical lipidique, formant un radical phénoxy ( $AO\cdot$ ) et l'anion correspondant ( $L^-$ ) avec lequel le proton formé précédemment pourra réagir et former une espèce neutre et non radicalaire (LH) (**Figure 19**) [91], [93].

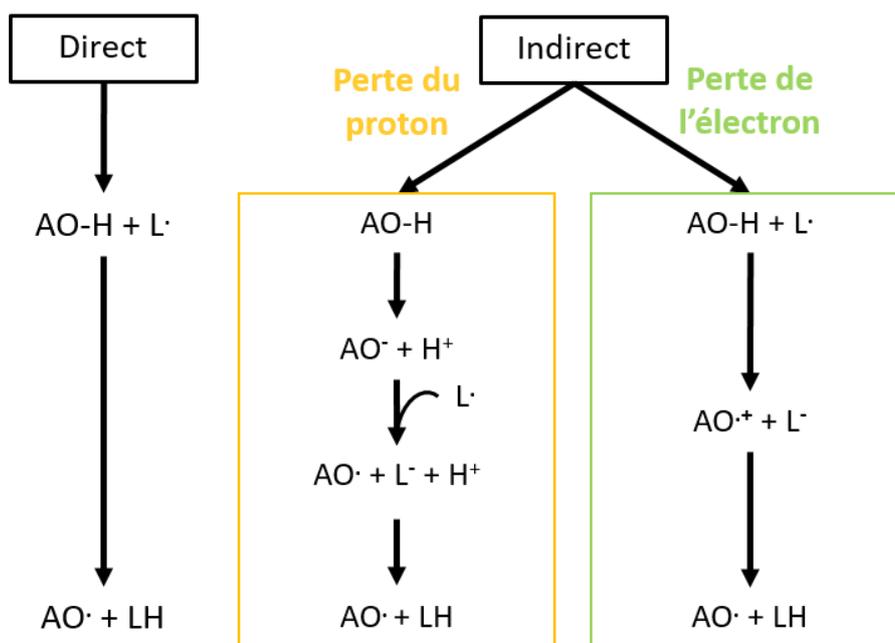
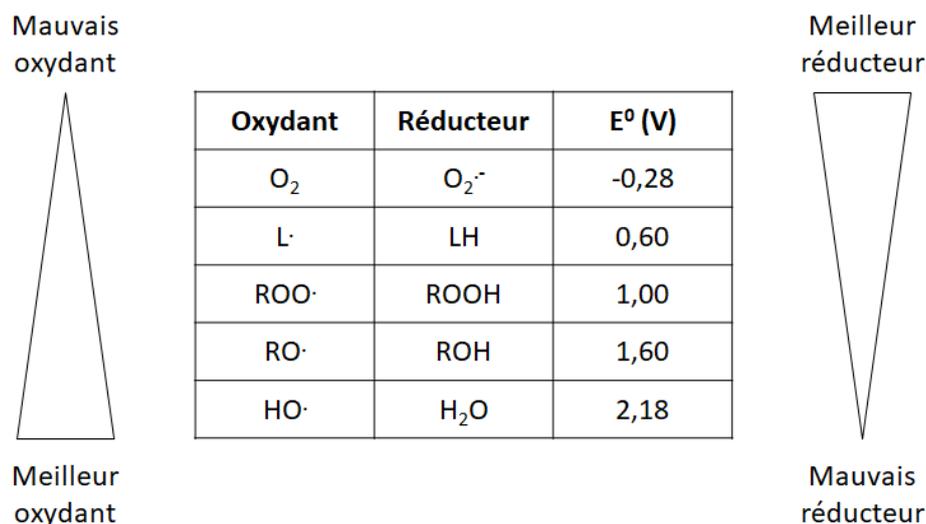


Figure 19 : Mécanisme de cession d'un atome d'hydrogène direct et indirect.

Il est possible de mesurer la capacité de cession d'un atome d'hydrogène grâce à la mesure de l'énergie de dissociation de liaison ou BDE (pour **Bond Dissociation Enthalpy**) [93], [94]. Plus cet indice est faible et plus le transfert est aisé. En effet, il signifie que l'apport énergétique pour rompre la liaison entre l'oxygène et l'hydrogène, de la fonction hydroxyle du phénol, est faible. Il permet ainsi de définir l'aptitude d'une molécule à céder son atome d'hydrogène.

Le transfert d'atome d'hydrogène est un mécanisme d'oxydo-réduction. Il signifie que les potentiels standards ( $E^0$ ) des couples redox correspondants vont être une des clés de l'efficacité des antioxydants. Comme présenté figure 20, nous remarquons que les antioxydants piègeurs de radicaux nécessitent de posséder un potentiel redox inférieur aux radicaux alcoyles ( $E^0 = 1,60$  V), peroxydes ( $E^0 = 1,00$  V) et/ou lipidique ( $E^0 = 0,60$  V) pour être efficace faisant suite à la règle du gamma.



**Figure 20** : Potentiels standard ( $E^{\circ}$ ) de radicaux oxygénés et d'origine lipidique.

Il est cependant, nécessaire de former un composé suffisamment stable pour éviter de remplacer les radicaux avec lesquels ils ont réagi dans la propagation de l'oxydation. La stabilisation des radicaux AO· formés est obtenue [95], [96] :

- par délocalisation électronique sur le cycle aromatique,
- par transfert d'un nouvel atome d'hydrogène conduisant à la formation de quinone,
- par réaction covalente avec un autre radical.

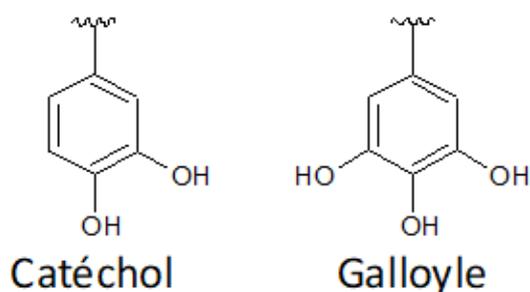
#### IV.1.2.2 Chélateur de métaux

Lors des différents processus industriels tels que l'extraction ou le raffinage, il n'est pas rare de récupérer des traces de métaux de transition. Garrido et ses collaborateurs ont déterminé la concentration en fer, cuivre, zinc, sodium, potassium ou encore magnésium d'huiles de colza, tournesol, maïs, soja et olive [97]. La présence des ions métalliques ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) peut catalyser l'auto-oxydation lipidique. En effet, ils vont abaisser l'énergie d'activation nécessaire à la rupture de la liaison L-H ou intervenir dans des réactions d'Haber-Weiss ou Fenton. Si bien qu'il existe depuis le début des années 1980 une norme issue du *Codex Alimentarius* fixant à un maximum de 5,0  $\mu\text{g/g}$  pour le fer et 0,4  $\mu\text{g/g}$  pour le cuivre dans les huiles vierges [98]. Les données disponibles dans la littérature indiquent des concentrations de 2,46  $\mu\text{g/g}$  d'huile pour le fer et de 0,67  $\mu\text{g/g}$  d'huile pour le cuivre dans l'huile de lin [99], tandis que dans l'huile de

## Contexte bibliographique

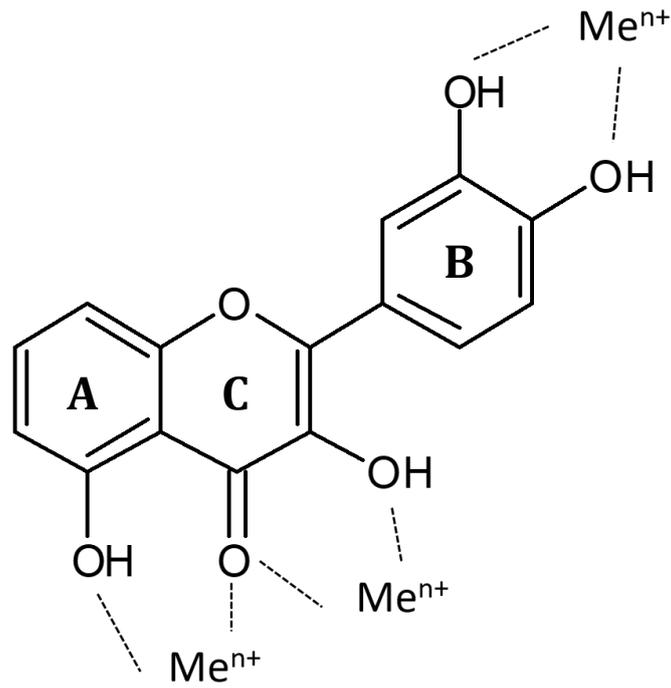
tourne-sol commerciale ces concentrations sont plutôt de l'ordre 0,094 µg/g d'huile pour le fer et de 0,002 µg/g d'huile pour le cuivre [100].

Certains antioxydants possèdent au sein de leur structure des groupements fonctionnels tels que le groupement catéchol (1,2-dihydroxybenzène) ou encore galloyle (1,2,3-trihydroxybenzène) (**Figure 21**). Ces groupements vont, en présence de métaux, former des liaisons de coordinations permettant de les piéger. Ce mode d'action est désigné par le terme de chélation. La chélation a pour conséquence d'inhiber l'oxydation grâce à la formation de complexes insolubles, en diminuant le potentiel redox des métaux ou encore par simple encombrement stérique du complexe.



**Figure 21** : Représentation schématique des groupements catéchol et galloyle retrouvés dans de nombreux composés phénoliques.

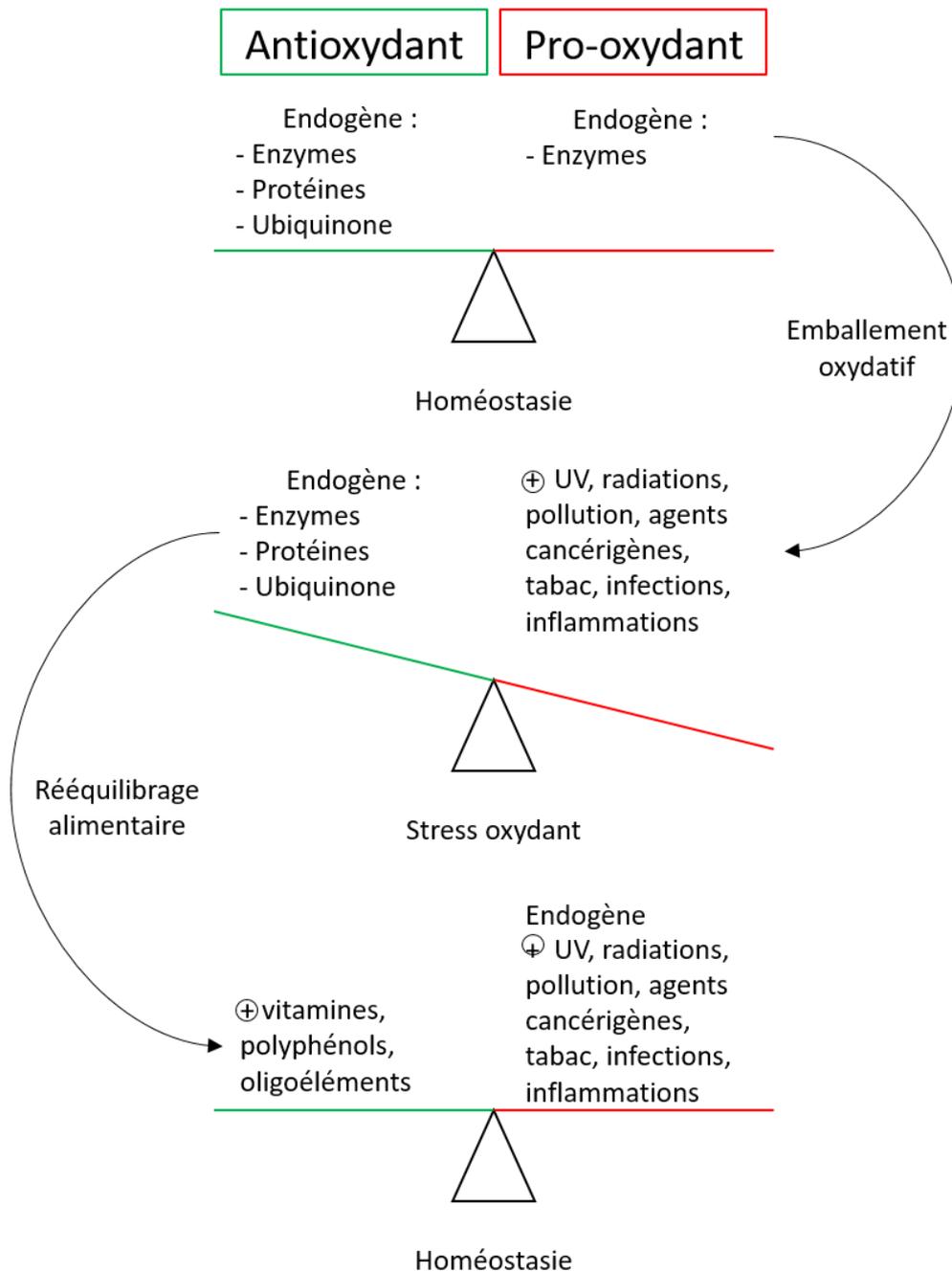
Parmi les chélateurs de métaux, les flavonoïdes et les acides phénoliques vont être les plus nombreux et les plus efficaces. En effet, nous retrouvons ces groupements fonctionnels dans leurs squelettes (**Figure 21**). Pietta montre que les ions métalliques sont capables de se lier par coordination aux cycles B du groupement catéchol et par couplage avec les fonctions cétones et hydroxyles qui peuvent se trouver sur les cycles A et C chez les flavonoïdes (**Figure 22**) [101].



**Figure 22** : Noyau flavonol dihydroxylé en position 3' et 4' (cycle B) montrant les sites de liaisons de coordination des complexes antioxydants-métaux [101].

#### IV.1.3 Effets sur la santé humaine d'une consommation d'antioxydants

L'un des rôles prépondérants des antioxydants chez l'Homme est leur faculté à réguler la balance oxydante de l'organisme.



**Figure 23 :** Balance entre les espèces pro- et anti-oxydantes et développement du stress oxydant.

Nous présentions dans la figure précédente (**Figure 23**) que les EROs peuvent être produites de façon endogène par l'organisme. La production de ces molécules est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Chez l'Homme elles participent à la défense immunitaire [102], à l'apoptose cellulaire [103] et sont impliquées dans les voies de la signalisation cellulaire [104]. Cependant, de nombreux phénomènes extérieurs peuvent conduire à la synthèse d'EROs supplémentaires tels que les UV, la pollution ou encore le tabac [105]. Pour remédier à la

production de ces EROs supplémentaires, l'organisme possède un système de régulation endogène (Coenzyme Q10, glutathion, enzymes).

Néanmoins, l'emballement de la mécanique de production des EROs mène au stress oxydant [106]. Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre par excès d'EROs généralement obtenues par leurs accumulations suite à la production endogène et exogène non compensée par les mécanismes de protection endogènes. Ce déséquilibre est donc capable de créer des conditions favorables à l'apparition de nombreuses maladies. Bien que controversée, la théorie des radicaux libres de Harman fait du stress oxydant et de manière générale les radicaux libres, un acteur du vieillissement cellulaire programmé [107] et ce par son action sur l'oxydation et la dégradation des protéines [108], acides nucléiques [109] ou lipides membranaires [110].

Lorsque le système endogène ne suffit plus, il devient nécessaire pour l'organisme de le compléter par son alimentation. Parmi ces molécules les composés phénoliques participent à la protection de l'organisme en montrant des effets protecteurs contre certains cancers, certaines maladies cardiovasculaires ou bien encore la maladie d'Alzheimer. La diversité des composés phénoliques entraîne une multitude de cibles biologiques potentielles. Ils sont capables d'inhiber l'activité d'enzymes, de réguler l'expression de gènes ou bien d'être neuroprotecteurs.

### IV.1.3.1 Inhibition enzymatique

Un dérèglement enzymatique peut être la cause d'un désordre dans l'organisme. Lorsque ces dérèglements entraînent la surexpression et/ou la suractivité de l'enzyme, un moyen de lutte peut être l'utilisation d'un inhibiteur. Les antioxydants en sont parfois capables, comme le rapportent Hemeda et Klein, qui ont montré la capacité de l' $\alpha$ -tocophérol, de la quercétine (*Annexe 29*) ou encore de l'acide chlorogénique (*Annexe 28*) à inhiber des peroxydases [111]. Dans une étude publiée en 2001, Valentao et ses collaborateurs, ont montré l'implication d'une infusion de feuilles de *Centaureum erythraea* dans le piégeage de l'anion superoxyde mais également dans l'inhibition non compétitive de la xanthine oxydase. L'infusion montrait la présence d'un mélange d'un flavonoïde et d'acides hydroxycinnamiques (acides *p*-coumarique, férulique et sinapique) [112]. Plus récemment, Di Majo et ses collaborateurs ont montré

l'efficacité de plusieurs flavonoïdes (quercétine, kaempférol (*Annexe 30*), catéchine (*Annexe 46*) ou épicatechine (*Annexe 47*)) à des concentrations de 1  $\mu\text{M}$  sur l'inhibition de la superoxyde dismutase [113].

### IV.1.3.2 La chimio-prévention des antioxydants

L'activité antinucléoplasique des antioxydants porte encore à contestation de nos jours. Cependant, depuis la fin des années 90, l'intérêt des antioxydants se trouve dans la chimio-prévention de nombreux cancers. Katiyar et Mukhtar ont démontré l'effet chimio-préventif d'antioxydants du thé sur des cancers de la peau provoqués par agents chimiques ou radiation UV [114]. L'implication du stress oxydant sur le développement cancéreux suggère que la prise régulière d'antioxydants naturels peut de façon significative prévenir la carcinogénèse. Plus récemment, Pereira et ses collaborateurs ont démontré l'intérêt de la quercétine dans la réduction de l'hypertension mais pourrait également avoir un rôle antitumoral en réduisant la phosphorylation des protéines FAK (pour *Focal Adhesion Kinase*) protéines impliquées dans la prolifération cellulaire lors du développement des tumeurs [115].

### IV.1.3.3 Activité antidiabétique

Les modes de consommation des pays développés sont parfois la cause du développement du diabète de type 2. Perera et Li rapportent que la consommation de goyave permet de diminuer les taux de sucre plasmatique sans toutefois diminuer les taux d'insuline. Cette activité intéressante chez les personnes souffrant de diabète serait à mettre au profit de la strictinine (*Annexe 31*), isostrictinine (*Annexe 32*) et de la pédonculagine (*Annexe 33*). D'autre part, certaines anthocyanes ont la particularité d'agir sur le métabolisme glucidique et lipidique dans les tissus humains. Elles sont capables d'agir sur les niveaux de sécrétion ou d'absorption de l'insuline ou bien directement sur l'expression de gènes [116].

### IV.1.3.4 Activité neuroprotectrice

Le vieillissement de la population entraîne le développement de plus en plus important de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer. Mandel et ses

## Contexte bibliographique

collaborateurs se sont intéressés aux effets des polyphénols sur ce genre de maladies. Leur intérêt s'est porté sur les résultats des antioxydants présents dans le thé vert et plus particulièrement aux voies de signalisation cellulaires induites par l'épigallocatechin-3-gallate (*Annexe 47*). Ils rapportent que les extraits de thé vert ou l'épigallocatechin-3-gallate sont tous les deux capables de prévenir les effets du syndrome parkinsonien induits par la prise de la neurotoxine MTPT (*N*-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) chez la souris. L'épigallocatechin-3-gallate serait également capable de prévenir la mort de cellules neuronales, causée par plusieurs autres neurotoxines. Dans ce cas de figure il semblerait que l'activité des PKC (pour *Protein Kinase C*) soit impliquée dans l'effet neuroprotecteur de l'épigallocatechin-3-gallate. L'activité des PKC nécessaire à la protection des cellules neurales est favorisée en présence d'épigallocatechin-3-gallate contre ces neurotoxines [117]. Elle empêcherait ainsi la perte rapide d'activité des PKC neurales ayant pour conséquence des dommages cérébraux tels que l'ischémie conduisant à une privation de glucose pour le cerveau.

### IV.1.3.5 Conséquences d'un surdosage

Les bienfaits présentés précédemment tout comme les recommandations des agences de santé ou l'OMS (*Organisation Mondiale de la Santé*) ne doivent pas nous faire oublier la phrase prêtée à Paracelse « Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison ». Il est possible de trouver de nombreuses études contradictoires sur l'effet des antioxydants. La principale menace est le surdosage pouvant entraîner des effets pro-oxydants [118], des effets carcinogéniques ou bien dus au devenir des antioxydants oxydés qui n'est pas ou peu connus de nos jours [119].

L'étude de Mandel et ses collaborateurs sur l'épigallocatechin-3-gallate a d'ailleurs démontré l'implication de la concentration sur l'activité de la molécule. Tandis qu'une concentration comprise entre 1 et 10  $\mu\text{M}$  était bénéfique en diminuant l'expression de nombreux gènes pro-apoptotique (*bax*, *bad*, ou *gadd45*), une concentration de 50  $\mu\text{M}$  avait cette fois l'effet inverse et stimulait l'expression de ces mêmes gènes [117].

C'est pourquoi nous avons donc tout intérêt à utiliser ces molécules de la manière la plus raisonnée possible et chercher la concentration minimum pour une efficacité maximum.

### IV.2 Les antioxydants en agroalimentaire

Les antioxydants utilisés en alimentaire peuvent se classer en deux catégories, ceux d'origine naturelle avec ou sans modifications préalables et ceux synthétiques. Aujourd'hui seule une quinzaine d'antioxydants différents sont autorisés en France avec ou sans limitations de doses.

#### IV.2.1 Réglementations françaises/européennes

Au niveau européen et par extension au niveau français, les additifs alimentaires sont réglementés selon la règle de la liste positive. C'est-à-dire que seules les molécules inscrites sur cette liste sont autorisées. Par conséquent, tout autre additif ne peut l'être qu'après l'avis de l'EFSA (pour *European Food Safety Authority*, l'*Autorité européenne de sécurité des aliments*), l'avis du Comité compétent du Conseil et du Parlement européen et enfin suite à la publication d'un règlement d'autorisation au Journal officiel de l'Union Européenne. Afin d'obtenir l'avis de la Commission pour l'inscription d'une nouvelle molécule, l'entité demandeuse doit fournir un dossier technique comme détaillé dans le règlement UE n° 234/2011. Ce dossier est composé de trois parties, l'une d'elles est administrative, la deuxième est destinée à présenter l'estimation des risques et la dernière présente l'évaluation de leurs gestions.

#### IV.2.2 Les antioxydants d'origine naturelle

Nous retrouvons la vitamine C (E300) et ses dérivés (E301 – E304) ; la vitamine E et extraits riches (E306) et ses dérivés (E307 – E309) ; les esters de l'acide gallique (E310 – E313) ; la résine/gomme de gaïac (E314) ; les lécithines (E322) ; l'acide citrique (E330) et ses sels (E331 – E333) ; les sels de l'acide lactique (E325 – E326) ; l'acide tartrique (E334) et ses sels (E335 – E336) ; les extraits de romarin (E392).

D'une manière générale, très peu sont utilisés sans modification. En effet, les estérifications ou l'utilisation de sels modulent leurs propriétés physico-chimiques afin de les rendre plus ou moins solubles et/ou moins toxiques.

### IV.2.3 Les antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants synthétiques autorisés, nous retrouvons l'acide érythorbique (E315) une forme synthétique de l'acide ascorbique et ses sels (E316 – E318) ; le butylhydroquinone tertiaire (BHQT) (E319) ; le butylhydroxyanisol (BHA) (E320) ; le butylhydroxytoluène (BHT) (E321) ; l'anoxomère (E323) ; l'éthoxyquine (bien que très probablement interdit à la fin de l'année 2020) (E324). Il existe également l'éthylène diamine tétra acétate ou EDTA (E385-386) comme molécule organique synthétique qui agit comme chélateur de métaux.

Il convient d'ajouter également ceux d'origine minérale tels que le chlorure d'étain (E512), les *o*-phosphates (E339-E343) ou thiosulfate de sodium (E539).

### IV.2.4 Le marché des antioxydants

La valeur du marché des antioxydants est très difficile à apprécier. Il n'existe pas ou peu de données disponibles sur l'ensemble de la filière des antioxydants. En revanche, un rapport de 2017 prévoit que le marché des antioxydants naturels devrait avoir un taux de croissance annuel composé (TCAC), qui représente la croissance moyenne annuelle sur une période spécifique, de plus de 9,5% sur la période 2017-2021 [120]. Bien que le marché seul des antioxydants soit difficile à connaître, il existe depuis quelques années un développement important du marché des compléments alimentaires dont une importante part de ces compléments est composée d'extraits de plantes ou d'antioxydants. Sur la seule année 2017, les compléments alimentaires ont mondialement été crédités d'un chiffre d'affaires de 120 millions d'euros, tandis qu'en France il était de l'ordre de 2,3 millions d'euros.

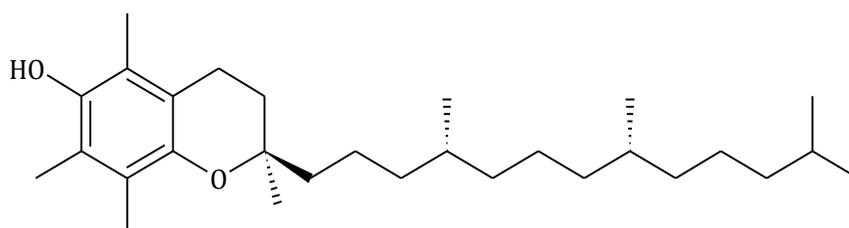
D'origine végétale, naturelle, abondants dans la nature et potentiellement efficaces à de faibles concentrations, les composés phénoliques ont donc un réel intérêt pour enrichir les huiles alimentaires en terme de bénéfices et de formulations de produits à forte valeur ajoutée.

### IV.3 Etude comparative des antioxydants sélectionnés

Les antioxydants commerciaux sélectionnés l'ont été par leur nature et leur structure, ainsi que par leurs abondances et leurs coûts, permettant un éventail de choix en fonction des différentes classes de composés phénoliques.

#### IV.3.1 L' $\alpha$ -tocophérol

L' $\alpha$ -tocophérol est l'un des huit isomères de la vitamine E.



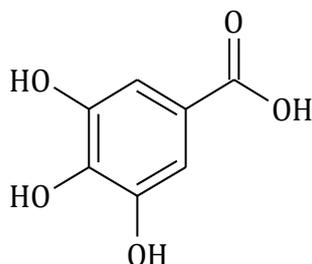
**Figure 24 :** Structure de l' $\alpha$ -tocophérol.

La vitamine E a été isolée en 1936, bien que des travaux au début des années 1920, montraient déjà l'importance de cette vitamine dans les milieux lipophiles. En 1924, Bennett Sure lui donnera le nom de vitamine E. Elle est connue aujourd'hui, pour avoir des propriétés anti-oxydante et sa nature liposoluble en fait un antioxydant naturellement présent dans les huiles végétales. Sa teneur est de 1 500 mg/kg d'huile de germe de blé, 1 100 mg/kg dans l'huile de palme (non raffinée) et 600 mg/kg dans l'huile de tournesol [121]. Dans l'huile de lin, l' $\alpha$ -tocophérol est à l'état de trace, c'est le  $\gamma$ -tocophérol qui est la forme majoritaire [8]. C'est une molécule bon marché, (50 €/kg) [122], d'où son utilisation comme additif alimentaire (naturel ou synthétique).

Pour ces raisons, il a été choisi pour servir d'antioxydant modèle.

### IV.3.2 L'acide gallique

L'acide gallique est un acide hydroxybenzoïque (**Figure 25**) qui tire son nom d'une excroissance, la galle du chêne. Cette excroissance va concentrer les antioxydants qui sont produits pour défendre la plante contre l'attaque d'un parasite.



**Figure 25** : Structure de l'acide gallique.

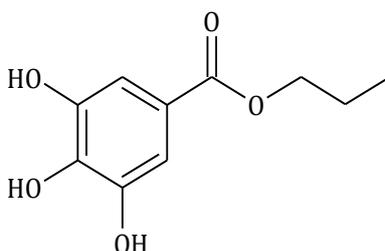
L'acide gallique est un antioxydant abondant dans le règne végétal, comme en témoignent ses proportions dans les châtaignes (4 800 mg/kg) ou le clou de girofle (4 600 mg/kg) [123]. Sa solubilité dans l'eau est très importante car elle est de 12 000 mg/kg à 20 °C. Son abondance et sa grande disponibilité en font un antioxydant peu cher (10-30 €/kg) [122]. Il a été choisi comme antioxydant témoin pour sa nature hydrophile et ses résultats seront comparés à celui de l' $\alpha$ -tocophérol. L'étude d'Asnaashari en 2014 a en effet montré la grande capacité de l'acide gallique et plus encore de son ester méthylique à mieux protéger les huiles de poisson brutes que l' $\alpha$ -tocophérol [124]. En revanche, dans l'émulsion huile dans l'eau présentée dans cette étude, les facteurs de stabilisation sont moins importants que ceux dans l'huile brute. Ils montrent également des écarts-types plus grands, proposant que les émulsions sont bien plus affectées par la méthode d'émulsification que l'antioxydant, même si les résultats montrent que l' $\alpha$ -tocophérol protège mieux que l'acide gallique ou son ester méthylique dans les émulsions [124].

La toxicité de l'acide gallique est relativement faible sur les modèles murins. Des rats ont été soumis à des régimes compris entre 0 et 5% d'acide gallique sur une durée de treize semaines, ce qui a permis d'en déduire un niveau de consommation sans effet toxique observable (*No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)*) de 0,2% [125]. Cette valeur représente une

consommation de 120 mg/kg/j d'acide gallique et nos concentrations dans les huiles ne dépassaient pas 200 mg/kg d'huile. Nous sommes donc loin de cette valeur seuil.

### IV.3.3 Le gallate de propyle (E310)

L'acide gallique n'est pas autorisé en alimentation sans modification. Pour cette raison, le gallate de propyle a été choisi puisqu'il est l'un des esters de l'acide gallique disponible dans l'industrie et autorisé dans l'agroalimentaire (**Figure 26**).



**Figure 26** : Structure du gallate de propyle.

Nous avons fait le choix de privilégier cette forme plutôt que les gallates d'octyle ou de dodécyle (=lauryl) par la décision d'utiliser un ester d'acide gallique ayant des propriétés physico-chimiques proches de la molécule non estérifiée. Ce choix s'explique aussi par son utilisation dans l'industrie pour protéger les huiles chauffées [126] à faible coût ( $\approx 15$  €/kg) [122] et permettra de comparer les résultats obtenus avec ceux de l'acide gallique.

### IV.3.4 Les extraits de thé vert

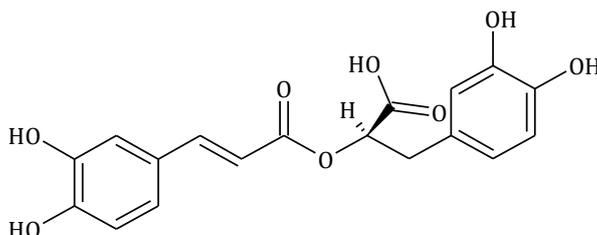
Les extraits de thé vert ont été choisis car ils sont autorisés dans de nombreux compléments alimentaires. Leur coût est variable entre 12 et 300 €/kg [122], principalement dû à la composition des extraits et leurs richesses ou non en catéchines. Ceux que nous avons sélectionnés ont la particularité d'être composés à 60% d'un mélange de catéchines. Selon une étude faite par Hilal sur 34 thés verts et résumée dans un article du Dr. Schweikart, les catéchines majoritaires sont les épicatechines gallate (2,0% de masse sèche) et les épigallocatechines gallate (6,8 % de masse sèche) [127]. Il est donc raisonnable de penser que nous avons une proportion importante dans nos extraits d'esters de l'acide gallique. La présence

## Contexte bibliographique

de ces composés apporte un intérêt supplémentaire pour comparer l'activité anti-oxydante d'une troisième forme d'acide gallique.

### IV.3.5 L'acide rosmarinique

L'acide rosmarinique est un ester d'acide caféique et d'acide  $\alpha$ -hydroxy-dihydrocaféique (**Figure 27**).



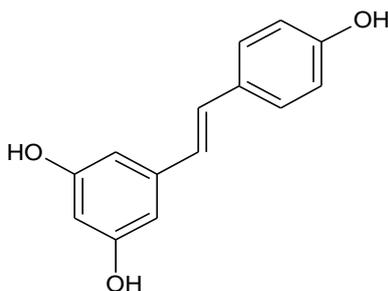
**Figure 27** : Structure de l'acide rosmarinique

Bien que cette molécule présente un coût élevé pouvant dépasser les 1 000 €/kg [122], l'intérêt de sa sélection vient de précédents travaux au laboratoire sur sa faculté à protéger des modèles de membranes biomimétiques à une très faible concentration (1%) [128], mais également par son abondance dans le romarin ( $\approx 9\,900$  mg/kg de plante sèche) d'où il tire son nom, dans la sauge officinale ( $\approx 6\,100$  mg/kg de plante sèche), dans le thym ( $\approx 8\,300$  mg/kg de plante sèche) et dans la menthe poivrée ( $\approx 1\,730$  mg/kg de plante sèche) [123].

Ces importantes concentrations et l'autorisation des extraits de romarin à être utilisés en alimentaire, en font un potentiel candidat pour être utilisé directement afin de protéger et/ou d'aromatiser les huiles.

### IV.3.6 Le resvératrol

Contrairement aux autres composés phénoliques sélectionnés, le resvératrol est une molécule hydrophobe (**Figure 28**). Il va être retrouvé dans la vigne, l'arachide ou la Renouée du Japon mais en faibles quantités. C'est également une molécule fragile par isomérisation de sa double liaison à la chaleur et aux UV. Le resvératrol est donc une molécule onéreuse (200-300 €/kg) [122].

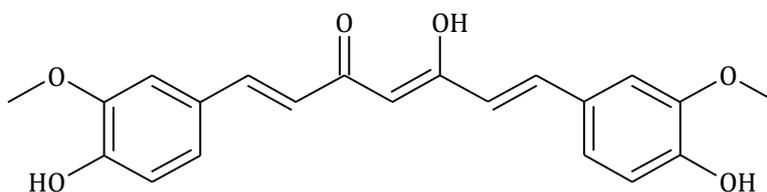


**Figure 28** : Structure du resvératrol.

Néanmoins, le resvératrol est l'une des molécules les plus répandues de la famille des stilbénoides, c'est pour cette raison que nous l'avons testé comme représentant de cette classe.

### IV.3.7 La curcumine

La curcumine est une molécule retrouvée dans le curcuma à hauteur de 22 000 mg/kg de matière sèche et entre dans la composition de la poudre de curry [123] (**Figure 29**). Son prix peut monter à environ 100 €/kg, mais est plutôt compris entre 1 et 10 €/kg [122].

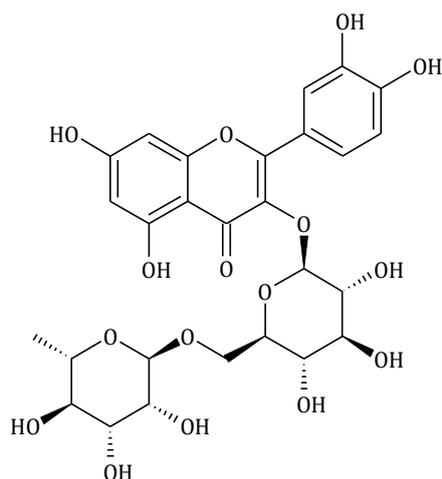


**Figure 29** : Structure de la curcumine.

La curcumine est utilisée principalement comme colorant dans l'industrie agroalimentaire sous l'appellation E100(i). Cependant cette molécule possède également des propriétés anti-oxydantes comme l'a décrit Noguchi *et al.*, [129].

### IV.3.8 Le rutoside

Le rutoside, également appelé quercétine-3-O-rutinoside est constitué d'une molécule de quercétine (un flavonol) et du rutinoside reliés entre eux par une liaison éther. Le rutinoside est un diholoside, constitué d'un rhamnose lié à un glucose par une liaison o-glycosidique en  $\alpha$  (1-6) (**Figure 30**).



**Figure 30** : Structure du rutoside.

Il est majoritairement retrouvé dans les câpres (3 323 mg/kg), l'olive noire (454 mg/kg), les framboises noires (190 mg/kg) et rouges (110 mg/kg) ou bien encore dans les prunes fraîches (59 mg/kg) [123]. C'est un puissant antioxydant, il est d'ailleurs considéré comme un puissant piègeur de radicaux [130].

### IV.3.9 Les antioxydants du lin

Selon les conditions de culture et l'espèce sélectionnée, il est possible de retrouver dans les graines de lin des flavonoïdes en quantités minoritaires (entre 300 et 700 mg par kg de graines) [131].

Les acides phénoliques sont présents dans le lin en quantités non négligeables. Ils représentent la seconde classe d'antioxydants trouvés chez le lin avec des valeurs comprises entre 8 000 et 10 000 mg d'acides phénoliques totaux par kg de graines [132]. Parmi eux, l'acide férulique est le composé majoritaire suivi des acides coumarique et caféique [66]. Ils sont retrouvés dans la plante sous forme libre, glycosylé ou bien estérifié. Ils ont fait l'objet de nombreuses études et présentent des activités anti-oxydantes, antitumorales ou antimicrobiennes. Les acides férulique et caféique sont de puissants antioxydants possédant des activités anti-inflammatoires et antimutagènes. Ils ont fait l'objet d'un brevet par la société américaine Kraft Foods afin de masquer l'amertume de certains édulcorants artificiels [133]. La

## Contexte bibliographique

DL50 de l'acide férulique est supérieure à 850 mg/kg chez la souris [134] ainsi qu'une dose létale aigüe orale de 3 200 mg/kg chez le rat [135].

Enfin, la classe regroupant les antioxydants majoritaires chez le lin est celle des lignanes. Le lin contient, en effet, jusqu'à 800 fois plus de lignanes que les autres plantes. Les principaux représentants de ce groupe de polyphénols vont être le pinorésinol, le laricirésinol et le sécoisolaricirésinol qui représente à lui seul entre 7 000 et 29 000 mg par kg de graines [136]. Lors d'une consommation de sécoisolaricirésinol, ce dernier est converti dans le tractus digestif en entérodiol (*Annexe 34*) et entérolactone (*Annexe 35*) deux molécules possédant des propriétés antinucléoplasiques contre les cancers du sein chez les femmes et de la prostate chez les hommes [137]. Le sécoisolaricirésinol (*Annexe 24*) et les extraits de lin (tourteaux de lin) permettent de se prémunir contre certains cancers (colon, poumon, sein) [138], d'inhiber la production d'angiotensine I [139] ou encore de diminuer le taux de cholestérol sanguin et d'augmenter le ration HDL/LDL . Néanmoins, selon leurs concentrations, les lignanes peuvent dérégler la régulation hormonale en étant agoniste ou antagoniste des œstrogènes [140].

### Chapitre V. Le projet CAPSOIL

#### V.1 La problématique du projet

Depuis maintenant une vingtaine d'années, de nombreux produits alimentaires enrichis en acides gras polyinsaturés (AGPI) (oméga-6, oméga-3) sont apparus sur le marché. Il existe cependant, des interrogations concernant les procédés de transformations industriels, la cuisson ou encore la conservation de ces aliments, pouvant entraîner une accélération de l'oxydation de ces AGPI. De ce fait, plus un aliment sera riche en AGPI, plus grands sont les risques qu'il contienne des lipides oxydés potentiellement toxiques. C'est l'une des principales raisons de la faible durée de conservation des huiles alimentaires riches en AGPI (tournesol, lin, cameline, huiles de poisson...).

Ce projet se propose de stabiliser les huiles alimentaires oxydables riches en oméga-6 (tournesol) et oméga-3 (lin) par la co-encapsulation de ces huiles en présence d'antioxydants dans des capsules protéiques et/ou polysaccharidiques.

#### V.2 Les objectifs du projet

Les objectifs de ce projet sont nombreux. Il vise la co-encapsulation d'huile riche en AGPI et d'antioxydants naturels, au sein de capsules d'origine naturelle telles que des protéines végétales (soja, pois, tournesol...) et/ou des polysaccharides.

- (i) : Extraire et purifier des antioxydants phénoliques issus de végétaux (tourteaux, extraits de plantes...).
- (ii) : Identifier les antioxydants, seuls ou en mélange, les plus efficaces pour lutter contre la peroxydation lipidique.
- (iii) : Identifier les enrobants les plus efficaces pour allonger la stabilité des huiles.
- (iv) : Préparer des poudres contenant l'huile et des antioxydants naturels
- (v) : Obtenir des poudres pour permettre la vectorisation d'AGPI oméga-3 et oméga-6 et d'antioxydants pour l'alimentation.

### V.3 CAPSOIL : un projet pluridisciplinaire

Ce projet a été mené par un consortium pluridisciplinaire qui regroupait initialement six laboratoires de trois universités.

Le partenaire 1, du laboratoire de *Biologie des Plantes et Innovation* (BIOPI) (EA 3900) de l'Université de Picardie Jules Verne (UPJV) avait la charge d'extraire, de caractériser et de purifier des antioxydants phénoliques issus des déchets agricoles.

Le partenaire 2, au sein des unités de recherche des laboratoires de *Biomécanique et Bioingénierie* (BMBI) (UMR CNRS 7338) et *Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable* (TIMR) (EA 4297) de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), avait la charge de mettre au point les stratégies d'encapsulation des huiles alimentaires en présence ou non d'antioxydants.

Le partenaire 3, au sein de l'unité de recherche du laboratoire du *Génie Enzymatique et Cellulaire* (GEC) (UMR CNRS 7025) de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), avait la charge de déterminer l'efficacité de l'enrichissement en antioxydant des huiles alimentaires.

La caractérisation de l'efficacité de la co-encapsulation des huiles et des antioxydants dans la prévention de la peroxydation lipidique a été réalisée, en collaboration, par les partenaires 2 et 3.

Enfin, la société PIVERT en était le financeur initial. La société PIVERT est un institut pour la transition énergétique (ITE) son rôle est de développer l'innovation dans le domaine de la chimie du végétal afin d'accélérer le transfert de technologie vers l'industrie. Pour ce faire, la SAS PIVERT fédère des industriels (Total, Avril, Tereos, ...) et des pôles de recherche (universités, CNRS, INRA, ...).

En revanche, bien que l'*Unité de Nutrition Humaine* (UNH) (UMR 1019 INRA) de l'Université de Clermont Auvergne ait été sollicitée au montage du projet, le projet s'est arrêté avant l'intervention de ce dernier partenaire. Le rôle initial de ce partenaire portait sur l'évaluation de l'impact d'une supplémentation en huiles encapsulées sur la santé d'un modèle murin.

## Contexte bibliographique

Le projet CAPSOIL s'est donc structuré autour de deux thèses :

- La première thèse intitulée : **Etude de la co-encapsulation d'huiles alimentaires oxydables et d'antioxydants phénoliques**, a été réalisée au sein des laboratoires BMBI et TIMR par le Docteur Lorine Le Priol (thèse soutenue le 29 novembre 2019). Elle impliquait la mise au point d'un procédé de co-encapsulation, d'huiles riches en acides gras polyinsaturés par la valorisation de matériaux d'enrobages d'origine végétale (protéines et/ou polysaccharides), en présence ou en absence d'antioxydants.
- La seconde thèse intitulée : **Enrichissement, d'huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés, par des composés phénoliques d'origine naturelle afin de les protéger de la peroxydation lipidique en vue d'une encapsulation pour augmenter la durée de conservation de ces huiles**, a été réalisée au laboratoire GEC, par moi-même.

### V.4 Les objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse était de fournir, au partenaire 2 du projet, des huiles enrichies en composés phénoliques purs ou sous la forme d'extraits, afin de formuler ces huiles enrichies et stabilisées sous la forme de poudre par atomisation (spray drying).

La stratégie choisie a donc nécessité la mise en place d'une étape d'enrichissement des huiles modèles (tournesol ( $\omega 6$ ) et lin ( $\omega 3$ )) en utilisant des solvants de vectorisation autorisés en alimentaire : l'eau ; le propylène glycol (additif alimentaire utilisé comme agent émulsifiant (E1520)) et l'éthanol (E1510).

Les antioxydants sélectionnés devaient être soit des molécules naturelles déjà utilisées en alimentaire (tocophérol, gallate de propyle, curcumine) soit de nouvelles molécules valorisables sous la forme d'extraits (extraits de thé vert, acide rosmarinique (extraits de romarin) ou les extraits de lin ayant montré un grand intérêt dans de précédents travaux au laboratoire).

Enfin, la détermination des meilleurs candidats ; des meilleurs enrobants ; des meilleures combinaisons a été effectuée en étroite collaboration avec le partenaire 2.

# **Matériel et Méthodes**

## Chapitre I. Matériel

### I.1 Réactifs et solvants

Le chloroforme (stabilisé à l'éthanol 0,6 %), l'éthanol absolu, l'iodure de potassium, le thiosulfate de sodium et l'acide acétique ont été obtenus auprès de VWR International (France). L'isooctane, la *para*-anisidine, le *trans-trans* 2,4 décadiénal, la solution méthanoïque de tétra méthyl ammonium hydroxyde et le décane anhydre proviennent de Sigma-Aldrich (France). L'amidon utilisé provient de Prolabo (France). Le propylène glycol nous a été fourni par Acros Organics (Geel, Belgique). L'eau ultrapure de qualité milliQ© a été produite par un système milliPore de chez Merck.

### I.2 Huiles alimentaires

Les huiles de lin et de tournesol nécessaires à ce travail de thèse ont été achetées dans le commerce, l'huile de lin était une huile vierge de première pression à froid de la marque Bio Planète® (France), tandis que l'huile de tournesol était une huile raffinée non oléique de la marque distributeur Carrefour® (France).

### I.3 Antioxydants

Nous avons obtenu des extraits méthanoïques de graines de lin ainsi que huit fractions isolées de ces extraits qui nous ont été fournis par le laboratoire BIOPI (Biologie des Plantes et Innovation) de l'Université de Picardie Jules Verne. Notre partenaire a analysé chaque fraction par RMN, afin d'en déterminer la composition (**Tableau 7**).

**Tableau 7** : Détermination par RMN des fractions purifiées des graines de lin. Les huit fractions obtenues sont numérotées de 1 à 8, en partant des temps de rétention les plus faibles vers les plus élevés.

			Acide hydroxycinnamique		Lignanes		Flavonoïdes	
Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Composition	Oses	n.d.	CoumG + Caff G	Fer G + Caff G	PDG + LDG	SDG	n.d.	Lipides

Les autres antioxydants utilisés étaient commerciaux et ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (France) :

- Acide gallique (*Annexe 17*)
- Acide rosmarinique (*Annexe 36*)
- $\alpha$ -tocophérol (*Annexe 48*)
- Gallate de propyle (*Annexe 37*)
- Extraits de thé vert (contiennent au moins 60 % de catéchines (*Annexe 46 ; 47*))
- Rutoside (*Annexe 41*)
- Resvératrol (*Annexe 40*)
- Curcumine (*Annexe 38*)
- Acide coumarique (*Annexe 18*)
- Acide caféique (*Annexe 19*)
- Acide férulique (*Annexe 20*)
- Pinorésinol (*Annexe 22*)
- Laricirésinol (*Annexe 23*)
- Sécoisolaricirésinol (*Annexe 24*)
- Sécoisolaricirésinol di-glucoside (*Annexe 44*)

Les logP ainsi que les surfaces polaires topographiques (TPSA) de chacun des antioxydants ont été déterminés et calculés par le logiciel Molinspiration Cheminformatics Software disponible en accès libre à l'adresse électronique suivante :

[www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)

### Chapitre II. Méthodes

#### II.1 Caractérisation des huiles

Les profils lipidiques des deux huiles ont été analysés et comparés aux données des fournisseurs et de la littérature par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et par chromatographie liquide de haute résolution couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS). L'intérêt était ici de confirmer la présence d'une huile de tournesol non oléique, d'une huile de lin vierge et les concentrations initiales en tocophérol de chacune des huiles.

##### II.1.1 Caractérisation par GC-FID

La préparation des esters méthyliques d'acides gras s'appuie sur les travaux du laboratoire de par son expertise dans ce domaine [141], [142]. La réaction est effectuée en mélangeant 5  $\mu\text{L}$  d'huile en présence de 100  $\mu\text{L}$  de chloroforme. La réaction de *trans*-estérification est déclenchée par l'addition de 10  $\mu\text{L}$  de Tétra Méthyl Ammonium Hydroxyde (TMAH) en solution dans le méthanol à 25% (m/v).

Après 10 min, 50  $\mu\text{L}$  de décane sont ajoutés pour stopper la réaction. Nos échantillons sont par la suite centrifugés pendant 3 min à 8 000 rpm (centrifugeuse 5415 R Eppendorf ; Hambourg, Allemagne). La centrifugation permet la séparation du glycérol (phase inférieure) des esters méthyliques nouvellement formés (phase supérieure). Le surnageant (10  $\mu\text{L}$ ) est dilué dans 180  $\mu\text{L}$  d'heptane et analysé par GC-FID.

La séparation et le dosage des acides gras ont été effectués par chromatographie en phase gazeuse de type « GC-FID 2010 Plus (Shimadzu, Japon) » complétée d'un AOC-20s (auto-sampler) et d'un AOC-20i (auto-injector). La colonne est une « BPX 70 SGE » (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , SGE Analytical Science, Royaume-Uni), la température initiale du four était de 120°C et maintenue 2 min après injection, puis le gradient de température du four variait de 120°C à 250°C avec une augmentation de 5°C/min. Le volume d'injection était de 1  $\mu\text{L}$  d'esters méthyliques d'acides gras à la température de 250°C. Ils sont entraînés jusqu'au détecteur à

## Matériel et Méthodes

ionisation de flamme (FID) par le dihydrogène (H<sub>2</sub>) avec un débit de 1,15 mL/min. Les composés ont été identifiés par comparaison entre les temps de rétention d'un mélange de standards Supelco 37 (Bellefonte, USA) avec ceux de nos échantillons et en calculant la longueur de chaîne équivalente (ECL) [143].

Les compositions en acides gras sont exprimées en pourcentages relatifs de leurs surfaces de pic par rapport à la surface de pic totale de l'ensemble des acides gras :

$$\% \text{ acide gras} = 100 \times (\text{Aire du pic de l'acide gras}) / (\text{Somme des aires des pics}) \text{ (eq.8)}$$

### II.1.2 Caractérisation par LC-HRMS

La préparation des échantillons de LC-HRMS commence par le prélèvement de 50 µL d'huile qui sont par la suite solubilisés dans 150 µL d'isopropanol.

La séparation par chromatographie liquide de haute résolution s'est faite sur une « HPLC 1290 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) ». La colonne utilisée est une « C18 Hypersil Gold » (100 x 2,1 mm x 1,9 µm) (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) à la température constante de 50°C.

Les conditions de séparations sont les suivantes :

- Solvant d'élution : voie A = Acétonitrile : Eau (60 : 40, v/v) (0,1% acide formique et formiate d'ammonium (10 mmol/L)) ; voie B = Isopropanol : Acétonitrile : Eau (90 : 8 : 2, v/v) (0,1% acide formique et formiate d'ammonium (10 mmol/L)).
- Gradient d'élution : t = 0-2 min (B = 32%), t = 2-8 min (B = 40%), t = 8-10 min (B = 45%), 10-16 min (B = 50%), 16-22 min (B = 60%), 22-28 min (B = 70%), 28-35 min (B = 80%), 35-40 min (B = 100%).
- Post run : B = 40 % et équilibré 10 min avant nouvelle injection.
- Débit = 0,25 mL/min.
- Injection = 2 µL.

La chromatographie liquide a été couplée à un spectromètre de masse hybride à temps de vol/quadrupôle d'ultra haute résolution (QToF) (Agilent 6538 Agilent Technologies) avec une

## Matériel et Méthodes

source électrospray (ESI). La température de la source, le fragmenteur et le « skimmer » sont réglés respectivement à 350°C, 150 V et 65 V. L'acquisition des données a été réalisée en mode balayage entre les valeurs  $m/z$  comprise entre 100 et 1 700  $m/z$ , avec un balayage de deux spectres par seconde.

Les ions parents sélectionnés ont été fragmentés avec une énergie de collision fixée à 35 eV. Seule l'analyse en MS2 des six ions les plus intenses a été effectuée. Deux masses de références internes ont été utilisées pour le calibrage en cours de manipulations du spectromètre de masse (121,0509 ; 922,0098) en mode positif [144].

Le logiciel MassHunter B.07 contrôlait les paramètres et l'acquisition des données. Néanmoins, les fichiers générés pour les échantillons par Agilent (\*.d) ont été convertis en fichiers \*.mzXML à l'aide du logiciel MSConvert [145]. Ces fichiers ont été ensuite traités avec MZmine2 v2.39 [146]. Les spectres de masse ont été acquis en utilisant une ionisation électrospray en mode positif.

### II.1.3 Dosage du tocophérol

#### II.1.3.1 Préparation de la gamme étalon et des échantillons

La gamme étalon et les échantillons d'huiles pour le dosage du tocophérol sont préparés de la façon suivante :

- Etalons : solution mère ( $S_0$ ) d' $\alpha$ -tocophérol à 10  $\mu\text{g/mL}$  dans un mélange heptane : isopropanol (98,5 : 1,5).

**Tableau 8** : Gamme étalon de l' $\alpha$ -tocophérol.

[ $\alpha$ -tocophérol] ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	10,0
$V_{S_0}$ (mL)	0,1	0,2	0,2	0,4	0,8	1,2	1
$V_{\text{solvant}}$ (mL)	9,9	3,8	1,8	1,6	1,2	0,8	-
$V_t$ (mL)	10	4	2	2	2	2	1

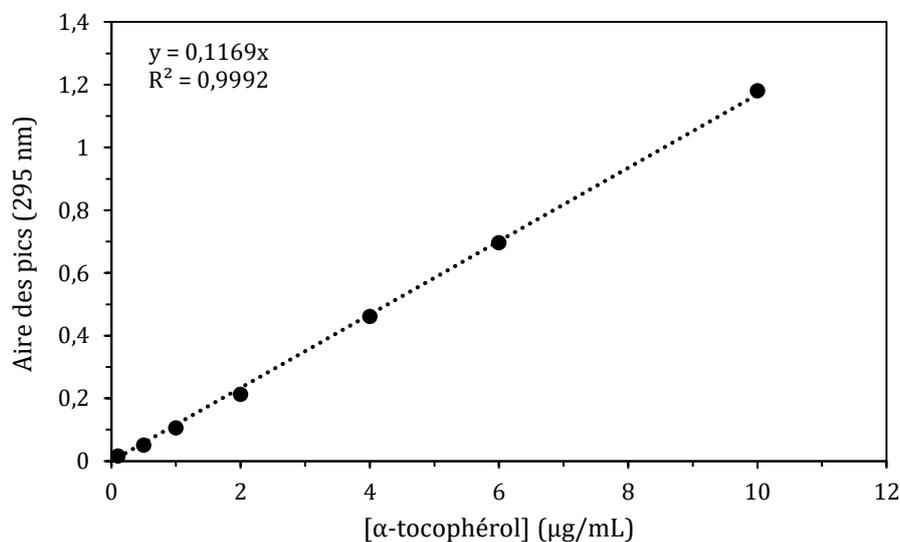
## Matériel et Méthodes

- Echantillons : prélever exactement une masse d'huile proche de 1 g à diluer dans une fiole de 25 mL dans un mélange heptane : isopropanol (98,5 : 1,5). Diluer si nécessaire au 1/10<sup>ème</sup> ou au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange heptane : isopropanol (98,5 : 1,5).

### II.1.3.2 Détermination de la teneur en tocophérol

Le dosage du tocophérol par chromatographie liquide, inspiré des travaux de Carpenter [147], s'est fait sur une « HPLC Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France ». La colonne utilisée était une « hypersil Gold Hilic » (150 x 4,6 mm x 5 µm) (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). La température utilisée était de 30°C. Le mode d'élution était isochratique (heptane : isopropanol (98,5 : 1,5)). Le débit du solvant était de 0,3 mL/min pendant 10 min. Le volume d'injection était de 20 µL et la détection des molécules a été faite par détecteur UV à 295 nm.

La gamme étalon ainsi que les échantillons ont été dosés de la même manière. La droite d'étalonnage est présentée figure 31.



**Figure 31** : Droite d'étalonnage de l'α-tocophérol dans l'heptane : isopropanol (98,5 : 1,5) par la technique de chromatographie liquide à haute performance en phase normale.

Les teneurs en tocophérol sont exprimées en équivalent d'α-tocophérol en mg/kg d'huile :

$$[\text{Tocophérol}] = ((\text{Aire du pic}/0,1169) \times 25 \times \text{facteur de dilution}) / m_{\text{huile}} \text{ (g)} \text{ (eq.9)}$$

### II.2 Méthodes d'addition des antioxydants dans l'huile

#### II.2.1 Extraction liquide-liquide des antioxydants par les huiles

Cette méthode d'addition nécessite la préparation d'une solution aqueuse d'antioxydants au préalable. La solution aqueuse est introduite dans l'huile dans des tubes en polypropylène de 15 ou 50 mL. Afin de permettre l'extraction par l'huile des molécules anti-oxydantes de la solution aqueuse, le mélange est vortexé à la vitesse maximale (2 700 RPM) pendant 2 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 min à 4°C, afin de ne récupérer que l'huile. L'huile (surnageant) est ensuite utilisée immédiatement pour la détermination de la concentration en antioxydant et/ou la mesure de stabilité oxydative au Rancimat. Cette méthode avait été retenue car elle permet un enrichissement des huiles avec un minimum de modification et donc de ce fait permet de comparer la stabilité oxydative des huiles seules, enrichies en vrac, encapsulées et enrichies-encapsulées.

#### II.2.2 Addition d'antioxydants par solution de propylène glycol et d'éthanol

La méthode d'addition avec le propylène glycol s'inspire des travaux de Salta *et al.* [148], tandis que celle d'addition avec l'éthanol s'inspire des travaux de Sanchez de Medina *et al.* [149].

Les solutions mères d'antioxydants sont préalablement préparées à des concentrations dépendantes de la solubilité des molécules dans les solvants et de la quantité disponible. Les solutions sont vigoureusement agitées, pendant 2 min, à la vitesse maximale du vortex (2 700 RPM) et conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Par la suite, le volume nécessaire de solution est prélevé et introduit individuellement dans l'huile, afin d'obtenir une concentration effective de 80 ou 200 mg/kg d'huile. L'objectif n'est pas ici d'enrichir une huile qui doit être commercialisée en vrac mais de fournir à notre partenaire une huile enrichie par les antioxydants qui ont montré, au préalable, un intérêt pour la protection lipidique. Les résultats obtenus seront ensuite comparés avec ceux de l'encapsulation seule et de la co-encapsulation (huile + antioxydant). Ainsi, nous nous sommes affranchis d'éliminer les solvants (le propylène glycol et l'éthanol) contrairement à la publication [149],

bien qu'il n'ait pas été exclu, lors du pilotage du projet, que cela soit nécessaire dans le protocole final.

### II.3 Détermination de la concentration ajoutée en antioxydant dans les huiles

La détermination de la quantité d'antioxydant introduit dans l'huile a été mesurée par l'injection directe d'un volume d'huile enrichie sur une colonne HPLC et suivie par détection UV. L'injection directe de l'huile a été préférée à la réextraction des quantités introduites pour un gain de temps. Cette méthode de détermination a été validée grâce aux résultats fournis par l'addition au propylène glycol et à l'éthanol, et par la non influence de l'injection de l'huile sur les temps de rétention après plusieurs dizaines d'échantillons. Néanmoins, nous avons fait le choix d'intégrer un programme de nettoyage tous les trois échantillons après avoir constaté une augmentation de la pression de la colonne après 5 échantillons, pouvant indiquer un début de colmatage. Cela n'avait cependant, aucune influence sur l'analyse des aires des pics ni des temps de rétention.

L'HPLC utilisée était une « Agilent Technologies, 1260 Infinity » composé d'un échantillonneur automatique, d'un détecteur UV et du logiciel d'analyse de données. La colonne utilisée était une « Eclipse plus C18 » (100 x 4,5 mm) à la température de 30°C.

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Solvant d'élution : voie A : Eau (0,1% acide formique) ; voie B : Acétonitrile.
- Gradient d'élution : t = 0-2 min (B = 2%) ; t = 2-10 min (B = 30%) ; t = 10-15 min (B = 99%).
- Débit : 1 mL/min.
- Détection UV : 254 et 280 nm.
- Volume d'injection : 20 µL.

Le temps nécessaire au rééquilibrage de la colonne entre deux échantillons a été fixé à 3 min.

### II.4 Formulation des lots d'huiles enrichies en antioxydants

Pour mieux comprendre les effets, sur le long terme, de l'enrichissement en antioxydants des huiles, différents lots d'huiles enrichies en antioxydants ont été conditionnés et conservés. Les caractéristiques de chacun des lots testés sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 9** : Lots formulés et testés pendant le projet.

Lot	Huile	Température de stockage	Solvant de vectorisation des antioxydants
1	Tournesol	25°C	Propylène glycol
2	Tournesol	25°C	Ethanol
3	Lin	4°C	Propylène glycol
4	Lin	4°C	Ethanol
5	Lin	25°C	Ethanol

Les lots 1, 2, 3 et 4 ont servi à comparer les solvants d'addition entre eux. Le lot 5 a, quant à lui, permis d'étudier l'influence des antioxydants sélectionnés sur le rancissement de l'huile de lin au cours du stockage.

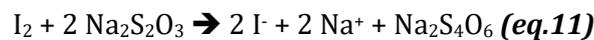
### II.5 Détermination de la stabilité oxydative des huiles

#### II.5.1 Analyse des produits primaires de l'oxydation

L'analyse des produits primaires de l'oxydation a été effectuée par la détermination iodométrique des indices de peroxydes (IP). Les avantages de cette méthode vont être sa simplicité, son faible coût ne nécessitant pas un appareillage onéreux et l'observation d'un état oxydatif à l'instant t. D'autre part, les indices de peroxydes sont une méthode d'étude standardisée de la peroxydation des huiles *NF T 60-220* remplacée par la méthode *NF EN ISO 3960* (Avril 2017) [150]. Par conséquent, ils sont très largement adoptés pour étudier l'inhibition de l'oxydation lipidique. Ils utilisent en revanche, des solvants CMR, les indices de peroxydes dépendent de l'état oxydatif initial et vont être contraignant avec les poudres (micro-encapsulation des huiles), nécessitant l'extraction des huiles des microparticules.

### II.5.1.1 Principe de la méthode des indices de peroxydes (IP)

Cette méthode utilise un dosage indirect des molécules de diode ( $I_2$ ) formées par réaction d'oxydo-réduction entre des ions iodures ( $I^-$ ) en excès et les hydroperoxydes présents dans l'huile (**eq.10**). Ce  $I_2$  va par la suite réagir en présence du thiosulfate de sodium ( $Na_2S_2O_3$ ) lors d'une seconde réaction d'oxydo-réduction (**eq.11**) entraînant la diminution jusqu'à l'extinction de la couleur rose-violette en présence d'empois d'amidon.



### II.5.1.2 Mesure des indices de peroxydes (IP)

Une masse d'huile précise comprise entre 0,1 et 0,5 g est prélevée et placée dans un erlenmeyer de 250 mL. 30 mL d'une solution d'acide acétique : chloroforme (2 : 1 v/v) puis 1 mL d'une solution saturée d'iodure de potassium (KI) sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 1 min à l'obscurité puis est laissé 5 min supplémentaires sans agitation toujours à l'obscurité. 75 mL d'eau milli Q® sont ajoutés et enfin 1 mL d'empois d'amidon comme indicateur coloré. La solution est finalement dosée par le thiosulfate de sodium jusqu'à complète disparition de la couleur rose-violette. Un contrôle est effectué dans les mêmes conditions sans huile.

### II.5.1.3 Calcul des indices de peroxydes (IP)

Les indices de peroxydes (IP) sont alors calculés de la manière suivante :

$$IP \text{ (m éq d'O}_2 \text{ actif/kg)} = [Na_2S_2O_3] \times (V_s - V_{\text{contrôle}}) \times 1000 / m_s \text{ (eq.12)}$$

Où :

$[Na_2S_2O_3]$  = Concentration de la solution titrante de thiosulfate de sodium (mol/L).

$V_s$  = Volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour doser l'échantillon.

$V_{\text{contrôle}}$  = Volume de thiosulfate de sodium utilisé pour le contrôle.

$m_s$  = masse de l'échantillon d'huile testé (g).

Pour une meilleure comparaison des méthodes d'additions les résultats ont été traités de la manière suivante :

$$\%_{\text{inhibition}} = 100 \times (\text{IP}_{\text{sample}} - \text{IP}_{\text{control}}) / \text{IP}_{\text{control}} \text{ (eq.13)}$$

$$\Delta\text{IP (még d'O}_2 \text{ actif / kg d'huile)} = \text{IP}_{\text{sample}} - \text{IP}_{\text{control}} \text{ (eq.14)}$$

$\text{IP}_{\text{sample}}$  = Indice de peroxyde de l'échantillon.

$\text{IP}_{\text{control}}$  = Indice de peroxyde du contrôle.

Un  $\Delta\text{IP}$  positif signifie une quantité d'oxygène actif plus importante que le témoin donc une oxydation (sous forme de peroxydes et d'époxydes) plus importante que l'huile témoin et inversement.

### II.5.2 Analyse des produits secondaires de l'oxydation

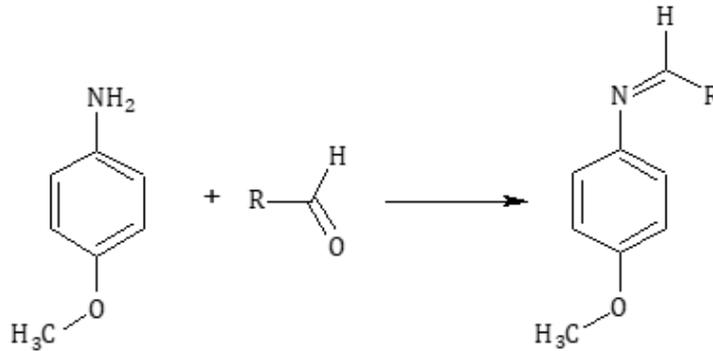
#### II.5.2.1 Suivi des aldéhydes non volatils

Les produits secondaires non volatils ont été analysés par la mesure des indices de *para*-anisidine (*p*-AV). Cette mesure des indices de *p*-AV, de même que les IP, ne nécessite pas d'appareillage coûteux et est simple d'utilisation. Les indices de *p*-AV permettent de connaître l'état oxydatif des échantillons à un instant *t*. Il s'agit d'une méthode d'étude standardisée des aldéhydes et cétones alpha et/ou béta insaturés des huiles *NF EN ISO 6885* (Mai 2016) [151].

En revanche, les indices de *p*-AV utilisent des solvants et réactifs CMR, le réactif est sensible à l'humidité et ils sont, eux aussi, contraignant avec les poudres (micro-encapsulation des huiles), nécessitant comme pour les IP l'extraction des huiles des microparticules.

### II.5.2.1.1 Principe de la méthode des indices de *p*-anisidine (*p*-AV)

La mesure de l'indice de *p*-AV nécessite la préparation d'une solution de *p*-anisidine solubilisée dans de l'acide acétique (0,25g/100mL). La *p*-anisidine va réagir avec les aldéhydes qui résultent de l'oxydation des huiles selon la réaction suivante :



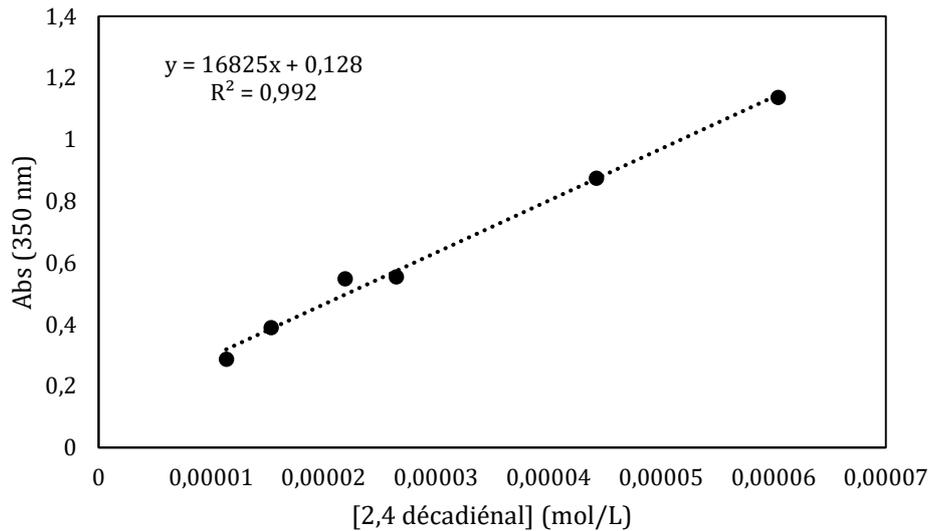
**Figure 32** : Réaction de condensation entre les aldéhydes et cétones et la *p*-anisidine avec formation d'une base de Schiff.

La base de Schiff formée entre l'anisidine et l'aldéhyde ou la cétone absorbe à 350 nm et peut donc être dosée par spectrophotométrie UV.

### II.5.2.1.2 Mesure *p*-AV

Nous exprimons notre indice de *p*-AV en équivalent en mol de 2,4 décadiénal par gramme d'huile. Une gamme d'étalonnage du 2,4 décadiénal dans l'huile de lin a donc été réalisée préalablement afin de déterminer son coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ).

Pour cela une solution mère de 20 mg de 2,4 décadiénal par gramme d'huile a été préparée pour réaliser une gamme étalon comprise entre 0,08 et 0,30 mg de 2,4 décadiénal par g d'huile. A partir de cette gamme étalon, nous avons tracé la courbe représentée figure 33.



**Figure 33** : Droite d'étalonnage du 2,4 décadiénal dans l'huile de lin afin d'obtenir l' $\epsilon$  de la molécule par spectrophotométrie UV-visible.

Grâce à cette courbe nous trouvons un coefficient d'extinction molaire de  $16\ 825\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (**Figure 33**).

Une masse d'huile précise comprise entre 0,5 et 4 g est prélevée et introduite dans une fiole jaugée de 20 mL. De l'iso-octane est ajouté afin de dissoudre et diluer l'échantillon jusqu'au trait de jauge de la fiole. L'absorbance ( $A_{S1}$ ) de cette solution est mesurée à 350 nm contre la référence ( $A_{B1}$ ), le solvant seul (iso-octane). 5 mL d'iso-octane pur sont prélevés et placés dans un tube à essai. 5 mL de l'échantillon dilué sont également prélevés et placés dans un second tube. 1 mL de la solution d'anisidine dans l'acide acétique est introduit dans chacun des deux tubes. Après exactement 10 min, l'absorbance du solvant + le réactif (comme référence  $A_{B2}$ ) et celle de l'échantillon ( $A_{S2}$ ) sont mesurées à 350 nm à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD S 300 UV-VIS (Iéna, Allemagne).

### II.5.2.1.3 Calcul des indices de p-anisidine (p-AV)

Les indices d'anisidine (p-AV) sont alors calculés de la manière suivante :

$$p-AV = (20 \times 1,2 \times 152,23 \times (A_2 - A_1)) / (16\,825 \times m) \text{ (eq.15)}$$

Où :

20 = Volume de la fiole utilisée pour dissoudre l'échantillon (mL).

1,2 = facteur correctif de dilution de l'échantillon après l'ajout du réactif d'anisidine (1 mL).

$A_2 = A_{S2} - A_{B2}$  où  $A_{S2}$  = absorbance de l'échantillon (t = 10) et  $A_{B2}$  = solvant + réactif (t = 10).

$A_1 = A_{S1} - A_{B1}$  où  $A_{S1}$  = absorbance de l'échantillon (t = 0) et  $A_{B1}$  = solvant seul.

152,23 = masse molaire du 2,4 dècadiénel (g.mol<sup>-1</sup>).

16 825 = coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

m = masse de l'échantillon pesé dans la fiole (g).

### II.5.2.2 Suivi des produits secondaires volatils

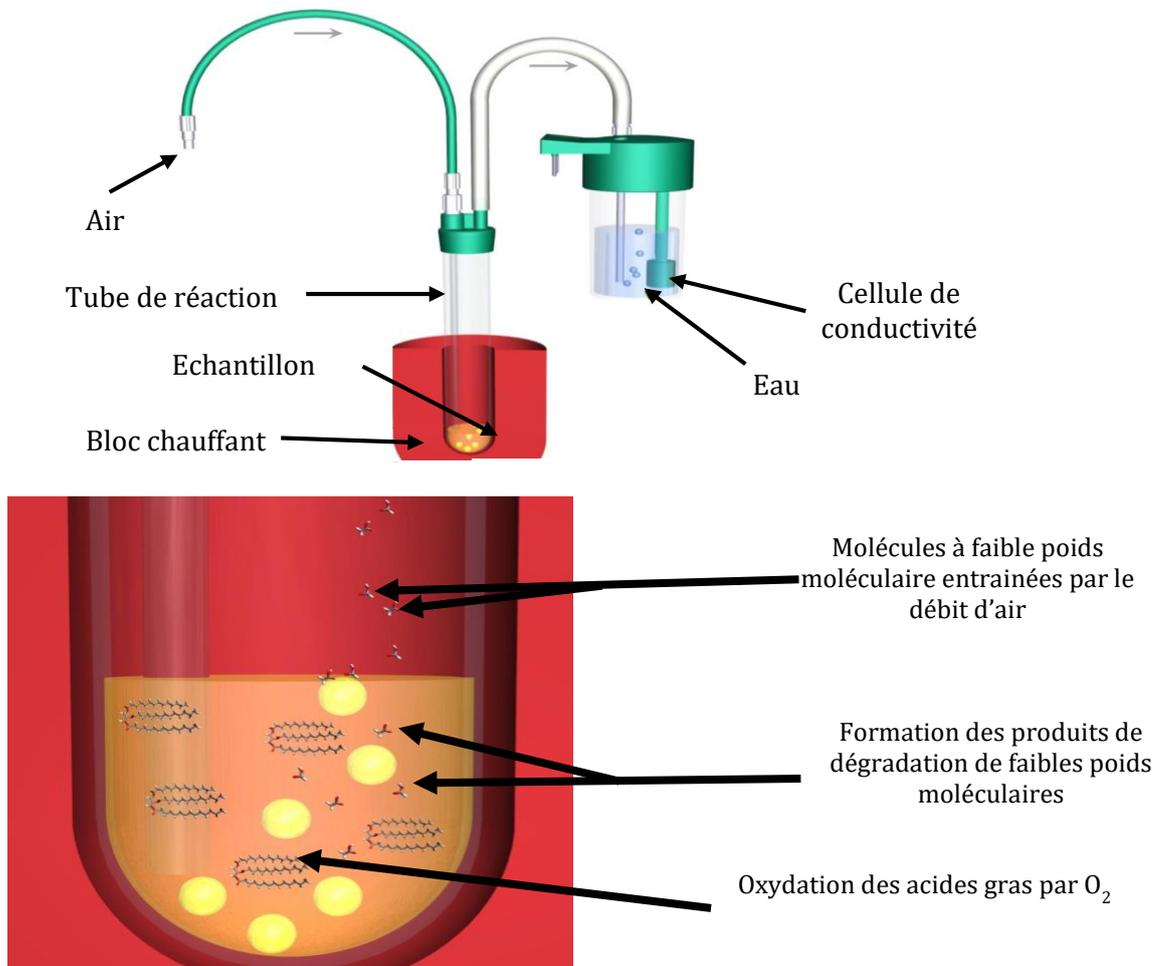
Le suivi des produits secondaires volatils de l'oxydation a été réalisé par détermination de l'indice de stabilité oxydative (OSI) par le Rancimat (892 Professional Rancimat, Metrohm AG, Suisse) méthode standardisée *NF EN ISO 6886* (Juin 2016) [152]. Les principaux inconvénients de cette méthode sont le coût de l'appareillage et le principe d'une oxydation accélérée. En revanche, ses atouts pour répondre aux problématiques du projet ont convaincu ses membres d'utiliser le Rancimat. En effet, cette méthode est rapide, reproductible et surtout utilisable sans modification sur les liquides (huiles en vrac) comme les poudres (huiles encapsulées), ce dernier avantage a été l'élément déterminant afin de pouvoir rapidement comparer les huiles brutes avec celles encapsulées par notre partenaire.

#### II.5.2.2.1 Principe de la technique Rancimat

La méthode du Rancimat a été développée par Metrohm et elle est utilisée pour le suivi des huiles en vieillissement.

Le Rancimat est une technique d'oxydation accélérée des huiles par augmentation de la température. Ainsi, l'appareil est équipé d'un bloc chauffant qui permet d'induire l'oxydation des

échantillons (**Figure 34**). L'oxydation des lipides produits des composés volatils qui sont entrainés par un flux d'air jusqu'à une cellule de mesure de conductimétrie remplie d'eau ultrapure. Une électrode de conductimétrie plongée dans cette cellule permet alors de suivre les variations de la conductivité en temps réel.



**Figure 34** : Schémas de la technique Rancimat et de l'implication du flux d'air dans l'entraînement des molécules volatiles vers les récipients de mesure de conductivité.

### II.5.2.2.2 Mesure des indices de stabilité oxydative (OSI) par la technique du Rancimat

Une masse minimum de 2 g de chaque échantillon est introduite dans un tube de mesure en verre. L'échantillon est chauffé à une température de 100°C (huile de tournesol) ou 90°C (huile de lin) et soumis à un flux d'air de 10L/h pendant la totalité du temps de l'analyse.

Le mode choisi pour l'ensemble des expérimentations au Rancimat est le premier mode. Il s'appuie sur l'étude de la dérivée seconde de la conductivité au cours du temps (l'accélération) donc de la production des produits secondaires volatils de l'oxydation. Ainsi le pic de la dérivée

seconde de la conductivité en fonction du temps, permet directement à l'appareil de déterminer un temps d'induction, correspondant à l'indice de stabilité oxydative de l'échantillon.

Les OSI sont donc automatiquement déterminés par le logiciel de l'appareil (StabNet version 1.1) et exprimés en heure (h).

Pour une meilleure comparaison entre les méthodes d'addition, les résultats ont été traités de la manière suivante :

$$\% \text{ gain de stabilité} = 100 \times ((\text{OSI}_{\text{sample}} - \text{OSI}_{\text{control}}) / \text{OSI}_{\text{control}}) \text{ (eq.16)}$$

$$\Delta \text{OSI (h)} = \text{OSI}_{\text{sample}} - \text{OSI}_{\text{control}} \text{ (eq.17)}$$

Où :

**OSI<sub>sample</sub>** = Indice de stabilité oxydative de l'échantillon directement déterminé par l'appareil.

**OSI<sub>control</sub>** = Indice de stabilité oxydative du contrôle directement déterminé par l'appareil.

Un  $\Delta \text{OSI}$  positif indique un échantillon avec une meilleure stabilité que l'huile témoin et inversement.

### II.6 Analyse des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques tels que les énergies d'activation ( $E_a$ ) et les facteurs de fréquences d'Arrhenius ( $A$ ) ont été déterminés à partir des pentes et des points d'intersection de la droite issue de l'équation d'Arrhenius :

$$\ln(k) = \ln(A) - (E_a/R) \times (1/T) \text{ (eq.18)}$$

Où :

$k$  correspond à la constante de vitesse de la réaction égale à l'inverse de l'OSI ( $\text{h}^{-1}$ ).

$R$  correspond à la constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ).

$T$  correspond à la température en Kelvin.

## Matériel et Méthodes

Les enthalpies ( $\Delta H$ ) et entropies ( $\Delta S$ ) d'activation ont été déterminées à partir des pentes et des points d'intersections de l'équation dérivée de la théorie des complexes activés :

$$\ln(k/T) = \ln(k_b/h) + (\Delta S/R) - (\Delta H/R) \times (1/T) \text{ (eq.19)}$$

Où :

$k_b$  correspond à la constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K).

$h$  correspond à la constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J.s).

Les enthalpies libres de Gibbs ( $\Delta G$ ) ont été calculées par l'équation suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \text{ (eq.20)}$$

### II.7 Méthode d'analyse statistique

Les barres d'erreurs et les écarts-types représentés sur les graphiques et les tableaux dans la suite du manuscrit sont présentés avec un intervalle de confiance de 95%. Ils se trouvent représentés uniquement si la mesure ou l'expérience a été répétée au moins trois fois. Ses bornes sont calculées de la manière suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{0,975;n} \times \sigma}{n}$$

Où  $\bar{x}$  correspond à la moyenne des mesures.

$t_{0,975;n}$  au fractile de la loi de Student de paramètre 1 ; n.

$\sigma$  correspond à l'écart-type des mesures.

n correspond au nombre de mesures réalisées.

# Résultats

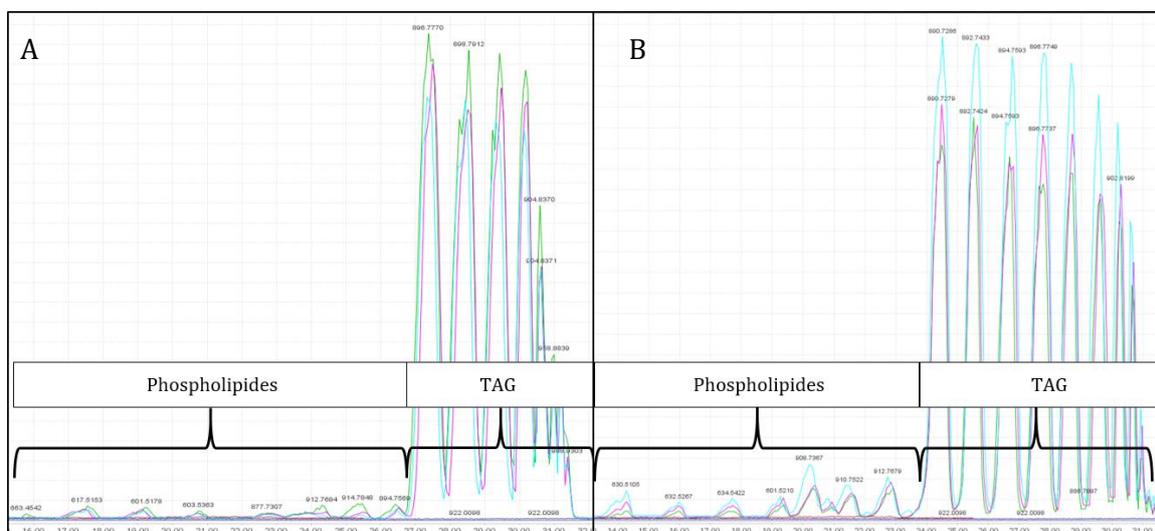
## Chapitre I. Caractérisation des huiles commerciales de lin et de tournesol.

Le préalable avant de démarrer tous travaux sur l'oxydation des huiles commerciales a été de les caractériser. L'huile de tournesol commerciale de la marque Carrefour® et huile de lin commerciale de la marque Bio Planète® ont été étudiées en commençant par la composition lipidique exacte de ces deux huiles ainsi que leur teneur en tocophérol.

### I.1 Composition des huiles

#### I.1.1 Répartition des différentes classes de lipides dans les huiles

La technique de LC-MS permet de mettre en évidence la composition des huiles en terme de classe de lipides. Ainsi, comme attendu pour les huiles, nous obtenons une forte proportion en triacylglycérols (TAG) et de faibles quantités de phospholipides (**Figure 35**). Néanmoins, nous remarquons qu'il y a une plus grande proportion de phospholipides dans l'huile de lin. L'intensité relative des pics des phospholipides, présenté sur la figure 35 est 2 à 2,5 fois plus importante chez le lin que chez le tournesol. Nous pouvons observer que les premiers temps de rétention des TAG chez le lin et le tournesol interviennent respectivement à partir de 24 et 27 min.

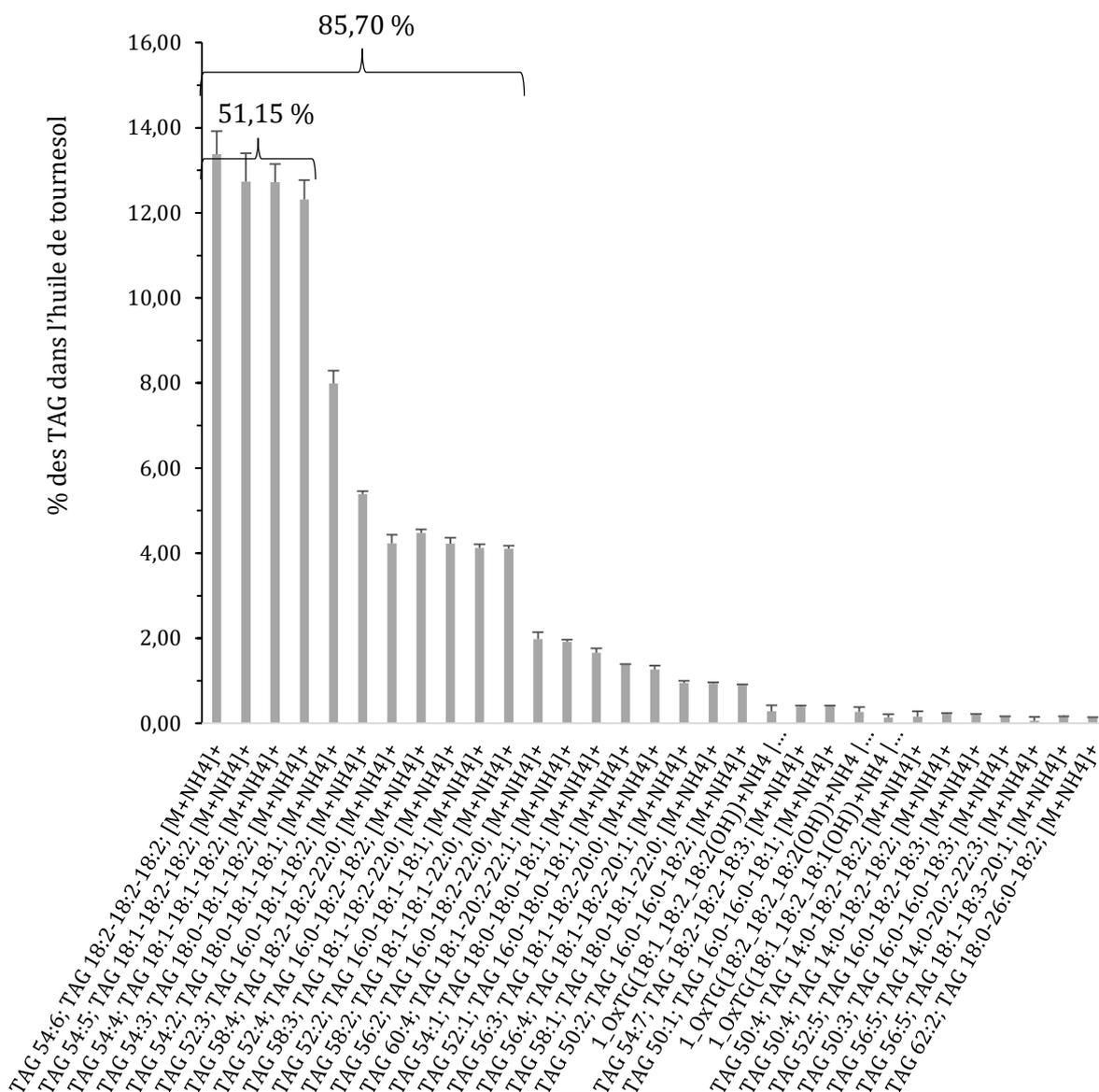


**Figure 35** : Chromatogrammes des huiles de tournesol (**A**) et de lin (**B**) obtenus par LC-MS, où chaque couleur correspond à un échantillon d'huile (n=3).

D'où la présence d'une plage de pics des TAG plus importante chez le lin que le tournesol, qui s'explique par des compositions en acides gras différentes entre les deux huiles.

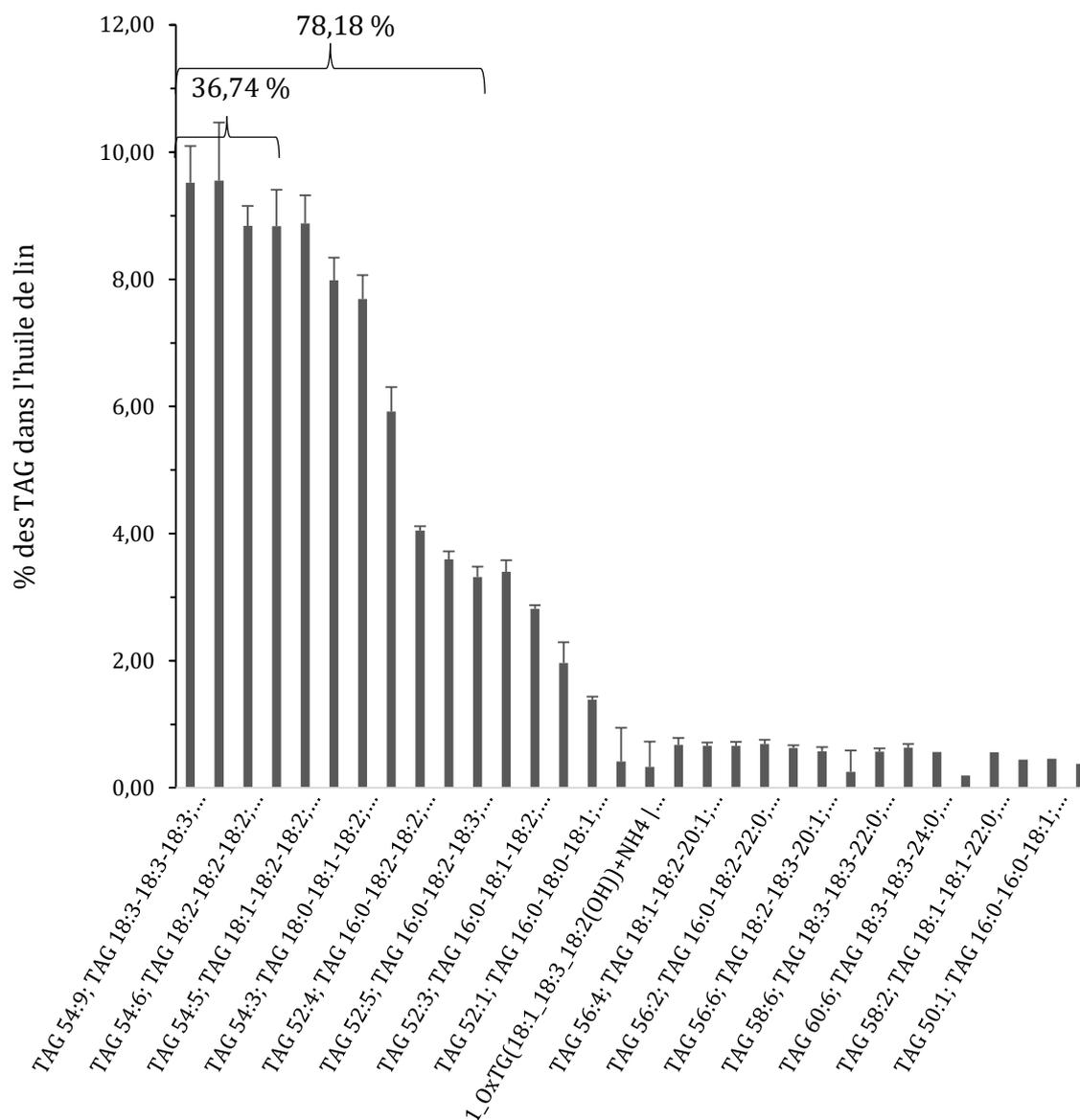
### I.1.1 Composition en acides gras

Les différents TAG retrouvés dans les huiles sont analysés par LC-HRMS et les figures 36 et 37 représentent les pourcentages relatifs de chaque TAG dans, respectivement l'huile de tournesol et de lin. Dans l'huile de tournesol les quatre premiers TAG représentent plus que 50 % des TAG totaux (**Figure 36**).



**Figure 36** : Répartition des différents TAG présents dans l'huile de tournesol obtenue par LC-HRMS.

Ils contiennent chacun au minimum un acide linoléique (C18:2) avec soit de l'acide oléique (C18:1) soit un acide oléique et un acide stéarique (C18:0). Dans l'huile de lin, les résultats montrent un plus grand équilibre dans la représentation des TAG. Les quatre principaux TAG ne représentent, en effet, qu'un tiers (36,74 %) des TAG totaux (**Figure 37**). Ces résultats confirment ceux présentés précédemment (**Figure 35**). De plus, nous notons une grande différence dans la composition en acides gras entre les quatre principaux TAG du tournesol et du lin puisque dans le lin on ne retrouve que de l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3) et de l'acide linoléique (C18:2)..



**Figure 37 :** Répartition des différents TAG présents dans l'huile de lin obtenue par LC-HRMS.

Les pourcentages d'acides gras saturés, mono-insaturés, polyinsaturés dont les acides gras  $\omega 3$  de chacune des deux huiles de tournesol et de lin ont été déterminés par GC-FID. Afin de comparer la répartition des acides gras selon leur taux d'insaturation avec les données de la littérature et celles du fournisseur, nous avons récapitulé toutes ces données dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Compositions relatives en acides gras des huiles de tournesol et de lin obtenues par GC-FID, la littérature [153] et les données fournisseur.

	Acide gras saturés totaux	Acide gras mono-insaturés totaux	Acide gras polyinsaturés totaux	Dont oméga 3	Total
Tournesol					
GC-FID	10,26 %	33,66 %	56,07 %	0,23 %	100,00 %
Littérature	10,20 %	13,60 %	76,10 %	0,1 %	99,90 %
Fournisseur	10,87 %	27,17 %	61,96 %	-	100,00 %
Lin					
GC-FID	10,92 %	22,03 %	67,12 %	50,53 %	100,07 %
Littérature	6 – 31,40 %	18 – 20,40 %	68 – 82 %	35 – 66 %	-
Fournisseur	11,83 %	19,35 %	68,82 %	50,54 %	100,00 %

Le tableau 10 montre des huiles qui possèdent des profils lipidiques généraux très similaires. Ce sont, comme nous le souhaitons, deux huiles riches en acides gras polyinsaturés (plus de 50% des lipides totaux). Bien que les pourcentages d'acides gras polyinsaturés totaux des deux huiles soient relativement proches, la composition de ces acides gras polyinsaturés est totalement différente suivant l'huile considérée, comme attendu. Dans l'huile de tournesol la totalité des AGPI sont de l'acide linoléique (C18:2), tandis que les deux tiers des AGPI de l'huile de lin sont de l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3).

Dans la plupart des cas, nous remarquons une très bonne corrélation entre les données fournisseur, la littérature et nos propres résultats. Toutefois, l'huile de tournesol montre une proportion d'AGMI plus importante par GC-FID qu'annoncé par le fournisseur. Il y a, de plus, une différence marquée entre les résultats de GC-FID et ceux de la littérature pour une huile de tournesol non oléique. Ainsi, bien que nous soyons en présence d'une huile de tournesol majoritairement insaturée et par conséquent non oléique, ces résultats pourraient indiquer un mélange d'huile de tournesol oléique et non oléique ou bien tout simplement un cultivar avec cette composition particulière.

### I.1.2 Teneur en tocophérol

La quantification du tocophérol contenue dans les deux huiles a été réalisée par HPLC (Chapitre II.1.3 du Matériel et Méthodes). Le dosage a concerné les huit isomères (*Annexe 48 ; 49*). Les résultats sont présentés dans le tableau 11 et sont exprimés en équivalent d' $\alpha$ -tocophérol.

**Tableau 11** : Comparaison des teneurs en tocophérol contenue dans les huiles de tournesol et de lin obtenues par HPLC, la littérature [153] et les données fournisseurs.

[Tocophérol] $\text{éq } \alpha\text{-tocophérol}$ (mg/kg d'huile)		
	Tournesol	Lin
[Expérimentale]	629 $\pm$ 16	470 $\pm$ 4
[Littérature]	400 – 950	440 – 588
[Fournisseur]	598	55

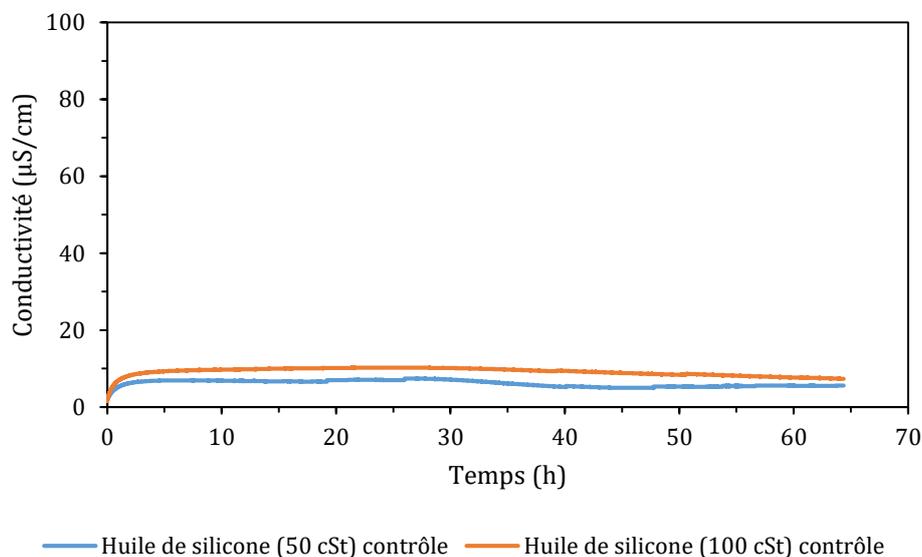
Nous remarquons que les teneurs en tocophérol dans les huiles sont importantes. L'huile de tournesol est plus riche que l'huile de lin. Leurs teneurs sont en accord avec les valeurs de la littérature [153]. Dans le cas de l'huile de tournesol cette teneur est très proche de celle du fournisseur. En revanche, dans le cas de l'huile de lin, la teneur du fournisseur est majoritairement sous-estimée par rapport à notre résultat et à la littérature. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le fournisseur ne prend en compte que l' $\alpha$ -tocophérol. En effet, la littérature montre que le tocophérol majoritaire du lin n'est pas l' $\alpha$ -tocophérol mais le  $\gamma$ -tocophérol [153] et les teneurs en  $\alpha$ -tocophérol sont proches de celle des données du fournisseur.

### I.2 Stabilité oxydative des huiles commerciales

La stabilité oxydative des huiles commerciales a été mesurée au Rancimat. Ce choix a nécessité certaines mises aux points préalables. Le mode automatique de détermination des OSI a été choisi comme nous le précisons dans le matériel et méthodes (Chapitre II.5.2 du Matériel et Méthodes). Toutefois avant de tester les huiles choisies, nous avons commencé par

déterminer l'OSI de deux huiles non oxydables de type polydiméthylsiloxane ou plus communément appelées huiles de silicone. La méthodologie choisie pour le choix de chaque huile de silicone testée s'appuie sur les viscosités des huiles alimentaires. Une huile de silicone avec une viscosité de 50 cSt a été utilisée pour mimer l'huile de lin (48-52 cSt) ainsi qu'une huile de silicone de 100 cSt pour s'approcher de l'huile de tournesol (75 cSt) [154].

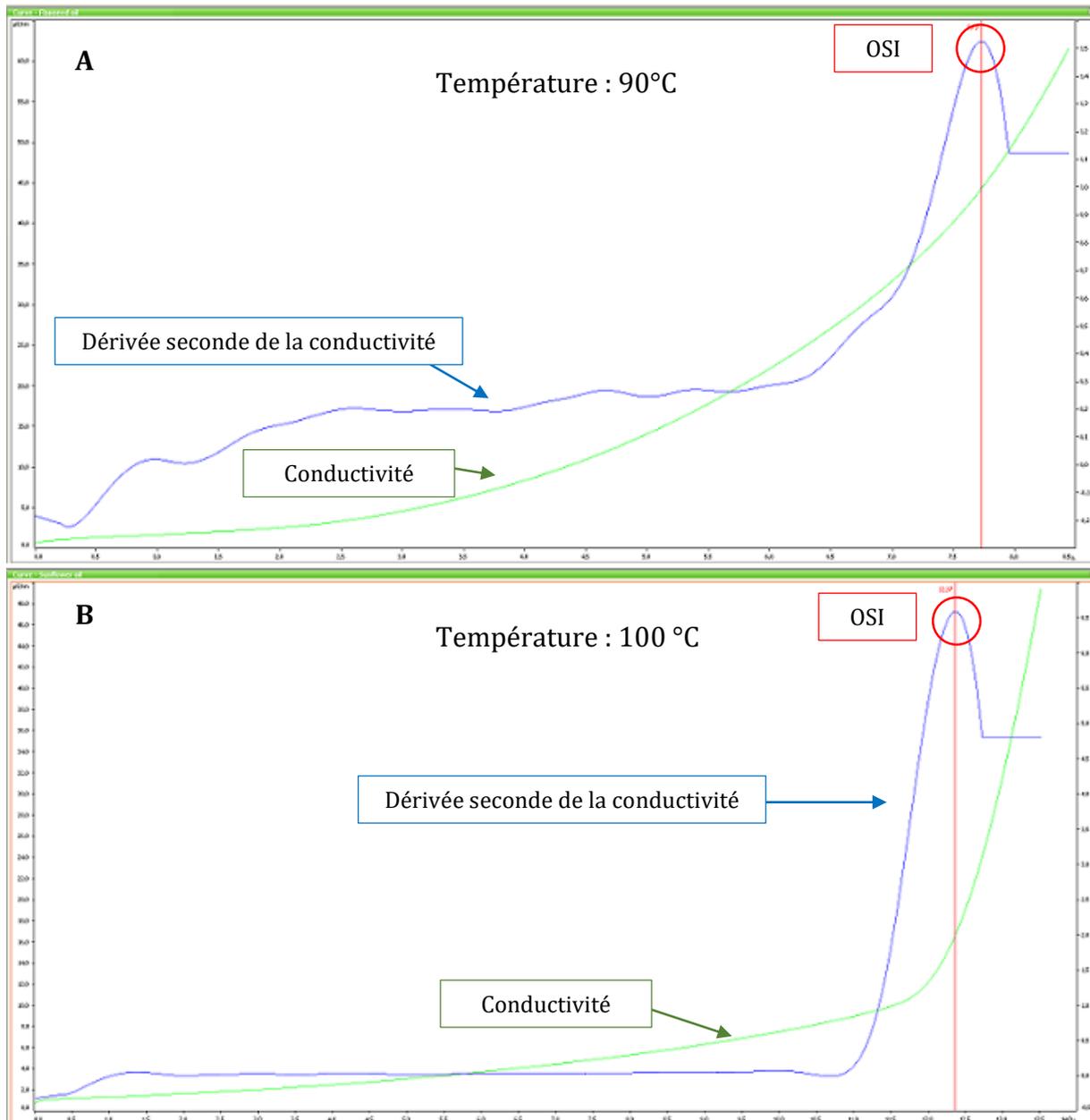
Ainsi la figure 38 correspond aux courbes de conductivité au cours du temps d'analyse au Rancimat, des huiles de silicone 50 et 100 cSt.



**Figure 38** : Courbes de conductivité en fonction du temps des huiles de silicone, par traitement thermique au Rancimat.

La conductivité en fonction du temps, présentée sur la figure 38 ne varie pas ou très peu sur la totalité de l'étude (plus de 64h). Sans une accélération de la conductivité il n'est pas possible par l'appareil de déterminer automatiquement un OSI pour ces huiles. Cette expérience montre bien que l'analyse des huiles seules n'est possible que lorsqu'elles se dégradent en produisant des produits volatils qui se retrouvent entrainés dans la cellule de mesure, ce qui n'est pas possible avec les huiles de silicone.

La figure 39 correspond aux courbes obtenues au cours de l'analyse des huiles de lin et de tournesol au Rancimat.



**Figure 39 :** Courbes expérimentales de détermination des OSI de l'huile de lin (A) et de tournesol (B) par l'oxydation accélérée induite par le traitement thermique au Rancimat.

Sur la figure 39, les courbes vertes représentent la conductivité en fonction du temps, les courbes bleues représentent la dérivée seconde de la conductivité au cours du temps et enfin en rouge sont représentés les valeurs des OSI déterminées par le logiciel du Rancimat.

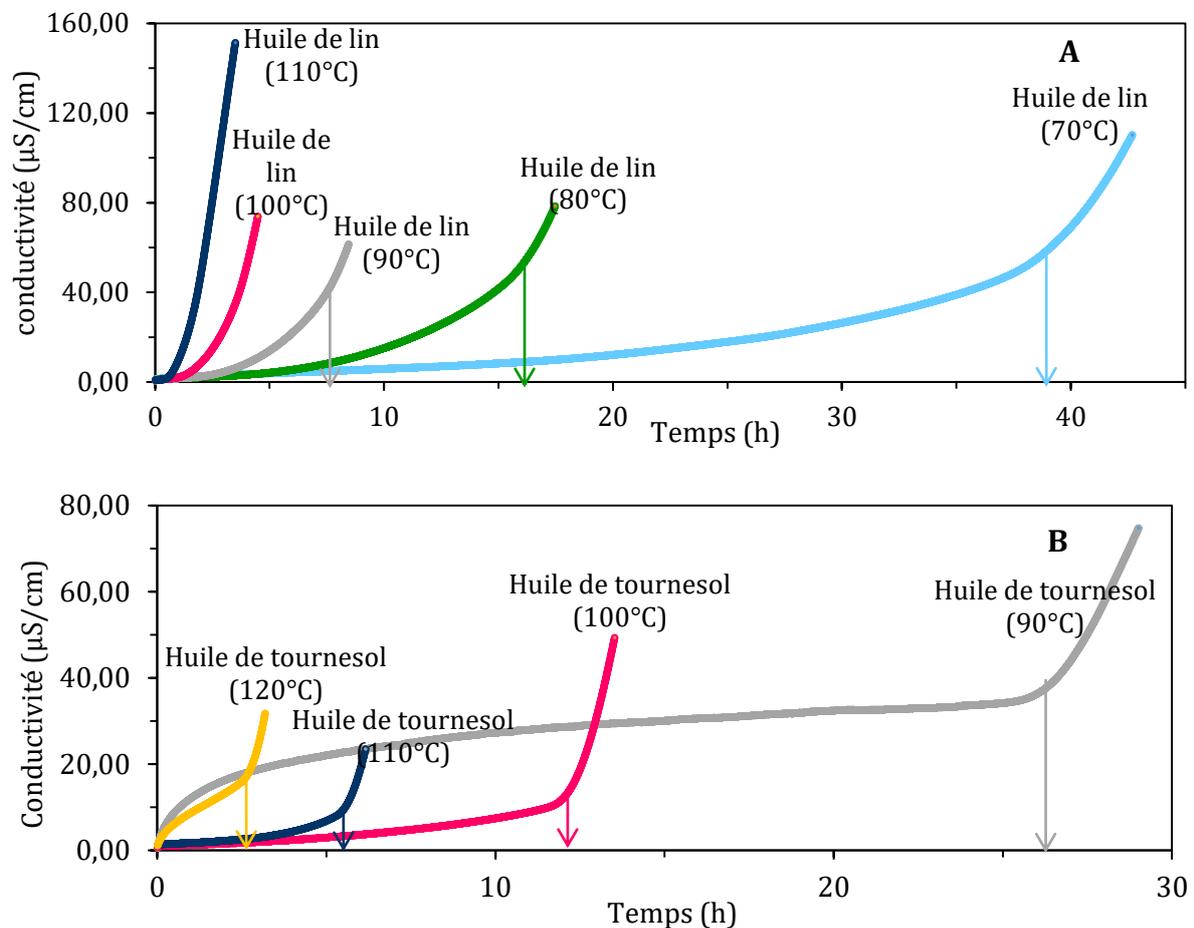
Si nous nous intéressons aux courbes vertes de la figure 39, nous observons une augmentation de la conductivité au cours du temps de l'analyse. Ces augmentations correspondent à une dégradation des échantillons (production de produits secondaires volatils).

Alors que nous observons que la conductivité de l'huile de tournesol varie peu avant de subir une forte accélération (**Figure 39B**), nous observons une augmentation de la conductivité plus progressive avec l'huile de lin qu'avec l'huile de tournesol (**Figure 39A**).

Ceci suggèrent que la production des produits secondaires de l'oxydation se fait de manière plus régulière qu'avec l'huile de tournesol. Les hydroperoxydes issus des acides gras de l'huile de lin sont ainsi, sensiblement plus instable que ceux obtenus à partir de l'huile de tournesol [49]. Cependant, la détermination de l'indice de stabilité oxydative n'intervient qu'au moment de la dégradation complète de l'échantillon. La dégradation complète se matérialise par l'accélération de la production des produits d'oxydation et la détermination d'un temps d'induction ou OSI.

## Résultats

La figure 40 représente les courbes de conductivité obtenues au cours du temps pour les huiles de lin (A) et de tournesol (B) à différentes températures d'oxydation.



**Figure 40 :** Courbes de conductivité en fonction du temps de l'huile de lin (A) et de tournesol (B) à différentes températures d'analyse au Rancimat.

Nous remarquons sur la figure 40 que la variation de la conductivité au cours du temps est dépendante des températures d'oxydation utilisées par le Rancimat et également de l'huile testée. Chaque huile présente, en effet, des variations de conductivités différentes pour une température équivalente. Si nous comparons les courbes des huiles de lin et de tournesol à 90 °C, 100 °C ou 110 °C par exemple, nous remarquons que le temps nécessaire à l'accélération de la conductivité est plus long avec l'huile de tournesol qu'avec l'huile de lin.

Il est également intéressant de noter que plus la température est basse et plus le temps nécessaire à l'accélération de l'oxydation de l'échantillon, est long. Cette différence entre les huiles est causée par les compositions différentes des huiles. L'huile de lin va être plus

rapidement oxydée lors de l'expérimentation au Rancimat que ne l'est l'huile de tournesol comme le confirme la littérature [49].

Les OSI correspondant aux courbes de la figure 39 sont respectivement de 7,73h pour l'huile de lin à 90°C et de 12,37h pour l'huile de tournesol à 100°C. Tandis que celles de la figure 40 sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 12** : OSI des échantillons de la figure 48.

T°C	70°C	80°C	90°C	100°C	110°C	120°C
	OSI (h)					
Lin	37,57	15,98	7,68	3,80	1,81	-
Tournesol	-	-	30,61	14,48	6,70	3,32

Les OSI des huiles de tournesol et de lin du tableau 12 ont permis de déterminer les paramètres cinétiques d'oxydation de ces huiles au Rancimat. Les énergies d'activation ( $E_a$ ) et le facteur de fréquence ( $A$ ) ont été déterminés par la relation d'Arrhenius (**eq.18**), tandis que les variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropies ( $\Delta S$ ) l'ont été à partir de la théorie des complexes activés [155] (**eq.19**). Ces paramètres sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 13** : Paramètres cinétiques des huiles de lin et de tournesol calculés à partir des OSI.

Huile	$\ln(k) = \ln(A) - (E_a/R) \times (1/T)$				
	$a$	$b$	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$A$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$
Lin	-9858,9	25,13	81,97	$8,18 \times 10^{10}$	0,9996
Tournesol	-10605	25,78	88,17	$1,57 \times 10^{11}$	0,9997
Huile	$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) + (\Delta S/R) - (\Delta H/R) \times (1/T)$				
	$a$	$b$	$\Delta H$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J.mol.K <sup>-1</sup> )	$R^2$
Lin	-9496,7	18,24	78,96	-45,93	0,9995
Tournesol	-10228	18,85	85,04	-40,84	0,9997

L'énergie d'activation ( $E_a$ ) de l'huile de lin est de 81,97 kJ.mol<sup>-1</sup> est inférieure à l' $E_a$  de l'huile de tournesol qui est de 88,17 kJ.mol<sup>-1</sup>. L'huile de tournesol nécessite donc un apport énergétique

supérieur pour être oxydée. Les variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) sont de 78,96 et 85,04 kJ.mol<sup>-1</sup> pour l'huile de lin et de tournesol, respectivement. Tandis que les variations d'entropie ( $\Delta S$ ) vont être de -45,93 et -40,84 J.mol.K<sup>-1</sup> pour l'huile de lin et de tournesol, respectivement.

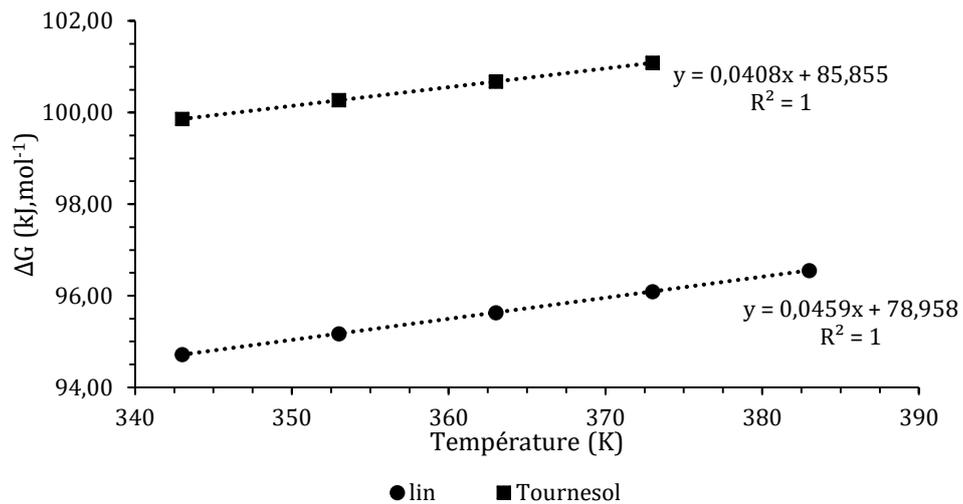
Ces résultats sont en accord avec les valeurs disponibles dans la littérature [156]–[159]. La valeur négative de  $\Delta S$  souligne que les complexes activés sont plus ordonnés que les réactifs. Les énergies libres de Gibbs ont été calculées à partir de ces deux paramètres (*eq.20*) (*Figure 41*) en fonction des températures utilisées.

### I.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les compositions des huiles de tournesol et de lin que nous avons utilisées. Les teneurs en acides gras polyinsaturés de ces deux huiles sont très proches. Néanmoins, dans l'huile de tournesol les AGPI sont exclusivement composés d'acide linoléique de la famille des oméga-6, tandis que ceux de l'huile de lin sont au deux tiers composés d'acide  $\alpha$ -linoléique de la famille des oméga-3.

Nous avons également souligné la teneur particulière en tocophérol de l'huile de lin, qui se trouve être bien plus riche que ne le laissait penser le fournisseur. Cet écart pourrait être attribué à la méthode de dosage employée par le fournisseur qui ne semble prendre en compte que l' $\alpha$ -tocophérol [153] sans prendre en compte le  $\gamma$ -tocophérol forme majoritaire chez le lin.

Les huiles présentent une grande instabilité à l'oxydation mise en avant par les expériences du Rancimat. Cette instabilité est causée par leur richesse en AGPI puisque des huiles moins insaturées ont des OSI plus grands comme l'huile d'olive [157]. Pour toutes ces raisons, l'huile de lin a été plus rapidement oxydée que l'huile de tournesol dans des conditions identiques. Ces observations ont été confirmées par l'étude des paramètres cinétiques. En effet, l'énergie libre ( $\Delta G$ ) en fonction des températures utilisées (*Figure 41*) et l' $E_a$  (*Tableau 13*) de l'huile de lin sont inférieures à celles de l'huile de tournesol, synonyme d'une moins bonne stabilité à l'oxydation [156].



**Figure 41** : Courbes des enthalpies libres de Gibbs ( $\Delta G$ ) en fonction des températures (en K) pour les huiles de lin et de tournesol.

Étant donné que nous ne cherchons pas à comparer l'efficacité anti-oxydante des molécules entre les deux huiles, mais le but est bien de déterminer quelle(s) molécule(s) est (sont) efficace(s) dans chacune des huiles, ces différences de stabilité nous ont conduits à utiliser une température d'analyse différente. L'huile de lin sera ainsi étudiée uniquement à 90°C et l'huile de tournesol à 100°C.

### Chapitre II. Mise au point de l'enrichissement des huiles en antioxydants.

Bien en amont de l'étude sur l'efficacité des antioxydants dans la préservation des huiles hautement polyinsaturées, il a été nécessaire de déterminer le moyen le plus efficace pour enrichir nos huiles avant les études de co-encapsulation. Comme nous le présentons dans le Matériel et Méthodes (section II.2 de la partie Matériel et Méthodes), nous avons identifié trois solvants qui sont autorisés en alimentaire et qui permettraient l'enrichissement des huiles de lin et de tournesol en antioxydants :

- l'eau,
- le propylène glycol (E1520),
- l'éthanol (E1510).

Les concentrations en antioxydants introduites dans les huiles et la détermination des OSI en fonction de ces concentrations ont servi à comparer les trois méthodes entre elles. Les protocoles d'enrichissement explicités dans le Matériel et Méthodes (section II.2 de la partie Matériel et Méthodes) sont différents suivant la méthode choisie et il est important de noter que la méthode d'enrichissement par l'extraction des antioxydants partait avec deux handicaps majeurs par rapport aux deux autres. En effet, la concentration dans l'huile ne pouvait pas être maîtrisée et nous ne pouvions pas enrichir les huiles avec des antioxydants hydrophobes ( $\alpha$ -tocophérol, resvératrol). Cependant, sa simplicité d'application, l'utilisation de solution protéique aqueuse par notre partenaire lors de l'atomisation, mais également l'efficacité de l'acide rosmarinique à de très faibles proportions pour protéger des membranes biomimétiques ont convaincu les membres du projet d'étudier cette méthode.

#### II.1 Choix du solvant pour enrichir les huiles en antioxydants

L'acquisition et la valorisation de molécules d'intérêt à partir de coproduits agricoles demandent du temps. Il a donc été nécessaire d'appréhender le sujet de thèse et de mettre au point, l'enrichissement des huiles grâce à des molécules commerciales. Afin de comparer les

méthodes d'enrichissement entre elles, nous avons sélectionné deux antioxydants : les acides gallique et rosmarinique.

### II.1.1 Extraction des antioxydants par les huiles

L'enrichissement des huiles par la solution aqueuse peut être comparé à une extraction liquide-liquide. Afin de permettre que la plus grande quantité possible d'antioxydant soit extraite par l'huile, nous avons fait varier trois paramètres :

- le *ratio* huile/eau,
- la concentration initiale en antioxydant dans l'eau,
- le volume total du mélange (volume d'huile + volume d'eau).

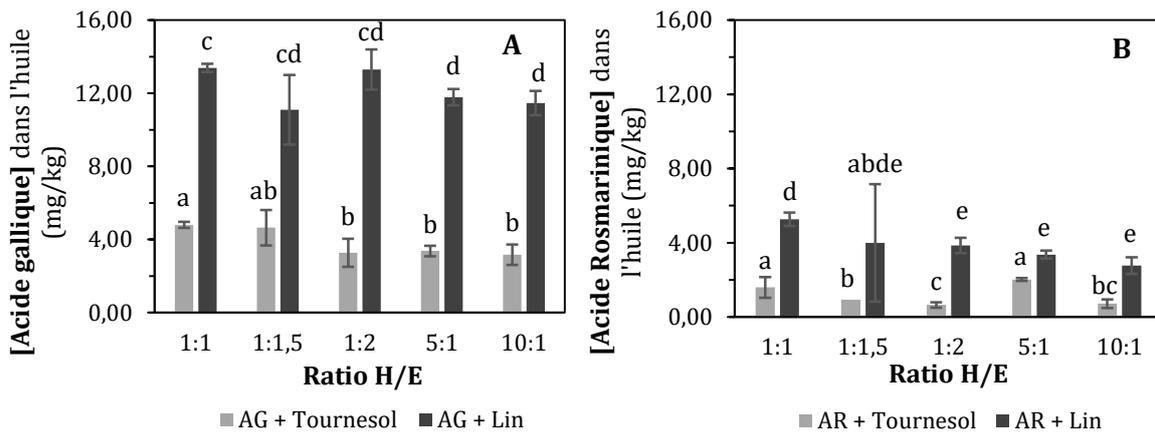
Bien évidemment d'autres paramètres auraient pu être sélectionnés, comme en faisant varier la température du mélange lors de l'étape d'extraction.

#### II.1.1.1 *Ratio* huile/eau

Le premier paramètre que nous avons étudié est le *ratio* huile/eau. Ainsi, la concentration en antioxydant a été fixée à 5 000 mg/kg pour l'acide gallique et 500 mg/kg pour l'acide rosmarinique. Les différents *ratios* volume d'huile/volume d'eau testés étaient les mêmes pour les deux huiles et les volumes d'huiles ont été fixés à 5 mL, conduisant aux volumes totaux suivants :

<i>Ratio</i>	Volume total (mL)
1 : 1	10
1 : 1,5	12,5
1 : 2	15
5 : 1	6
10 : 1	5,5

La figure 42 représente les concentrations des acides gallique et rosmarinique dans l'huile (en mg/kg) en fonction du *ratio* huile/eau utilisé.



**Figure 42 :** Concentration en acide gallique (A) et acide rosmarinique (B) dans les huiles en mg d'antioxydant par kg d'huile en fonction du ratio huile/solution aqueuse, déterminée par HPLC. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons  $\pm$  écart-type de trois échantillons. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ ).

La figure 42 montre une meilleure incorporation des antioxydants dans l'huile de lin que dans l'huile de tournesol. L'augmentation du volume de solution aqueuse n'a pas d'influence sur l'incorporation des antioxydants dans les huiles. En revanche, une légère diminution apparaît lorsque le volume d'huile augmente. Ainsi, nous avons décidé de conserver le *ratio* 1 : 1 pour la suite des expérimentations.

### II.1.1.2 Impact de la concentration initiale en antioxydant

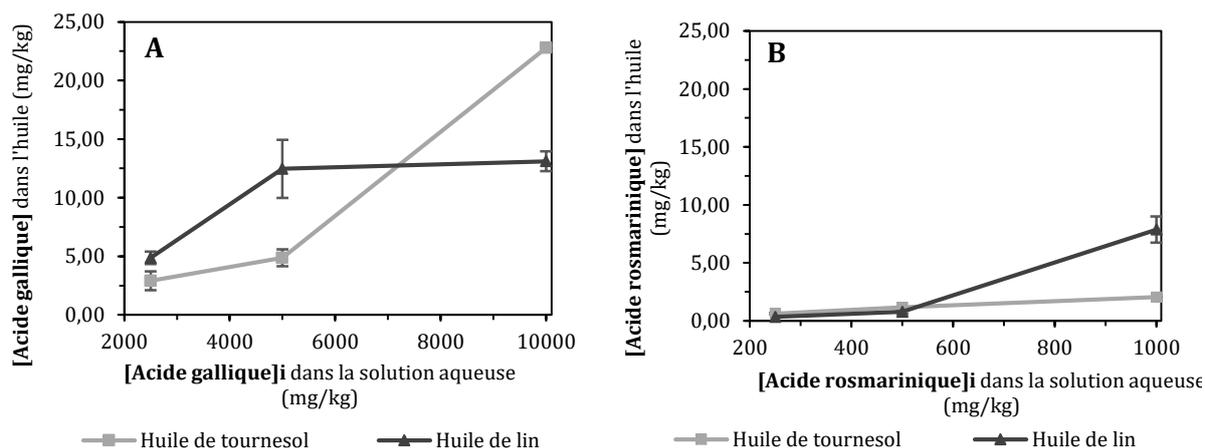
Après l'influence du *ratio* sur l'incorporation des antioxydants dans l'huile, le deuxième paramètre que nous avons étudié est la concentration initiale en antioxydant. Pour obtenir la plus grande quantité possible d'antioxydant dans l'huile, nous avons préparé des solutions aqueuses proches des limites de solubilité pour chacune de nos deux molécules. En se basant sur les données du fournisseur, la solubilité à 20°C dans l'eau de l'acide rosmarinique est proche de 1 000 mg/kg et celle de l'acide gallique est proche de 12 000 mg/kg. Nous avons donc choisi de tester les concentrations initiales suivantes :

- [Acide gallique] : 2 500 ; 5 000 ; 10 000 (mg/kg)
- [Acide rosmarinique] : 250 ; 500 ; 1 000 (mg/kg)

Les solutions aqueuses contenant les antioxydants aux différentes concentrations sont introduites dans les huiles commerciales de lin et de tournesol en ayant fixé un volume total de

mélange de 4 mL. Après homogénéisation du milieu, la concentration finale en antioxydant dans l'huile a été déterminée par HPLC en phase inverse (section II.3 de la partie Matériels et Méthodes).

La figure 43 représente la concentration d'antioxydant (en mg/kg) incorporée dans l'huile en fonction de la concentration initiale d'antioxydant dans la solution aqueuse (en mg/kg).



**Figure 43 :** Concentration en acide gallique (A) et acide rosmarinique (B) dans les huiles de tournesol et de lin en mg d'antioxydant par kg d'huile en fonction de la concentration initiale de la solution aqueuse, déterminée par HPLC.

Nous observons sur la figure 43 que la concentration de la solution aqueuse de départ influence la concentration des antioxydants dans l'huile. Comme attendu, plus la concentration initiale en acide gallique ou rosmarinique augmente et plus la concentration finale dans l'huile de chacun d'entre eux est importante. Cependant, nous remarquons que quelle que soit la concentration initiale testée, la concentration finale en antioxydant dans les huiles reste faible.

Enfin, la figure 43 montre que l'incorporation des deux antioxydants est plus importante dans l'huile de lin que dans l'huile de tournesol exceptée pour la plus forte concentration d'acide gallique.

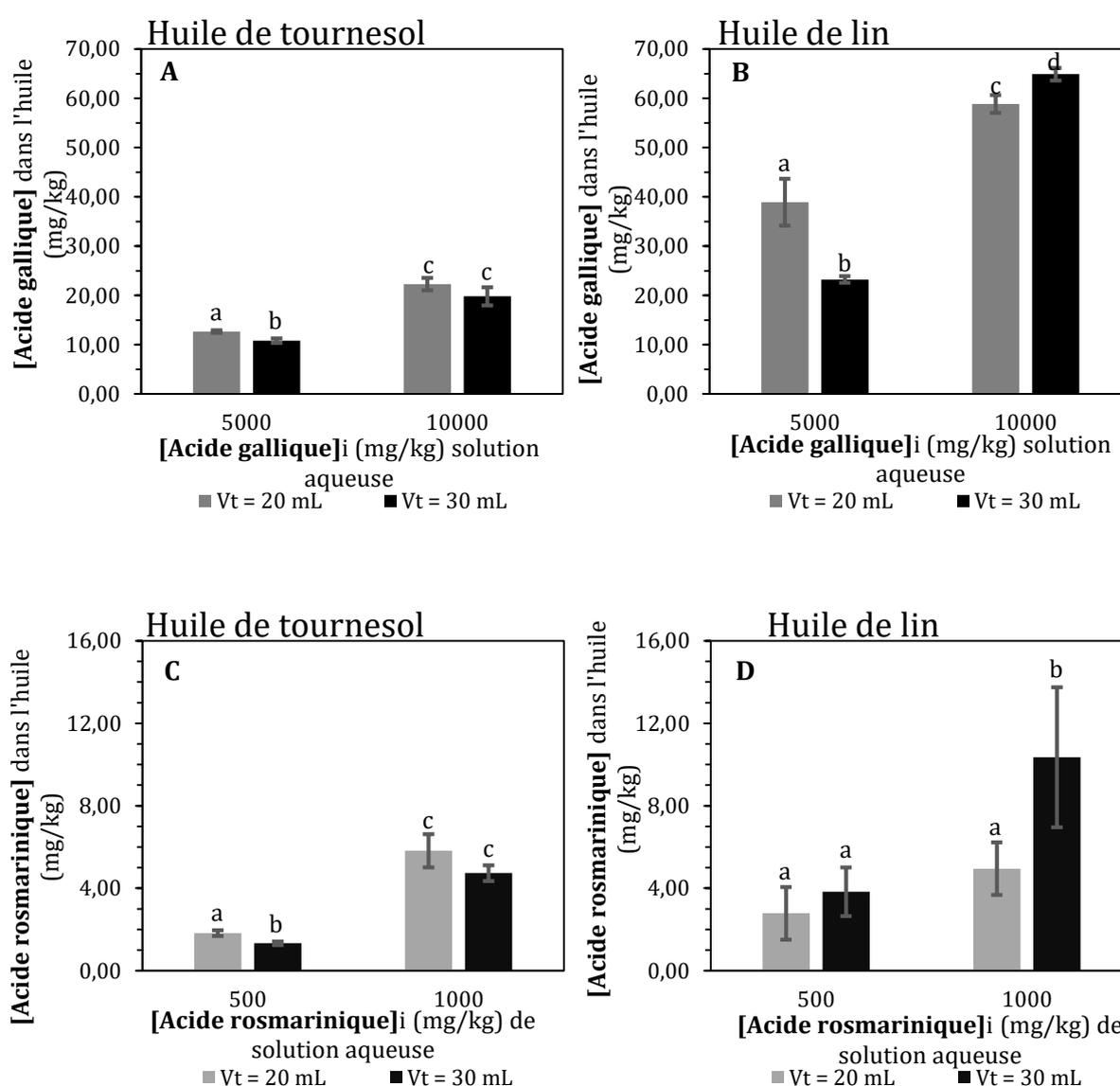
### II.1.1.3 Volume total du mélange

Le dernier paramètre que nous avons testé est le volume total du mélange (eau + huile). Deux volumes ont été choisis : 20 mL (10 mL d'huile + 10 mL de solution aqueuse) et 30 mL (15 mL

d'huile + 15 mL de solution aqueuse). Les concentrations en antioxydant ont été fixées de la manière suivante :

- Acide gallique : 5 000 ; 10 000 mg/kg de solution aqueuse,
- Acide rosmarinique : 500 ; 1 000 mg/kg de solution aqueuse.

Dans la figure 44 sont représentés les résultats de la concentration finale en antioxydant incorporé dans l'huile (en mg/kg) en fonction de la concentration initiale de la solution aqueuse (en mg/kg) pour chaque volume total choisi.



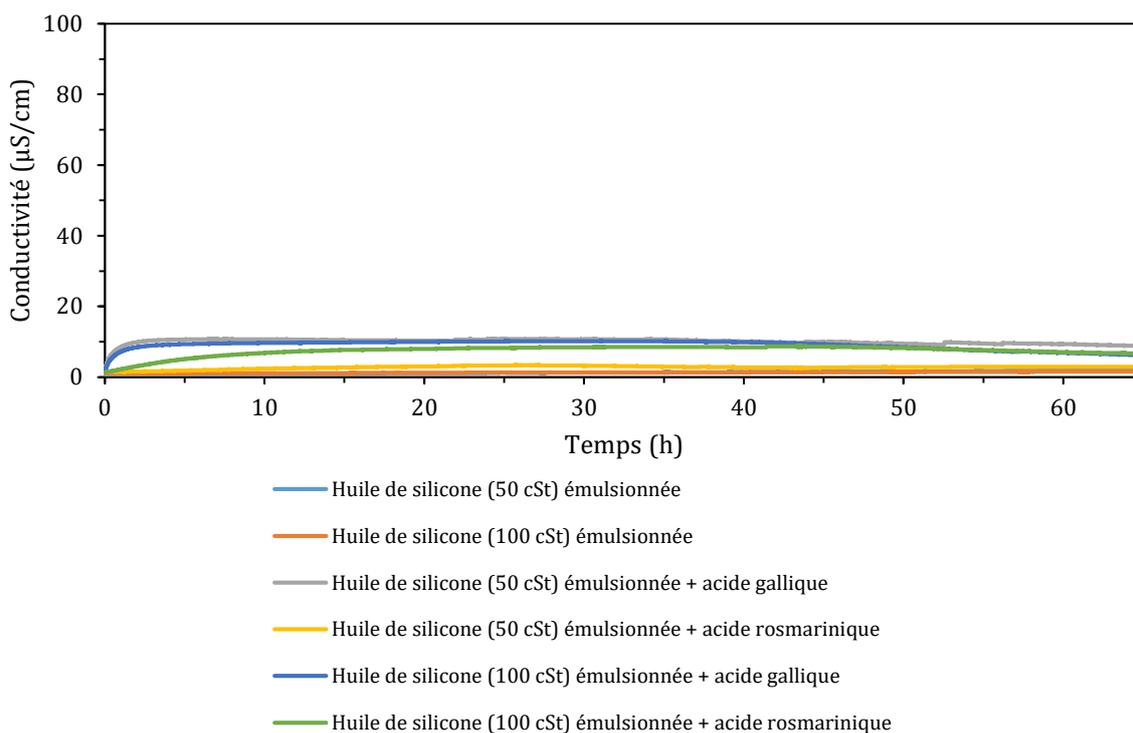
**Figure 44** : Concentration des acides gallique (A et B) et rosmarinique (C et D) dans les huiles de tournesol (A et C) et de lin (B et D) en fonction de la concentration initiale et du volume total, déterminée par HPLC. Les valeurs sont la moyenne de trois échantillons  $\pm$  écart-type de trois échantillons. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différents ( $P < 0,05$ ).

Comme précédemment, la figure 44 montre que la concentration en acide gallique ou rosmarinique incorporée est plus importante dans l'huile de lin que dans l'huile de tournesol. Elle souligne également que plus la concentration initiale est importante et plus grande est la concentration finale dans l'huile, comme le présentait la figure 43. Néanmoins, nous n'observons pas d'influence significative du volume total du mélange sur l'extraction des antioxydants par les huiles (**Figure 44**), bien que des différences soient observables. Elles s'expliqueraient par la difficulté de répéter l'étape d'extraction. En effet, bien que le choix de l'injection directe des huiles enrichies nécessite régulièrement un « nettoyage » de la colonne chromatographique (tous les trois échantillons, section II.3 de la partie Matériels et Méthodes), la très bonne répétabilité de cette technique sur plusieurs dizaines d'échantillons sans modification des temps de rétention, nous a convaincu que ces différences ne sont pas causées par le dosage HPLC.

### II.1.1.4 Stabilité oxydative des huiles enrichies en antioxydants

#### II.1.1.4.1 Stabilité oxydative d'huiles inertes enrichies en antioxydants

Selon la même méthodologie que précédemment (I.2 du chapitre des Résultats), nous avons commencé par étudier l'influence de la méthode d'extraction, ainsi que l'influence de la présence d'acides gallique et rosmarinique sur l'analyse au Rancimat grâce aux huiles de silicone. La figure 45 présente les courbes de conductivité au cours du temps d'analyse, pour les huiles de silicone en présence ou absence d'antioxydants dans la solution aqueuse.

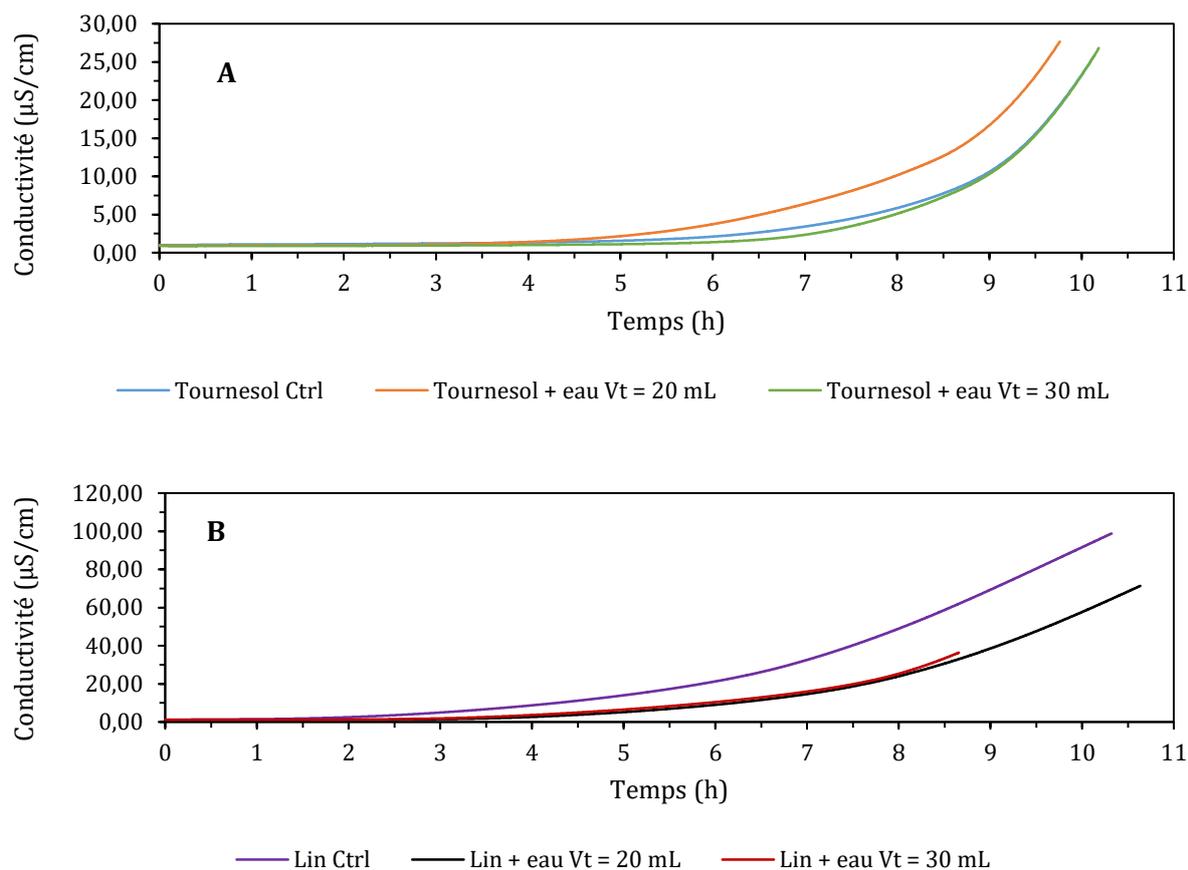


**Figure 45 :** Courbes de conductivités obtenues au Rancimat, en fonction du temps d'analyse, pour les huiles de silicone émulsionnées et enrichies ou non en antioxydants, chauffées à 100 °C.

Les conductivités présentées sur la figure 45 restent faibles pour l'ensemble des échantillons. Il y a néanmoins une augmentation plus rapide pour les échantillons enrichis en antioxydants. Malgré tout, ces variations ne permettent pas d'influencer la mesure des indices de stabilité car nous démontrions précédemment (section I.2 de la partie Résultats) que les huiles de silicone ne s'oxydent pas au Rancimat (**Figure 38**) or ici il n'y a pas d'acquisition d'un indice de stabilité en présence des antioxydants.

### II.1.1.4.2 Stabilité oxydative des huiles après extraction liquide-liquide avec la solution aqueuse

La figure 46 présente les courbes de conductivité au cours du temps, des huiles de tournesol (**A**) et de lin (**B**) après avoir été soumises à la même méthode d'extraction avec de l'eau mais sans présence d'antioxydant.



**Figure 46** : Courbes des conductivités obtenues au Rancimat, en fonction du temps pour les huiles de tournesol (A) et de lin (B) chauffées respectivement à 100 °C et à 90 °C.

Les courbes, correspondant à l'huile de tournesol seule et celles des huiles de tournesol soumises aux traitements en présence d'eau sans antioxydant (Vt = 30 mL) puis centrifugées, sont identiques (**Figure 46A**). En revanche, il y a une légère augmentation de la conductivité dans le cas de l'échantillon au volume total de 20 mL. Toutefois, les OSI obtenus à partir de ces courbes indiquent des valeurs très proches :

- 9,29 h pour l'huile de tournesol seule,
- 8,94 h pour l'huile de tournesol mélangée avec de l'eau pour un volume total de 20 mL,
- 9,32 h pour l'huile de tournesol mélangée avec de l'eau pour un volume total de 30 mL.

Nous retrouvons les mêmes observations avec l'huile de lin (**Figure 46B**). La courbe de l'huile de lin témoin (courbe violette) est légèrement différente des deux tests d'huile en présence d'eau suivie de la centrifugation, courbe noire (20 mL) et rouge (30 mL). Cependant, de manière

analogue à l'huile de tournesol cela n'a pas d'influence sur les résultats d'OSI puisque l'on obtient là aussi des valeurs très proches :

- 7,76 h pour l'huile de lin seule,
- 7,81 h pour l'huile de lin mélangée avec de l'eau pour un volume total de 20 mL,
- 7,92 h pour l'huile de lin mélangée avec de l'eau pour un volume total de 30 mL.

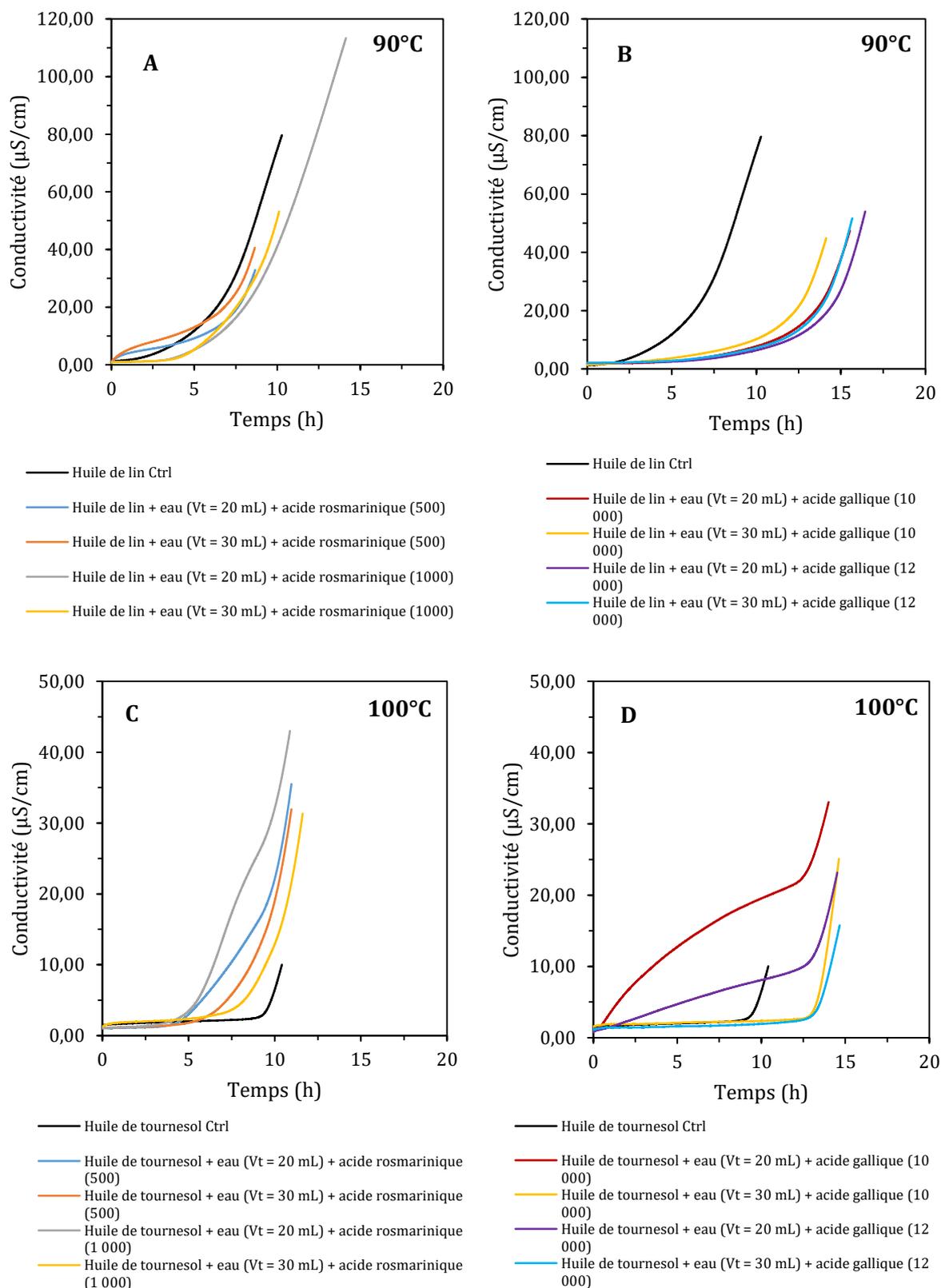
Grâce à la figure 46, nous déduisons que l'étape d'extraction, qui mélange huile et eau, n'a pas d'influence sur la stabilité oxydative des huiles mesurée au Rancimat.

### II.1.1.4.3 Stabilité oxydative des huiles enrichies par la solution aqueuse d'antioxydants

Après avoir mis en évidence que la méthode d'extraction avec l'eau sans les antioxydants par l'huile n'avait pas d'incidence sur la mesure des OSI, nous avons décidé de mesurer les OSI des huiles après enrichissement avec cette fois une solution aqueuse d'antioxydants. À cet effet, nous avons préparé des solutions aqueuses d'antioxydants à des concentrations de 500 et 1 000 mg/kg pour l'acide rosmarinique et de 10 000 et 12 000 mg/kg pour l'acide gallique puis extrait les antioxydants de la solution aqueuse par les huiles de lin et de tournesol. Le tableau 14 présente les indices moyens ( $n=3$ ) ainsi que la valeur des OSI pour chaque courbe de conductivité présentée sur la figure 47.

**Tableau 14** : Résultats du test de stabilité des huiles émulsionnées par la solution aqueuse en présence d'antioxydants.

Aox	Acide rosmarinique				Acide gallique				Ctrl
[Aox] <sub>i</sub>	500		1 000		10 000		12 000		-
Vt (mL)	20	30	20	30	20	30	20	30	-
OSI <sub>Lin</sub> (h)	7,93	7,92	8,94	9,26	12,94	14,22	14,35	15,05	7,62
moyenne ± écart-type (h)	7,46 ± 0,43	7,53 ± 0,34	8,65 ± 0,30	9,23 ± 0,05	12,57 ± 0,52	13,67 ± 0,78	13,89 ± 0,65	14,65 ± 0,58	7,64 ± 0,02
OSI <sub>Tournesol</sub> (h)	10,04	10,04	9,96	10,64	12,82	13,38	13,29	13,43	9,53
moyenne ± écart-type (h)	9,91 ± 0,17	9,71 ± 0,40	10,60 ± 0,65	10,65 ± 0,35	13,12 ± 0,37	12,59 ± 0,25	13,87 ± 0,51	13,32 ± 0,24	8,95 ± 0,82



**Figure 47 :** Courbes de conductivité en fonction du temps d'analyse des échantillons d'huiles de lin (A et B) et de tournesol (C et D) en présence d'acide rosmarinique (A et C) et d'acide gallique (B et D) à différents volumes totaux et concentrations initiales.

## Résultats

Les courbes de conductivités des échantillons sur la figure 47 sont très peu différentes les unes des autres avec l'acide rosmarinique. Alors qu'un très léger retardement d'accélération est visible chez le lin, il semble que ceci ne soit pas le cas chez le tournesol.

En revanche les échantillons avec l'acide gallique montrent bien un retard de l'accélération de l'augmentation de la conductivité quelle que soit l'huile, la concentration initiale et le volume total de la solution.

Cependant dans le tableau 15, où nous avons répertorié les gains de stabilité, nous montrons tout de même que l'addition d'acide rosmarinique favorise la stabilité oxydative des deux huiles et ce même à de très faibles concentrations. Nous résumons dans le tableau 15, les concentrations en antioxydants dans les huiles et les gains de stabilité calculés (section II.5.2, *eq.14* de la partie Matériel et Méthodes) en fonction de la concentration initiale des solutions aqueuses et du volume total de la solution.

**Tableau 15** : Résultats des gains de stabilité à l'oxydation par la technique du Rancimat, suite à l'enrichissement en acides gallique et rosmarinique par la méthode d'addition par solution aqueuse pour les huiles de tournesol et de lin. ( $n=3$ ).

Antioxydant	[AOX] <sub>i</sub> (mg/kg)	Vt émulsion (mL)	Huile de tournesol (100°C, 10L/h)		Huile de lin (90°C, 10L/h)	
			[AOX] <sub>f</sub> (mg/kg)	Gain de stabilité (%)	[AOX] <sub>f</sub>	Gain de stabilité (%)
Acide gallique	10 000	20	22,30 ± 0,86	21 %	58,84 ± 1,26	65 %
		30	19,82 ± 1,29	17 %	64,90 ± 0,89	79 %
	12 000	20	25,82 ± 1,36	28 %	76,26 ± 0,51	82 %
		30	30,26 ± 1,11	23 %	82,47 ± 1,76	92 %
Acide rosmarinique	500	20	1,68 ± 0,09	2 %	2,56 ± 0,82	1 %
		30	1,23 ± 0,06	0 %	3,52 ± 0,76	2 %
	1 000	20	5,35 ± 0,52	13 %	4,55 ± 0,82	17 %
		30	4,36 ± 0,24	10 %	9,52 ± 2,17	24 %

Nous observons sur la figure 47 et dans le tableau 15 que les volumes totaux ne montrent pas d'implication directe sur l'étape d'extraction des antioxydants ni sur la mesure des OSI. De plus,

plus la concentration en antioxydants est importante et meilleur est le gain de stabilité (**Tableau 15**). Ces observations soulignent que plus nous incorporons d'antioxydants dans les huiles et plus nous améliorons le gain de stabilité et donc par extension la stabilité de l'huile. Les deux antioxydants montrent, ainsi, un effet dose-dépendant contre la peroxydation lipidique.

Nous remarquons que nous avons un meilleur gain de stabilité dans le cas de l'huile de lin par rapport à l'huile de tournesol. Ceci s'explique par une extraction plus efficace des antioxydants dans l'huile de lin que dans l'huile de tournesol.

De même, les concentrations en acide gallique sont plus importantes qu'avec l'acide rosmarinique dans le cas des deux huiles. Ceci peut s'expliquer grâce aux concentrations initiales bien plus importantes dans le cas de l'acide gallique que l'acide rosmarinique.

### II.1.2 Bilan de l'enrichissement en antioxydant des huiles par solution aqueuse

L'enrichissement en acides gallique et rosmarinique par solution aqueuse, améliore significativement la stabilité oxydative des huiles mesurée au Rancimat. Les résultats précédents ont montré l'influence de la concentration initiale de la solution aqueuse en antioxydants. Bien que nous n'ayons pas démontré un lien de cause à effet de la capacité extractive des huiles de la part du volume total du mélange, ce trait pourrait être un point important à prendre en compte pour un essai pilote d'enrichissement des huiles par cette méthode.

Nos résultats nous ont indiqué que les conditions optimales pour extraire les antioxydants de l'eau vers les huiles sont une concentration initiale proche de la concentration de saturation, soit 12 000 mg/L pour l'acide gallique et 1000 mg/L pour l'acide rosmarinique, ainsi qu'un *ratio* huile/eau de 1 pour 1.

En revanche, malgré les résultats encourageants montrant l'influence positive de l'addition d'acides gallique et rosmarinique pour protéger les huiles, l'ajout d'antioxydants par une solution aqueuse présente plusieurs inconvénients majeurs que nous avons listés avant son étude :

- la faible solubilité dans l'eau de certaines molécules anti-oxydantes (ex : quercétine),

- le faible taux d'enrichissement des huiles malgré l'utilisation de solutions aqueuses très concentrées en antioxydants,
- l'impossibilité de contrôler finement la quantité d'antioxydant incorporée dans l'huile.

Ainsi, devant ses multiples inconvénients, cette méthode ne nous a pas convaincu et c'est pourquoi nous avons choisi de ne pas la retenir et d'envisager l'enrichissement des huiles à partir de solutions de propylène glycol et d'éthanol.

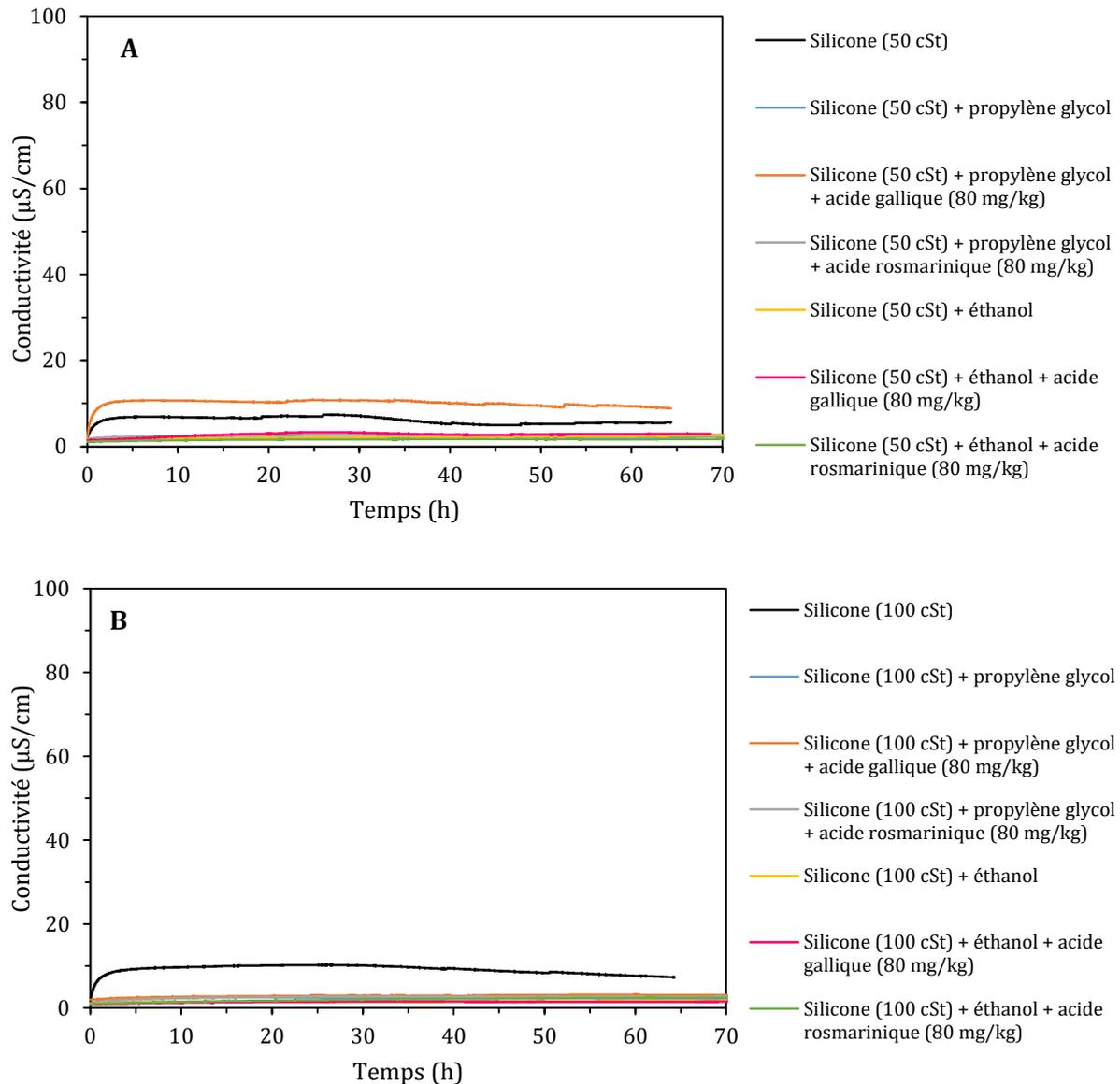
### II.1.3 Enrichissement par ajout des antioxydants en solution de propylène glycol et d'éthanol

Nous avons choisi ces deux solvants car ils sont couramment utilisés dans la littérature [160], [161] et ils nous permettront non seulement de mieux contrôler les quantités de molécules anti-oxydantes dans les huiles mais, en plus, de solubiliser une plus grande quantité/variété de composés. Nos deux antioxydants témoins, les acides gallique et rosmarinique, ont été solubilisés dans du propylène glycol et l'éthanol à une concentration de 20 000 mg/L. Puis des volumes de ces solutions ont été ajoutés à nos deux huiles de lin et de tournesol, afin d'obtenir des concentrations théoriques de 200 ou 80 mg d'antioxydant par kg d'huile.

#### II.1.3.1 Influence des solvants et des antioxydants utilisés sur la mesure de stabilité oxydative

De manière identique à l'addition par solution aqueuse, nous avons tout d'abord testé l'influence des deux solvants sur la conductivité après analyse au Rancimat d'une huile non oxydable, des huiles de silicone, enrichies ou non en antioxydants.

La figure 48 présente les conductivités des huiles de silicone en fonction du temps en présence ou en absence des acides gallique et rosmarinique incorporés grâce aux méthodes au propylène glycol et à l'éthanol. Les résultats de l'huile de silicone de 50 cSt et ceux de l'huile de silicone à 100 cSt devant mimer respectivement l'huile de lin et l'huile de tournesol, les températures des deux huiles de silicone étaient donc les mêmes que celles des huiles de lin (90°C) et de tournesol (100°C).



**Figure 48** : Courbes de conductivité en fonction du temps pour étudier l'influence des solvants et des antioxydants sur la mesure de conductivité du Rancimat avec les huiles de silicone 50 cSt (A) et 100 cSt (B).

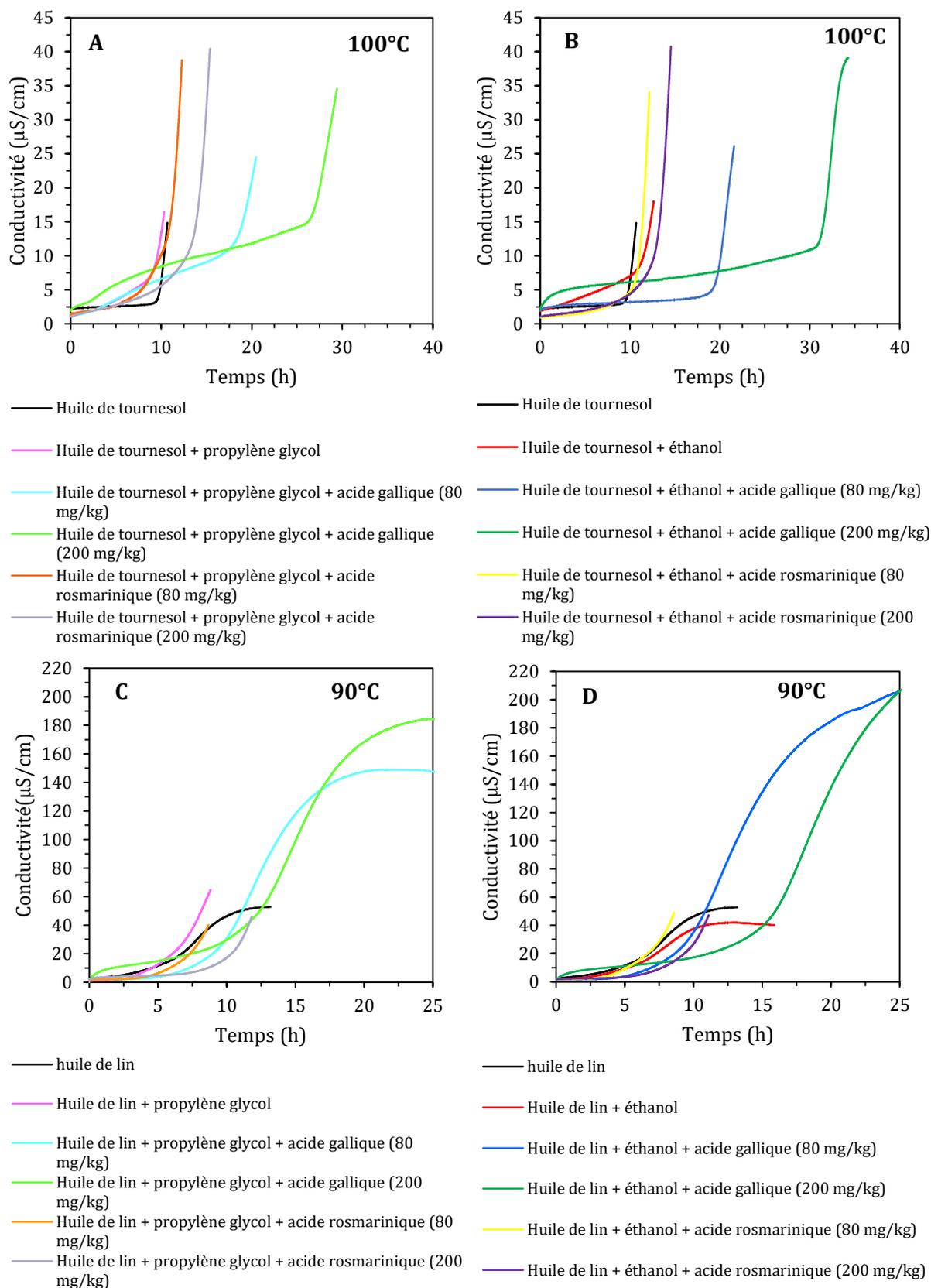
L'expérience présentée dans la figure 48 montre que la conductivité au cours du temps ne varie pas ou très peu avec les huiles de silicone. Comme nous pouvons le voir sur toutes les courbes en présence de solvant seul et en présence de solvant et d'antioxydants, la conductivité ne varie pas de manière significative et nous n'observons jamais d'augmentation rapide de la conductivité permettant de déterminer un OSI.

Ces observations conduisent à conclure que la présence du solvant et des antioxydants n'intervient pas dans la mesure des indices de stabilité car ils n'agissent pas directement sur la conductivité.

### II.1.3.2 Stabilité oxydative des huiles enrichies en antioxydants par les méthodes au propylène glycol et à l'éthanol

Les mêmes expériences que celles réalisées avec les huiles de silicone ont été réalisées avec les deux huiles commerciales de lin et de tournesol.

La figure 49 représente la conductivité en fonction du temps, des huiles de lin et de tournesol seules, en présence des solvants seuls ou en présence des solvants et des antioxydants aux concentrations de 80 et 200 mg/kg d'huile.



**Figure 49** : Courbes de conductivité en fonction du temps pour l'huile de tournesol (A et B) et de lin (C et D) en présence et absence d'antioxydants par la méthode au propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D), obtenues au Rancimat.

## Résultats

Sur les courbes présentées sur la figure 49 nous remarquons une période de latence plus ou moins longue en fonction de l'échantillon. Cette période est suivie d'une rapide augmentation de la conductivité traduisant l'oxydation totale de l'échantillon. Nous pouvons ainsi déterminer les indices de stabilité (OSI), les différences d'indices de stabilités ( $\Delta$ OSI) (Chapitre II.5.2.2.2, (eq.17) du Matériel et Méthodes) et les gains de stabilité (%) (Chapitre II.5.2.2.2, (eq.16) du Matériel et Méthodes). Ces différents paramètres sont récapitulés dans le tableau 16.

**Tableau 16** : Résultats des gains de stabilité à l'oxydation par la technique du Rancimat, suite à l'addition d'acides gallique et rosmarinique par la méthode d'addition au propylène glycol et à l'éthanol pour les huiles de tournesol et de lin.

		Huile de tournesol (100°C, 10 L/h)			Huile de lin (90°C, 10 L/h)		
Antioxydant	[Aox] (mg/kg)	OSI (h)	$\Delta$ OSI (h)	Gain de stabilité	OSI (h)	$\Delta$ OSI (h)	Gain de stabilité
<b>Huile seule</b>							
Ctrl	-	9,75	-	-	6,75	-	-
<b>Addition par propylène glycol</b>							
Huile + solvant	0,00	9,46	-0,29	0 %	6,73	-0,02	0 %
Acide gallique	80,00	18,74 ± 0,80	+8,99	92 %	9,52 ± 0,06	+2,77	41 %
	200,00	26,92 ± 1,06	+17,17	176 %	12,57 ± 0,24	+5,82	86 %
Acide rosmarinique	80,00	11,24 ± 0,09	+1,49	15 %	7,86 ± 0,09	+1,11	16 %
	200,00	14,08 ± 0,41	+4,33	44 %	10,82 ± 0,30	+4,07	60 %
<b>Addition par éthanol</b>							
Huile + solvant	0,00	9,57	-0,18	0 %	6,65	-0,10	0 %
Acide gallique	80,00	19,76 ± 0,21	+10,01	103 %	9,33 ± 0,08	+2,58	38 %
	200,00	28,36 ± 0,16	+18,61	191 %	15,93 ± 0,31	+9,18	136 %
Acide rosmarinique	80,00	11,13 ± 0,25	+1,38	14 %	7,86 ± 0,17	+1,11	16 %
	200,00	13,32 ± 0,38	+3,57	37 %	10,16 ± 0,35	+3,41	51 %

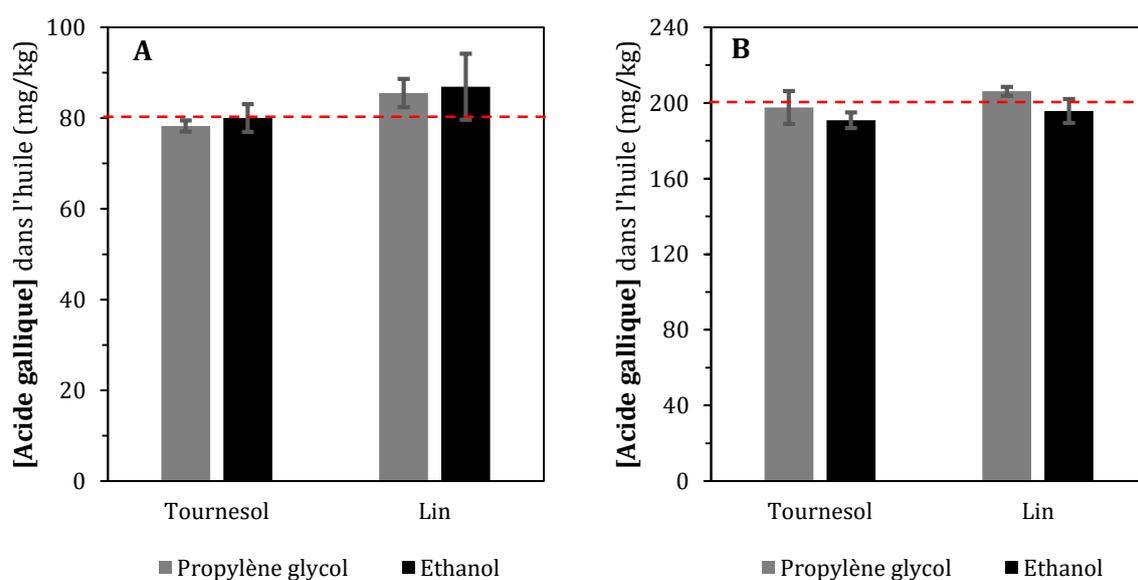
Les résultats de la figure 49 et du tableau 16 montrent que le solvant seul, que ce soit du propylène glycol ou de l'éthanol, n'a pas d'influence significative sur la stabilité oxydative des deux huiles. Par contre, lorsque les antioxydants sont ajoutés dans les huiles, nous obtenons une

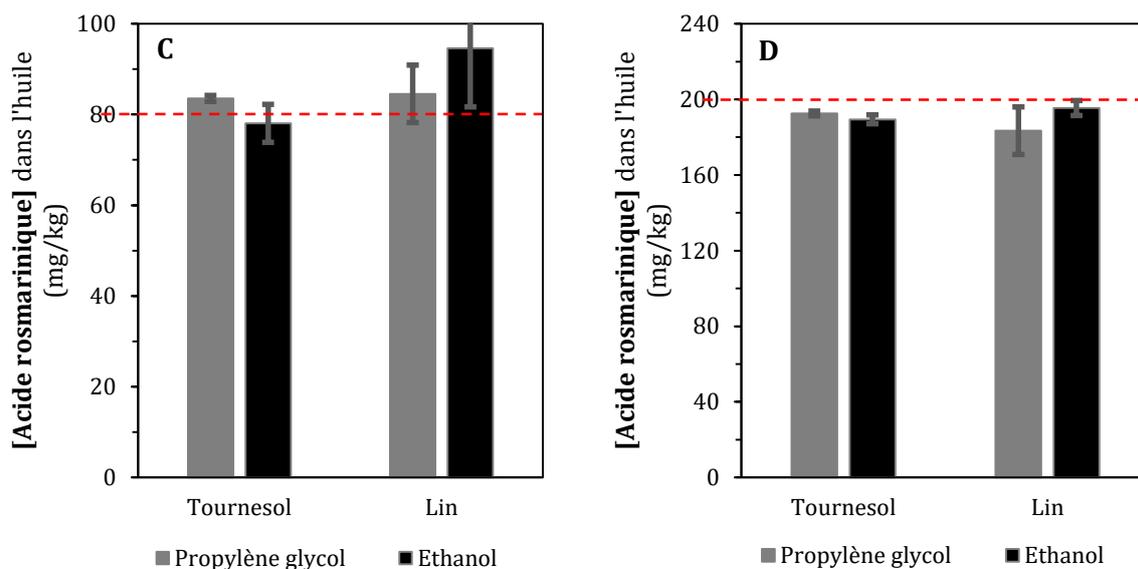
## Résultats

augmentation de la stabilité oxydative des huiles. Plus la concentration en antioxydant est grande, plus le gain de stabilité est important. D'autre part, nous observons également que l'acide gallique est plus efficace que l'acide rosmarinique pour prévenir l'oxydation des huiles et ce phénomène est plus marqué dans l'huile de tournesol que dans l'huile de lin.

Afin de confirmer les observations du Rancimat sur le caractère dose-dépendant de l'efficacité de nos deux antioxydants, nous avons réalisé le dosage de la quantité d'antioxydant retrouvée dans l'huile par HPLC en phase inverse de la même manière que pour l'enrichissement par extraction liquide-liquide, (section II.3 de la partie Matériel et Méthodes).

Les résultats obtenus avec les deux molécules et avec les deux huiles sont présentés sur la figure 50. Nous remarquons une bonne corrélation entre les concentrations attendues (représentées par les lignes en pointillées) et celles obtenues expérimentalement (représentées par les histogrammes), confirmant la validation de la méthode de détermination de la concentration des antioxydants dans les huiles. L'enrichissement par les méthodes au propylène glycol et par l'éthanol nous permet de contrôler efficacement et précisément la quantité d'antioxydants introduits dans les huiles. Le choix de l'injection directe de l'huile, sur la colonne chromatographique, pour la détermination de la concentration en antioxydants peut donc être validé par ces résultats (*Figure 50*).





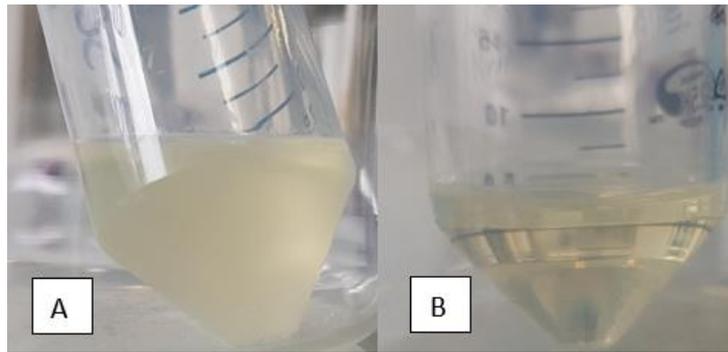
**Figure 50** : Concentration en acide gallique (A et B) et acide rosmarinique (C et D) en mg d'antioxydant par kg d'huile, déterminée par HPLC, pour un enrichissement avec les méthodes au propylène glycol et à l'éthanol.

La maîtrise des concentrations en antioxydants ajoutées permet d'en incorporer un plus grand nombre et augmente de manière significative les capacités des acides gallique et rosmarinique à protéger les huiles.

### II.1.3.3 Aspect des huiles enrichies

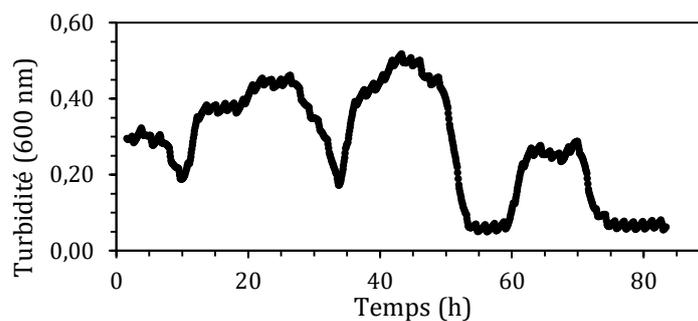
À ce stade des investigations il n'est pas possible de différencier les deux méthodes l'une de l'autre car nous notons que les gains de stabilité présentés précédemment sont proches pour l'addition par propylène glycol et éthanol (**Tableau 16**).

En revanche, la présence, du propylène glycol dans les huiles influence l'aspect visuel des huiles. En effet, l'addition de propylène glycol mène à la formation d'une émulsion changeant l'aspect de l'huile (**Figure 51**). La formation d'un trouble (**Figure 51A**), pourrait donc impacter les bienfaits organoleptiques des huiles ou tout simplement les phénomènes d'oxydation. À titre de comparaison, la figure 51 (**B**) qui correspond à l'huile de tournesol enrichie par l'éthanol ne montre aucune modification d'aspect.



**Figure 51** : Photographie de l'émulsion d'huile de tournesol après addition de propylène glycol (A) et éthanol (B).

C'est pourquoi le devenir de l'émulsion huile de tournesol/propylène glycol a été observé en suivant l'évolution de sa turbidité au cours du temps. La figure 52 représente la variation de turbidité à 600 nm de l'émulsion en fonction du temps.



**Figure 52** : Turbidité de l'émulsion huile de tournesol/propylène glycol en fonction du temps.

La variation de la turbidité n'est pas linéaire pendant le temps de l'expérience comme le souligne la figure 52. Nous observons des diminutions et augmentations successives de la turbidité qui indiquent une certaine instabilité au cours du temps du mélange huile-propylène glycol. Cette expérience montre cependant une tendance générale de la turbidité à diminuer au cours du temps. Cette observation met en évidence la séparation entre les deux entités (propylène glycol et huile). Puisque la densité du propylène glycol ( $d = 1,04$ ) est supérieure à celle de l'huile ( $d = 0,92$ ), lorsque les deux entités vont se séparer, le propylène glycol sera entraîné au fond de la cuve de spectrophotométrie.

### II.1.4 Bilan sur le choix du solvant pour l'enrichissement des huiles

Comme nous nous y attendions l'extraction des antioxydants par l'huile n'était pas adéquate et malgré certaines possibilités offertes en rapport avec la solution aqueuse de protéines du spray drying, cette méthode a finalement été abandonnée suite à de trop nombreux inconvénients.

D'autre part, les additions d'acides gallique et rosmarinique par solution de propylène glycol et d'éthanol ont permis :

- de contrôler plus finement la concentration finale,
- d'incorporer une plus grande quantité d'antioxydants,
- et d'augmenter la protection de l'huile contre l'oxydation.

Néanmoins, dans la section II.1.3.3 de la partie Résultats, nous montrions que l'aspect des deux huiles est différent lorsqu'elles sont enrichies avec une solution éthanoïque ou avec du propylène glycol. Si nous ne prenons en compte que l'aspect, l'addition de l'antioxydant en solution éthanoïque semblerait préférable. Cependant, certains consommateurs refuseront de consommer une huile contenant de l'éthanol et bien que l'élimination ou non de l'éthanol n'ait pas été tranchée à ce stade du projet, nous avons décidé de conserver ces deux méthodes d'enrichissement pour évaluer l'impact de l'addition d'acide gallique sur le stockage des huiles de tournesol et de lin.

## II.2 Etude du stockage des huiles enrichies en antioxydants par solution de propylène glycol et éthanol

D'après les recommandations des agences de santé et de l'étiquetage sur les bouteilles des huiles, les conditions de stockage des huiles de tournesol et de lin sont [40] :

**Tableau 17** : Conditions de stockage recommandées pour les huiles de tournesol et de lin.

	Temps de conservation	Température	Luminosité
<b>Huile de tournesol :</b>	6 - 12 mois après ouverture	25°C	Obscurité
<b>Huile de lin :</b>	3 mois après ouverture	4°C (réfrigérateur)	Obscurité

Ainsi les conditions de stockage que nous avons choisies sont les suivantes :

- Récipient en verre fermé et recouvert d'aluminium pour protéger de la lumière
- Conservation à 25°C (huile de tournesol), 4°C (huile de lin)

Deux méthodes de suivi de l'oxydation ont été utilisées :

- Les indices de peroxydes (produits primaires de l'oxydation) par dosage iodométrique (Chapitre II.5.1 du Matériel et Méthodes) (*eq.12*),
- Les indices de stabilité oxydative (produits secondaires de l'oxydation) par Rancimat (Chapitre II.5.2.2 du Matériel et Méthodes).

Les expérimentations en stockage ont été réalisées avec l'acide gallique car c'est la molécule qui présente la plus grande efficacité (*Tableau 16*).

### II.2.1 Enrichissement des huiles en acide gallique

L'acide gallique est ajouté à de l'huile de tournesol ou à de l'huile de lin à une concentration finale de 80 mg/kg soit via une solution éthanoïque soit via le propylène glycol. Un témoin négatif à savoir l'huile seule et un témoin positif à savoir l'huile en présence du solvant ont été étudiés dans les mêmes conditions.

#### II.2.1.1 Huile de tournesol

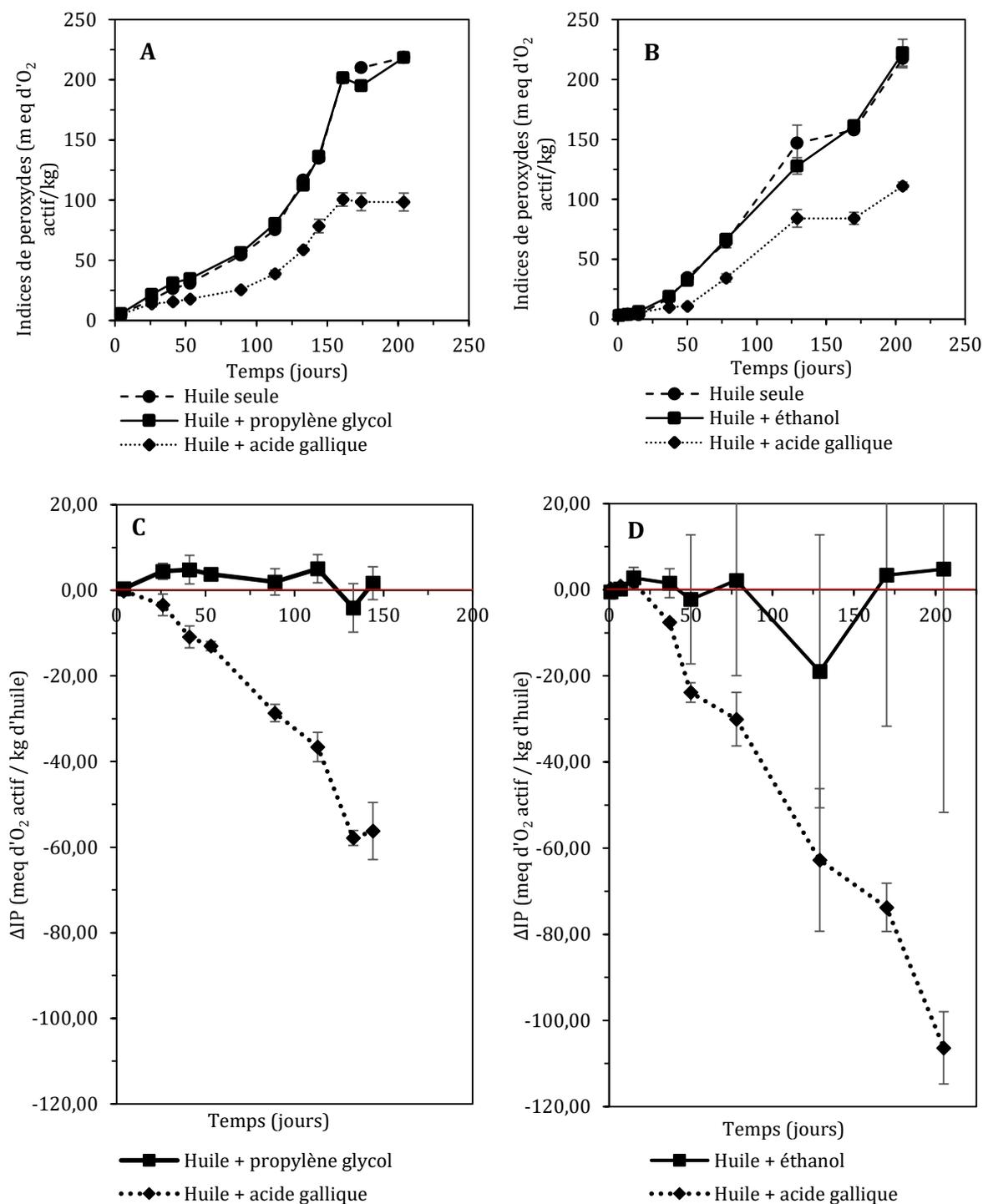
La figure 52 présente les indices de peroxydes en fonction du temps pour l'addition d'acide gallique par le propylène glycol (*A*) et l'éthanol (*B*), ainsi que les différences d'indices de peroxydes (*eq.17*) avec le propylène glycol (*C*) et l'éthanol (*D*) pour l'huile de tournesol.

Les tendances des courbes des IP montrent une production d'hydroperoxydes qui augmente avec le temps. Nous remarquons, de plus que l'allure des courbes est identique. Elles

commencent toutes par une augmentation de l'indice de peroxydes suivie d'un ralentissement comme le montre la présence des plateaux après 160 et 125 jours de stockage, respectivement, pour le propylène glycol et l'éthanol (**Figure 53A** et **Figure 53B**). L'augmentation des indices de peroxydes traduit une production de peroxydes supérieure à leur dégradation, alors que le plateau correspond à une production égale à la dégradation des peroxydes. La comparaison des témoins négatifs (huile de tournesol seule) et positifs (huile de tournesol + propylène glycol ou éthanol) ne montre aucune différence significative des indices de peroxydes (**Figure 53A** et **Figure 53B**). Ces observations sont confirmées par les variations d'indices de peroxydes ( $\Delta IP$ ) entre les témoins positifs et négatifs qui ne montrent pas de différences significatives par rapport aux résultats des témoins négatifs (matérialisée par les lignes rouges) (**Figure 53C** et **Figure 53D**). Nous en déduisons que les deux solvants n'interfèrent pas sur les résultats des indices de peroxydes lors du stockage des huiles.

Nous remarquons qu'en présence d'acide gallique les IP et  $\Delta IP$  deviennent significativement inférieurs aux valeurs des contrôles dès le 26<sup>ème</sup> jour pour le propylène glycol (**Figure 53A** et **Figure 53C**) et le 37<sup>ème</sup> jour pour l'éthanol (**Figure 53B** et **Figure 53D**).

Ainsi la présence d'acide gallique semble ralentir la production des peroxydes. Nous remarquons, toutefois, que dans le cas de l'éthanol la production d'hydroperoxydes augmente de nouveau après 170 jours de stockage (**Figure 53B**). L'enrichissement en acide gallique permet de réduire les quantités de dioxygène présent, ce qui se matérialise par une production d'hydroperoxydes inférieure aux témoins.



**Figure 53 :** Courbes des IP (A et B) et ΔIP (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de tournesol par propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D).

À partir de ces observations nous avons décidé de calculer un pourcentage d'inhibition de la production d'hydroperoxydes (chapitre II.5.3, *eq.13* du Matériel et Méthodes). La présence d'acide gallique permet ainsi de réduire de 47% et de 50% la production d'hydroperoxydes respectivement pour le propylène glycol et l'éthanol par rapport au témoin négatif. L'allure des

courbes des  $\Delta IP$  montrent une capacité d'inhibition identique tout au long de l'analyse (**Figure 53C** et **Figure 53D**). Toutefois, malgré des écart-types plus grands dans le cas de l'addition par l'éthanol (**Figure 53D**), l'inhibition de l'acide gallique par cette méthode d'addition est légèrement meilleure. En effet, pour un temps donné, les  $\Delta IP$  sont plus importants comme à  $j = 50$  et  $j = 130$  où ils sont respectivement de -13,02 et -57,85 milliéquivalents de dioxygène actif par kg d'huile pour le propylène glycol contre -22,86 et -62,73 milliéquivalents de dioxygène actif par kg d'huile pour l'éthanol.

La figure 54 représente les indices de stabilité oxydative en fonction du temps pour l'huile de tournesol avec et sans addition d'acide gallique par le propylène glycol (**A**) et l'éthanol (**B**), ainsi que les différences de variations des indices de stabilité oxydative (**eq.17**) des échantillons par rapport au témoin négatif pour le propylène glycol (**C**) et l'éthanol (**D**). Nous voyons que les OSI diminuent au fur et à mesure que le temps de stockage augmente. De manière analogue aux indices de peroxydes, les solvants ne modifient pas significativement les OSI des huiles seules (comparaison témoins négatif et positif). L'addition d'acide gallique permet d'obtenir un OSI supérieur aux deux témoins à  $j = 0$  quelle que soit la méthode utilisée. De plus, même après 110 jours de stockage, l'OSI de l'huile de tournesol enrichie en acide gallique est toujours supérieur à celui des deux témoins (**Figure 54A** et **Figure 54B**). L'étude des  $\Delta OSI$  indique les mêmes conclusions et nous remarquons d'ailleurs que les écarts à  $j = 0$  sont sensiblement les mêmes (**Figure 54C** et **Figure 54D**).

En revanche, l'écart, bien que restant positif, entre les OSI de l'huile supplémentée en antioxydant et ceux des deux témoins diminue au fur et à mesure de l'expérience et ce quelle que soit la méthode d'addition. Ceci s'expliquerait par la dégradation de l'acide gallique par oxydation et donc une diminution de ses propriétés protectrices vis-à-vis de l'oxydation de l'huile.

Nous remarquons, toutefois, que cet écart se maintient plus longtemps avec l'éthanol, comme en témoigne les résultats à  $j = 90$  et  $140$  de +5,43h et +4,16h pour le propylène glycol (**Figure**

54C) en comparaison des résultats à  $j = 106$  et  $160$  de  $+6,43h$  et de  $+4,50h$  pour l'éthanol (Figure 54D).

D'autre part, les indices de stabilité expérimentaux des échantillons d'acide gallique ne deviennent inférieurs à ceux de l'huile seule ( $j = 0$ ) qu'à partir du 110<sup>ème</sup> jour et 106<sup>ème</sup> jour pour respectivement le propylène glycol et l'éthanol, soit le même intervalle de temps.

Cela explique que le gain de stabilité moyen sur la période d'étude est de 132% par rapport à l'huile seule que ce soit avec le propylène glycol ou l'éthanol.

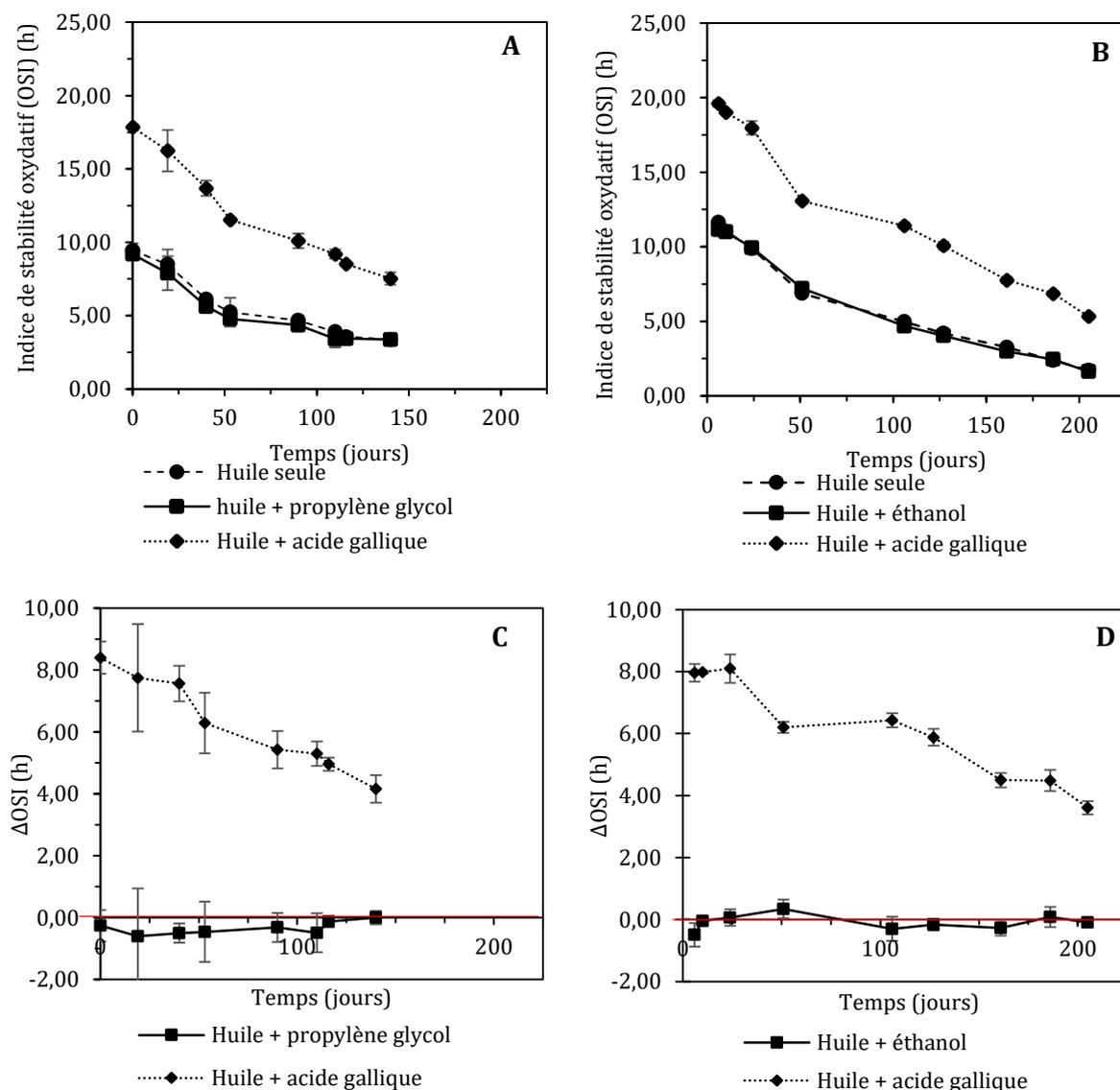


Figure 54 : Courbes des OSI (A et B) et des  $\Delta OSI$  (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de tournesol avec le propylène glycol (A et C) et l'éthanol (B et D).

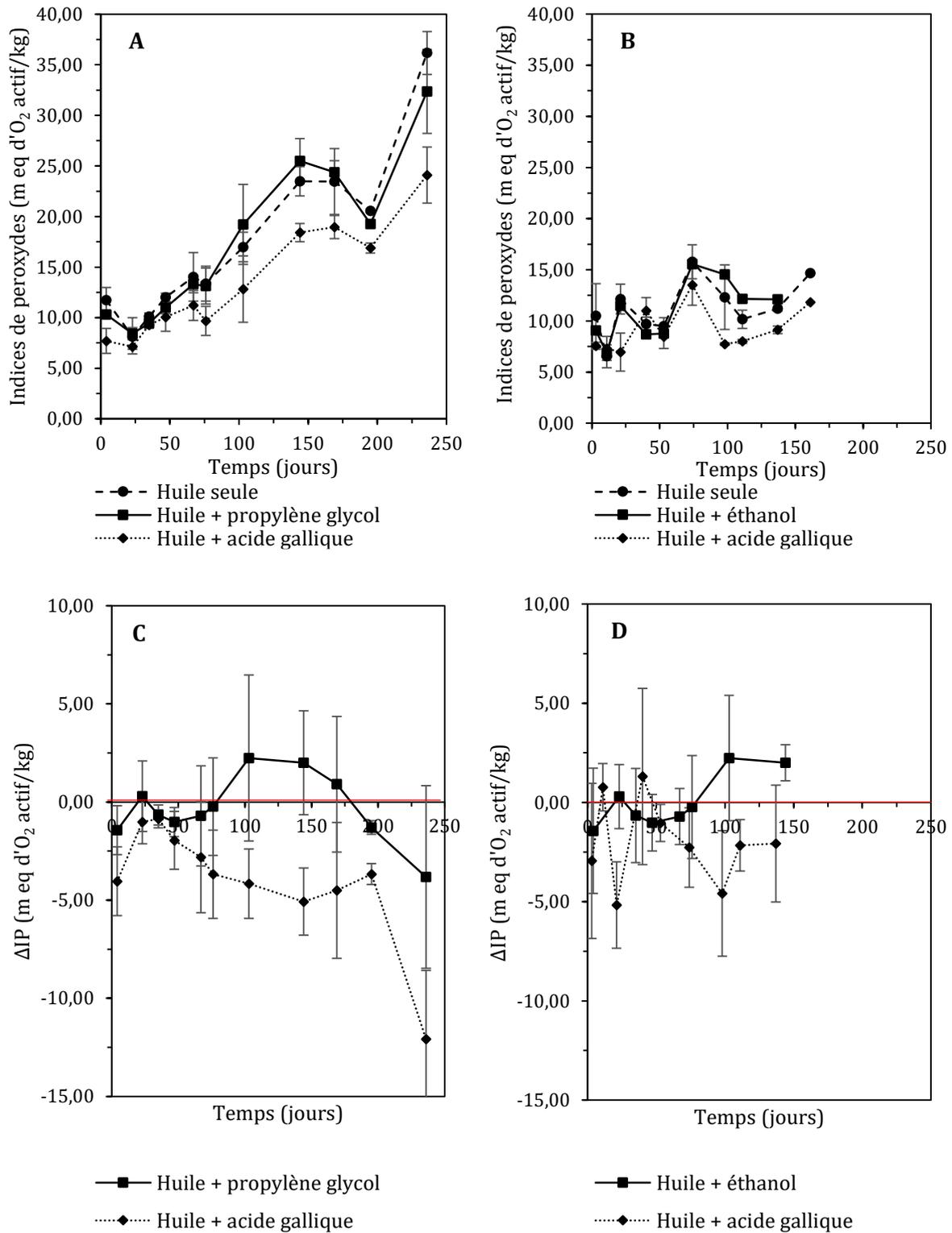
### II.2.1.2 Huile de lin

Les mêmes expériences ont été réalisées avec l'huile de lin. La figure 55 représente les indices de peroxydes (IP) ainsi que les variations des indices de peroxydes ( $\Delta$ IP), en fonction du temps de stockage de l'huile de lin en présence ou absence d'acide gallique.

La figure 55 illustre la difficulté d'étudier la production des peroxydes avec l'huile de lin. En effet, les courbes bien que significativement différentes les unes des autres sont relativement proches. De plus nous constatons que l'allure des courbes est bien différente de celle des courbes obtenues avec l'huile de tournesol (**Figure 53**). Ainsi, avec l'huile de lin, nous remarquons que l'augmentation des indices de peroxydes n'est pas continue et les valeurs des indices de peroxydes sont également beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec l'huile de tournesol dans les mêmes conditions ( $< 40$  milliéquivalents d' $O_2$  actif à  $j = 236$  pour l'huile de lin et  $> 218$  milliéquivalents d' $O_2$  actif à  $j = 204$  pour l'huile de tournesol). Cette différence de production s'expliquerait principalement par la température de stockage de  $4^\circ C$  pour le lin contre  $25^\circ C$  pour le tournesol.

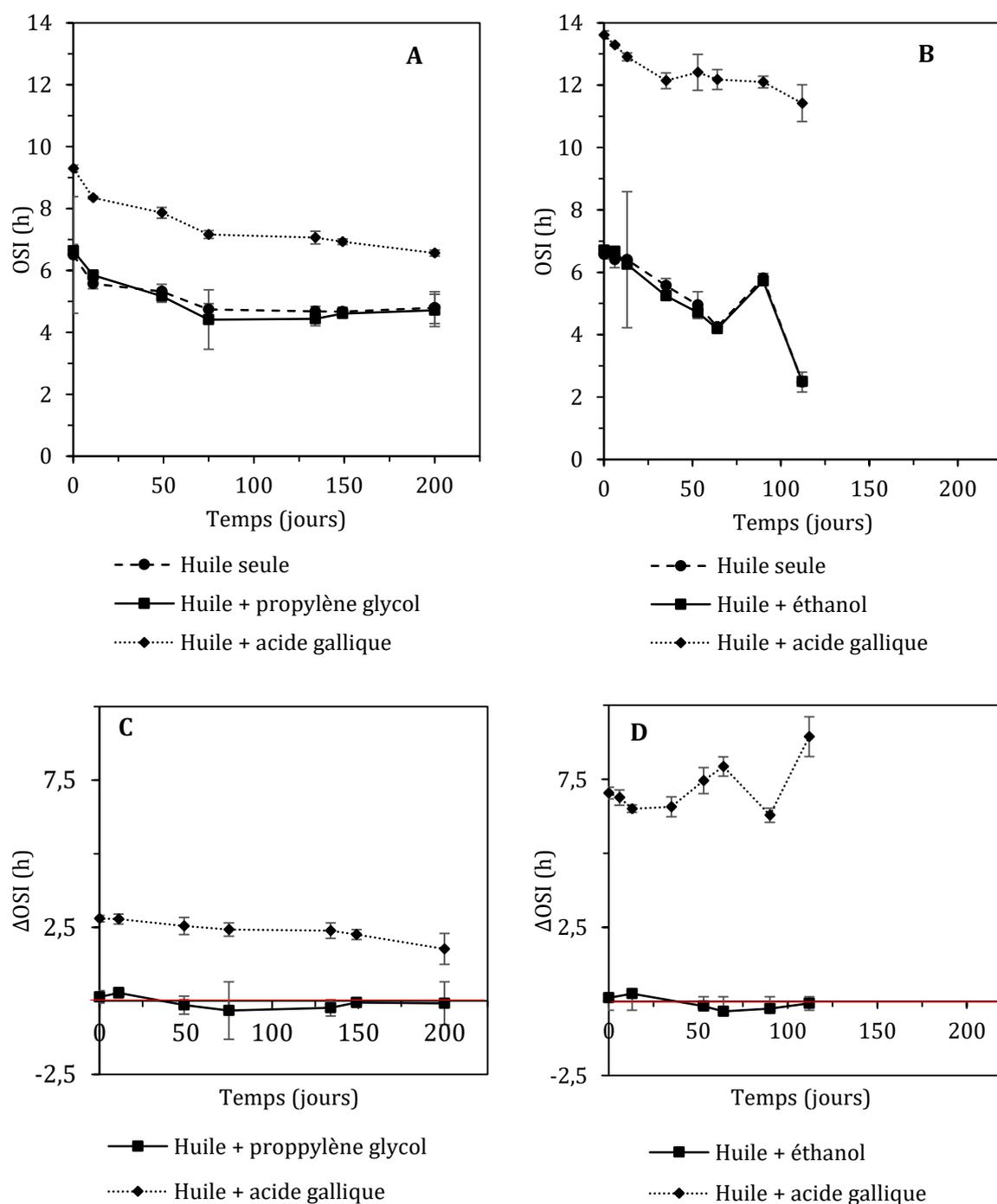
Néanmoins, nous observons que l'addition d'acide gallique permet de diminuer la valeur des indices de peroxydes en comparaison avec le témoin et que la présence de propylène glycol ou d'éthanol n'a aucune influence sur la mesure des peroxydes.

Cependant, bien que nous observons une capacité de l'acide gallique à réduire la production d'hydroperoxydes dans l'huile de lin, les pourcentages d'inhibition sont beaucoup plus faibles que pour l'huile de tournesol. En effet, l'acide gallique est capable de réduire de seulement 23% et 15% la production de peroxydes respectivement pour le propylène glycol et l'éthanol (**Figure 55C** et **Figure 55D**).



**Figure 55 :** Courbes des IP (A et B) et ΔIP (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de lin par propylène glycol (A et C) et éthanol (B et D).

La figure 56 expose les indices de stabilité oxydative (OSI) ainsi que les variations des indices de stabilité oxydative ( $\Delta OSI$ ), en fonction du temps de stockage de l'huile de lin en présence ou absence d'acide gallique.



**Figure 56 :** Courbes des OSI (A et B) et des  $\Delta OSI$  (C et D) en fonction du temps de stockage pour l'addition d'acide gallique dans l'huile de lin avec le propylène glycol (A et C) et l'éthanol (B et D).

De manière identique à l'huile de tournesol, les OSI sont meilleurs en présence d'acide gallique que sans. La présence des solvants seuls sans antioxydant ne semble pas avoir d'influence sur la mesure des OSI. Nous distinguons cependant une différence des OSI entre les huiles supplémentées en acide gallique introduit par le propylène glycol (**Figure 56A**) ou par l'éthanol (**Figure 56B**) car dès  $j = 0$ , l'échantillon supplémenté en acide gallique par la solution éthanoïque, possède un OSI plus élevé que celui de l'huile enrichie en acide gallique par la solution de propylène glycol. Ceci est confirmé par l'étude des  $\Delta$ OSI où nous remarquons que l'écart est beaucoup plus important lorsque l'acide gallique est additionné par l'éthanol (**Figure 56D**) que par le propylène glycol (**Figure 56C**). Ce fait avait déjà été observé dans le tableau 16.

Toutefois, contrairement à l'huile de tournesol, l'écart entre l'échantillon supplémenté en acide gallique et les témoins se maintient plus longtemps pendant le temps de stockage.

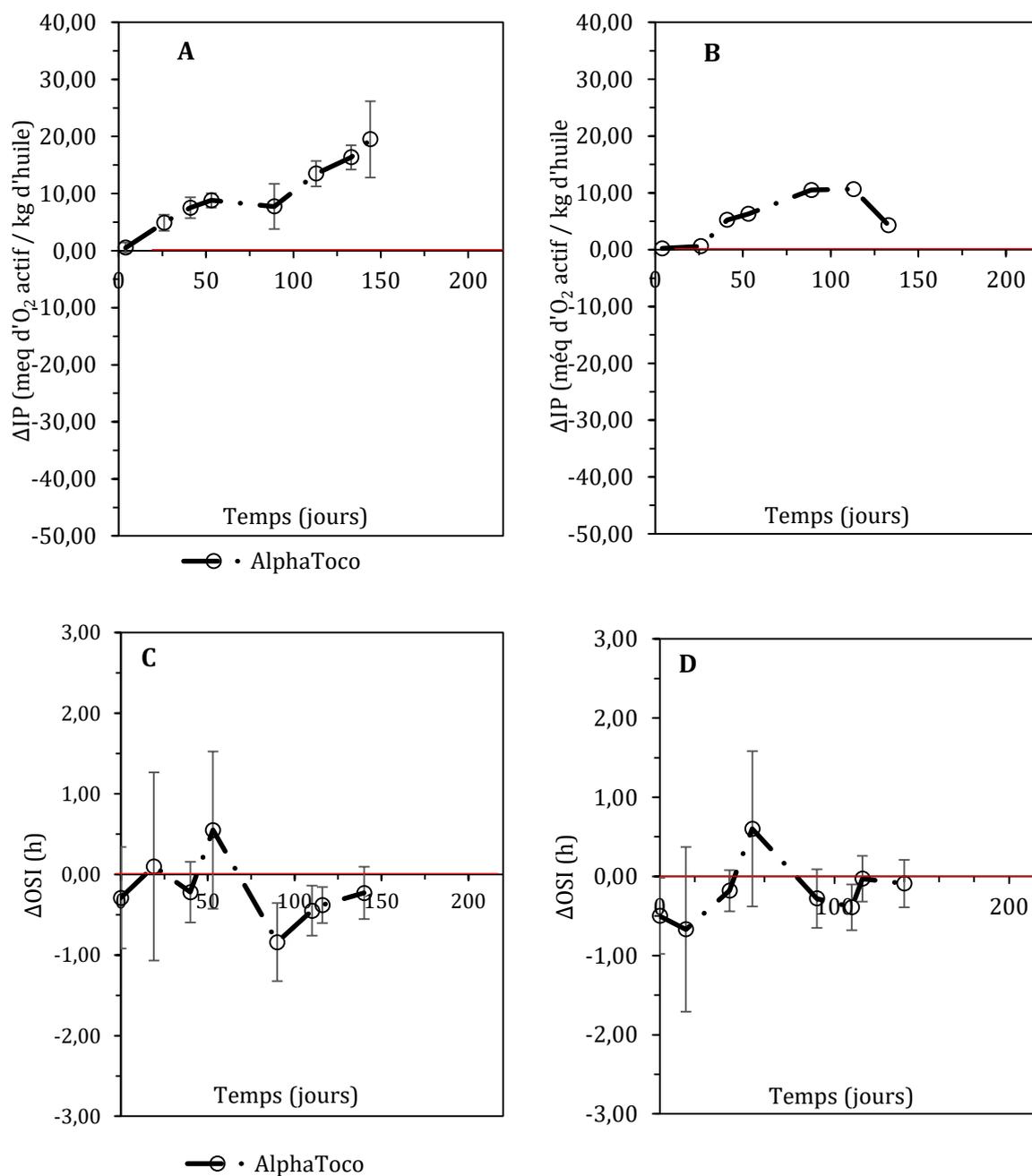
Nous trouvons un gain de stabilité qui reste compris entre 48 % et 51 % sur l'ensemble de la période d'analyse pour le propylène glycol tandis qu'il est de 125 % pour l'éthanol. Il est à noter que pendant les 149 jours de stockage, l'OSI de l'huile de lin en présence d'acide gallique, compris entre 9,30h ( $j = 0$ ) et 6,93h ( $j = 149$ ), est resté supérieur à la valeur initiale du témoin négatif (6,50 h) avec l'addition par le propylène glycol, tandis que dans le cas de l'addition par éthanol la présence de l'acide gallique mène à des OSI, compris entre 13,61 h ( $j = 0$ ) et 11,42 h ( $j = 112$ ), toujours supérieurs à la valeur initiale de l'huile seule (6,58 h) pendant la totalité de l'expérience.

### II.2.2 Enrichissement des huiles en $\alpha$ -tocophérol

À la suite de ces résultats plus qu'encourageant avec l'acide gallique (antioxydant hydrophile), nous avons décidé d'étudier dans les mêmes conditions l'addition d'un antioxydant cette fois liposoluble (l' $\alpha$ -tocophérol).

## II.2.2.1 Huile de tournesol

La figure 57 présente les variations d'indice de peroxyde ( $\Delta IP$ ) et les variations d'indice de stabilité ( $\Delta OSI$ ) de l'huile de tournesol en fonction du temps de stockage de l'huile de tournesol enrichie en  $\alpha$ -tocophérol avec nos deux solvants : propylène glycol ou éthanol.



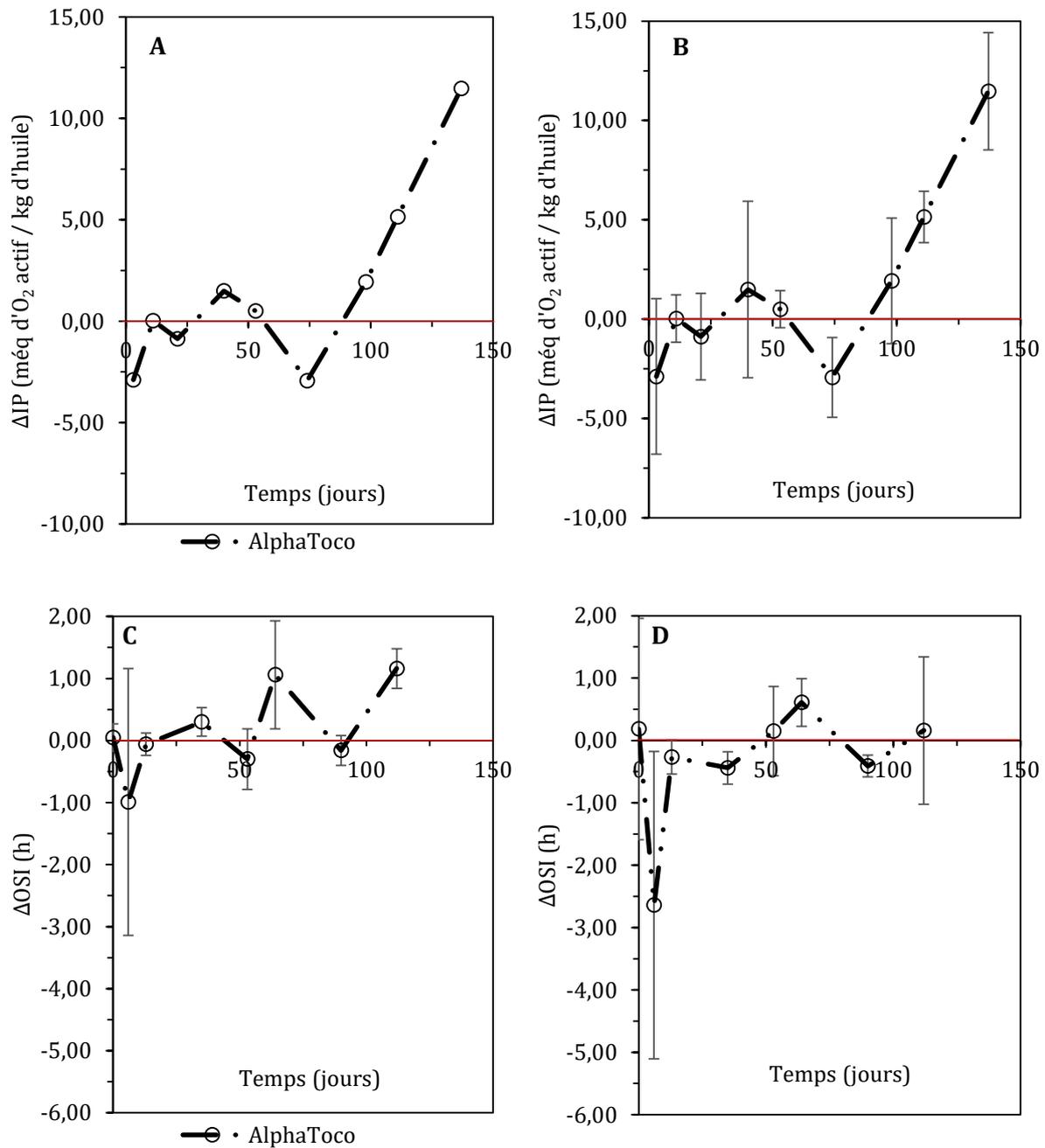
**Figure 57** : Courbes des  $\Delta IP$  (A et B) et  $\Delta OSI$  (C et D) de l'huile de tournesol pour l'échantillon d' $\alpha$ -tocophérol par addition avec le propylène glycol (A et C) ou l'éthanol (B et D) en fonction du temps de stockage.

Les tendances observées pour les courbes de la figure 57 indiquent que l'addition d' $\alpha$ -tocophérol augmente les indices de peroxydes par rapport à l'huile seule (**Figure 57A** et **Figure 57B**) quel que soit le solvant utilisé. En revanche, bien qu'il semble que l'addition de l' $\alpha$ -tocophérol réduise les OSI de l'huile de tournesol, ces observations ne sont pas significatives.

### II.2.2.2 Huile de lin

La figure 58 présente les variations d'indice de peroxydes ( $\Delta IP$ ) et les variations d'indice de stabilité ( $\Delta OSI$ ) de l'huile de lin enrichie en  $\alpha$ -tocophérol, en fonction du temps de stockage avec nos deux solvants : propylène glycol ou éthanol.

Les tendances observées pour les courbes de la figure 58 indiquent de manière analogue à l'huile de tournesol que l'addition d' $\alpha$ -tocophérol a tendance à augmenter les indices de peroxydes par rapport à l'huile seule et n'influence pas la mesure de stabilité oxydative de l'huile au Rancimat quel que soit le solvant utilisé.



**Figure 58** : Courbes des  $\Delta IP$  (A et B) et  $\Delta OSI$  (C et D) de l'huile de lin pour l'échantillon d' $\alpha$ -tocophérol par addition avec le propylène glycol (A et C) ou l'éthanol (B et D) en fonction du temps de stockage.

### II.2.3 Bilan sur l'enrichissement des huiles en conditions de stockage

Le bilan de l'enrichissement des huiles en conditions de stockage ne permet pas de distinguer clairement des différences dans l'utilisation des deux solvants avec l'huile de tournesol. En effet,

qu'il s'agisse du propylène glycol et de l'éthanol ou de l'acide gallique et du tocophérol, les résultats sont identiques.

En revanche, en ce qui concerne l'huile de lin l'acide gallique améliore de manière significative l'OSI de l'huile lorsqu'il est incorporé par la solution éthanoïque par rapport à son incorporation par la solution de propylène glycol.

Toutefois, pour l'ensemble des résultats avec le tocophérol, nous rencontrons une molécule incapable d'améliorer significativement les OSI des deux huiles. De même, le tocophérol mène à une surproduction de peroxydes sans distinction du solvant ni de l'huile.

### II.3 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'étudier et de comparer les avantages et inconvénients de chacune des trois méthodes d'enrichissement des huiles.

L'enrichissement par extraction liquide-liquide des antioxydants par l'huile a permis de faire ressortir plusieurs conclusions intéressantes :

- l'incorporation des acides gallique et rosmarinique sont plus importantes dans l'huile de lin que dans l'huile de tournesol,
- la capacité de ces molécules à protéger les huiles à très faible concentration (< 5 mg d'acide rosmarinique/kg d'huile ; < 20 mg d'acide gallique/kg d'huile),
- l'efficacité anti-oxydante des acides gallique et rosmarinique est dose-dépendante.

Malgré tout, cette méthode d'enrichissement n'a pas été retenue car les inconvénients listés précédemment (section II.1.1.4 de la partie Résultats) étaient trop nombreux pour poursuivre son investigation.

Les résultats préliminaires, des deux autres méthodes de supplémentation, ont montré certains inconvénients liés à l'utilisation du propylène glycol comme solvant d'enrichissement :

- formation d'une émulsion instable et visible à l'œil nu,
- la décantation du propylène glycol dans le fond du tube,
- son importante viscosité (42 cSt à 25°C) [162].

Malgré ces inconvénients, les essais préliminaires de stabilité oxydative n'ont pas montré d'effet significatif du solvant sur la capacité anti-oxydante de l'acide gallique. Pour cette raison, nous avons réalisé des essais de stockage afin d'observer l'évolution de chacun des échantillons dans le temps.

Les inconvénients du propylène glycol listé ci-dessus peuvent expliquer la moindre efficacité de l'acide gallique lorsqu'il est utilisé comme solvant d'enrichissement par rapport à l'éthanol avec l'huile de lin. En effet, la décantation du propylène glycol au fond du récipient entraîne majoritairement les antioxydants avec lui. *A contrario* l'éthanol entraînera majoritairement les molécules à l'interface huile/air du récipient.

L'étude en stockage, nous a également révélé des interprétations divergentes entre les résultats des indices de peroxydes et des indices de stabilité du Rancimat. Les échantillons du tocophérol montrent effectivement des conclusions différentes lorsque nous nous intéressons aux IP et aux OSI. Il n'y a, par exemple, pas de différence significative des résultats d'OSI par rapport aux témoins négatifs, tandis que, l'addition supplémentaire de tocophérol entraîne dans tous les cas une surproduction de peroxydes.

Ainsi nous attribuons ces résultats controversés :

- aux voies d'oxydation accélérées du Rancimat en comparaison avec les phénomènes naturels d'auto-oxydation qui sont éventuellement différents,
- à l'inactivation partielle ou totale des molécules pendant la période de chauffage au Rancimat, les rendant inefficaces et/ou pro-oxydantes,
- aux conditions pro-oxydantes du tocophérol [163]-[165],
- aux conditions de stockage de l'huile de lin qui ne permet pas une différence significative entre les échantillons.

Néanmoins l'ensemble des résultats de ce chapitre nous a convaincu que l'addition par éthanol était la plus intéressante et c'est pourquoi nous avons poursuivi nos investigations futures avec cette seule méthode d'addition.

### Chapitre III. Sélection de nouvelles molécules anti-oxydantes naturelles pour la protection des huiles

Dans ce chapitre, l'activité protectrice des antioxydants présentés dans le contexte bibliographique (section IV.3 du Contexte bibliographique) a été testée par une mesure d'efficacité directe au Rancimat sans temps de stockage. L'objectif principal était ici de tester et comparer un très grand nombre de molécules dans un intervalle de temps restreint. Les candidats les plus prometteurs ont par la suite été testés en conditions de stockage.

Pour ce faire, nous avons introduit une forte concentration de chaque molécule anti-oxydante (200 mg d'antioxydants/kg d'huile) afin de maximiser leurs effets pour identifier plus aisément les molécules les plus efficaces.

La stratégie approuvée par le financeur, a été d'utiliser de façon préliminaire, des antioxydants commerciaux purs. Cette stratégie a également permis de comparer chaque composé seul avec les extraits de lin et ainsi d'observer l'efficacité spécifique d'une ou plusieurs molécules, des extraits, ainsi qu'un potentiel effet synergique. C'est pourquoi l'ensemble des antioxydants peuvent être séparés en deux catégories, les antioxydants commerciaux :

- les extraits de thé vert,
- le rutoside (*Annexe 41*),
- le resvératrol (*Annexe 40*),
- la curcumine (*Annexe 38*),
- les acides coumarique (*Annexe 18*), caféique (*Annexe 19*), férulique (*Annexe 20*)
- et les lignanes : le pinorésinol (*Annexe 22*), le laricirésinol (*Annexe 23*) et le sécoisolaricirésinol (*Annexe 24*) comme représentant des polyphénols majoritaires de la graine de lin.

et les antioxydants issus de la purification des graines de lin par notre partenaire amiénois :

- les acides hydroxycinnamiques séparés ou en mélanges,
- les lignanes et flavonoïdes.

### III.1 Antioxydants naturels commerciaux

Des solutions mères éthanoïques pour chaque antioxydant ont été préparées et les concentrations sont résumées dans le tableau 18. Les échantillons d'huile ont été ensuite enrichis afin d'obtenir une concentration de 200 mg/kg d'huile et ils ont été analysés au Rancimat en triplicate à 100°C avec l'huile de tournesol et à 90°C avec l'huile de lin.

**Tableau 18** : Concentrations initiales, volumes prélevés et masse d'huile pour chaque antioxydants commerciaux avant traitement au Rancimat.

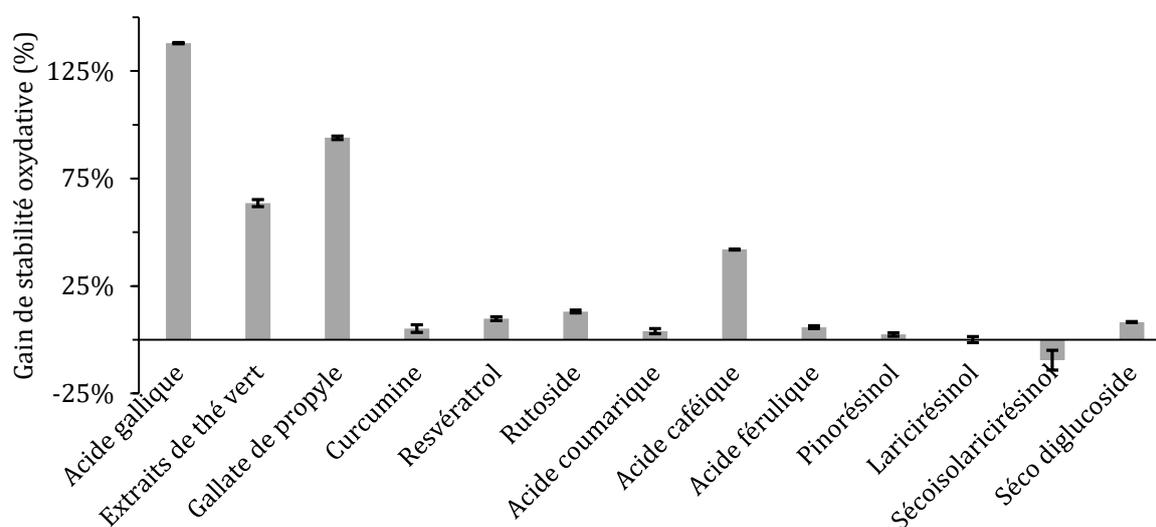
Antioxydant	[Aox] <sub>éthanol</sub> (mg/mL)	V <sub>prélevé</sub> (mL)	m huile (g)
Acide gallique	50	0,1	25
Gallate de propyle	50	0,1	25
Extraits de thé vert	50	0,1	25
Rutoside	25	0,2	25
Resvératrol	50	0,1	25
Curcumine	50	0,1	25
Acide coumarique	50	0,1	25
Acide caféique	50	0,1	25
Acide férulique	50	0,1	25
Pinorésinol	12,5	0,4	25
Laricirésinol	12,5	0,4	25
Sécoisolaricirésinol	16,67	0,3	25
SDG	16,67	0,3	25

La figure 59 résume les résultats des gains de stabilité oxydative (%) (*eq.16*) déterminés grâce au Rancimat pour l'ensemble des antioxydants testés sur l'huile de tournesol.

Quatre molécules ont été capables d'augmenter les temps d'induction de plus 40% par rapport à l'huile de tournesol seule : l'acide gallique (138%) ; le gallate de propyle (94%) ; les extraits de thé vert (64%) et l'acide caféique (42%). Les résultats pour la curcumine, le resvératrol et le rutoside bien que significatifs présentaient un gain de stabilité inférieur à 15%.

Les lignanes et les autres acides hydroxycinnamiques (acide férulique et coumarique) n'ont pas montré une réelle activité anti-oxydante en addition dans l'huile de tournesol. Au contraire,

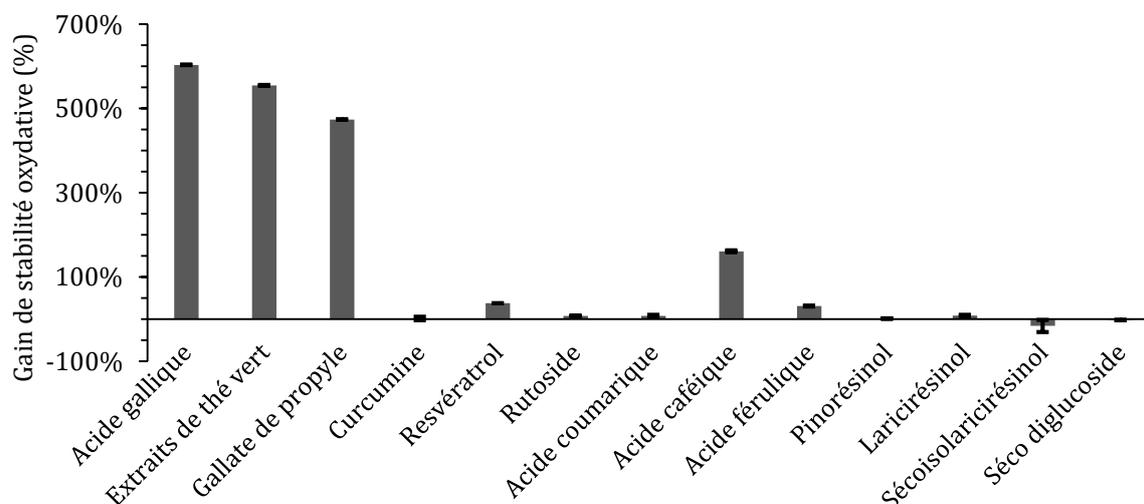
le sécoisolaricirésinol a montré un effet pro-oxydant avec une diminution de la stabilité oxydative par rapport à l'huile seule (**Figure 59**).



**Figure 59** : Résultats des gains de stabilité (%) des antioxydants commerciaux incorporés dans l'huile de tournesol par la technique du Rancimat.

Ces résultats peuvent s'expliquer par une thermo-sensibilité de certains composés. En effet, la curcumine et le resvératrol sont connus pour être instable à la lumière et/ou à la chaleur [166]-[168]. Ils pourraient donc être dégradés lors des tests au Rancimat ce qui réduirait leur efficacité anti-oxydante.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec l'huile de lin. La figure 60 résume les résultats des gains de stabilité (%) mesurés au Rancimat pour l'ensemble des antioxydants testés.



**Figure 60** : Résultats des gains de stabilité (%) des antioxydants commerciaux incorporés dans l'huile de lin par la technique du Rancimat.

Aucun antioxydant testé ne semble aussi efficace que l'acide gallique. Bien que très efficace, le gallate de propyle est moins performant que l'acide gallique. Ce fait est rapporté dans la littérature comme la conséquence de l'estérification de l'acide gallique qui, bien que permettant de le rendre plus hydrophobe et acceptable en utilisation alimentaire, le rend aussi moins performant comme le démontrent les résultats d'IC<sub>50</sub> du piégeage des radicaux DPPH rapportés par Lu et ses collaborateurs [169].

Alors que les extraits de thé vert étaient moitiés moins actifs que l'acide gallique dans l'huile de tournesol, ils se montrent, en revanche, très efficace dans l'huile de lin. Dans la littérature, des études sur de l'huile de maïs, qui possède un profil lipidique proche de l'huile de tournesol, avait déjà montré qu'à quantité de matière équivalente l'acide gallique était meilleur que chaque catéchine du thé testée séparément [170]. De même les extraits de thé vert utilisés dans la littérature montrent de façon quasi systématique une très forte efficacité anti-oxydante, meilleure que certaines molécules synthétiques, lorsqu'ils sont utilisés dans des huiles à forte teneur en oméga-3 comme des huiles de poisson [171]. Bien qu'il n'existe pas de publication comparant ces deux observations, il semble que cela explique les résultats différents que nous avons obtenu entre l'huile de tournesol et l'huile de lin. D'autre part, les conditions d'analyses des deux huiles étaient différentes ce qui pourrait également expliquer ces différences.

Aucun des lignanes testés n'a été capable d'être significativement efficace pour limiter l'oxydation des huiles. Les acides hydroxycinnamiques semblent quant à eux plus prometteurs avec, en particulier, l'acide caféique qui est efficace dans les deux huiles. D'autre part, la curcumine et le pinorésinol sont inefficaces de même que le sécoisolaricirésinol di-glucosylé et non di-glucosylé qui montre une perte de stabilité oxydative de l'huile (**Figure 60**).

### III.2 Antioxydants purifiés de la graine de lin

Dans le précédent paragraphe, nous montrions que les composés phénoliques retrouvés dans le lin ne sont pas tous capables d'améliorer la stabilité oxydative des huiles (**Figure 59** et **Figure**

60). Pour cette raison, nous avons décidé de tester les composés phénoliques isolés du lin soit séparés, soit sous forme de fractions.

### III.2.1 Les acides hydroxycinnamiques

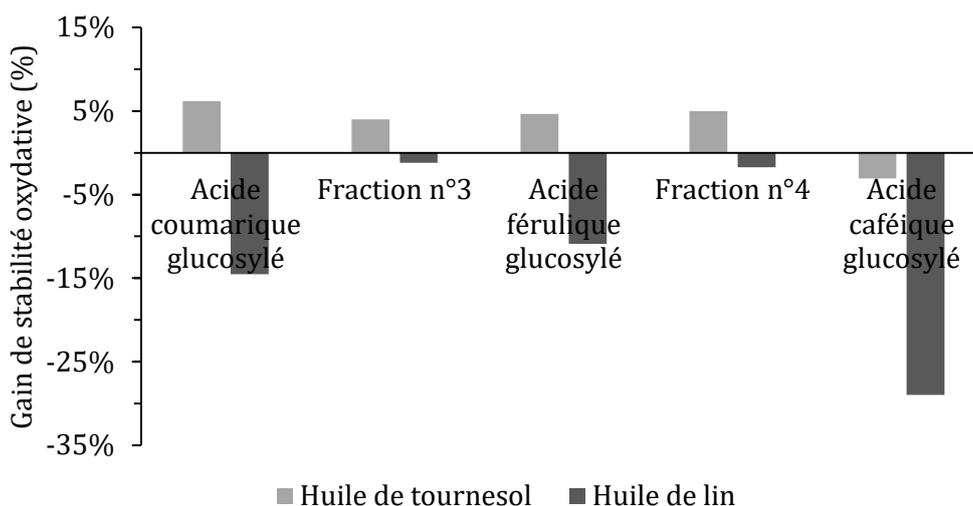
Les premières fractions isolées des graines de lin par chromatographie sont les acides phénoliques glucosylés (acide coumarique, caféique et férulique) (**Tableau 7**). Les acides hydroxycinnamiques ont été testés séparément ou en mélange sous la forme de deux fractions n°3 (mélange d'acides coumarique et caféique) et n°4 (mélange d'acides férulique et caféique).

Les solutions mères des acides hydroxycinnamiques et des fractions n°3 et n°4 ont été préparées de manière identique aux antioxydants commerciaux et les concentrations sont résumées dans le tableau 19. Les cinq solutions ont mené à cinq échantillons à la concentration finale de 200 mg/kg d'huile qui ont ensuite été analysés au Rancimat en triplicate à 100°C pour l'huile de tournesol et à 90°C pour l'huile de lin.

**Tableau 19** : Concentrations initiales, volumes prélevés et masse d'huile pour chaque antioxydant purifié du lin avant traitement au Rancimat.

Antioxydants	[Aox] <sup>éthanol</sup> (mg/mL)	V <sub>prélevé</sub> (mL)	m huile (g)	[Aox] <sup>huile</sup> (mg/kg)
Acide coumarique glucosylé	16,67	0,3	25	200
Fraction 3	16,67	0,3	25	200
Acide férulique glucosylé	16,67	0,3	25	200
Fraction 4	16,67	0,3	25	200
Acide caféique glucosylé	8,2	0,24	10	197

La figure 61 récapitule les gains de stabilité oxydatif (%) des acides hydroxycinnamiques seuls ou en fractions pour l'huile de lin et l'huile de tournesol.



**Figure 61** : Résultats des gains de stabilité (%) des fractions d'acides hydroxycinnamiques incorporées dans l'huile de tournesol et de lin par la technique du Rancimat.

Dans l'huile de tournesol, tous les acides hydroxycinnamiques testés, à l'exception de l'acide caféique glucosylé, sont capables d'augmenter la stabilité oxydative de l'huile de tournesol (**Figure 61**). Cela confirme les tendances observées sur la figure 59. Néanmoins, les gains de stabilité oxydative sont extrêmement faibles pour des concentrations en antioxydants aussi importantes. De plus, nous remarquons que l'acide caféique qui présentait une capacité à protéger l'huile de tournesol de l'oxydation (**Figure 59**) devient totalement inefficace lorsqu'il est glucosylé (**Figure 61**).

En revanche, avec l'huile de lin aucune molécule ou fraction ne permet d'augmenter le temps d'induction (**Figure 61**). Au contraire, ils montrent tous une activité pro-oxydante significative excepté la fraction n°3.

Ces résultats indiquent que la glycosylation réduit/inhibe l'activité anti-oxydante des molécules voire les rendrait pro-oxydantes.

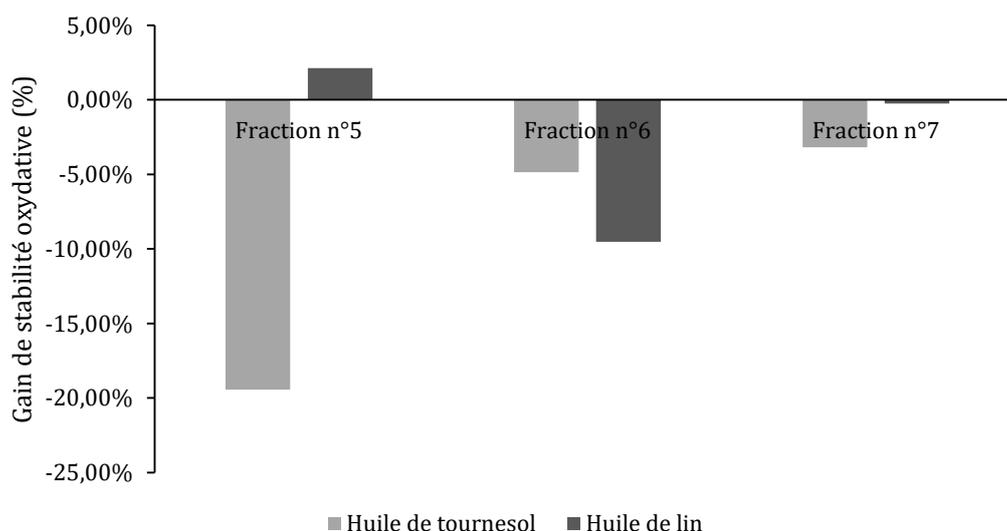
### III.2.2 Les lignanes et les flavonoïdes

Les autres fractions testées sont composées de lignanes seuls ou en mélange et de flavonoïdes dont la nature reste à déterminer. Les trois fractions disponibles étaient :

- Fraction n°5 : Mélange pinorésinol di-glucosylé (*Annexe 42*) et laricirésinol di-glucosylé (*Annexe 43*),
- Fraction n°6 : Sécoisolaricirésinol di-glucosylé (*Annexe 44*),
- Fraction n°7 : Flavonoïdes.

Les trois fractions restantes ont été préparées de la même manière que les antioxydants commerciaux et les acides hydroxycinnamiques. Ainsi, les concentrations finales dans l'huile étaient de 200 mg/kg d'huile et chaque échantillon a par la suite été analysé au Rancimat en triplicate à 100 °C pour l'huile de tournesol et 90°C pour l'huile de lin.

La figure 62 récapitule les gains de stabilité oxydative (%) des huiles de lin et de tournesol enrichies avec les fractions de lignanes et flavonoïdes.



**Figure 62** : Résultats des gains de stabilité (%) des fractions de lignanes et flavonoïdes incorporés dans l'huile de tournesol et de lin par la technique du Rancimat.

Sur la figure 62 nous observons que ces trois fractions abaissent significativement la stabilité oxydative de l'huile de tournesol, soulignant un caractère pro-oxydant à ces concentrations.

De la même manière dans l'huile de lin, aucune fraction anti-oxydante purifiée du lin n'augmente significativement la stabilité de l'huile.

Ainsi, comme nous l'avons déjà remarqué avec les acides hydroxycinnamiques, les composés glucosylés sont moins efficaces pour limiter/inhiber la peroxydation lipidique des huiles que leurs homologues non glucosylés (aglycones).

### III.3 Bilan de la sélection des antioxydants

L'ensemble des résultats sur la sélection des antioxydants permet de classer les antioxydants avec un gain de stabilité supérieur à 10% dans l'huile de tournesol de la manière suivante :

Acide gallique > Gallate de propyle > Extraits de thé vert > Acide caféique > Rutoside > Resvératrol.

Tandis que ceux avec un gain de stabilité supérieur à 10% dans l'huile de lin se classent comme suit :

Acide gallique > Extraits de thé vert > Gallate de propyle > Acide caféique > Resvératrol > Acide férulique.

Nous remarquons que se sont tous des antioxydants commerciaux qui sont représentés. En effet, aucune molécule purifiée ou fractions purifiées n'est capable d'avoir un gain de stabilité supérieur ou égal à 10%.

L'ensemble de ces résultats apporte toutefois une hypothèse qui avait déjà été montrée précédemment dans le laboratoire concernant l'efficacité supérieure des molécules aglycones vis-à-vis de leurs homologues glycosylés [172]. Il est possible que dans nos conditions d'analyses que les composés glucosylés soient moins efficaces, inefficaces voire pro-oxydants. Nous remarquons également que dans les milieux lipophiles tels que les huiles, le sécoisolaricirésinol n'est pas un bon candidat puisqu'il diminue la stabilité des huiles. D'autre part, il apparait ici que les acides hydroxycinnamiques du lin sont meilleurs que les lignanes or si nous comparons avec les précédentes études faites au laboratoire ces résultats sont contradictoires avec ce qui avait été rapporté sur l'étude de membranes biomimétiques [172].

Les acides phénoliques glucosylés (**Figure 62**) montrent un certain intérêt à protéger l'huile de tournesol tandis que les lignanes ou flavonoïdes glucosylés sont inefficaces voire pro-oxydants. Dans l'huile de lin, cette fois ce sont ces mêmes acides hydroxycinnamiques qui

semblent être pro-oxydants, les lignanes glucosylés ne montrent aucune efficacité dans l'huile de lin (**Figure 61**).

Suite à la théorie de Porter sur le paradoxe polaire et les phénomènes d'oxydations aux interfaces colloïdales que nous présentions dans la partie bibliographique, nous nous sommes intéressés cette fois aux logP et aux TPSA de ces molécules. Le logP représente le rapport logarithmique entre les concentrations de la substance, partagée entre l'octanol et l'eau. Le TPSA quant à lui représente la somme de la surface de tous les atomes ou groupe d'atomes polaires. L'objectif était ici de mettre en évidence ou non une relation entre ces paramètres et les différentes activités anti-oxydantes.

Les extraits de thé vert que nous avons utilisés sont composés d'un minimum de 60% de catéchines (**Annexe 46 ; 47**) (= catéchine (C), épicatechine (EC), gallocatéchine (GC), épicatechine gallate (ECG), épigallocatéchine (EGC), épigallocatéchine gallate (EGCG), gallocatéchine gallate (GCG)).

**Tableau 20** : Valeurs des logP et TPSA des catéchines des extraits de thé vert, d'après Molinspiration cheminformatics software.

Catéchines	LogP	TPSA
(±) C	1,37	110
(±) EC	1,37	110
(±) GC	1,08	131
(±) ECG	2,54	177
(±) EGC	1,08	131
(±) EGCG	2,25	197
(±) GCG	2,25	197

Bien que nous présentons dans le tableau 20 des logP et des TPSA différents pour chaque catéchine susceptible d'être présente dans notre extrait commercial de thé vert, chaque paramètre possède une valeur élevée comme par exemple les GCG et EGCG avec un logP relativement important de 2,25 et une valeur de TPSA de 197 Å<sup>2</sup>. L'acide gallique possède, quant

à lui un logP plus faible de 0,59, de même que son TPSA (98 Å<sup>2</sup>) (**Tableau 21**). Pourtant, les gains de stabilité de l'acide gallique et des extraits de thé vert sont respectivement de 138% et 64% pour l'huile de tournesol et de 603% et 555% pour l'huile de lin. L'acide caféique possède un logP de 0,9 et un TPSA de 78 Å<sup>2</sup> très proche de l'acide gallique (**Tableau 21**). Cependant, cette particularité ne lui permet pas d'avoir des résultats de stabilité équivalents à l'acide gallique. En effet, nous obtenons un gain de stabilité de 42% avec l'huile de tournesol et de 161% avec l'huile de lin.

**Tableau 21** : Valeurs des logP et TPSA des molécules étudiées, d'après Molinspiration cheminformatics software.

Antioxydant	LogP	TPSA
PDG	-1,7	236
LDG	-1,5	247
SDG	-1,3	258
Caf G	-1,06	157
Rutoside	-1,1	266
Fer G	-0,8	146
Coum G	-0,4	137
SMG	0,4	179
Acide gallique	0,59	98
Acide caféique	0,9	78
Acide férulique	1,3	67
Acide coumarique	1,4	57
Acide rosmarinique	1,6	145
Gallate de propyle	1,73	87
Sécoisolaricirésinol	2,1	99
Laricirésinol	2,3	88
Curcumine	2,3	93
Pinorésinol	2,6	77
Resvératrol	2,99	61

Ceci est également observable avec le gallate de propyle. Nous remarquons un logP relativement élevé de 1,73. En revanche, son TPSA est de 87 Å<sup>2</sup> et donc très proche de celui de l'acide gallique.

Il semble donc très difficile de prédire l'efficacité anti-oxydante d'une molécule analysée au Rancimat, en étudiant uniquement ces deux paramètres.

Toutefois, les résultats de sélection nous ont permis d'extraire certains candidats potentiels que nous avons décidé d'étudier en conditions de stockage.

Il s'agit des molécules suivantes :

- l'acide gallique (commercial) (*Annexe 17*),
- les extraits de thé vert (commerciaux),
- le gallate de propyle (commercial) (*Annexe 37*),
- l'acide caféique (commercial) (*Annexe 19*).

Suite aux résultats de la figure 62, montrant des résultats positifs mais non significatifs des lignanes et flavonoïdes dans l'huile de lin, nous avons décidé d'étudier en stockage :

- la fraction n°5 (purifié),
- la fraction n°7 (purifié),
- les extraits de lin (purifié).

Enfin, nous avons décidé d'y ajouter l' $\alpha$ -tocophérol afin de comprendre pourquoi il montre une activité pro-oxydante :

- l' $\alpha$ -tocophérol (commercial) (*Annexe 48*).

### III.4 Activité anti-oxydante dans l'huile de lin, des molécules sélectionnées

Dans ce chapitre, nous avons évalué l'efficacité des molécules sélectionnées dans le chapitre précédent pour leurs protections des huiles à  $j = 0$ , afin de mettre en évidence ou non le maintien de cette protection au cours du stockage et également de choisir la ou les meilleures molécules pour de futures études en co-encapsulation.

Pour cela nous avons fait le choix d'utiliser uniquement l'huile de lin car elle est la plus sensible à l'oxydation donc sa durée de stockage sera nécessairement plus courte que celle de

l'huile de tournesol. Nous avons ensuite choisi de stocker les échantillons à 25°C afin d'obtenir une production d'hydroperoxydes supérieure à celle obtenue à 4°C (**Figure 55**) sans pour autant se placer dans des conditions de températures trop extrêmes.

Les échantillons ont donc été stockés pendant 156 jours :

- à la température de 25°C,
- dans des récipients en verre scellés et protégés de la lumière,
- avec une concentration finale en antioxydant de 80 mg/kg d'huile.

Nous avons également fait le choix d'ajouter l'analyse des indices de *p*-anisidine suite aux précédents résultats montrant des différences entre les indices de peroxydes et les indices de stabilité (section II.2.1 et II.2.2 de la partie Résultats).

Dans ces conditions, la production de peroxydes a été suivie par détermination des indices de peroxydes, la formation des aldéhydes non volatils l'a été par mesure des indices de *p*-anisidine et enfin la production des composés secondaires volatils l'a été par détermination des indices de stabilité au Rancimat.

### III.4.1 Analyse des produits primaires de l'oxydation

Les indices de peroxydes des huit molécules sélectionnées ainsi que des deux témoins (négatif et positif) ont été analysés en triplicate pendant les 156 jours de stockage à intervalles de temps réguliers.

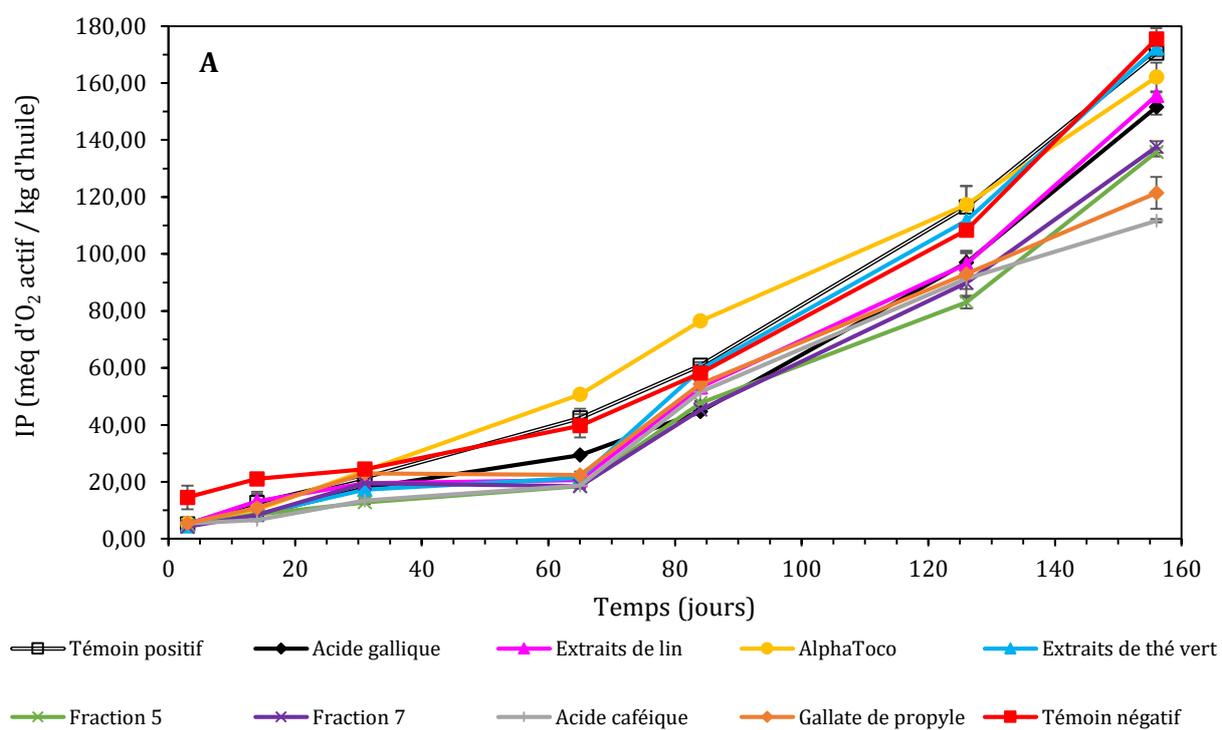
La figure 63 représente les indices de peroxydes (IP) (**Figure 63A**) et les différences d'indices ( $\Delta$ IP) (**Figure 63B**), pour chaque échantillon, en fonction du temps.

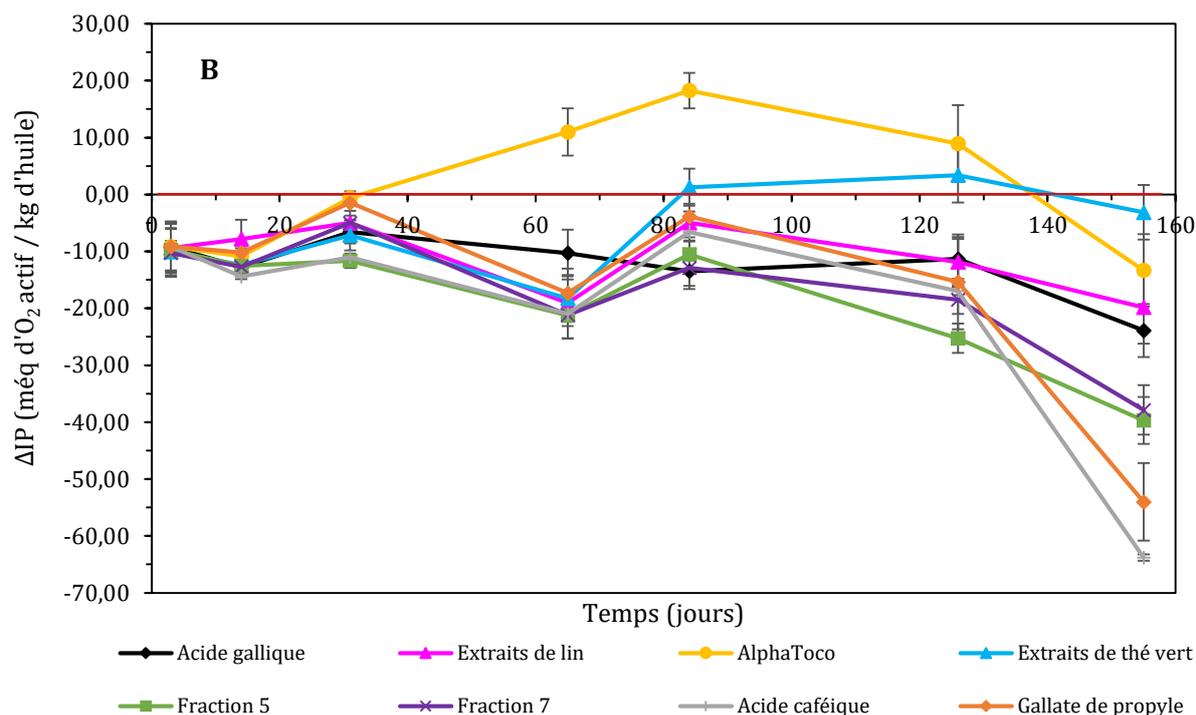
De manière identique au précédent chapitre (section II.2 de la partie Résultats), il est à noter que les courbes des IP en fonction du temps sont proches les unes des autres (**Figure 63A**). En effet, la figure 63 (**B**) confirme les faibles différences entre les échantillons et le témoin négatif.

Néanmoins, la comparaison entre les indices de peroxydes du chapitre précédent (**Figure 55B**) et ceux de la figure 63 (**A**), montrent que l'augmentation de la température de stockage entraîne une plus importante production de peroxydes. Nous remarquons que les indices de peroxydes de l'huile (témoin négatif) ne dépassent pas les 15 milliéquivalents de dioxygène actif

par kg d'huile à 4°C (**Figure 55B**), tandis qu'à 25°C ils sont supérieurs à 175 milliéquivalents de dioxygène actif par kg d'huile (**Figure 63A**) pour un temps de stockage équivalent.

Sur la figure 63 (**A**) nous observons des taux d'indices de peroxydes inférieurs aux témoins dans le cas des acides gallique et caféique, du gallate de propyle, des fractions n°5 et 7 isolées du lin ainsi qu'avec les extraits de lin et de thé vert. Donc dans ces échantillons, la production des peroxydes semble retardée jusqu'au 65<sup>ème</sup> jour.





**Figure 63 :** Graphiques représentant les indices de peroxydes (IP) (A) et les variations d'indices de peroxydes ( $\Delta$ IP) (B) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage, par dosage iodométrique.

Nous avons calculé, comme précédemment les pourcentages d'inhibition moyens des molécules citées (section II.5.1.3, *eq.13* de la partie Matériel et Méthodes). Ces valeurs d'inhibition, pour les 65 premiers jours, sont présentées ci-dessous :

Fraction n°5 = fraction n°7 = acide caféique = 53% d'inhibition ; Extraits de lin = 48% d'inhibition ; Extraits de thé vert = 46% d'inhibition ; Gallate de propyle = 44% d'inhibition ; Acide gallique = 26% d'inhibition.

En revanche, l' $\alpha$ -tocophérol montre, de nouveau, une activité pro-oxydante avec une surproduction de 28% de peroxydes par rapport au témoin.

À partir du 84<sup>ème</sup> jour nous observons une réduction de l'inhibition de la production des hydroperoxydes pour chaque échantillon. Les extraits de thé vert deviennent même inefficaces à partir de ce point expérimental (84<sup>ème</sup> jour), alors qu'ils montraient des résultats très intéressants lors de la pré-sélection et jusqu'au 65 premiers jours de manipulations (**Figure 60** et **Figure 63**). Ils ne sont plus capables de diminuer les taux d'indices de peroxydes dans l'huile à partir du 84<sup>ème</sup> jour par rapport au témoin. Nous expliquons ce phénomène par la

consommation, totale ou partielle, des espèces responsables de l'activité anti-oxydante au cours des soixante-cinq premiers jours de stockage.

Les pourcentages d'inhibition des autres molécules à partir du 84<sup>ème</sup> jour deviennent en moyenne :

Acide caféique = 21% d'inhibition ; Fraction n°7 = 20% d'inhibition ; Gallate de propyle = 17% d'inhibition ; Acide gallique = 16% d'inhibition ; Fraction n°5 = 14% d'inhibition ; Extraits de lin = 10% d'inhibition.

Les résultats de la figure 63 tendent à montrer qu'à partir de deux mois de stockage à la température de 25°C, nous avons consommé la majorité des antioxydants ajoutés dans l'huile de lin. En effet, l'inhibition maximale de la production de peroxydes est maintenue jusqu'au 65<sup>ème</sup> jour de stockage inclus, se traduisant par un retardement pour les échantillons enrichis en antioxydant. Au-delà de soixante-cinq jours de stockage, les indices de peroxydes augmentent plus rapidement et rejoignent ceux mesurés (sans jamais les dépasser).

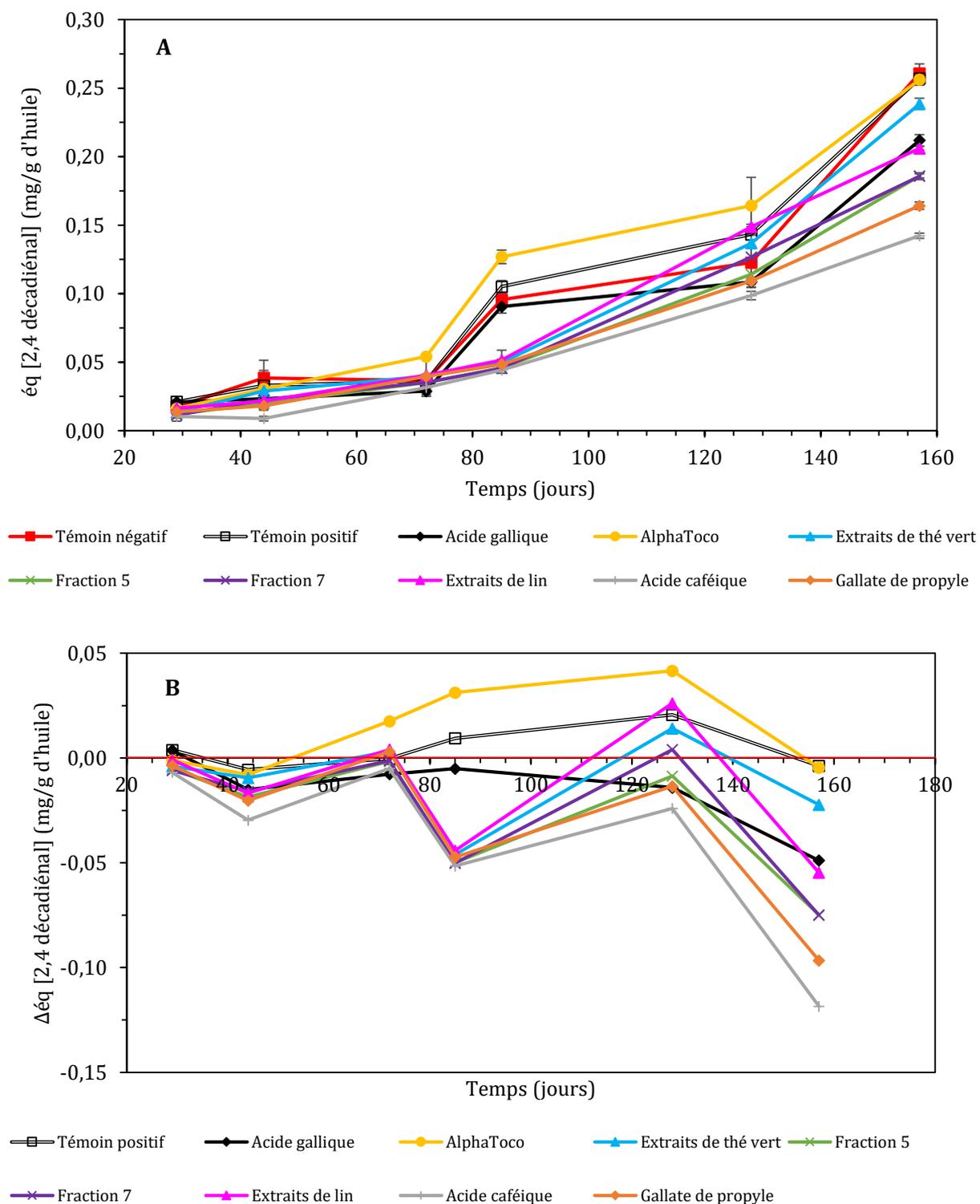
### III.4.2 Analyse des produits secondaires de l'oxydation

Au cours du stockage de l'huile de lin enrichie en antioxydants, l'analyse des produits secondaires de l'oxydation a été réalisée grâce à la mesure des indices de *p*-anisidine (aldéhydes non volatils) et des indices de stabilité oxydative au Rancimat.

#### III.4.1.1 Analyse des aldéhydes par mesure de l'indice de *p*-Anisidine

La figure 64 représente les indices d'anisidine (**Figure 64A**) et les différences d'indices d'anisidine entre les échantillons et le témoin (**Figure 64B**) en fonction du temps de stockage de l'huile de lin enrichie avec nos antioxydants sélectionnés.

Sur la figure 64 (**A**), on remarque que les indices d'anisidine de tous les échantillons, à l'exception de l'échantillon d'huile enrichie en tocophérol, augmentent peu pendant les soixante-dix premiers jours puis l'augmentation devient plus importante au-delà. Il y a donc un certain temps de latence dans la production des aldéhydes comme le montre la figure 64 (**B**).



**Figure 64 :** Graphiques représentant les indices d'anisidine (A) et les variations d'indices d'anisidine (B) (en équivalent en milligramme de 2,4 d\acute{e}cadi\acute{e}nal par gramme d'huile) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage.

Ceci se traduit donc par une faible production de produits de dégradation sous la forme d'aldéhydes pendant les soixante-dix premiers jours. Ces résultats sont en cohérence avec ceux des indices de peroxydes (**Figure 63**) puisque ces derniers n'augmentent que très peu durant les soixante-cinq premiers jours. Ces résultats signifient que la faible production de peroxydes les conduit à s'accumuler plutôt que se dégrader. En revanche, les indices de peroxydes de l'huile de lin enrichie en tocophérol présentait une augmentation plus importante que les autres échantillons (**Figure 63A**) et la même constatation peut être faite avec l'indice d'anisidine de cet échantillon (**Figure 64A**).

À partir du 85<sup>ème</sup> jour, nous observons une augmentation rapide des indices d'anisidine de tous les échantillons. Malgré cette augmentation de la production de produits secondaires de peroxydation et le point expérimental du 128<sup>ème</sup> jour, il apparaît évident que l'huile enrichie avec les extraits de lin et de thé vert, les deux fractions n°5 et 7 isolées du lin, l'acide caféique et le gallate de propyle présentent des taux de produits secondaires plus bas que les témoins et même que l'huile enrichie en acide gallique.

Les faibles différences observées figure 64 (**B**) entre les échantillons et les témoins, semblent montrer une rapide dégradation de ces composés non volatils en composés volatils.

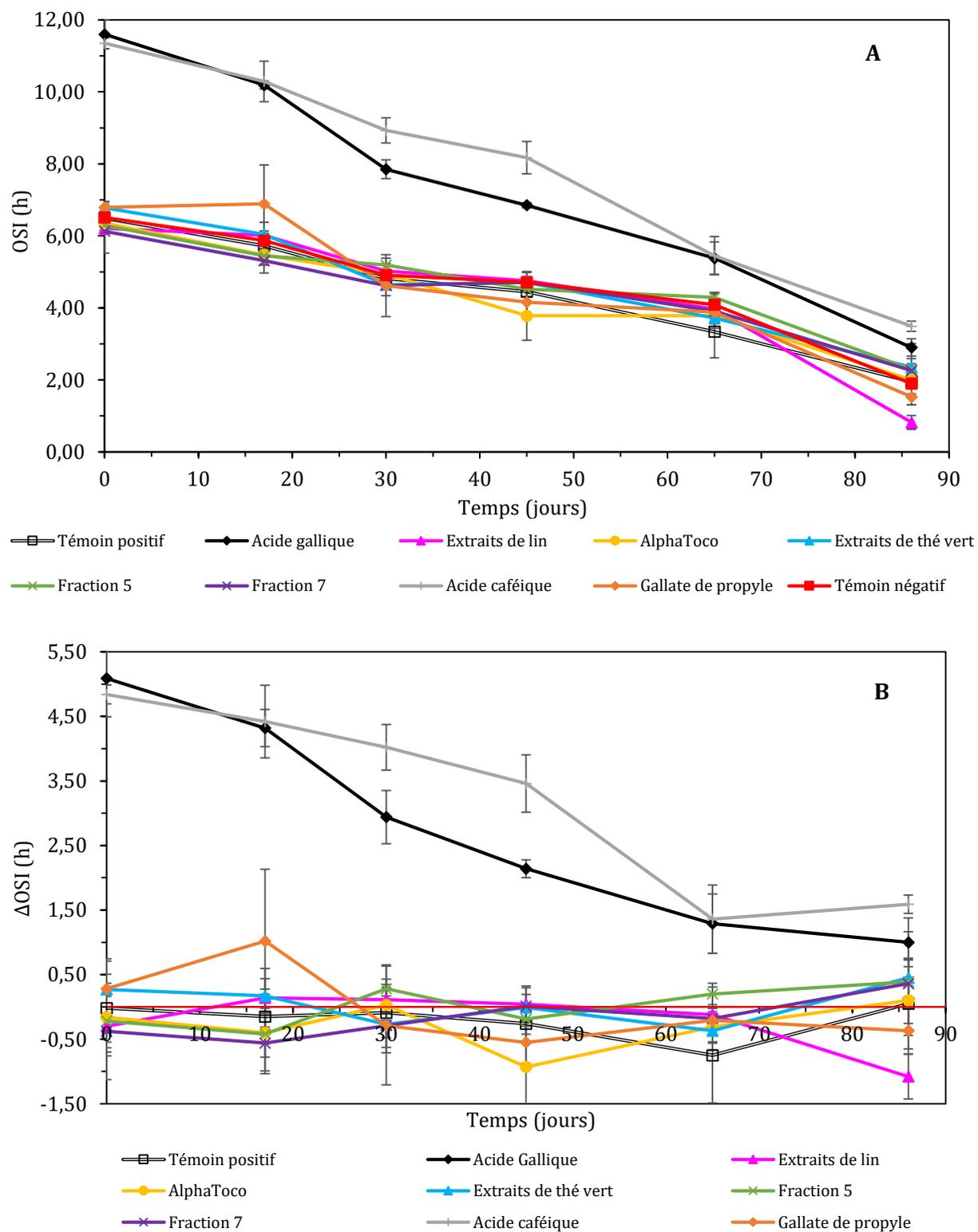
### III.4.1.2 Analyse des produits volatils au Rancimat

La figure 65 présente les résultats de stabilité oxydative (OSI) et les variations des indices de stabilité oxydative ( $\Delta$ OSI) en fonction du temps pour l'huile de lin enrichie avec les antioxydants sélectionnés.

Nous montrons l'effet antioxydant des acides gallique et caféique. Les autres molécules testées ne permettent pas d'augmenter significativement la stabilité oxydative de l'huile de lin. Il est d'ailleurs important de noter qu'à partir de quatre-vingt-dix jours il n'était plus possible de déterminer un indice de stabilité au Rancimat.

Grâce à la figure 65 (**B**) nous distinguons plus facilement l'influence de chaque échantillon. Nous montrons une très légère variation positive de la stabilité oxydative avec les fractions n°5 et 7 avec les deux derniers points expérimentaux.

En revanche, le tocophérol, le gallate de propyle et les extraits de lin et de thé vert ne sont pas significativement différents des résultats du témoin.



**Figure 65 :** Graphiques représentant les OSI (A) en heure et les  $\Delta$ OSI (B) en fonction du temps, pour les antioxydants sélectionnés chez l'huile de lin en conditions de stockage.

### III.5 Bilan et conclusion sur l'enrichissement de l'huile de lin par les molécules sélectionnées

Nous avons, dans ce chapitre, l'objectif de déceler de nouvelles molécules efficaces à protéger les huiles de l'oxydation. Les résultats que nous avons présentés montrent que deux antioxydants sont efficaces quelle que soit la méthode de caractérisation de l'oxydation de l'huile de lin : l'acide gallique et l'acide caféique. Les fractions n°5 et 7 ainsi que le gallate de propyle se montrent efficaces pour inhiber la formation des hydroperoxydes et des aldéhydes non volatiles mais pas pour inhiber les composés volatiles dosés au Rancimat. Nous pouvons dans ce cas se demander si ces antioxydants ne pourraient pas être thermosensibles et seraient donc dégradés par le chauffage de l'huile généré par le Rancimat. Les extraits de lin présentent également une certaine efficacité anti-oxydante d'après les indices de peroxyde et d'anisidine mais, là encore, ces composés semblent peu efficaces lorsque l'huile est chauffée par le Rancimat. Enfin, les extraits de thé vert et le tocophérol se montrent peu voire pas du tout efficaces pour protéger l'huile de lin de la peroxydation lipidique.

Afin de pallier aux difficultés rencontrées (section II.2.1.2 de la partie Résultats), les conditions de stockage de l'huile de lin ont été légèrement différentes des conditions préconisées tout en s'en rapprochant. Ce postulat devait permettre d'augmenter la production des produits d'oxydation et donc de mieux apprécier l'efficacité des molécules. Nous nous rendons compte que les concentrations en produits d'oxydation ont bien été multipliées par rapport aux valeurs des conditions normales (section II.2.1.2 de la partie Résultats). De même, la production d'hydroperoxydes qui était très faiblement réduite dans les conditions de stockage de la section II.2.1.2 de la partie Résultats (15%) est doublée dans le cas du stockage à 25°C, avec une moyenne de 32% d'inhibition. Elle reste toutefois, inférieure à l'inhibition de l'huile de tournesol.

Ceci peut s'expliquer car les antioxydants, à la concentration de 80 mg/kg d'huile, ont été en grande majorité consommés dans les 70-80 premiers jours de stockage. En effet, les productions

des peroxydes et des aldéhydes sont ralenties par rapport au témoin pendant cet intervalle de temps pour tous les échantillons excepté le tocophérol.

Ainsi les échantillons testés en stockage peuvent être classés de la manière suivante :

Acide caféique > Acide gallique > Gallate de propyle  $\approx$  Fraction n°5  $\approx$  Fraction n°7 > Extraits de lin > Extraits de thé vert.

Tout comme dans la section III.3 de la partie Résultats, nous nous sommes intéressés aux logP et aux TPSA des molécules. Nous observons que nos molécules les plus efficaces : les acides caféique et gallique, possèdent tous les deux un logP proche de zéro ainsi qu'un TPSA inférieur à  $100 \text{ \AA}^2$  (**Tableau 21**). D'autre part, les antioxydants qui suivent en efficacité à savoir le gallate de propyle (1,73 ;  $87 \text{ \AA}^2$ ) et la fraction n°5 (mélange de PDG : -1,7 ;  $236 \text{ \AA}^2$  et LDG : -1,5 ;  $247 \text{ \AA}^2$ ) montrent des capacités anti-oxydantes relativement proches. Ce fait particulier suggère qu'il est possible de compenser un TPSA important par un très faible logP et inversement.

### Chapitre IV. Co-encapsulation de molécules anti-oxydantes et d'huiles polyinsaturées

Les résultats qui seront présentés dans ce chapitre ont été réalisés soit dans le cadre de la thèse de Lorine Le Priol soit avec sa collaboration. La microencapsulation par spray drying avait montré son efficacité à protéger les huiles végétales riches en AGPI contre l'oxydation. Afin d'accroître de manière significative la stabilité oxydative, des antioxydants ont été co-encapsulés dans les microparticules les plus intéressantes.

Au démarrage de cette étude seuls les résultats de pré-sélection étaient disponibles (**Figure 59 ; Figure 60 ; Figure 61 ; Figure 62**). Pour cette raison, le comité de pilotage du projet a fait le choix d'étudier, dans un premier temps, uniquement le gallate de propyle et l' $\alpha$ -tocophérol du fait de leur autorisation dans l'industrie, avant tout autres molécules potentiellement efficaces lors de l'étude en stockage du paragraphe précédent. Les conditions d'émulsifications, précédemment retenues pour la microencapsulation, étaient de 10% m/v d'extraits protéiques et de 10% m/v d'huile de tournesol. L'ensemble des échantillons ont été soumis à l'analyse au Rancimat et ont fourni des indices de stabilité oxydative (OSI) soit à  $t=0$ , soit lors de cinétiques de vieillissement.

#### IV.1 Conditions de formation des poudres

Les précédents travaux de Lorine Le Priol sur l'encapsulation ont montré qu'une formulation d'extraits protéiques était capable d'augmenter la stabilité oxydative (OSI) d'une huile par comparaison avec l'huile brute, par une analyse comparée au Rancimat. Les microcapsules formulées à partir d'extraits protéiques de pois (M-PP) présentaient les meilleurs résultats de protection en comparaison avec les autres extraits (soja, chanvre, tournesol et riz brun). De plus, l'addition de polysaccharides (inuline (M-PP/I), maltodextrine (M-PP/M) et pectine (M-PP/P)), excepté l'alginate (M-PP/A) à 2% m/v avec les extraits protéiques de pois permettait d'améliorer significativement le temps de conservation des microcapsules par rapport aux microcapsules d'huiles obtenues avec les extraits protéiques de pois seuls (**Tableau 22**).

**Tableau 22** : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et de différents polysaccharides *par Lorine Le Priol*.

Echantillon	$\Delta$ OSI (h) comparé à l'huile de tournesol seule
M-PP (contrôle)	+ 9,01 ± 0,44 <sup>b</sup>
M-PP/A	+ 7,50 ± 0,12 <sup>a</sup>
M-PP/I	+ 10,98 ± 0,20 <sup>c</sup>
M-PP/M	+ 12,85 ± 0,10 <sup>d</sup>
M-PP/P	+ 15,01 ± 0,28 <sup>e</sup>

<sup>a-e</sup> les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05)

La pectine présentant les résultats les plus encourageants, l'optimisation du procédé a été réalisée uniquement sur le couple protéines de pois-pectine (M-PP/P). Des concentrations de 0,1% (M-PP/P (0,1%)) ou de 0,5% (M-PP/P (0,5%)) ont été formulées avec 10% m/v d'extraits protéiques de pois afin d'être comparés avec le résultat obtenu à 2% m/v de pectines présenté précédemment (M-PP/P) (**Tableau 22**).

Les valeurs de variations de stabilité oxydative des échantillons à différentes concentrations de pectine sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 23** : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et à différentes concentrations de pectine *par Lorine Le Priol*.

Echantillon	$\Delta$ OSI (h) comparé à l'huile de tournesol seule
M-PP (contrôle)	+ 9,01 ± 0,44 <sup>a</sup>
M-PP/P	+ 15,01 ± 0,28 <sup>d</sup>
M-PP/P (0,1%)	+13,12 ± 0,17 <sup>b</sup>
M-PP/P (0,5%)	+ 14,23 ± 0,33 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05)

Bien que l'échantillon à la concentration de 2% m/v de pectines ait montré de meilleurs résultats qu'en utilisant les deux autres concentrations, la viscosité de l'émulsion faisait diminuer le rendement du procédé. Etant donné que l'ensemble des échantillons étaient capables d'améliorer l'OSI des poudres par rapport à l'encapsulation formulée uniquement avec

les extraits protéiques de pois à t=0, notre partenaire avait décidé de retenir 0,1% m/v de pectine, 10% m/v de protéines de pois et 10% m/v d'huile comme formulation.

Malgré tout, il est apparu, après cette décision, que les échantillons aux concentrations de 0,1% et 0,5% m/v de pectine ne permettaient pas de maintenir l'amélioration dans le temps de la stabilité des poudres, en comparaison avec l'huile encapsulée dans une matrice composée uniquement de protéines de pois.

En se basant sur les recommandations du *Codex Alimentarius*, notre partenaire, Lorine Le Priol a utilisé des concentrations de 0,004% et 0,01% m/v de gallate de propyle et d' $\alpha$ -tocophérol dans l'émulsion initiale, fournissant des concentrations de 200 et 500 mg/kg de poudre pour ces deux composés. Notre partenaire a choisi une seconde concentration pour chaque molécule pour déterminer les conditions d'incorporations optimales des antioxydants, celle présentée ci-dessus et une seconde plus importante de 0,02% et 0,04% pour respectivement, le gallate de propyle et l' $\alpha$ -tocophérol.

### IV.2 Stabilité oxydative des huiles microencapsulées en présence d'antioxydants

Les différents échantillons ont été formulés à partir de 10% m/v d'extraits protéiques de pois, de 0,1% m/v de pectine et de 10% m/v d'huile de tournesol. Les échantillons avec 0,01% ou 0,04% m/v d' $\alpha$ -tocophérol seront notés M- $\alpha$ T (0,01) et M- $\alpha$ T (0,04) tandis que ceux avec 0,004% ou 0,02% m/v de gallate de propyle seront notés M-PG (0,004) et M-PG (0,02).

#### IV.2.1 Stabilité oxydative et cinétiques de vieillissement

Les tests d'efficacité des antioxydants ont été réalisés de la même manière que les essais précédents par une analyse au Rancimat et la détermination des OSI à t=0 puis à différents temps de stockage à 25°C.

**Tableau 24** : Variation des OSI de l'huile de tournesol encapsulée dans des matrices protéiques de pois et de pectine, renforcée par ajout d'antioxydants et comparés au  $\Delta$ OSI de l'échantillon sans antioxydant (contrôle) par Lorine Le Priol.

Echantillon	$\Delta$ OSI (h) comparé à l'huile de tournesol seule
M-PP/P (0,1) (contrôle)	+ 13,12 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
M- $\alpha$ T (0,01)	+ 11,27 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
M- $\alpha$ T (0,04)	+ 6,55 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
M-PG (0,004)	+ 13,55 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>
M-PG (0,02)	+17,58 $\pm$ 0,21 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05)

Les résultats du tableau 24 montrent des effets antagonistes si nous comparons le gallate de propyle et l' $\alpha$ -tocophérol. En effet, les  $\Delta$ OSI sont significativement inférieurs au  $\Delta$ OSI de l'échantillon M-PP/P (0,1%) de 1,85 et 6,57h pour M- $\alpha$ T (0,01) et M- $\alpha$ T (0,04). Ainsi, plus la concentration en  $\alpha$ -tocophérol augmente et moins le temps de stabilité de l'huile de tournesol est grand. De même que pour nos résultats sur l'huile brute (**Figure 57** ; **Figure 58**), ces résultats suggèrent un effet pro-oxydant du tocophérol dans le cadre de cette étude. En revanche, l'addition de gallate de propyle à 0,02% m/v a permis d'améliorer significativement l'OSI à t=0. Ces résultats sont confirmés par les essais en stockage (*données non présentées*) puisqu'un croisement des courbes de l'huile encapsulée et de l'huile brute est plus précoce avec M-PG (0,004) en comparaison avec M-PG (0,02). Ces résultats confirment l'efficacité du gallate de propyle à améliorer la stabilité oxydative de l'huile de tournesol encapsulée seule et plus encore vis-à-vis de l'huile brute.

### IV.2.2 Application de la formulation à la protection de l'huile de lin

La formulation a été réalisée à partir de 10% m/v d'extraits protéiques de pois, de 0,1% m/v de pectine, de 0,004% m/v de gallate de propyle et 10% m/v d'huile de lin. Les échantillons d'huiles ont été stockés à 25°C. Cet échantillon sera nommé M-PG (0,004) (L).

Ces conditions d'encapsulation ont une nouvelle fois démontré leurs efficacités à protéger l'huile de lin contre l'oxydation, puisque l'enrichissement de la matrice en pectine et l'émulsion

## Résultats

en gallate de propyle fait passer le  $\Delta OSI$  de +14,96h (M-PP (L)) à +25,69h (M- PG (0,004) (L)). De plus, l'huile pure était complètement oxydée après 150 jours de stockage à 25°C tandis que l'huile encapsulée n'était toujours pas totalement oxydée après 217 jours de stockage.

# Discussion

## Discussion

Ce travail de thèse consistait à fournir à notre partenaire des laboratoires BMBI et TIMR, un ensemble d'antioxydants montrant une efficacité certaine à ralentir la peroxydation lipidique d'huiles végétales riches en AGPI. Ces antioxydants devaient par la suite être étudiés en association avec les différents moyens de stabilisation étudiés par notre partenaire, afin de co-encapsuler ces huiles et des antioxydants au sein de matrices constituées de biopolymères (protéines, polysaccharides). Tandis que notre partenaire montrait l'intérêt de la microencapsulation seule à protéger les huiles sous la forme de poudre, l'enrichissement des huiles en antioxydants avait pour objectifs : d'accroître la protection effectivement apportée par la microencapsulation ; de réduire l'utilisation de molécule de synthèse ; tout en valorisant des molécules naturelles d'intérêt issues de coproduits agricoles.

L'encapsulation d'huiles brutes enrichies en antioxydants a nécessité dans un premier temps de mettre au point un protocole d'addition des antioxydants dans ces huiles. Cette première étape cruciale du doctorat s'appuie donc sur les deux premiers chapitres des résultats. Des solvants utilisables dans l'industrie agroalimentaire ont donc été privilégiés, c'est ainsi que l'eau, le propylène glycol et l'éthanol ont donc tout naturellement été choisis.

Les paramètres d'optimisation de l'extraction des antioxydants de la solution aqueuse par les huiles n'ont pas permis d'incorporer les acides gallique et rosmarinique en grandes quantités. Compte tenu de la méthode ces observations étaient prévisibles, cependant avec des concentrations inférieures à 5 mg/kg d'huile, d'acide rosmarinique et inférieures à 20 mg/kg d'huile, d'acide gallique, il est possible d'augmenter significativement la stabilité oxydative des huiles au Rancimat. D'autant que les résultats des huiles de tournesol et de lin, ayant subi les mêmes conditions extractives sans antioxydants (**Figure 46**), ont démontré que cette méthode n'influçait pas les indices de stabilité oxydative, alors que nous pouvions nous y attendre puisque Kim *et al.*, rapporte que de très légères variations d'humidités dans de l'huile de carthame réduisent les CMC des phospholipides et vont influencer la stabilité des huiles [173].

D'autre part, les résultats préliminaires par l'analyse des OSI ont permis de montrer l'intérêt d'ajouter des antioxydants hydrophiles, et plus particulièrement l'acide gallique, directement dans les huiles pour les protéger de la peroxydation lipidique.

L'analyse de ces OSI a également souligné l'effet dose-dépendant des acides gallique et rosmarinique de même que l'acide gallique présentait une plus grande efficacité que l'acide rosmarinique (**Tableau 16**). Cette différence d'efficacité anti-oxydante est préservée que la concentration en antioxydant soit exprimée en concentration massique ou en concentration molaire. Ces résultats soulignent une fois de plus le paradoxe polaire de Porter [75] mais également la théorie des phénomènes d'oxydation des huiles aux interfaces des associations colloïdales [72].

De plus, bien que l'extraction directe des antioxydants par les huiles n'ait pas été conservée, nous avons observé qu'aux mêmes conditions d'extraction, la nature d'une huile a une influence sur l'intégration des antioxydants. Nos résultats soulignaient que l'huile de lin (**vierge**) était capable d'extraire plus d'antioxydants que l'huile de tournesol. En 2015, Li et ses collaborateurs [174] avaient déjà démontré que les rendements d'extraction des composés phénoliques des huiles vierges étaient meilleurs que ceux des huiles raffinées. Cette étude a également montré l'implication de la composition en acide gras des huiles, sur les rendements d'extraction, bien qu'ils restent prudents sur cette observation. En effet, ils ont corrélé la quantité totale de polyphénols retrouvée dans l'huile en fonction du pourcentage de poly-insaturation [174]. Ils ont alors comparé l'huile de tournesol et l'huile de lin et ils ont observé que plus le pourcentage de poly-insaturation est élevé, plus l'huile va extraire des polyphénols. Or nous savons que l'huile de lin est composée à 50 % d'acide  $\alpha$ -linoléique et 20 % d'acide linoléique, tandis que l'huile de tournesol contient 56 % d'acide linoléique, ceci nous permet donc de confirmer les observations de Li *et al.*. Ceci explique les meilleurs résultats que nous avons obtenus avec l'huile de lin. Ces phénomènes sont également liés aux associations colloïdales que nous présentons dans la partie du contexte bibliographique (section III.1.2 du Contexte bibliographique). En effet, la co-extraction des composés mineurs en même temps que les

triglycérides, va permettre aux micelles inverses des huiles vierges, d'interagir plus facilement avec les molécules anti-oxydantes utilisées avec la méthode aqueuse que dans le cas d'une huile raffinée où les teneurs en composés mineurs sont d'autant plus réduites. Ce sont les résultats du chapitre sur la caractérisation des huiles de tournesol et de lin par GC-FID et LC-HRMS qui ont permis de confirmer que nous étions bien en présence d'une huile de tournesol non oléique (riche en  $\omega$ -6) et raffinée, ainsi que d'une huile de lin vierge et de première pression à froid comme le souligne sa forte teneur en phospholipides. Cependant, deux critiques peuvent être formulées concernant les allégations des fournisseurs et les résultats que nous avons obtenus. Tout d'abord, la présence réduite en acide linoléique dans l'huile de tournesol par rapport aux données fournisseur et plus encore par rapport à la littérature, pourrait signifier la présence d'une huile combinée [82],[83] ou tout simplement un mélange de graines oléiques et non oléiques pendant la trituration. D'autre part, nous avons souligné l'erreur de la teneur en tocophérol mentionnée par le fournisseur, dans l'huile de lin.

Malgré tout, les coefficients de partage des antioxydants entre la phase aqueuse et l'huile, la solubilité des molécules et enfin le coût et la disponibilité de certaines molécules n'ont pas permis de conserver cette méthode d'enrichissement.

La décision de ne pas éliminer les solvants à ce stade du procédé, sans pour autant ne pas revenir ultérieurement sur cette décision, n'a pas influencé les résultats des OSI à  $t=0$ , aux concentrations maximales de 1% v/v. En revanche, l'addition par le propylène glycol, à 1% v/v, a mené à la formation d'un trouble (émulsion), sans toutefois remettre en question son utilisation.

Néanmoins, il est apparu, lors de l'étude de l'acide gallique dans l'huile de lin avec ces deux solvants en stockage que les propriétés physico-chimiques des solvants sont capables de moduler l'efficacité anti-oxydante des molécules testées lors des échantillons en stockage. Pourtant cela n'affecte pas directement les mesures d'OSI ou d'IP. Nos hypothèses formulées précédemment sur les viscosités, les densités et les émulsions semblent se confirmer. Les deux solvants ne sont pas miscibles à l'huile, ce qui signifie qu'ils vont chacun former une émulsion

## Discussion

avec l'huile. Or celle avec le propylène glycol est plus stable (formation d'un trouble) (**Figure 51** et **Figure 52**) et les densités de l'huile ( $d = 0,92$ ), de l'éthanol ( $d = 0,79$ ) et du propylène glycol ( $d = 1,04$ ) peuvent conduire à la séparation des entités de la manière suivante :

- l'éthanol va remonter à l'interface air/huile car sa densité est moindre et ceci dans un laps de temps très court (pas de formation de trouble),
- le propylène glycol va être entraîné au fond du flacon car sa densité est supérieure à celle de l'huile mais de manière plus progressive dans le temps (**Figure 52**).

Ces phénomènes couplés aux conditions expérimentales (températures de stockage différentes) vont conduire l'acide gallique à être entraîné de façon majoritaire à l'interface de l'air/huile par l'éthanol, tandis qu'il sera majoritairement entraîné au fond du récipient par le propylène glycol.

Les expériences avec l' $\alpha$ -tocophérol ont souligné une surproduction d'hydroperoxydes par rapport au témoin sans pour autant influencer les indices de stabilité. Il est envisageable de présumer que nous avons dépassé la concentration maximale anti-oxydante (la molécule serait alors devenue pro-oxydante) [163]–[165], mais il est également possible de penser que le tocophérol s'oxyde au cours du temps et influence uniquement les IP et non les OSI.

La deuxième partie de ce travail, présentée dans le troisième chapitre de la partie résultats, a consisté à étudier la sélection d'antioxydants et au suivi de leurs facultés à protéger l'huile de lin en conditions de stockage.

Toujours en relation avec la théorie de Porter et des phénomènes d'oxydation des huiles aux interfaces, nous nous attendions à ce que des composés plus polaires que l'acide gallique soient encore plus efficaces. Cependant, cela n'a pas été le cas si nous nous référons aux données du Rancimat. En effet, le rutoside ( $\text{LogP} = -1,06$ ) et le SDG ( $\text{LogP} = -1,3$ ) commerciaux (**Figure 59** et **Figure 60**), ainsi que les acides hydroxycinnamiques et lignanes glycosylés du lin (**Figure 61** et **Figure 62**) n'ont pas été plus efficace que l'acide gallique pour améliorer les OSI des huiles. Ces molécules présentent la caractéristique d'être glycosylées or la présence des glycosylations

## Discussion

réduit voire inhibe l'efficacité anti-oxydante de ces molécules, comme le soulignait déjà la littérature dans le cas de membranes biomimétiques, où la glycosylation limitait l'efficacité anti-oxydante des molécules vis-à-vis de leurs équivalents aglycones [172]. L'acide caféique possède également un logP très proche de celui de l'acide gallique, pourtant le gain de stabilité de cet échantillon était moindre que celui de l'acide gallique (**Figure 59** et **Figure 60**). Inversement, nous nous attendions à ce que les molécules avec un logP supérieur à l'acide gallique soient moins efficaces. Cette fois-ci, nous n'apercevons pas de molécule plus efficace que l'acide gallique avec un logP supérieur (**Figure 59** et **Figure 60**).

La contradiction entre les résultats espérés et les résultats obtenus pourrait être due au choix d'utiliser des concentrations massiques plutôt que molaires (**Tableau 25**). Si nous étudions l'efficacité des molécules en fonction des concentrations molaires l'acide gallique et son ester, le gallate de propyle, sont bien les molécules les plus efficaces (**Tableau 26**). Les acides coumarique, caféique ou férulique sont significativement moins efficaces à quantité de matière très proche. Théoriquement, à efficacité équivalente, ces trois acides hydroxycinnamiques devraient montrer des gains de stabilité de l'ordre de 600, 550 ou 500% dans l'huile de lin et de 140, 130 ou 115% dans l'huile de tournesol, respectivement. Or il n'en est rien puisqu'ils présentent des gains de stabilité bien inférieurs : acide coumarique (8% dans le lin ; 4% dans le tournesol), acide caféique (161% dans le lin ; 42% dans le tournesol) et l'acide férulique (31% dans le lin ; 6% dans le tournesol).

**Tableau 25** : Conversion des concentrations massique (80 et 200 mg/kg d'huile) en concentrations molaires (mol d'antioxydant/kg d'huile).

[Aox] <sub>massique</sub> (mg/kg d'huile)	80	200
Acide gallique (mol/kg d'huile)	$4,7 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
Gallate de propyle (mol/kg d'huile)	$3,7 \times 10^{-4}$	$9,2 \times 10^{-4}$
Rutoside (mol/kg d'huile)	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$
Resvératrol (mol/kg d'huile)	$3,5 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-4}$
Curcumine (mol/kg d'huile)	$2,2 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$
Acide coumarique (mol/kg d'huile)	$4,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
Acide caféique (mol/kg d'huile)	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$
Acide férulique (mol/kg d'huile)	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Pinorésinol (mol/kg d'huile)	$2,2 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-4}$
Laricirésinol (mol/kg d'huile)	$2,2 \times 10^{-4}$	$5,5 \times 10^{-4}$
Sécoisolaricirésinol (mol/kg d'huile)	$2,2 \times 10^{-4}$	$5,5 \times 10^{-4}$
SDG (mol/kg d'huile)	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$

Seul le gallate de propyle apparait aussi efficace que l'acide gallique puisque les gains de stabilité attendus sont de l'ordre de 464% dans le lin et 106% dans le tournesol, tandis que les gains expérimentaux sont de 474% dans le lin et 94% dans le tournesol (**Tableau 26**).

**Tableau 26** : Gains de stabilité (%) des différentes molécules testées comparés aux gains théoriques (%) relatif à l'efficacité de l'acide gallique.

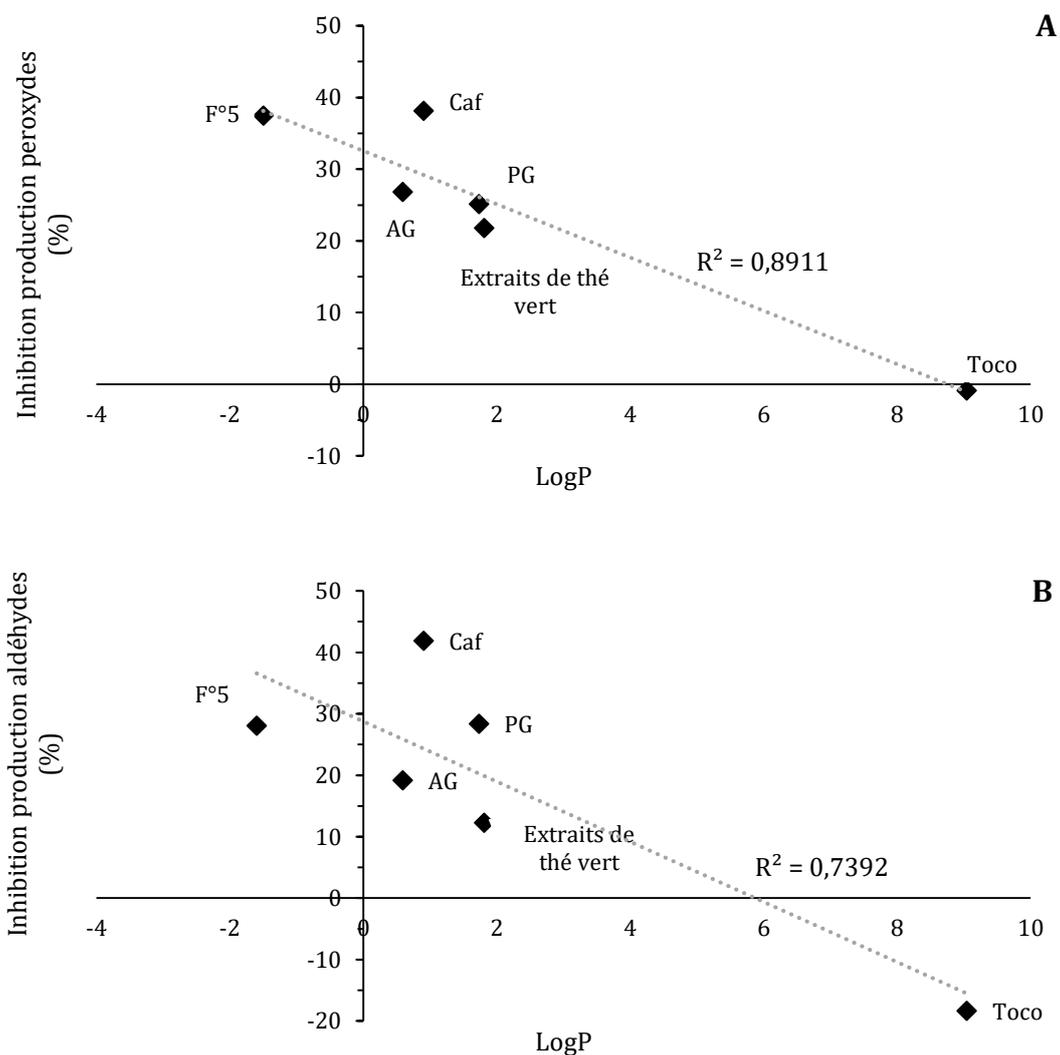
Antioxydant	Huile de lin		Huile de tournesol	
	Gain <sub>exp</sub> (%)	Gain <sub>théo</sub> (%)	Gain <sub>exp</sub> (%)	Gain <sub>théo</sub> (%)
Gallate de propyle	474	464	94	106
Rutoside	7	166	13	38
Resvératrol	38	440	10	100
Curcumine	-	271	5	62
Acide coumarique	8	600	4	140
Acide caféique	161	550	42	126
Acide férulique	31	500	6	115
Pinorésinol	-	282	2	65
Laricirésinol	-	277	8	63
Sécoisolaricirésinol	-10	277	-16	63
SDG	8	146	-	33

Ainsi cette différence de gain que nous prenions pour une conséquence de son estérification (section III.1 de la partie Résultats) ne serait due finalement qu'aux quantités de matières différentes des deux molécules.

## Discussion

*A contrario*, les IP et *p*-AV des échantillons étudiés en stockage contredisent les résultats des OSI, et permettent de démontrer que plus la valeur de logP augmente moins la molécule semble efficace et inversement. C'est ce que nous observons sur la figure 66 si nous faisons l'approximation suivante pour la fraction n°5 et les extraits de thé vert :

- Fraction n°5 : logP = -1,6 ; TPSA = 241
- Extraits de thé vert : logP = 1,8 ; TPSA = 150

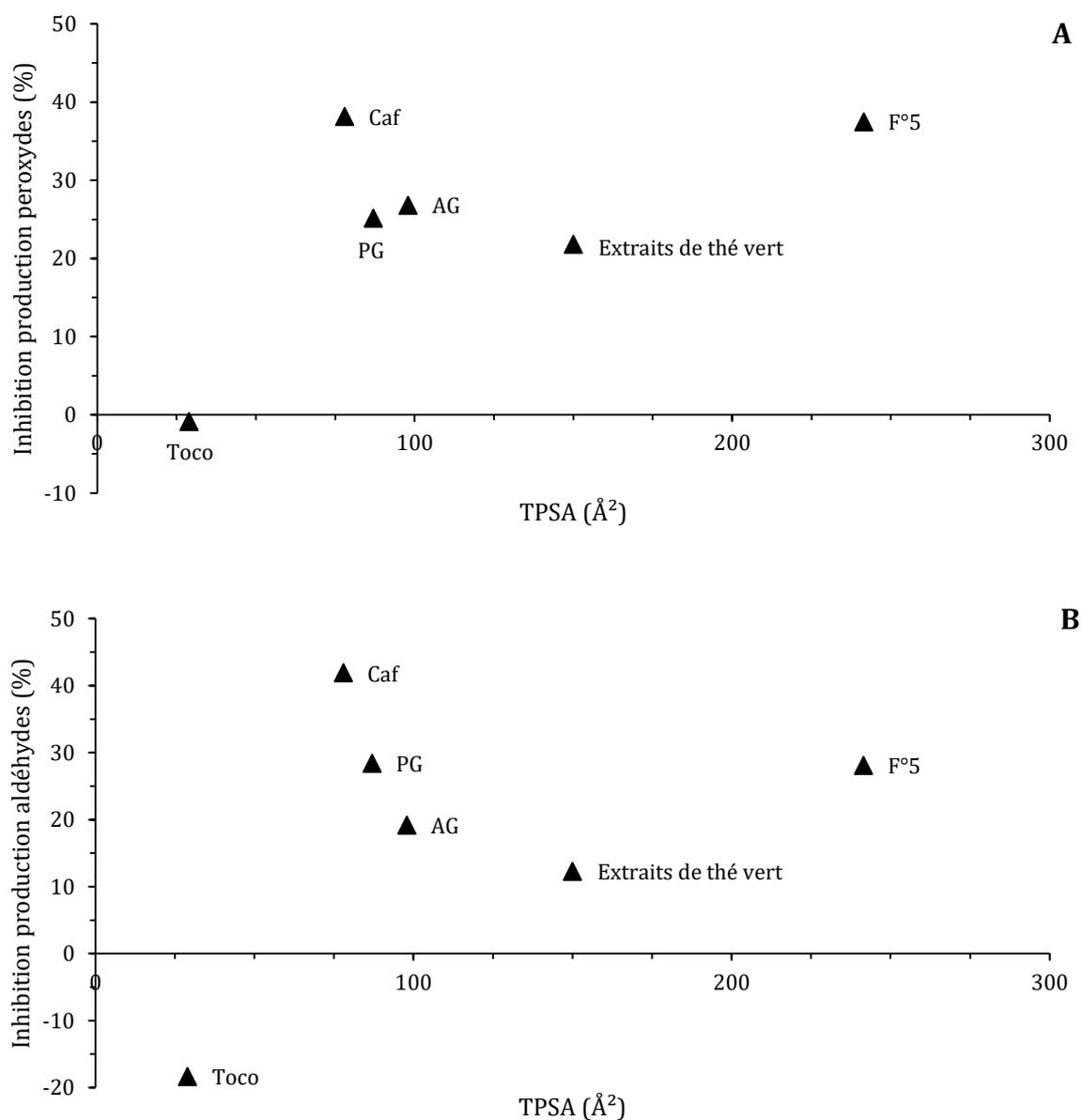


**Figure 66** : Graphiques représentant l'inhibition de la production des peroxydes (A) et des aldéhydes non volatiles (B) en fonction du logP des molécules.

## Discussion

Cependant, les inhibitions du gallate de propyle et surtout de l'acide caféique semblent supérieures comme en témoigne la figure 66 (B). Ce fait pourrait indiquer l'implication d'un autre paramètre, tel que le TPSA.

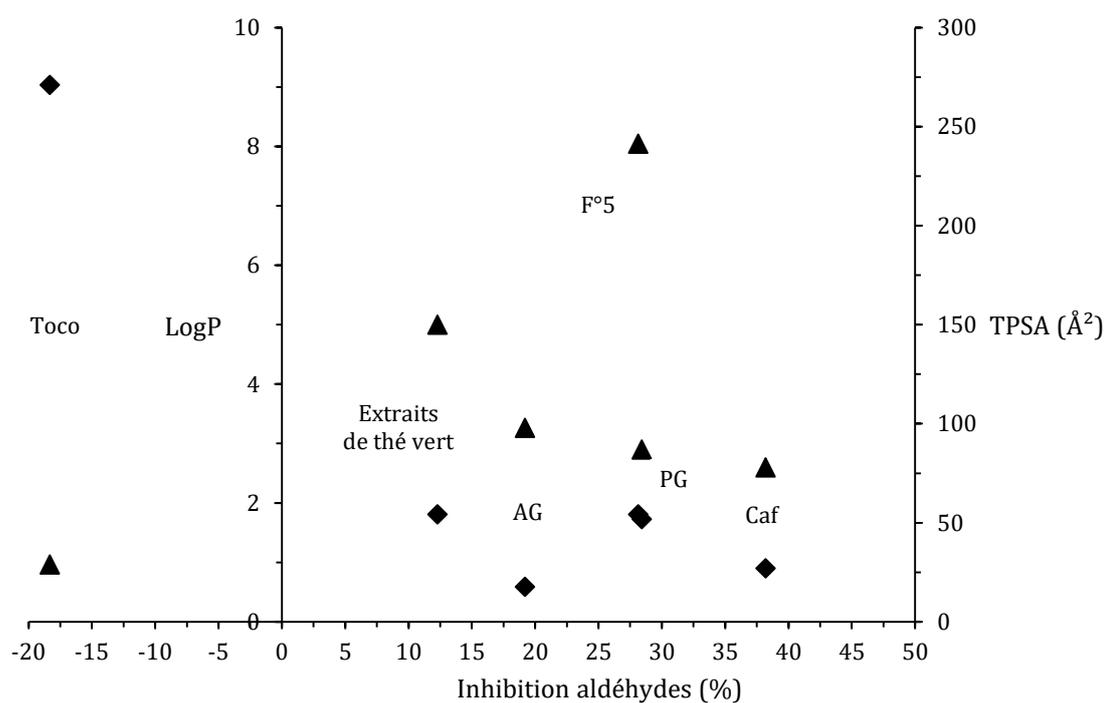
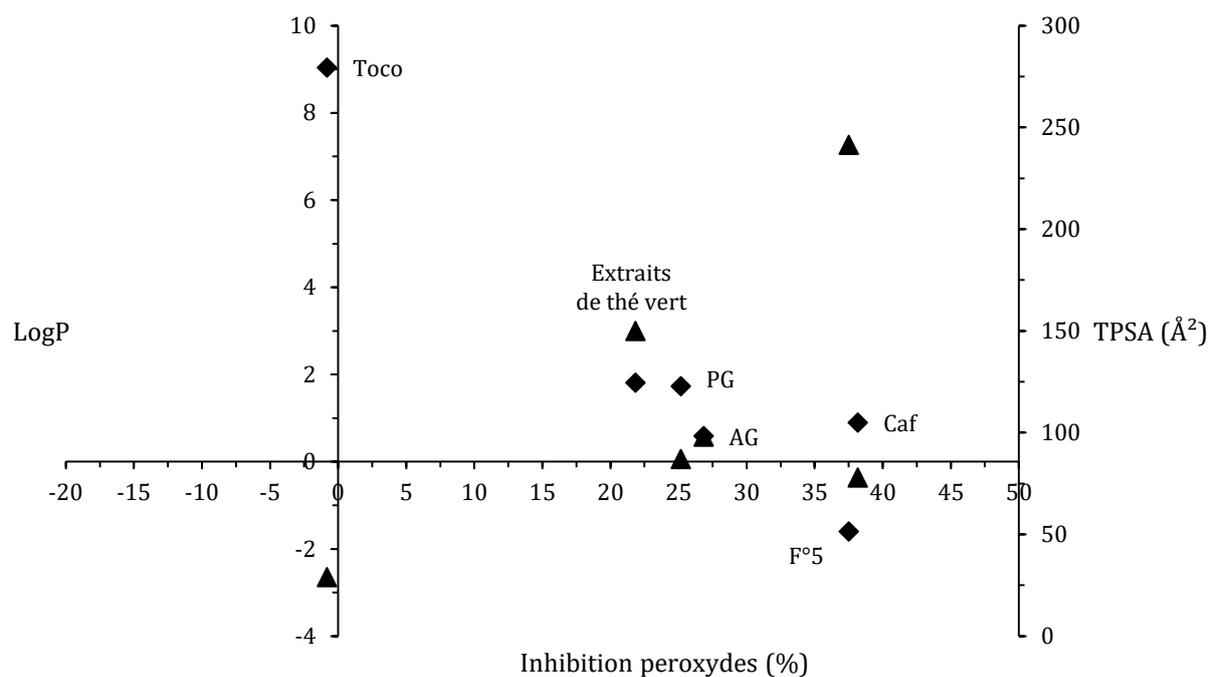
Nous présentons donc sur la figure 67 l'inhibition des peroxydes et des aldéhydes non volatils en fonction des valeurs de TPSA des échantillons. Contrairement au logP, nous ne pouvons pas émettre une hypothèse corrélant ce paramètre à l'efficacité d'une molécule.



**Figure 67** : Graphiques représentant l'inhibition de la production des peroxydes (A) et des aldéhydes non volatiles (B) en fonction du TPSA des molécules.

Néanmoins, le TPSA est une donnée utile dans l'élaboration d'un nouveau médicament pour optimiser sa capacité à pénétrer les membranes cellulaires. Des molécules avec un TPSA supérieur à  $140 \text{ \AA}^2$  ont tendance à avoir une faible capacité pénétrante tout comme des molécules avec un TPSA inférieur à  $80 \text{ \AA}^2$  vont être généralement nécessaires pour franchir la barrière hémato-encéphalique [175]. Cette particularité pourrait expliquer les meilleures inhibitions de l'acide caféique et du gallate de propyle par rapport à l'acide gallique observées sur la figure 67.

En revanche, si nous combinons les deux paramètres dans un même graphique en fonction des pourcentages d'inhibition des peroxydes (**A**) et des aldéhydes non volatils (**B**) (**Figure 68**), nous démontrons que le paramètre qui semble dominer l'efficacité d'une molécule serait le logP. En effet, à logP similaire (extraits de thé vert et PG), le pourcentage d'inhibition ne varie que très peu tandis que l'amplitude entre les valeurs de TPSA est beaucoup plus importante. D'autre part, les logP de l'acide caféique et du gallate de propyle sont respectivement de 0,9 et 1,73 soit une différence très marquée or leurs TPSA sont proches et les pourcentages d'inhibition des peroxydes sont très différents 38,2 % pour l'acide caféique contre 25,2 % pour le gallate de propyle.



**Figure 68** : Graphiques représentant les LogP (◆) et TPSA (▲) des molécules en fonction du pourcentage d'inhibition des peroxydes (A) et des aldéhydes (B).

Ainsi, dans notre étude il apparaît qu'une diminution du logP est un facteur positif sur l'efficacité d'une molécule à protéger les huiles, ce qui confirme de nouveau la théorie de Porter

sur le paradoxe polaire. En revanche, bien qu'il semble préférable que le TPSA soit le plus faible possible son influence semble réduite comme le montre le tocophérol (TPSA = 29 Å<sup>2</sup>) où le logP de cette molécule est le plus important que nous ayons testé (9,04) (**Figure 68**).

C'est pourquoi en s'intéressant cette fois au pourcentage d'inhibition des IP et des *p*-AV des molécules, en fonction du logP, l'acide caféique est, à quantité de matière équivalente, 1,5 fois plus efficace à inhiber la production des peroxydes et 2,4 fois plus efficace à inhiber la production des produits secondaires non volatils que ne l'est l'acide gallique.

Nous en concluons donc que bien que le Rancimat soit une méthode standardisée, qu'elle ait démontré son intérêt pour ce projet afin de comparer rapidement les huiles encapsulées avec les huiles brutes et qu'elle nous ait permis de procéder à la sélection d'un grand nombre de molécule sur des temps relativement courts, les indices de peroxydes et les indices d'anisidine semblent indispensables pour les études en stockage afin de confirmer ou non l'efficacité d'une molécule. Cependant nous nous y attendions dans la mesure où les espèces analysées ne sont pas les mêmes pour chacune des méthodes.

D'autre part, certaines hypothèses peuvent expliquer ces différences : (i) Les phénomènes d'oxydation au Rancimat pourraient être différents des phénomènes naturels. Symoniuk et ses collaborateurs ont précédemment comparé deux techniques d'oxydations accélérées, à savoir le Rancimat et la calorimétrie différentielle à balayage sous pression (PDSC). Ils affirment qu'il existe des différences significatives dans les paramètres cinétiques (énergie d'activation, constante de vitesse, ...) [158], [176] et que ces différences pourraient être dues aux méthodes elles-mêmes. La technique de PDSC utilise le dioxygène pur comme gaz et correspondrait, comme le rapporte Ramalho et ses collaborateurs, à une analyse des produits d'oxydation de l'étape d'initiation et/ou de propagation [177]. À titre de comparaison, le Rancimat utilise un flux d'air et non le dioxygène pur et analyse les produits d'oxydation volatils ce qui correspond à l'étape de terminaison [177]. (ii) La détermination des indices de peroxydes et d'anisidine pourrait être plus sensible ou bien (iii) une inactivation partielle ou totale des molécules anti-

oxydante s'opère pendant l'analyse, conséquence de la chaleur dégagée de l'appareil (Rancimat). Il n'est pas surprenant, en effet, de rencontrer des molécules sensibles à la chaleur [178]–[180].

Nous observons dans le chapitre II des résultats, une faible production de peroxydes avec l'huile de lin sur des temps de stockage relativement longs. De surcroît, cette production de peroxydes n'était pas constante mais procédait par sauts (*Figure 55*). L'une des explications était de penser que la dégradation de ces peroxydes n'était pas toujours compensée par la production, ce qui aurait souligné une faible stabilité des peroxydes issus de l'huile de lin. Or le stockage à 25°C (III.4.1 des résultats) a permis d'observer des productions d'hydroperoxydes proches de celle de l'huile de tournesol (*Figure 53*). Ces résultats montrent que les hydroperoxydes provenant du lin sont capables de s'accumuler, comme le rapportait déjà la littérature [181]. Il est donc plus vraisemblable que les conditions de stockage, c'est-à-dire 4 °C pour l'huile de lin, soient responsables de la faible production d'hydroperoxydes.

Cependant, comme le supposaient les résultats de stabilité du premier chapitre des résultats (I.2), l'huile de lin est une huile qui se dégrade de manière progressive (*Figure 39* et *Figure 40*). Pour cette raison, les produits primaires s'accumulent mais se dégradent tout de même de manière continue. Ainsi, nous nous attendions à une accumulation des aldéhydes (produits secondaires non volatils). Néanmoins, ce n'est pas ce que nous observons. L'huile seule s'oxyde en présentant une augmentation de l'indice de *p*-anisidine en escalier. Ceci indiquerait également une non-accumulation des aldéhydes sur la totalité du suivi et donc leur dégradation progressive en d'autres produits secondaires volatils et donc non détectables par mesure de l'indice d'anisidine. En revanche, les échantillons enrichis en antioxydants, exceptés le tocophérol et l'acide gallique, montrent un temps de latence, avant une pente plus importante caractéristique d'une accumulation (*Figure 64*). Il apparaît donc que l'enrichissement en certains antioxydants (acide caféique, gallate de propyle, fraction n°5 et 7, les extraits de lin et l'acide gallique dans une moindre mesure) permet de stabiliser sur un temps plus long les

peroxydes et les aldéhydes non volatils en comparaison avec l'huile non supplémentée en antioxydants (**Figure 63** et **Figure 64**).

D'autre part, nous avons remarqué que l'ensemble des échantillons étaient capables d'inhiber la production des peroxydes, excepté le tocophérol, pendant une durée de 70 jours. De même ils étaient capables d'inhiber la production des aldéhydes non volatils pendant les 80 premiers jours. Nous émettons ainsi l'hypothèse que les antioxydants sont majoritairement consommés, pendant ce laps de temps et ne permettent plus par la suite de protéger efficacement l'huile de lin. Nous remarquons à cette occasion que pour les mêmes conditions, l'inhibition est moins efficace dans le cas de l'huile de lin que dans l'huile de tournesol. Ceci s'explique par sa fragilité vis-à-vis de l'oxydation.

Nous soulignons (section III.2.2 de la partie Résultats) que l'huile de tournesol n'est pas protégée de l'oxydation après enrichissement avec les lignanes (**Figure 62**), tandis que les acides phénoliques (acide gallique et dérivés) et hydroxycinnamiques (acide caféique et acide férulique dans une moindre mesure) sont capables de la protéger. Si nous nous intéressons aux composés phénoliques présents dans la graine de tournesol, autre que le tocophérol, nous remarquons qu'il s'agit majoritairement d'acides hydroxycinnamiques [64], [182].

En revanche, l'huile de lin est majoritairement protégée de l'oxydation lorsqu'elle est enrichie en acide caféique et en lignanes (fraction n°5) (**Figure 63** et **Figure 64**), exception faite du sécoisolaricirésinol (**Figure 60** et **Figure 62**). Par analogie avec ce qui a été dit précédemment avec l'huile de tournesol, les lignanes sont la classe de polyphénols la plus abondante dans la graine de lin. Contrairement aux lignanes, l'acide caféique est le moins abondant des acides hydroxycinnamiques [66]. Cependant, l'acide chlorogénique (**Annexe 28**) quant à lui, représenterait d'après la littérature, le second acide phénolique majoritaire [183]. Or ce composé phénolique est un ester d'acide caféique et d'acide quinique (**Annexe 39**).

## Discussion

Concernant, cette fois, le mode d'action des antioxydants, l'activité anti-oxydante de l'acide gallique est caractéristique d'un mode d'action piègeur de radicaux. Il est bien connu pour être un excellent piègeur de radical quel que soit le mode d'évaluation (DPPH, ABTS) [184]. Nos résultats montrent que la protection apportée par les antioxydants sélectionnés est identique à l'acide gallique. Ainsi, la protection est due principalement à cette activité de piégeage de radicaux. Et donc à la capacité des antioxydants à céder un hydrogène aux radicaux L, LO $\cdot$  et LOO $\cdot$ .

Néanmoins dans une huile aussi fragile à l'oxydation que l'huile de lin, bien qu'ils permettent de stabiliser les peroxydes et les aldéhydes à longues chaînes, cela n'a que peu d'effet sur la mesure des OSI de l'huile. Il semble donc que l'addition des antioxydants dans l'huile de lin ne permet pas de prévenir la dégradation des peroxydes et des aldéhydes non volatils, en composés secondaires volatils lors du chauffage pendant l'analyse au Rancimat. D'autre part, dans nos conditions d'analyses, leur rapide épuisement pourrait également jouer un rôle dans l'efficacité des molécules avec cette méthode d'analyse.

Cependant, il est clair que chaque antioxydant que nous avons testé, excepté le tocophérol, montre une excellente efficacité anti-oxydante par piégeage de radicaux. Il serait judicieux d'augmenter les concentrations en antioxydant afin de les comparer avec nos résultats de sélection (200 mg/kg) et d'étudier les activités à quantités de matières équivalentes. En effet, les OSI des échantillons supplémentés ne sont pas significativement meilleurs que ceux du témoin (*Figure 65*).

# Perspectives

Les analyses des indices de peroxydes, de *p*-anisidine et de stabilité oxydative ont montré l'intérêt d'enrichir les huiles en polyphénols d'origine naturelle et en particulier en acide gallique. Ces résultats renforcent d'ailleurs la théorie de Porter sur le paradoxe polaire [75]. C'est pourquoi nous avons fait le choix d'incorporer ces antioxydants hydrophiles en utilisant des solvants (eau ; propylène glycol ; éthanol). Or, l'enrichissement avec le propylène glycol a entraîné la formation d'une émulsion, il serait donc intéressant de pouvoir comparer l'efficacité anti-oxydante des molécules utilisées directement dans l'huile, sous la forme de poudre ou d'extraits secs sans solubilisation préalable comme le font Esposto *et al.* [185] ou Aydeniz et Yilmaz [186] et ainsi apprécier l'homogénéité ou non de ces molécules hydrophiles dans un milieu lipophile. D'autre part, il serait intéressant d'étudier la stabilité des huiles après élimination des solvants (propylène glycol et éthanol), afin de confirmer ou non s'il y a une stabilisation des associations colloïdales par les solvant (< 1%), comme le font les agents de surfaces présents dans les huiles (composés mineurs).

Pour des raisons évidentes nous avons fait le choix d'analyser l'effet de nos molécules directement dans les huiles, en étudiant l'oxydation de nos lipides plutôt qu'en étudiant le pouvoir antioxydant des molécules ajoutées. C'est cette approche que nous avons utilisée pour sélectionner nos antioxydants mais elle présente certaines limites. En effet, nous avons utilisé le Rancimat comme méthode de pré-sélection des molécules commerciales et purifiées. Or comme nous l'avons observé avec le tocophérol, des divergences entre les méthodes d'analyse de l'oxydation étaient visibles (comparaison IP et OSI). Ainsi, la méthode de pré-sélection sur le seul critère du Rancimat ne semble pas être pertinente de prime abord. Pourtant, sa capacité d'analyse rapide et répétable sur un nombre important de molécules, nous a permis de faire une pré-sélection avant de tester en stockage ceux que nous voulions conserver. De plus, si nous nous intéressons aux résultats, il est possible d'observer qu'un échantillon qui présente une amélioration significative de la stabilité oxydative de l'huile est un échantillon efficace à protéger l'huile (acide gallique, acide caféique, gallate de propyle, ...). De même, un échantillon avec un

OSI significativement inférieur à l'huile contrôle sera incapable de protéger l'huile de l'oxydation (sécoisolaricirésinol). En revanche, il est vrai qu'il n'est pas possible d'avoir une vision claire de l'efficacité d'une molécule lorsque l'échantillon n'est pas significativement différent du contrôle. Lors des tests préliminaires et de la pré-sélection, il était possible d'observer une molécule montrant une activité pro-oxydante :  $\alpha$ -tocophérol ; une molécule montrant une activité anti-oxydante : fraction n°5 ou encore un extrait peu efficace : les extraits de lin. Cela justifie pourquoi les fractions n°5, 7 et les extraits de lin avaient été retenus pour l'étude de l'efficacité en stockage.

Ainsi il serait tout de même intéressant de tester l'efficacité en stockage des antioxydants qui n'ont pas été retenus lors de l'étape de pré-sélection réalisée au Rancimat afin d'approfondir et de comparer ces résultats avec ceux qui les ont rejetés.

Les expériences de stockages des molécules sélectionnées, avec l'huile de lin, suggèrent que l'ensemble des échantillons agit avec un mode d'action de piègeur de radicaux. En effet, il y a formation d'un plateau lors de l'analyse des indices de peroxydes et un retard dans le développement des produits secondaires non volatils de l'oxydation. Nous savons que ce mode d'action antioxydant nécessite la présence d'une fonction phénol libre, comme le démontre Cai *et al.* [187]. Or dans le cas de la fraction n°5, nos molécules sont sous la forme glucosylée, c'est-à-dire qu'aucun hydroxyle n'est libre sur les cycles aromatiques des pinorésinol di-glucoside et laricirésinol di-glucoside. Or nous avons montré la capacité de cette fraction à protéger l'huile de lin (**Figure 63** et **Figure 64**). Ainsi, il est possible que pendant les étapes de purifications une certaine quantité des deux molécules soit libre, il serait donc intéressant d'analyser la composition exacte en composés libres potentiels au sein de la fraction n°5. D'autre part il pourrait être intéressant de tester les pinorésinol et/ou laricirésinol aglycone en stockage, molécules qui avaient été retenues suite à leurs très faibles efficacités lors de la pré-sélection.

Enfin, les résultats de co-encapsulation fait en collaboration avec Lorine Le Priol et présentés dans le dernier chapitre des résultats (section IV de la partie Résultats) ont abordé les effets bénéfiques d'une nouvelle formulation par co-encapsulation de deux molécules anti-oxydantes, le gallate de propyle et l' $\alpha$ -tocophérol, avec des huiles riches en acides gras polyinsaturés. L'objectif d'accroître la stabilité oxydative dans le temps par rapport à la formulation de microcapsules seules sans antioxydants a été prouvée. En effet, l'optimisation d'un protocole d'encapsulation des huiles, suivant une combinaison particulière de matériaux d'encapsulations par notre partenaire, avait déjà débouché sur un accroissement de la stabilité oxydative des huiles encapsulées dans le temps vis-à-vis des huiles non encapsulées.

En revanche, ces premiers résultats de co-encapsulation n'ont concerné que le gallate de propyle et l' $\alpha$ -tocophérol et ils ont confirmé l'aspect pro-oxydant du tocophérol, ainsi que, l'avantage d'incorporer le gallate de propyle comparativement à l'atomisation seule sans antioxydant.

Il s'ouvre donc de nouvelles perspectives concernant nos échantillons ayant montré un réel intérêt dans l'enrichissement des huiles brutes (acide caféique, acide gallique, fraction n°5 et 7).

Suite à notre étude menée sur les composés phénoliques isolés du lin, il serait intéressant et judicieux d'analyser et comparer l'effet des molécules sélectionnées en co-encapsulation par rapport aux résultats obtenus avec l'enrichissement en gallate de propyle.

Il pourrait également être envisagé l'enrichissement des huiles avec le meilleur candidat et également d'incorporer dans la phase aqueuse de l'émulsion protéique, de la formulation d'atomisation, d'autres antioxydants afin de combiner protection de l'enveloppe et protection des huiles dans la microcapsule.

En effet, cela permettrait de confirmer ou non l'intérêt des composés phénoliques isolés du lin dans la protection des huiles. D'autre part, ce protocole de co-encapsulation valorise un ensemble de molécules d'intérêt issus de coproduits agricoles : des protéines (pois, soja), des polysaccharides (inuline, maltodextrine, pectine), des composés phénoliques et enfin des huiles à forte teneur en oméga-3 (huile de lin, huile de cameline). Ce projet pourrait ainsi conduire à la

## Perspectives

mise au point d'un produit manufacturé d'origine végétale riche en molécules naturelles, en oméga-3 et surtout avec une durée de conservation beaucoup plus importante qu'aujourd'hui. Ce nouveau produit répondrait ainsi à la demande récente des consommateurs puisque le nombre de français se disant « flexitariens » (30 % en 2018) ou « végétarien/végétaliste » ne cesse d'augmenter [188] et ce produit apporterait une alternative aux huiles riches en oméga-3 d'origine animale pour le rééquilibrage de la balance oméga-6/ oméga-3.

# **Communications scientifiques**

## Communications scientifiques

- Publications

L. Le Priol, A. Dagmey, S. Morandat, K. Saleh, K. El Kirat, A. Nesterenko.

**"Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation"**

*Food Hydrocolloids*. vol.95, 2019, pp. 105-115.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.026>

- Communications orales

A. Dagmey, J. Tchoumtchoua, A. Quero, F. Mesnard, S. Morandat.

**"Supplementation of oxidizable edible oils by natural phenolic antioxidants"**

2<sup>nd</sup> International Symposium on Lipid oxidation and antioxidants

4-6 Juin 2018, Graz, Autriche.

A. Dagmey, J. Tchoumtchoua, A. Quero, F. Mesnard, S. Morandat.

**"Effect of phenolic antioxidants on oxidative stability of Sunflower oil and Flaxseed oil"**

5<sup>ème</sup> journée scientifique Daniel THOMAS. Journée des doctorants

9 Juillet 2018, Compiègne, France.

- Communications par posters

A. Dagmey, J. Tchoumtchoua, A. Quero, F. Mesnard, S. Morandat.

**"Valorisation of phenolic compounds from flax by-products against lipid peroxidation of PUFA-rich edible oils"**

15<sup>th</sup> GERLI International Lipidomics Meeting.

30 Septembre – 2 Octobre 2019, Compiègne, France.

A. Dagmey, J. Tchoumtchoua, A. Quero, F. Mesnard, S. Morandat.

**"New phenolic compounds from flax (*linum usitatissimum*) to prevent lipid peroxidation in edible oils"**

17<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress and Expo.

20-23 Octobre 2019, Séville, Espagne.

# **Bibliographie**

- [1] P. Riches, "Statistiques," 2018.
- [2] FranceAgriMer, "Les synthèses de FranceAgriMer," no. Octobre, pp. 1–53, 2017.
- [3] "Infographie - Le beurre: décryptage et chiffres clés | Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation." [Online]. Available: <https://agriculture.gouv.fr/infographie-le-beurre-decryptage-et-chiffres-cles>. [Accessed: 19-Mar-2020].
- [4] "Corps gras : Une consommation marquée par les cultures culinaires régionales | Agro Media." [Online]. Available: <https://www.agro-media.fr/dossier/corps-gras-une-consommation-marquee-par-les-cultures-culinaires-regionales-29585.html>. [Accessed: 28-Mar-2020].
- [5] V. De, "La filière huile d'olive en France," pp. 4–5, 2017.
- [6] F. Agrimer, "Le marché des matières grasses en France," *Fr. Agrimer*, pp. 5–6, 2012.
- [7] S. Bhardwaj, S. J. Passi, and A. Misra, "Overview of trans fatty acids: Biochemistry and health effects," *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 5, pp. 161–164, 2011.
- [8] D. Firestone, *Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes*. AOCS Press, 2006.
- [9] Anses, "Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3)," pp. 1–331, 2017.
- [10] "Les acides gras trans | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail." [Online]. Available: <https://www.anses.fr/fr/content/les-acides-gras-trans>. [Accessed: 07-Apr-2020].
- [11] "Les lipides | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail." [Online]. Available: <https://www.anses.fr/fr/content/les-lipides>. [Accessed: 21-May-2019].
- [12] B. R. Bistrrian, "Clinical Aspects of Essential Fatty Acid Metabolism ;," *J. Parenter. Enter. Nutr.*, vol. 27, no. 3, pp. 168–175, 2003.
- [13] A. P. Simopoulos, "An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity," *Nutrients*, vol. 8, no. 3, p. 128, Mar. 2016.
- [14] A. P. Simopoulos, "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 8, pp. 365–379, Oct. 2002.
- [15] "Maladies cardiovasculaires et accident vasculaire cérébral – Santé publique France." [Online]. Available: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral>. [Accessed: 07-Apr-2020].

## Bibliographie

- [16] R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall, and K. H. Weisgraber, "Lipoproteins of Special Significance in Atherosclerosis: Insights Provided by Studies of Type III Hyperlipoproteinemia," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 454, no. 1, pp. 209–221, 1985.
- [17] M. A. Austin, "Plasma Triglyceride As a Risk Factor for Coronary Heart Disease," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 129, no. 2, pp. 249–259, 2017.
- [18] D. M. Hegsted, R. B. McGandy, M. L. Myers, and F. J. Stare, "Quantitative Effects of Dietary fat on Serum Cholesterol in Man," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 17, pp. 281–295, 1965.
- [19] R. P. Mensink and M. B. Katan, "Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects," *N. Engl. J. Med.*, vol. 323, no. 7, pp. 439–445, 1990.
- [20] S. Jansen *et al.*, "Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 1, pp. 36–41, 2000.
- [21] J. C. Lovejoy *et al.*, "Effects of Diets Enriched in Saturated (Palmitic), Monounsaturated (Oleic), or trans (Elaidic) Fatty Acids on Insulin Sensitivity and Substrate Oxidation in Healthy Adults," *Diabetes Care*, vol. 25, no. 8, pp. 1283–1288, 2002.
- [22] K. C. S. I. Itani, N. B. Ruderman, F. Schmieder, and G. Boden, "Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol , Protein," vol. 3, no. 17, pp. 2005–2011, 2005.
- [23] A. Bonanome, M. Bennett, and S. M. Grundy, "Metabolic effects of dietary stearic acid in mice: changes in the fatty acid composition of triglycerides and phospholipids in various tissues," *Atherosclerosis*, vol. 94, no. 2–3, pp. 119–127, 1992.
- [24] R. P. Mensink, "Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans," *Lipids*, vol. 40, no. 12, pp. 1201–1205, 2005.
- [25] E. Giovannucci, E. B. Rimm, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, A. Ascherio, and W. C. Willett, "Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 9, pp. 2390–7, May 1994.
- [26] G. R. Howe *et al.*, "Dietary Factors and Risk of Breast Cancer: Combined Analysis of 12 Case--Control Studies," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 7, pp. 561–569, Apr. 1990.
- [27] E. Giovannucci *et al.*, "A Prospective Study of Dietary Fat and Risk of Prostate Cancer," *JNCI J. Natl.*

- Cancer Inst.*, vol. 85, no. 19, pp. 1571–1579, Oct. 1993.
- [28] W. C. Willett, “Diet and cancer,” *Oncologist*, vol. 5, no. 5, pp. 393–404, Oct. 2000.
- [29] C. D. Funk, “Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology,” *Science (80-. )*, vol. 294, no. 5548, pp. 1871–1875, 2001.
- [30] G. Schmitz and J. Ecker, “The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 147–155, 2008.
- [31] S. C. Cunnane *et al.*, “Utilization of Uniformly Labeled <sup>13</sup>C-Polyunsaturated Fatty Acids in the Synthesis of Long-Chain Fatty Acids and Cholesterol Accumulating in the Neonatal Rat Brain,” *J. Neurochem.*, vol. 62, no. 6, pp. 2429–2436, 1994.
- [32] M. J. James, L. G. Cleland, and M. J. James, “Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 27, no. 2, pp. 85–97, Oct. 1997.
- [33] “Tournesol - Les espèces cultivées - Cultures & utilisation - Terres Univia.” [Online]. Available: <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/tournesol>. [Accessed: 17-Jul-2019].
- [34] E. Kvavadze *et al.*, “30,000-year-old wild flax fibers,” *Science*, vol. 325, no. 5946, p. 1359, Sep. 2009.
- [35] W. van Zeist and J. A. H. Bakker-Heeres, “Evidence for linseed cultivation before 6000 bc,” *J. Archaeol. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 215–219, Sep. 1975.
- [36] “Le lin et le chanvre européen.” [Online]. Available: [http://www.mastersoflinen.com/fre/lin/19-la-carte-du-lin\\_](http://www.mastersoflinen.com/fre/lin/19-la-carte-du-lin_). [Accessed: 22-Jul-2019].
- [37] “FAOSTAT.” [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/fr/#home>. [Accessed: 22-Jul-2019].
- [38] “Lin - Cultures & utilisation - [node:field-menu:parent:name] - Terres Univia.” [Online]. Available: <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/lin>. [Accessed: 17-Jul-2019].
- [39] A. Romain, *Nouveau manuel complet du fabricant de vernis*. R. Baudouin, 1979.
- [40] “Arrêté du 4 décembre 2008 fixant les conditions d’utilisation de l’huile de lin pour un usage alimentaire | Legifrance.” [Online]. Available: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000019900821&categorieLien=id>. [Accessed: 22-Jul-2019].
- [41] F. Labalette, N. Landé, D. Wagner, M. Roux-Duparque, and E. Saillet, “La filière lin oléagineux française: Panorama et perspectives,” *OCL - Ol. Corps Gras Lipides*, vol. 18, no. 3, pp. 113–122, 2011.
- [42] R. J. Hamilton, C. Kalu, E. Prisk, F. B. Padley, and H. Pierce, “Chemistry of free radicals in lipids,”

- Food Chem.*, vol. 60, no. 2, pp. 193–199, Oct. 1997.
- [43] J. W. Finley and J. M. deMan, “Lipids,” Springer, Cham, 2018, pp. 39–116.
- [44] A. Logan, U. Nienaber, and X. Pan, *Lipid Oxidation - Challenges in Food Systems*. AOCS Press, 2013.
- [45] O. Roman, B. Heyd, B. Broyart, R. Castillo, and M.-N. Maillard, “Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 1, pp. 49–59, Jun. 2013.
- [46] E. N. Frankel, “Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance,” vol. 61, no. 12, pp. 1908–1917, 1984.
- [47] J. Sanchez and T. N. Myers, “Peroxides and Peroxide Compounds, Organic Peroxides,” in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- [48] W. O. Lundberg and J. R. Chipault, “The Oxidation of Methyl Linoleate at Various Temperatures,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 69, no. 4, pp. 833–836, 1947.
- [49] Casimir C. Akoh and D. B. Min, *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, vol. 121, no. 15. 2002.
- [50] J. P. Cosgrove, D. F. Church, and W. A. Pryor, “The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids,” *Lipids*, vol. 22, no. 5, pp. 299–304, May 1987.
- [51] C. C. Akoh and D. B. Min, *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*, CRC Press. 2008.
- [52] L. Cui and E. A. Decker, “Phospholipids in foods: Prooxidants or antioxidants?,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 96, no. 1, pp. 18–31, 2016.
- [53] E. N. Frankel, *Lipid Oxidation: Second Edition*. Elsevier Inc., 2005.
- [54] K. Miyashita and T. Takagi, “Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 63, no. 10, pp. 1380–1384, Oct. 1986.
- [55] N. Frega, M. Mozzon, and G. Lercker, “Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 3, pp. 325–329, 1999.
- [56] G.-S. A., S. E., K. I., and S. M., “Tocopherol content in edible plant oils,” *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 57, no. 4[A], pp. 157–161, 2007.
- [57] S. Mo, L. Dong, W. J. Hurst, and R. B. van Breemen, “Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry,” *Lipids*, vol. 48, no. 9, pp. 949–956, Sep. 2013.
- [58] Y. YOSHIDA and E. NIKI, “Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components,” *J. Nutr. Sci.*

- Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 49, no. 4, pp. 277–280, 2003.
- [59] T. Wang, K. B. Hicks, and R. Moreau, “Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 79, no. 12, pp. 1201–1206, Dec. 2002.
- [60] M. R. Law, “Plant sterol and stanol margarines and health,” *West. J. Med.*, vol. 173, no. 1, pp. 43–47, Jul. 2000.
- [61] W. H. Ling and P. J. H. Jones, “Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects,” *Life Sciences*. 1995.
- [62] R. Yang *et al.*, “Phytosterol Contents of Edible Oils and Their Contributions to Estimated Phytosterol Intake in the Chinese Diet,” *Foods*, vol. 8, no. 8, p. 334, Aug. 2019.
- [63] N. T. Dunford, “Hemp and flaxseed oil: Properties and applications for use in food,” in *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition: Properties, Processing and Applications*, Elsevier Inc., 2015, pp. 39–63.
- [64] S. Zilic *et al.*, “The content of antioxidants in sunflower seed and kernel,” *Helia*, vol. 33, no. 52, pp. 75–84, Jul. 2010.
- [65] A. SIGER, M. NOGALA-KALUCKA, and E. LAMPART-SZCZAPA, “THE CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN COLD-PRESSED PLANT OILS,” *J. Food Lipids*, vol. 15, no. 2, pp. 137–149, May 2008.
- [66] H. Wang *et al.*, “Comparison of phytochemical profiles and health benefits in fiber and oil flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.),” *Food Chem.*, vol. 214, pp. 227–233, Jan. 2017.
- [67] W. Chaiyasit, R. J. Elias, D. J. McClements, and E. A. Decker, “Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 3, pp. 299–317, 2007.
- [68] A. Xenakis, V. Papadimitriou, and T. G. Sotiroudis, “Colloidal structures in natural oils,” *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2010.
- [69] C. R. Wold and M. D. Soucek, “Viscoelastic and thermal properties of linseed oil-based ceramer coatings,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 201, no. 3, pp. 382–392, Feb. 2000.
- [70] W.-S. Choo, J. Birch, and J.-P. Dufour, “Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 20, no. 3–4, pp. 202–211, May 2007.
- [71] “Method Detail.” [Online]. Available: <https://www.aocs.org/attain-lab-services/methods/methods/method-detail?productId=111474>. [Accessed: 24-Apr-2020].
- [72] K. Kittipongpittaya, A. Panya, D. J. McClements, and E. A. Decker, “Impact of free fatty acids and

## Bibliographie

- phospholipids on reverse micelles formation and lipid oxidation in bulk oil," *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 91, no. 3, pp. 453–462, 2014.
- [73] W. Chaiyasit, D. J. McClements, J. Weiss, and E. A. Decker, "Impact of surface-active compounds on physicochemical and oxidative properties of edible oil," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 2, pp. 550–556, 2008.
- [74] B. Chen, A. Han, M. Laguerre, D. J. McClements, and E. A. Decker, "Role of reverse micelles on lipid oxidation in bulk oils: Impact of phospholipids on antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and Trolox," *Food Funct.*, vol. 2, no. 6, pp. 302–309, 2011.
- [75] W. L. Porter, "Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems," *Toxicol. Ind. Health*, vol. 9, no. 1–2, pp. 93–122, Jan. 1993.
- [76] X. Pages, O. Morin, C. Birot, M. Gaud, S. Fazeuilh, and M. Gouband, "Raffinage des huiles et des corps gras et élimination des contaminants," *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, vol. 17, no. 2, pp. 86–99, Mar. 2010.
- [77] M. T. Satue, S.-W. Huang, and E. N. Frankel, "Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached, and deodorized olive oil," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 72, no. 10, pp. 1131–1137, Oct. 1995.
- [78] D. B. Min and J. Wen, "Effects of Dissolved Free Oxygen on the Volatile Compounds of Oil," *J. Food Sci.*, vol. 48, no. 5, pp. 1429–1430, Sep. 1983.
- [79] I. Aidos, S. Lourenclo, A. Padt, J. B. Luten, and R. M. Boom, "Stability of Crude Herring Oil Produced from Fresh Byproducts: Influence of Temperature during Storage," *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 9, pp. 3314–3320, Nov. 2002.
- [80] H. M. C. Azeredo, J. A. F. Faria, and M. A. A. P. Silva, "The Efficiency of TBHQ,  $\beta$ -carotene, Citric Acid, and Tinuvin 234R on the Sensory Stability of Soybean Oil Packaged in PET Bottles," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 1, pp. 302–306, Jan. 2003.
- [81] "Fruit d'Or Oméga 3 Doux." [Online]. Available: <https://www.fruitdor.fr/mes-produits/nos-classiques/fruit-dor-omega-3-doux>. [Accessed: 24-Apr-2020].
- [82] "Caractéristiques du produit | Huile Isio 1 L Isio 4 | Google Shopping." [Online]. Available: <https://www.google.com/shopping/product/582324338943621387/specs?q=mélange+d%27huiles+de+tournesol+oléiques+et+non+oléiques&client=firefox-b-d&sxsrf=ACYBGNTmRPCOxQ-mtgXj5ltpEayp91IDPg:1580306008313&prds=paur:ClkAsKraX74nONWYLMs1AM6JsaoO3RBZMy>

- 4mDNx3H7cIkDOniTuQfR-a9NNjJZreZ2uZ-hN7mRkryRvEmoYnoRWMK1DzZs-fs0vvHqKietJyLjq78oLqWugDzhIZAFPVH71i7Usp\_vFwLzxdSiDiJsSBwWqVbw,rj:1. [Accessed: 29-Jan-2020].
- [83] "Huile cuisson - Huilerie VIGEAN." [Online]. Available: <https://www.huilerievigean.com/p-534-huile-cuisson-desodorisee-bio.html>. [Accessed: 29-Jan-2020].
- [84] "Omega 3 fish oil." [Online]. Available: <https://www.arjunanatural.com/zepufa.php>. [Accessed: 06-May-2020].
- [85] "Why MEG-3 - MEG-3: Omega-3 EPA/DHA." [Online]. Available: [https://www.meg-3.com/en\\_GB/why-meg-3.html](https://www.meg-3.com/en_GB/why-meg-3.html). [Accessed: 06-May-2020].
- [86] "Dry n-3@." [Online]. Available: [https://www.basf.com/global/en/products/segments/nutrition\\_and\\_care/nutrition\\_and\\_health/omega-3/products/dry-n-3.html](https://www.basf.com/global/en/products/segments/nutrition_and_care/nutrition_and_health/omega-3/products/dry-n-3.html). [Accessed: 06-May-2020].
- [87] M. L. Kantor, S. S. Steiner, M. Kisco, H. M. Pack, and all N. of, "United States Patent (19) Kantor et al. 54 75 MCROENCAPSULATION OF FISH OL," Apr. 1988.
- [88] S. A. Heleno, A. Martins, M. J. R. P. Queiroz, and I. C. F. R. Ferreira, "Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review," *Food Chem.*, vol. 173, pp. 501–513, Apr. 2015.
- [89] Y. Liu, Y. Tikunov, R. E. Schouten, L. F. M. Marcelis, R. G. F. Visser, and A. Bovy, "Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review," *Front. Chem.*, vol. 6, p. 52, Mar. 2018.
- [90] K. Pei, J. Ou, J. Huang, and S. Ou, "p -Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 96, no. 9, pp. 2952–2962, Jul. 2016.
- [91] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 50, no. 3, pp. 586–621, Jan. 2011.
- [92] N. Francenia Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, B. Hernández-Carlos, and C. Villanueva-Cañongo, "Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds," in *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds [Working Title]*, IntechOpen, 2019.
- [93] Monica Leopoldini, Tiziana Marino, \* and Nino Russo, and M. Toscano, "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism," 2004.

- [94] \* Patrick Trouillas *et al.*, "Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study," 2008.
- [95] K. Doudin, S. Al-Malaika, H. H. Sheena, V. Tverezovskiy, and P. Fowler, "New genre of antioxidants from renewable natural resources: Synthesis and characterisation of rosemary plant-derived antioxidants and their performance in polyolefins," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 130, pp. 126–134, Aug. 2016.
- [96] F. Shahidi, "Antioxidants: Principles and applications," *Handb. Antioxidants Food Preserv.*, pp. 1–14, Jan. 2015.
- [97] M. D. Garrido, I. Frías, C. Díaz, and A. Hardisson, "Concentrations of metals in vegetable edible oils," *Food Chem.*, vol. 50, no. 3, pp. 237–243, Jan. 1994.
- [98] C. Alimentarius, "Norme pour les graisses et les huiles comestibles non visées par des normes individuelles," 1981.
- [99] P. Szyzewski, M. Frankowski, A. Zioła-Frankowska, J. Siepak, T. Szyzewski, and P. Piotrowski, "A comparative study of the content of heavy metals in oils: Linseed oil, rapeseed oil and soybean oil in technological production processes," *Arch. Environ. Prot.*, vol. 42, no. 3, pp. 37–40, 2016.
- [100] A. De Leonardis, V. Macciola, and M. De Felice, "Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 4, pp. 371–375, 2000.
- [101] P.-G. Pietta\*, "Flavonoids as Antioxidants," 2000.
- [102] G. Weiss and U. E. Schaible, "Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria," *Immunol. Rev.*, vol. 264, no. 1, pp. 182–203, Mar. 2015.
- [103] L. Zuo, T. Zhou, B. K. Pannell, A. C. Ziegler, and T. M. Best, "Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly," *Acta Physiol.*, vol. 214, no. 3, pp. 329–348, Jul. 2015.
- [104] P. A. Baeuerle and T. Henkel, "Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 141–179, Apr. 1994.
- [105] B. Niemann, S. Rohrbach, M. R. Miller, D. E. Newby, V. Fuster, and J. C. Kovacic, "Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 230–251, Jul. 2017.
- [106] H. Sies, "Oxidative stress: From basic research to clinical application," *Am. J. Med.*, 1991.

## Bibliographie

- [107] D. Harman, "PROLONGATION OF LIFE: ROLE OF FREE RADICAL REACTIONS IN AGING," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 17, no. 8, pp. 721–735, Aug. 1969.
- [108] A. Höhn and J. König, "Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins," *J. Proteomics*, vol. 92, pp. 132–159, Oct. 2013.
- [109] J. P. M. Melis, H. van Steeg, and M. Luijten, "Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 18, pp. 2409–2419, Jun. 2013.
- [110] K. A. Runas and N. Malmstadt, "Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers," *Soft Matter*, vol. 11, no. 3, pp. 499–505, Dec. 2015.
- [111] H. M. Hemeda and B. P. Klein, "Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts," *J. Food Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 184–185, Jan. 1990.
- [112] † P. Valentão, ‡,§ E. Fernandes, ‡ F. Carvalho, † P. B. Andrade, \*,† and R. M. Seabra, and M. L. Bastos‡, "Antioxidant Activity of Centaurium erythraea Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity," 2001.
- [113] D. Di Majo, M. La Guardia, G. Leto, M. Crescimanno, C. Flandina, and M. Giammanco, "Flavonols and flavan-3-ols as modulators of xanthine oxidase and manganese superoxide dismutase activity," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 65, no. 7, pp. 886–892, Nov. 2014.
- [114] S. K. Katiyar and H. Mukhtar, "Tea antioxidants in cancer chemoprevention," *J. Cell. Biochem.*, vol. 67, no. S27, pp. 59–67, Jan. 1997.
- [115] S. C. Pereira *et al.*, "Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension," *Atherosclerosis*, vol. 270, pp. 146–153, Mar. 2018.
- [116] Y. Li and P. Perera, "Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 6, no. 11, p. 37, Jan. 2012.
- [117] S. Mandel, O. Weinreb, T. Amit, and M. B. H. Youdim, "Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases," *J. Neurochem.*, vol. 88, no. 6, pp. 1555–1569, Feb. 2004.
- [118] M. Kessler, G. Ubeaud, and L. Jung, "Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 55, no. 1, pp. 131–142, Jan. 2003.
- [119] S. Saeidnia and M. Abdollahi, "Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 271, no. 1, pp. 49–63, Aug. 2013.

- [120] “Le marché des antioxydants naturels devrait croître à un TCAC de 9,58% au cours de la période 2017-2021: Adisseo, Archer-Daniels-Midland, Cargill, DuPont et Royal DSM – iCrowdNewswire French.” [Online]. Available: <http://www.icrowdfr.com/2017/12/26/le-marche-des-antioxydants-naturels-devrait-croitre-a-un-tcac-de-958-au-cours-de-la-periode-2017-2021-adisseo-archer-daniels-midland-cargill-dupont-et-royal-dsm/>. [Accessed: 28-Mar-2020].
- [121] “Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments.” [Online]. Available: <https://ciqual.anses.fr/>. [Accessed: 25-Apr-2020].
- [122] “Fabricants, Fournisseurs & Produits de la Chine - fr.Made-in-China.com.” [Online]. Available: <https://fr.made-in-china.com/>. [Accessed: 25-Apr-2020].
- [123] “Database on Polyphenol Content in Foods - Phenol-Explorer.” [Online]. Available: <http://phenol-explorer.eu/>. [Accessed: 25-Apr-2020].
- [124] M. Asnaashari, R. Farhoosh, and A. Sharif, “Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion,” *Food Chem.*, vol. 159, pp. 439–444, 2014.
- [125] N. Niho *et al.*, “Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 39, no. 11, pp. 1063–1070, Nov. 2001.
- [126] M. Martínez-Tomé, A. M. Jiménez, S. Ruggieri, N. Frega, R. Strabbioli, and M. A. Murcia, “Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives,” *J. Food Prot.*, vol. 64, no. 9, pp. 1412–1419, Sep. 2001.
- [127] “Catéchines dans le thé vert, blanc, et noir | Dr. Schweikart.” [Online]. Available: <https://www.thevert.com/catechines/>. [Accessed: 25-Apr-2020].
- [128] O. Fadel, K. El Kirat, and S. Morandat, “The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 12, pp. 2973–2980, Dec. 2011.
- [129] N. NOGUCHI, E. KOMURO, E. NIKI, and R. L. WILLSON, “Action of Curcumin as an Antioxidant against Lipid Peroxidation,” *J. Japan Oil Chem. Soc.*, vol. 43, no. 12, pp. 1045–1051, Dec. 1994.
- [130] J. Yang, J. Guo, and J. Yuan, “In vitro antioxidant properties of rutin,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1060–1066, Jul. 2008.
- [131] B. Dave Oomah, G. Mazza, and E. O. Kenaschuk, “Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment,” *Euphytica*, vol. 90, no. 2, pp. 163–167, 1996.

- [132] W. Herchi *et al.*, "Phenolic Compounds in Flaxseed: a Review of Their Properties and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade," *J. Oleo Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 7–14, 2014.
- [133] "Bitterness inhibitors," Dec. 1993.
- [134] Y. OZAKI and J.-P. MA, "Inhibitory effects of tetramethylpyrazine and ferulic acid on spontaneous movement of rat uterus in situ.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 38, no. 6, pp. 1620–1623, Jun. 1990.
- [135] C. Mancuso and R. Santangelo, "Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, Pergamon, pp. 185–195, 01-Mar-2014.
- [136] K. Struijs, J.-P. Vincken, R. Verhoef, W. H. M. van Oostveen-van Casteren, A. G. J. Voragen, and H. Gruppen, "The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls," *Phytochemistry*, vol. 68, no. 8, pp. 1227–1235, Apr. 2007.
- [137] L.-Q. Wang, "Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone," *J. Chromatogr. B*, vol. 777, no. 1–2, pp. 289–309, Sep. 2002.
- [138] M. Imran *et al.*, "Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside," *Nutr. J.*, vol. 14, no. 1, p. 71, Dec. 2015.
- [139] S. Ursoniu, A. Sahebkar, F. Andrica, C. Serban, and M. Banach, "Effects of flaxseed supplements on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trial," *Clin. Nutr.*, vol. 35, no. 3, pp. 615–625, Jun. 2016.
- [140] J. C. L. Tou, J. Chen, and L. U. Thompson, "Flaxseed and Its Lignan Precursor, Secoisolariciresinol Diglycoside, Affect Pregnancy Outcome and Reproductive Development in Rats," *J. Nutr.*, vol. 128, no. 11, pp. 1861–1868, Nov. 1998.
- [141] S. Acket *et al.*, "<sup>13</sup>C-metabolic flux analysis in developing flaxseed embryos to understand storage lipid biosynthesis," *Metabolites*, pp. 1–16, 2019.
- [142] S. Acket, "Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes," *Thèse Dr.*, 2015.
- [143] F. Merlier, N. Imatoukene, S. Octave, J.-M. Nicaud, and B. Thomasset, "A gas chromatography full scan high resolution Orbitrap mass spectrometry method for separation and characterization of 3-hydroxymethyl pyridine ester of fatty acids at low levels," *J. Chromatogr. A*, vol. 1575, pp. 72–79, Nov. 2018.
- [144] R. Martins-Noguerol *et al.*, "Lipidomic Analysis of Plastidial Octanoyltransferase Mutants of

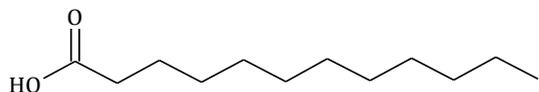
- Arabidopsis thaliana," *Metabolites*, vol. 9, no. 10, p. 209, Sep. 2019.
- [145] M. C. Chambers *et al.*, "A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics," *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 918–920, Oct. 2012.
- [146] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, and M. Orešič, "MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, no. 1, p. 395, Dec. 2010.
- [147] A. P. Carpenter, "Determination of tocopherols in vegetable oils," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 56, no. 7, pp. 668–671, Jul. 1979.
- [148] N. K. Andrikopoulos, F. N. Salta, A. Mylona, A. Chiou, and G. Boskou, "Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract," *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 13, no. 6, pp. 413–421, 2007.
- [149] V. Sánchez De Medina, F. Priego-Capote, C. Jiménez-Ot, and M. D. Luque De Castro, "Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 21, pp. 11432–11441, 2011.
- [150] "NF EN ISO 3960 - Avril 2017." [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-3960/corps-gras-d-origines-animale-et-vegetale-determination-de-l-indice-de-peroxyde-determination-avec-point-d-arret-iodometrique/article/872011/fa187652>. [Accessed: 28-Nov-2019].
- [151] "NF EN ISO 6885 - Mai 2016." [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-6885/corps-gras-d-origines-animale-et-vegetale-determination-de-l-indice-d-anisidine/article/837077/fa060309>. [Accessed: 28-Nov-2019].
- [152] "NF EN ISO 6886 - Juin 2016." [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-6886/corps-gras-d-origines-animale-et-vegetale-determination-de-la-stabilite-a-l-oxydation-essai-d-oxydation-accelere/article/837219/fa060367>. [Accessed: 28-Nov-2019].
- [153] D. Firestone, "Characteristics of Oils and Fats of Plant Origin," *Phys. Chem. Charact. Oils, Fats, Waxes*, 2013.
- [154] J. Lambert, "Les huiles végétales," 2005. [Online]. Available: <https://www.societal.org/mada/LeshuilesvegetalesIFHVP121205.pdf>.
- [155] T. LABUZA and L. TP, "ENTHALPY, ENTROPY COMPENSATION IN FOOD REACTIONS," *Food*

- Technol.*, 1980.
- [156] R. Farhoosh and S. Z. Hoseini-Yazdi, "Evolution of oxidative values during kinetic studies on olive oil oxidation in the Rancimat test," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 91, no. 2, pp. 281–293, Feb. 2014.
- [157] S. Gharby, H. Harhar, R. Mamouni, B. Matthaüs, E. H. Ait Addi, and Z. Charrouf, "Chemical Characterization and Kinetic parameter determination under Rancimat test conditions of four monovarietal virgin olive oils grown in Morocco," *OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids*, vol. 23, no. 4, 2016.
- [158] E. Symoniuk, K. Ratusz, and K. Krygier, "Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 11, pp. 3986–3995, Nov. 2016.
- [159] B. Kowalski, K. Ratusz, D. Kowalska, and W. Bekas, "Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat measurements," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 106, no. 3, pp. 165–169, 2004.
- [160] A. Chiou, N. Kalogeropoulos, P. Efstathiou, M. Papoutsi, and N. K. Andrikopoulos, "French Fries oleuropein content during the successive deep frying in oils enriched with an olive leaf extract," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1165–1171, Jun. 2013.
- [161] V. Sánchez de Medina, F. Priego-Capote, and M. D. Luque de Castro, "Characterization of Refined Edible Oils Enriched with Phenolic Extracts from Olive Leaves and Pomace," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 23, pp. 5866–5873, Jun. 2012.
- [162] "Dynamic Viscosity of common Liquids." [Online]. Available: [https://www.engineeringtoolbox.com/absolute-viscosity-liquids-d\\_1259.html](https://www.engineeringtoolbox.com/absolute-viscosity-liquids-d_1259.html). [Accessed: 28-Nov-2019].
- [163] P. C. Zuta, B. K. Simpson, X. Zhao, and L. Leclerc, "The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation of mackerel oil," *Food Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 800–807, 2007.
- [164] P. Pearson, S. A. Lewis, J. Britton, I. S. Young, and A. Fogarty, "The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo," *BioDrugs*, vol. 20, no. 5, pp. 271–273, 2006.
- [165] K.-H. Wagner and I. Elmadfa, "Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 624–629, Oct. 2000.

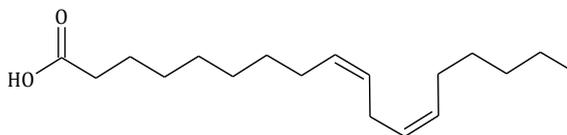
- [166] D. Akbik, M. Ghadiri, W. Chrzanowski, and R. Rohanizadeh, "Curcumin as a wound healing agent," *Life Sciences*. 2014.
- [167] M. Deak and H. Falk, "On the Chemistry of the Resveratrol Diastereomers," *Monatshefte fur Chemie*, vol. 134, no. 6, pp. 883–888, Jun. 2003.
- [168] T. S. Figueiras, M. T. Neves-Petersen, and S. B. Petersen, "Activation energy of light induced isomerization of resveratrol," *J. Fluoresc.*, vol. 21, no. 5, pp. 1897–1906, Sep. 2011.
- [169] Z. Lu, G. Nie, P. S. Belton, H. Tang, and B. Zhao, "Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives," *Neurochem. Int.*, 2006.
- [170] S. W. Huang and E. N. Frankel, "Antioxidant Activity of Tea Catechins in Different Lipid Systems," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 3033–3038, 1997.
- [171] U. N. Wanasundara and F. Shahidi, "Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils," *Food Chem.*, vol. 63, no. 3, pp. 335–342, Nov. 1998.
- [172] L. Socrier *et al.*, "Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action," *Food Chem.*, vol. 274, pp. 651–658, Feb. 2019.
- [173] J. S. Kim, M. J. Kim, and J. H. Lee, "The critical micelle concentration of lecithin in bulk oils and medium chain triacylglycerol is influenced by moisture content and total polar materials," *Food Chem.*, vol. 261, pp. 194–200, Sep. 2018.
- [174] Y. Li *et al.*, "Comprehension of direct extraction of hydrophilic antioxidants using vegetable oils by polar paradox theory and small angle X-ray scattering analysis," *Food Chem.*, vol. 173, pp. 873–880, Apr. 2015.
- [175] R. Barret, "Importance and Evaluation of the Polar Surface Area (PSA and TPSA)," in *Therapeutical Chemistry*, Elsevier, 2018, pp. 89–95.
- [176] E. Symoniuk, K. Ratusz, and K. Krygier, "Oxidative stability and the chemical composition of market cold-pressed linseed oil," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 119, no. 11, p. 1700055, Nov. 2017.
- [177] E. F. S. M. Ramalho *et al.*, "Use of different techniques in the evaluation of the oxidative stability of poultry fat biodiesel," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 106, no. 3, pp. 787–791, 2011.
- [178] J. Ou, M. Wang, J. Zheng, and S. Ou, "Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods," *Food Chemistry*. 2019.
- [179] S. Wachtel-Galor, K. W. Wong, and I. F. F. Benzie, "The effect of cooking on Brassica vegetables," *Food Chem.*, vol. 110, no. 3, pp. 706–710, 2008.

- [180] O. C. Adebooye, A. M. Alashi, and R. E. Aluko, "A brief review on emerging trends in global polyphenol research," *J. Food Biochem.*, vol. 42, no. 4, pp. 1–7, 2018.
- [181] D. Michotte, H. Rogez, R. Chirinos, E. Mignolet, D. Campos, and Y. Larondelle, "Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds," *Food Chem.*, vol. 129, no. 3, pp. 1228–1231, Dec. 2011.
- [182] S. Guo, Y. Ge, and K. Na Jom, "A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.)," *Chem. Cent. J.*, vol. 11, no. 1, p. 95, Sep. 2017.
- [183] A. E.-D. A. Bekhit *et al.*, "Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 13, pp. 129–152, Jan. 2018.
- [184] S. A. Adefegha, G. Oboh, I. I. Ejakpovi, and S. I. Oyeleye, "Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective," *Comp. Clin. Path.*, vol. 24, no. 6, pp. 1579–1585, Nov. 2015.
- [185] S. Esposto *et al.*, "Effect of an olive phenolic extract on the quality of vegetable oils during frying," *Food Chem.*, 2015.
- [186] B. Aydeniz and E. Yilmaz, "Performance of different natural antioxidant compounds in frying oil," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 1, pp. 21–30, 2016.
- [187] Y. Z. Cai, Mei Sun, Jie Xing, Q. Luo, and H. Corke, "Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants," *Life Sci.*, 2006.
- [188] FranceAgriMer, "Combien de végétariens en Europe ?," 2018.

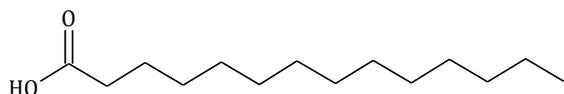
## ANNEXES



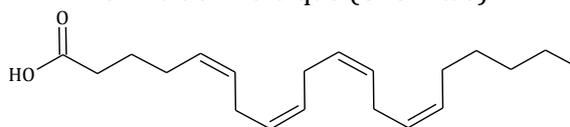
1 : Acide laurique (C12:0)



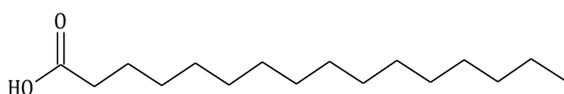
6 : Acide linoléique (C18:2 ω6)



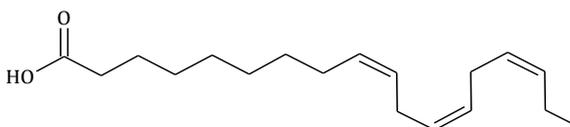
2 : Acide myristique (C14:0)



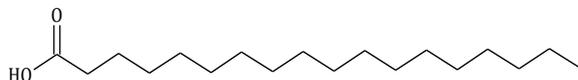
7 : Acide arachidonique (C20:4 ω6)



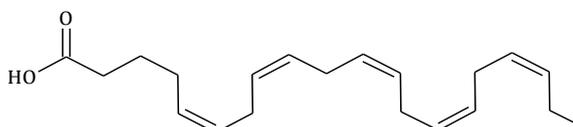
3 : Acide palmitique (C16:0)



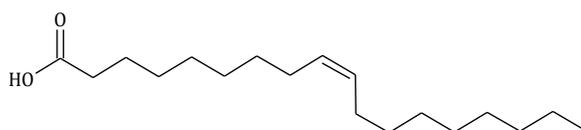
8 : Acide α-linolénique (C18:3 ω3)



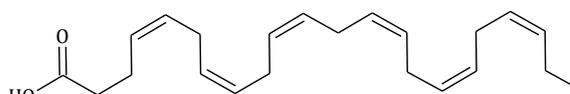
4 : Acide stéarique (C18:0)



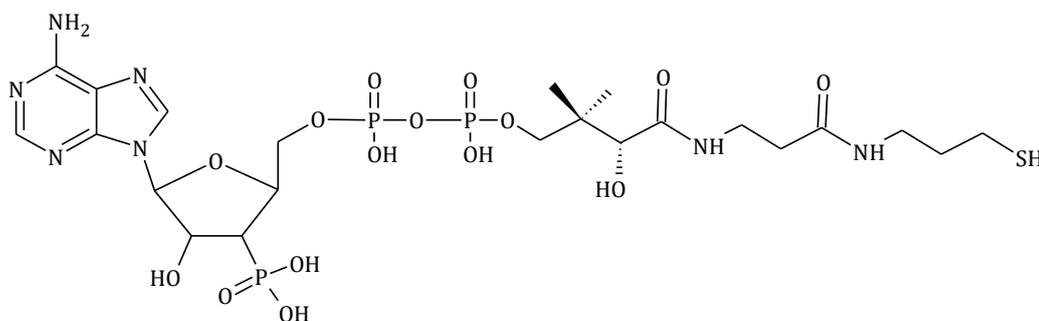
9 : Acide eicosapentaénoïque (C20:5 ω3)



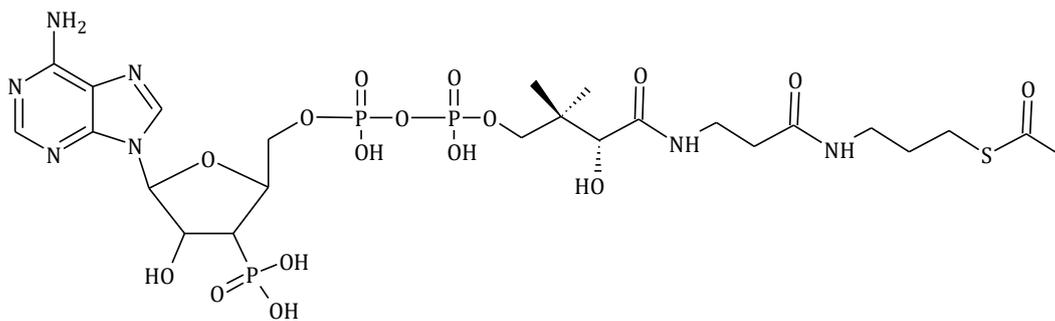
5 : Acide oléique (C18:1 ω9)



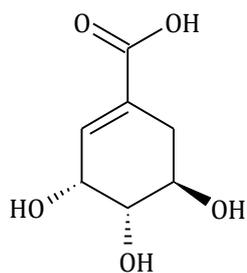
10 : Acide docosahexaénoïque (C22:6 ω3)



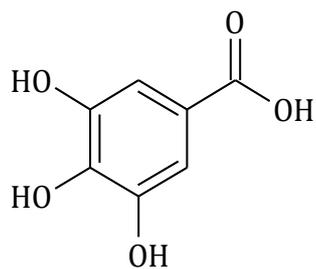
11 : Coenzyme A



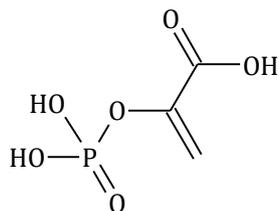
12 : Acétyl-CoA



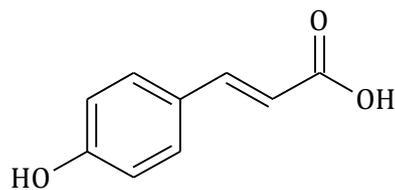
13 : Acide shikimique



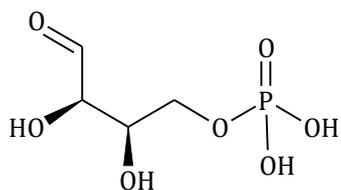
17 : Acide gallique



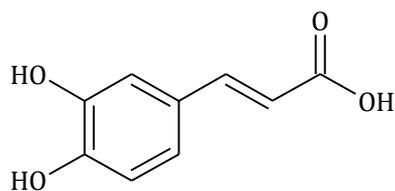
14 : Phosphoénolpyruvate



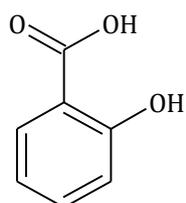
18 : Acide coumarique



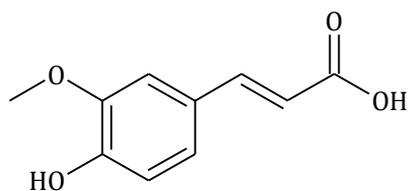
15 : Erythrose-4-phosphate



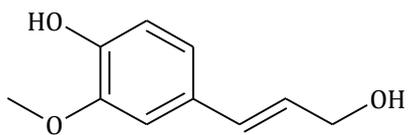
19 : Acide caféique



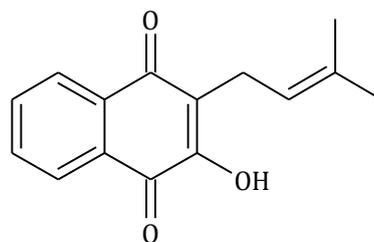
16 : Acide salicylique



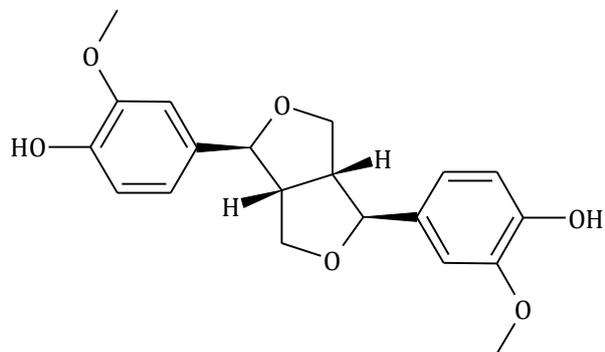
20 : Acide férulique



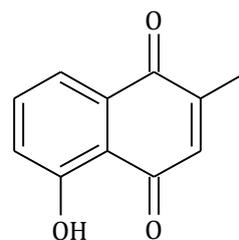
21 : Alcool coniférylique



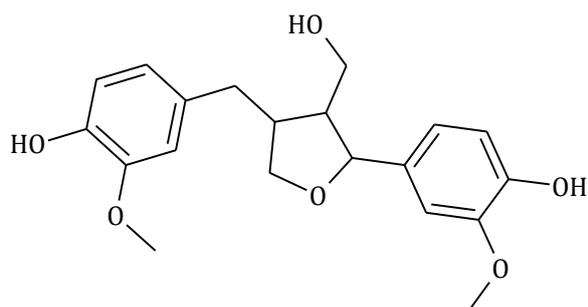
25 : Lapachol



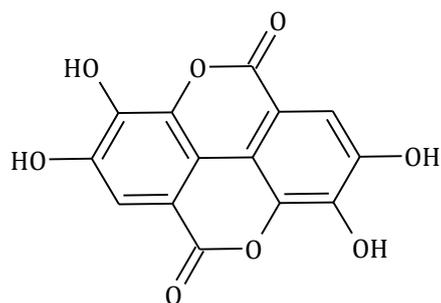
22 : Pinorésinol



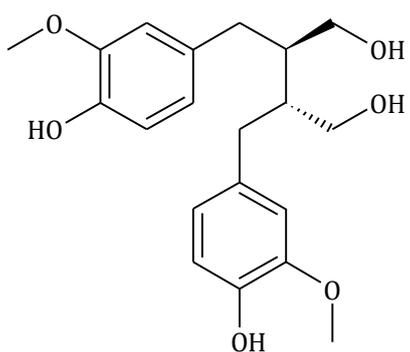
26 : Plumbagine



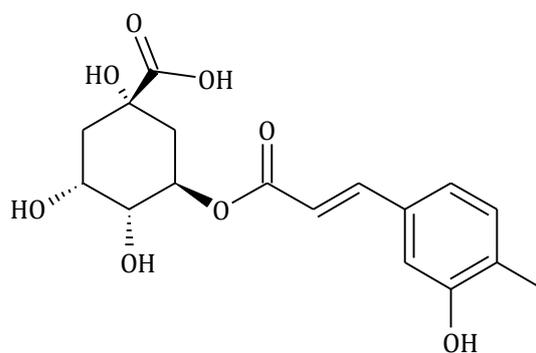
23 : Laricirésinol



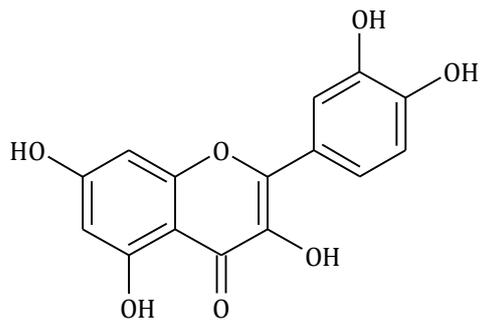
27 : Acide ellagique



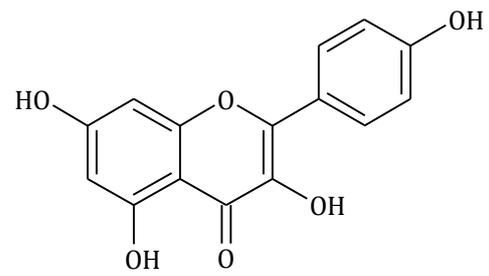
24 : Sécoisolaricirésinol



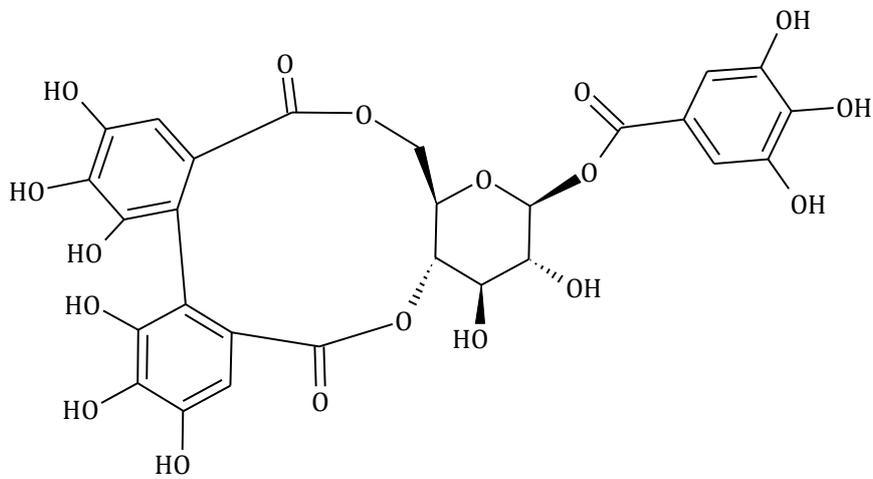
28 : Acide chlorogénique



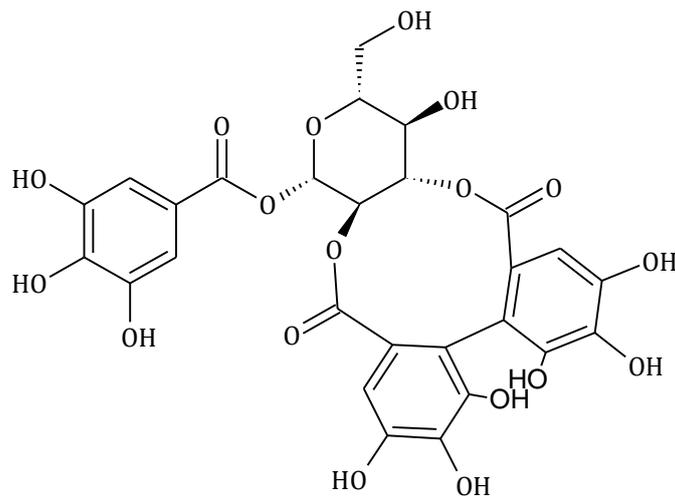
**29** : Quercétine



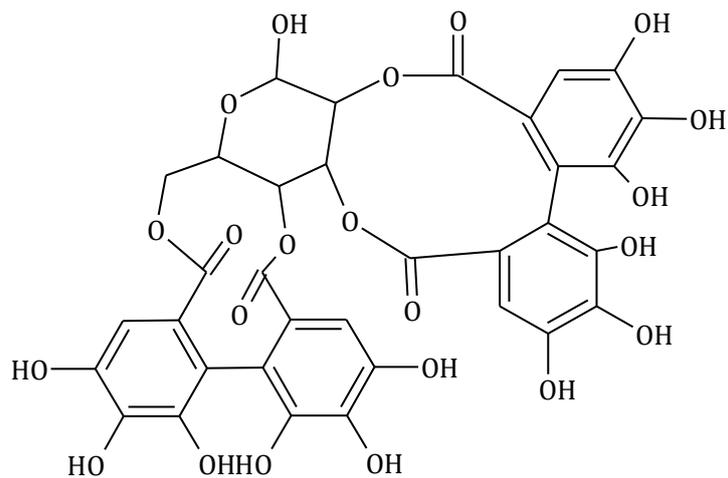
**30** : Kaempférol



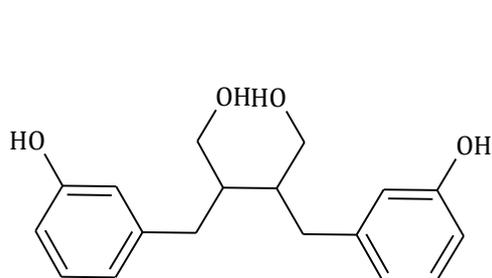
**31** : Strictinine



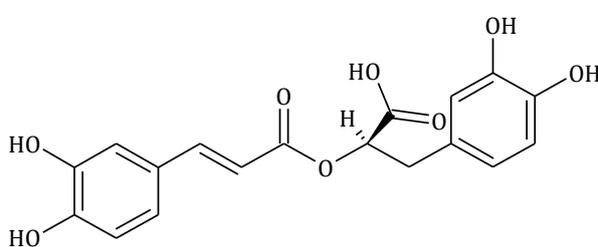
**32** : Isostrictinine



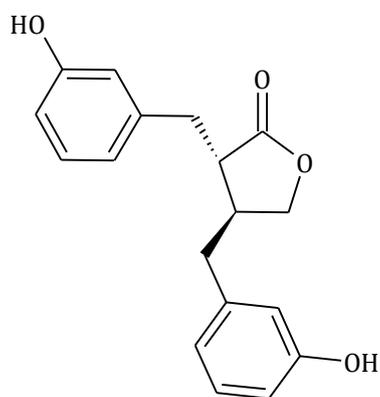
33 : Pédonculagine



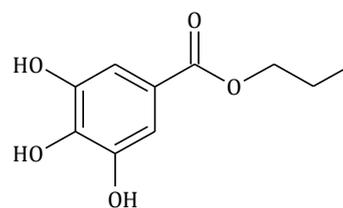
34 : Entérodol



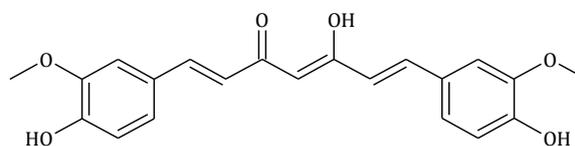
36 : Acide rosmarinique



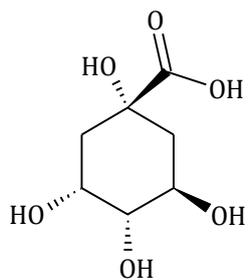
35 : Entérolactone



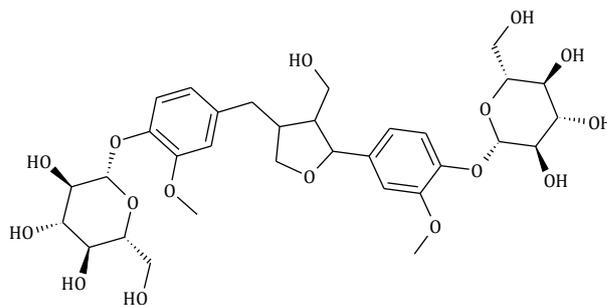
37 : Gallate de propyle



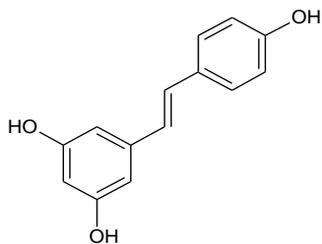
38 : Curcumine



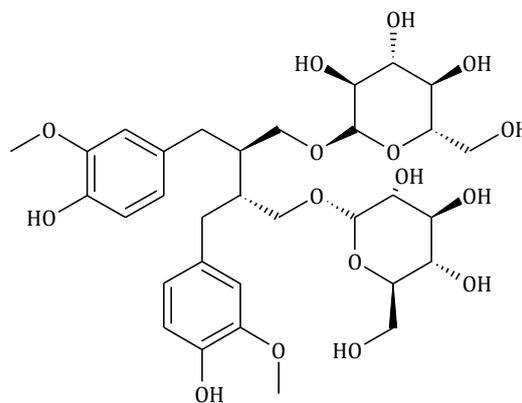
39 : Acide quinique



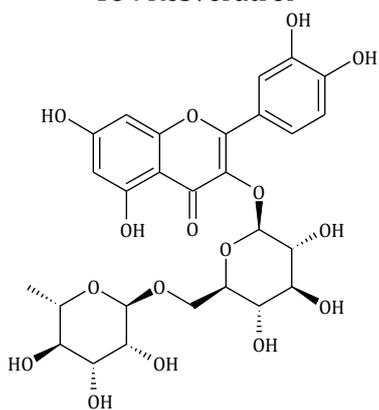
43 : Laricirésinol di-glucoside



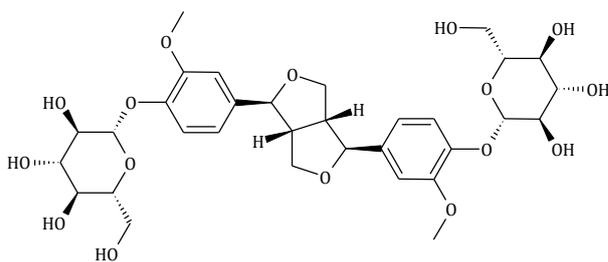
40 : Resvératrol



44 : Sécoisolaricirésinol di-glucoside

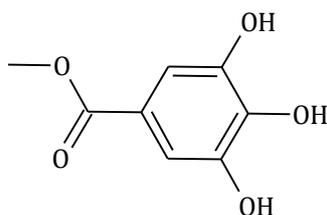


41 : Rutoside

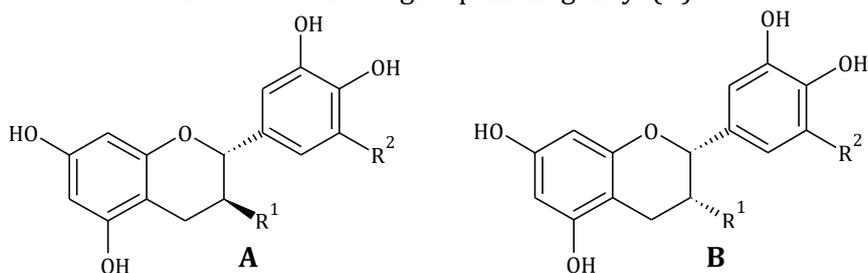


42 : Pinorésinol di-glucoside

## Structure des catéchines :

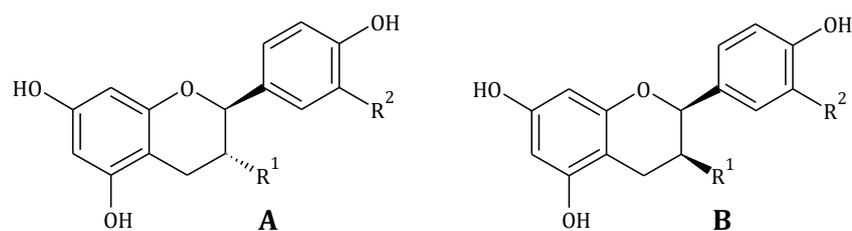


45 : Structure du groupement galloyl (G).



46 : Structures des (+) catéchines (A) et des (-) catéchines (B).

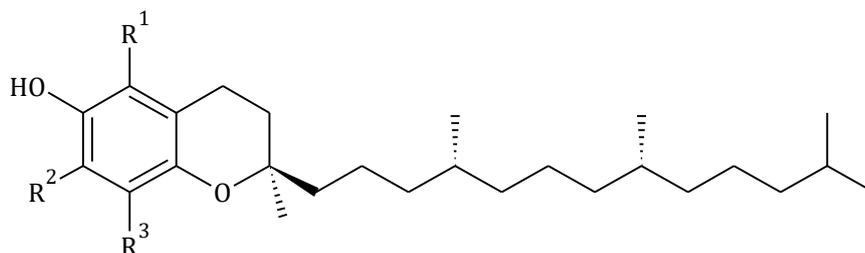
Composés	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
Catéchine (C)	OH	H
Galloatéchine (GC)	OH	OH
Catéchine gallate (CG)	G	H
Galloatéchine gallate (GCG)	G	OH



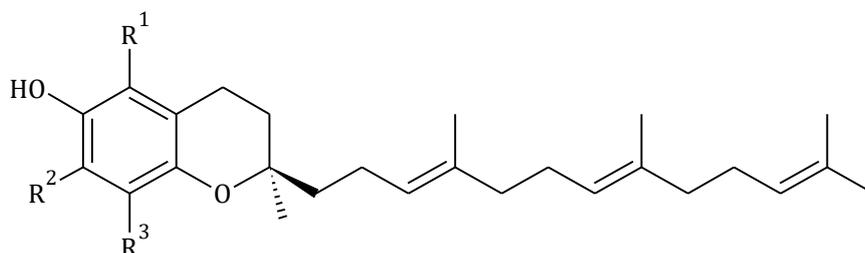
47 : Structures des (+) épicatechines (A) et des (-) épicatechines (B).

Composés	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
Epicatechine (EC)	OH	H
Epigalloatéchine (EGC)	OH	OH
Epicatechine gallate (ECG)	G	H
Epigalloatéchine gallate (EGCG)	G	OH

## Vitamine E :



48 : Structure des tocophérols



49 : Structure des tocotriénols

## Substituants des isomères de la vitamine E :

Substituants			Tocophérol	Tocotriénol
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α-tocophérol	α-tocotriénol
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	β-tocophérol	β- tocotriénol
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	γ-tocophérol	γ- tocotriénol
H	H	CH <sub>3</sub>	δ-tocophérol	δ- tocotriénol