

## Caractéristiques qualitatives des huiles

### 1.2.1 Données physico-chimiques

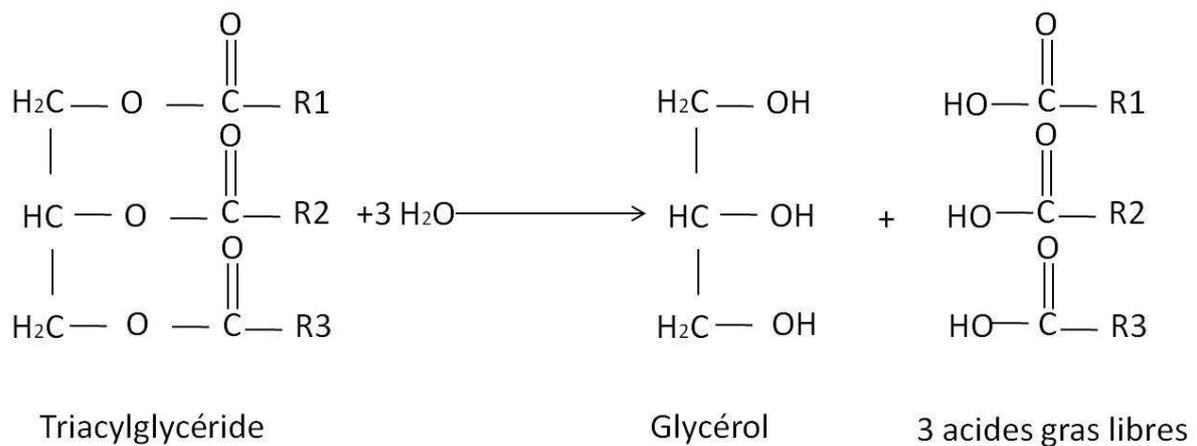
Le CNUCED propose une classification rapide des huiles en fonction de leur acidité libre. Cependant les critères de sélection ou d'exclusion d'une huile dans une catégorie sont très nombreux. Ils peuvent être spécifiques à une catégorie d'huile ou plus généraux. Le suivi de ces différents critères est nécessaire car une dégradation de la qualité de l'huile peut avoir de nombreuses conséquences tant d'un point de vue nutritionnel que d'un point de vue risque sanitaire. En effet, certains composés tels que les acides gras poly-insaturés (acides gras essentiels) ou la vitamine E sont parmi les acteurs principaux de l'intérêt nutritionnel de l'huile d'olive, mais ils sont très sensibles à l'oxydation. Une huile oxydée aura un intérêt nutritionnel plus faible qu'une huile bien conservée. Les produits d'oxydation des acides gras (radicaux peroxydes) pourraient potentiellement entraîner des mutations génétiques à l'origine de certains cancers (voir 1.4).

**Tableau 4 :** Données physico-chimiques de classification des huiles (Food and Agriculture Organization (FAO), 2001 et Codex Alimentarius, 1989)

	Densité relative (à 20°C)	Acidité (% acide oléique)	Indice peroxyde (meq O <sub>2</sub> /kg)	Extinction spécifique à 270 nm E <sub>1cm</sub> <sup>%</sup>	Acides gras saturé en position 2 (%)
Huile d'olive vierge extra		<1	<20	<0,25	<1,5
Huile d'olive vierge		<2	<20	<0,3	<1,5
Huile d'olive vierge ordinaire	0,910	<3,3	<20	<0,3	<1,5
Huile d'olive raffinée	- 0,916	<0,3	<5	<1,1	<1,8
Huile d'olive		<1,5	<15	<0,9	-
Huile de grignon d'olive raffinée		<1,5	<5	<2,0	<2,2
Huile de grignon d'olive		<1,5	<15	<1,7	-

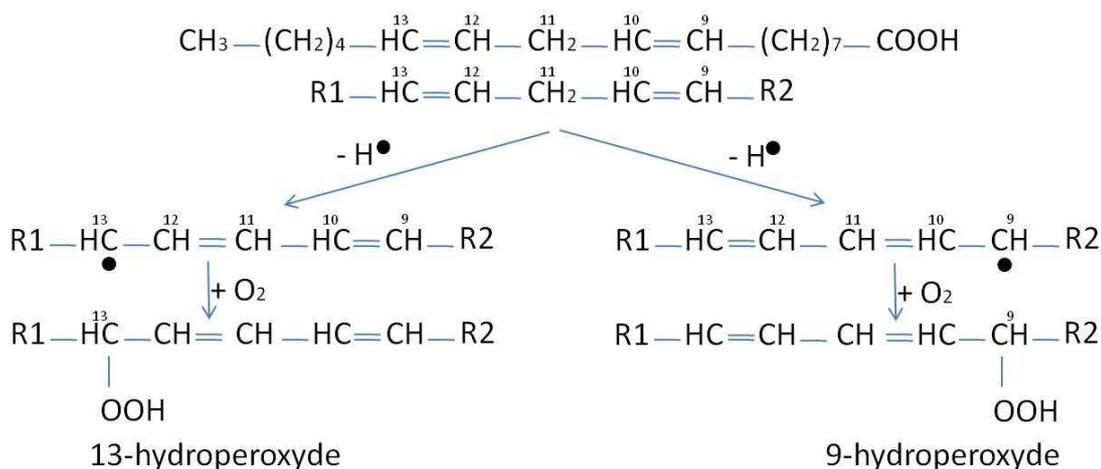
A la lecture du tableau 4, on peut remarquer que l'huile d'olive considérée doit avoir une densité comprise entre 910 et 916 g par litre. Les calculs dans les tableaux de résultats présentés ultérieurement incluront donc la relation 1 L d'huile équivaut à 913 g d'huile pour tous les résultats exprimés en kg.

Dans une huile, les acides gras naturels sont essentiellement présents sous forme de triglycérides (98-99%). L'hydrolyse de ces derniers libère les acides gras (Figure 19) donc leur dosage permet d'avoir un état de l'avancement de la dégradation de l'huile. On remarque que c'est le principal critère distinctif entre les huiles commercialisées car les trois catégories d'huile vierge ont des seuils de qualité différents. Les seuils de tolérance sont plus faibles sur les huiles raffinées car cette étape doit supprimer presque toute trace d'acides gras libres.



**Figure 19** : Hydrolyse du glycérol et libération des acides gras

L'oxydation des acides gras insaturés aboutit à la formation d'hydroperoxydes (Figure 20). Cette étape est aussi appelée initiation de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes sont instables et peuvent réagir avec d'autres molécules pour générer de nouveaux radicaux. Ceci constitue l'étape de propagation dans la peroxydation des acides gras. Topallar *et coll.* ont démontré en 1997 que l'oxydation des acides gras dépend directement de la capacité de l'oxygène à réagir avec les radicaux peroxydes. Leur dosage permet donc d'avoir un état de l'avancement ou non de l'oxydation de l'huile.



**Figure 20** : Auto-oxydation d'acide linoléique (Frankel, 1984)

L'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet fournit des informations complémentaires sur la qualité d'une huile. Le coefficient d'extinction à 270 nm est un bon révélateur de la teneur de l'huile en peroxyde. Cette analyse peut donc venir en complément de la précédente ou peut intervenir en amont afin de vérifier si un dosage précis des hydroperoxydes est nécessaire.

Ces trois analyses (acidité libre, valeur peroxyde et examen à spectrophotométrique à 270 nm) sont rapides et nécessitent peu de matériel onéreux. Il est donc possible de connaître rapidement l'état général de la qualité de l'huile d'olive à analyser. Les normes de qualité en industries agroalimentaires étant de plus en plus rigoureuses, d'autres critères doivent cependant être pris en considération (Tableau 5).

**Tableau 5** : Caractéristiques complémentaires des huiles d'olive (Codex Alimentarius, 1989)

	Indice de réfraction ( $n_D$ 20°C)	Indice de saponification (mg KOH/g)	Indice d'iode (Wijs)	Insaponifiable	Cires
Huile d'olive vierge	1,4677-	184-196	75-94	<15g/kg	<250
Huile d'olive raffinée	1,4705				<350
Huile de grignon d'olive raffinée	1,4680-1,4707	182-193	75-92	<25 g/kg	<350

Des dispositions sur la teneur des huiles en métaux lourds et métaux de transition sont également à prendre en compte car ceux-ci, même à l'état de traces, peuvent servir de catalyseur pour des réactions d'oxydation et donc faciliter la dégradation des huiles. La commission du codex alimentarius a également établi des limites maximales de résidu pour ce qui concerne les pesticides dans l'huile.

Si la caractérisation physico-chimique des huiles d'olive est une étape essentielle dans la classification des huiles, elle n'est pas suffisante. En effet les caractères organoleptiques sont également à respecter :

- l'huile d'olive vierge est une huile claire, de couleur jaune à vert, d'odeur et de saveur spécifiques, exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

- l'huile d'olive raffinée est une huile claire, limpide, sans sédiment, de couleur jaune clair, sans odeur ou saveur spécifique et exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

- l'huile de grignons d'olive raffinée est une huile claire, limpide, sans sédiment, de couleur jaune clair à jaune brun, sans odeur ou saveur spécifique et exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

De manière générale, pour être catégorisée en huile d'olive vierge extra, une huile ne doit présenter aucun défaut organoleptique, une très faible acidité et un très faible état d'oxydation. Ces caractéristiques assurent au consommateur l'achat d'un produit de qualité qui se conservera bien dans le temps.

### 1.2.2 Caractéristiques sensorielles

Une simple analyse chimique ne peut suffire pour déterminer la qualité d'une huile. En effet, les composés volatiles qui se développent au cours du procédé de fabrication de l'huile puis pendant son stockage sont capables de modifier l'odeur et la saveur de l'huile. Pour cela une analyse sensorielle codifiée et détaillée a été développée par le COI et la Communauté Economique Européenne (CEE). Les attributs sensoriels d'une huile ont été classés en deux catégories : les attributs positifs et les défauts.

Il existe 3 grands attributs positifs (COI, 2007):

- Amer : il est défini comme le goût élémentaire caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de la véraison, perçu par les papilles caliciformes formant le V lingual.
- Fruité : ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits sains et frais, perçues par voie directe ou rétronasale. Le fruité vert correspond aux caractéristiques rappelant les fruits verts à l'inverse du fruité mûr qui témoigne d'une récolte des olives plus tardive.
- Piquant : sensation tactile de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes, pouvant être perçue dans toute la cavité buccale, en particulier dans la gorge.

Toute caractéristique autre que ces trois attributs sera perçue comme un défaut de l'huile. Il est à noter que pour être classée comme « huile d'olive vierge extra », l'huile ne doit présenter aucun de ces défauts. Les principaux défauts sont :

- Chômé/lies : flaveur caractéristique de l'huile tirée d'olives entassées ou stockées dans des conditions telles qu'elles se trouvent dans un état avancé de fermentation anaérobie, ou de l'huile restée en contact avec les « boues » de décantation, ayant elles aussi subi un processus de fermentation anaérobie, dans les piles et les cuves.
- Moisi/humide : flaveur caractéristique d'une huile obtenue d'olives attaquées par des moisissures et des levures par suite d'un stockage des fruits pendant plusieurs jours dans l'humidité.
- Vineux/vinaigré ou acide/aigre : flaveur caractéristique de certaines huiles rappelant le vin ou le vinaigre. Cette flaveur est due fondamentalement à un processus de fermentation aérobie des olives ou des restes de pâte d'olive dans des scourtins qui n'auraient pas été lavés correctement, qui donne lieu à la formation d'acide acétique, acétate d'éthyle et éthanol.
- Métallique : flaveur qui rappelle les métaux. Elle est caractéristique de l'huile qui est demeurée longtemps en contact avec des surfaces métalliques, au cours du procédé de broyage, de malaxage, de pression ou de stockage.
- Rance : flaveur des huiles ayant subi un processus d'oxydation intense

D'autres attributs négatifs moins courants ont également été décrits par le Comité Oléicole International. Parmi ceux-ci le cuit ou brûlé (dû à un réchauffement excessif et prolongé de la pâte lors du malaxage), le « vers » (olives ayant subi une attaque de la mouche de l'olivier, *Bactrocera Oleae*) ou encore le bois humide (olive ayant subi une congélation sur l'arbre avant récolte).

## 1.3 Composition générale des huiles d'olive

Les huiles d'olive vierges jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et sont importantes en nutrition humaine pour plusieurs raisons. En premier lieu car les lipides sont la principale source d'énergie pour le corps humain en comparaison de leur masse. De plus l'intérêt pour les huiles d'olive a été accru depuis la découverte de leur richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Elles sont également une source importante d'acides gras poly-insaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain. Si les acides gras sont les constituants majeurs de l'huile d'olive, ce sont les constituants mineurs qui permettent l'authentification d'une huile, tant sur le plan de la provenance géographique que sur sa qualité physico-chimique.

### 1.3.1 Les acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides. Ces lipides contiennent une fraction principale dite saponifiable (phospholipides, triglycérides) et une fraction mineure insaponifiable (stérols, vitamines liposolubles, caroténoïdes). Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et la solubilité dans les solvants organiques.

Les acides gras sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxyle. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison carbone-carbone, dans ce cas les acides gras sont dits « saturés ». Elle peut également contenir une double liaison (acides gras monoinsaturés AGMI) ou plusieurs doubles liaisons (acides gras polyinsaturés AGPI). Pour les acides gras insaturés, ils sont souvent référencés selon la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyl terminal. Il existe 2 grandes familles d'AGPI : la série en n-6 (ou oméga 6) et la série n-3 (ou oméga 3). Dans l'huile d'olive on trouve de l'acide linoléique (oméga 6) et de l'acide alpha-linolénique (oméga 3). Ces acides gras sont dits « essentiels » car ils ne peuvent pas

être synthétisés par l'homme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans la nature, les acides gras sont généralement sous forme de triesters entre des acides gras et du glycérol selon la formule :



Dans le cas de l'huile d'olive les triacylglycérides représentent entre 98% et 99% de la masse totale. Quelques rares acides gras libres peuvent être trouvés et témoignent d'une oxydation du triester. La composition en acide gras est très variable et dépend de la variété d'olives, la région de production et de l'année de la récolte (influence des conditions environnementales). Des normes telles que celle du codex alimentarius régulent cependant cette variabilité en plaçant des limites hautes et basses sur les proportions de chacun des acides gras (Tableau 6).

**Tableau 6** : Composition en acide gras d'une huile d'olive selon les résultats d'Ollivier *et coll.* (2003) et selon la norme du codex alimentarius

Acide gras	Formule brute	Ollivier et coll. (%)	Codex alimentarius (%)
Acide myristique	C14:0	Tr	<0,1
Acide palmitique	C16:0	7,5-15,6	7,5-20
Acide sapiénique	C16:1n-9	0,1-0,2	0,3-3,5
Acide palmitoléique	C16:1n-7	0,3-1,9	
Acide margarique	C17:0	<0,3	<0,5
Acide margaroléique	C17:1n-8	<0,5	<0,6
Acide stéarique	C18:0	1,4-3,4	0,5-5
Acide oléique	C18:1n-9	60,9-82,1	55-83
Acide vaccénique	C18:1n-7	0,7-3,6	-
Acide linoléique	C18:2n-6	4,5-16,1	3,5-21
Acide $\alpha$ -linoléique	C18:3n-3	0,4-1,2	<1,5
Acide arachidonique	C20:0	0,3-0,5	<0,8
Acide gadoléique	C20:1n-9	0,2-0,5	-
Acide béhénique	C22:0	<0,2	<0,2
Acide lignocérique	C24:0	<0,1	<1

Cx:yn-z où x est le nombre de carbones, y le nombre de double liaisons, z la position de la double liaison en partant du méthyle terminal. tr = traces.

Les travaux de cette thèse ayant été réalisés en France, le tableau 6 montre les valeurs obtenues par Ollivier *et coll.* (2003) pour des huiles uniquement produites en France. Cette étude est représentative de ce que l'on peut produire sur le territoire français car elle résulte de l'analyse de 564 échantillons d'huile, prélevés sur quatre campagnes consécutives et sur cinq variétés d'olives.

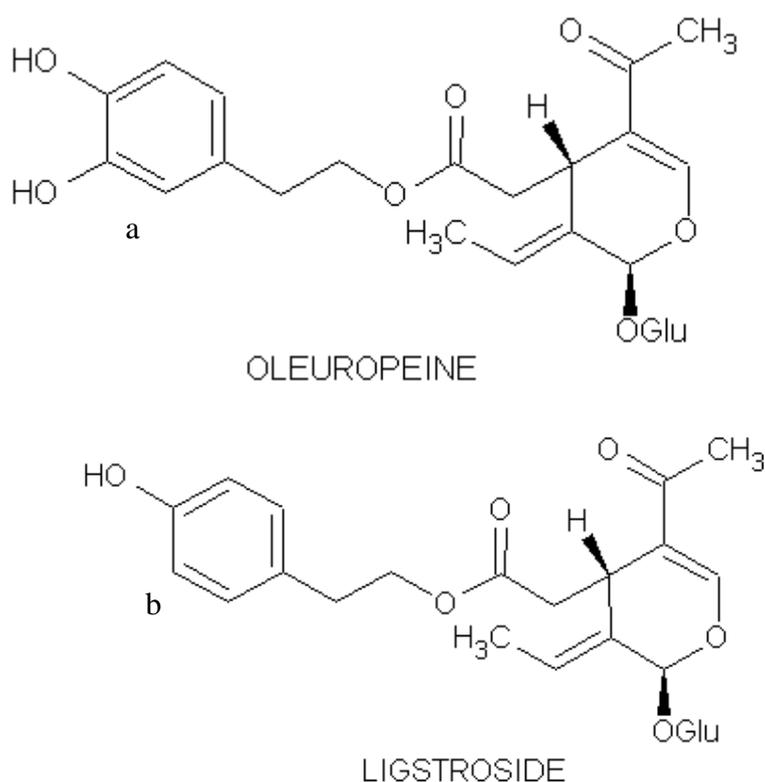
La variabilité en acides gras est relativement importante, mais en moyenne, l'huile d'olive vierge se compose à 72% d'acides gras mono-insaturés (AGMI), 14% d'acides gras poly-insaturés (AGPI) et 14% d'acides gras saturés (AGS) (Harwood, 2000). L'acide gras majoritaire est l'acide oléique qui représente à lui seul près de 70% des acides gras. Les acides gras poly-insaturés représentent une fraction non négligeable de l'huile et sont majoritairement composés d'acide linoléique. Les acides gras insaturés sont généralement de configuration *cis*, mais certains acides gras peuvent présenter une configuration spatiale *trans*, notamment dans les produits issus de transformations industrielles. L'isomérisation *cis-trans* se fera d'autant plus facilement que l'acide gras sera insaturé et que le traitement thermique sera poussé (Judd, 1994). Des risques cardiovasculaires sont associés à l'absorption de ces acides en grande quantité, cependant les acides gras *trans* d'origine naturelle semblent non nocifs pour la santé humaine (Motard-Bélanger, 2003). En France les industries agroalimentaires doivent limiter la proportion d'acides gras *trans* à 1g/100g de produit alimentaire (recommandation AFSSA, 2005).

### 1.3.2 Les composés phénoliques

Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition de l'huile d'olive en terme de masse, les composés mineurs tels que les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles et pour leur intérêt nutritionnel (Brenes, 2002 ; Visioli, 1998). L'huile d'olive contient des composés phénoliques simples et complexes qui augmentent sa stabilité et lui confère des propriétés antioxydantes et modulent sa saveur (Fedeli, 1977). Les composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles (Brenes, 2000). Mais si les composés phénoliques sont aujourd'hui au centre de nombreuses études, c'est surtout pour leur potentiel en matière de prévention de la santé humaine (Garcia, 2010 ; Vierhuis, 2001).

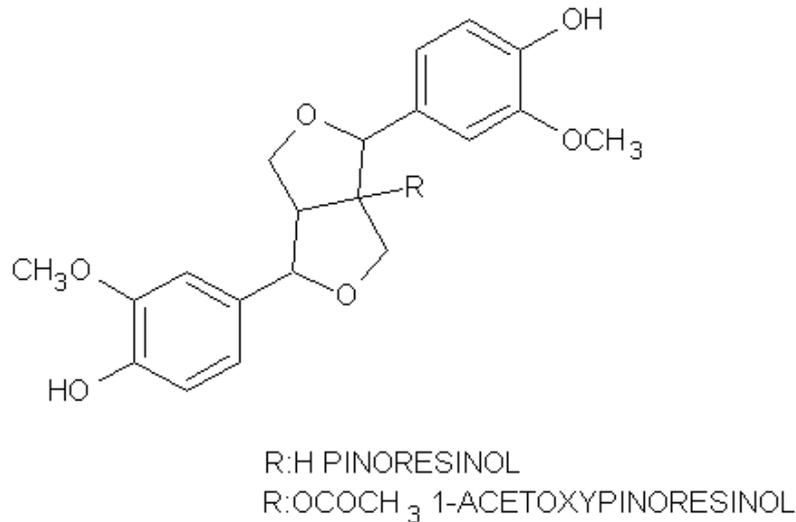
Différentes familles de composés phénoliques sont présentes dans les olives et dans les huiles :

- Les dérivés sécoiridoides qui sont des composés glycosylés issus du métabolisme secondaire des terpènes (Soler, 2000). Parmi eux, l'oleuropéine (Figure 21a) est le composé majoritaire dans les feuilles d'olivier et dans les olives et c'est le principal responsable de l'amertume des olives (Andrews, 2003 ; Soler, 2000 ; Shasha, 1961). Le ligstroside (un groupement hydroxyle de moins que l'oleuropéine) (Figure 21b) est également présent en grande quantité dans l'olive. Cependant, lors de la transformation en huile d'olive, ces molécules sont hydrolysées en de nombreux dérivés de masses moléculaires très variables, les plus grosses molécules résiduelles étant leurs dérivés aglycones.



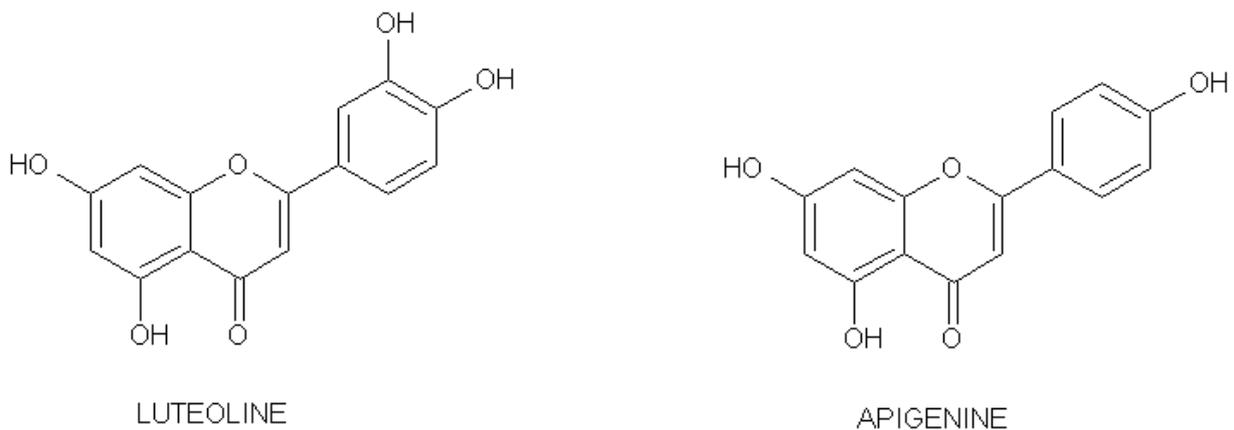
**Figure 21** : Structure de l'oleuropéine (a) et du ligstroside (b)

- les lignanes telles que le pinorésinol, l'acétopinorésinol et l'acide élenolique sont également détectées dans les huiles (Yang, 2007 ; Brenes, 2000) (Figure 22).



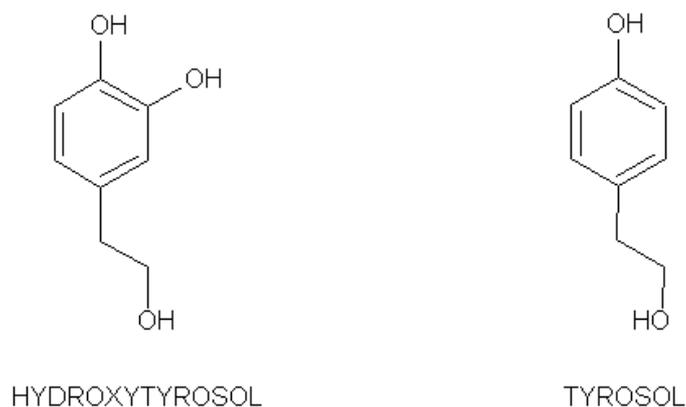
**Figure 22 :** Structure du pinorésinol et de l'acétoxypinorésinol

- des flavonoïdes font également partie des composés majoritaires trouvés dans l'huile, il s'agit de l'apigénine et de la lutéoline (Ocakoglu, 2009 ; Murkovic, 2004 ; Ryan, 2003) (Figure 23).

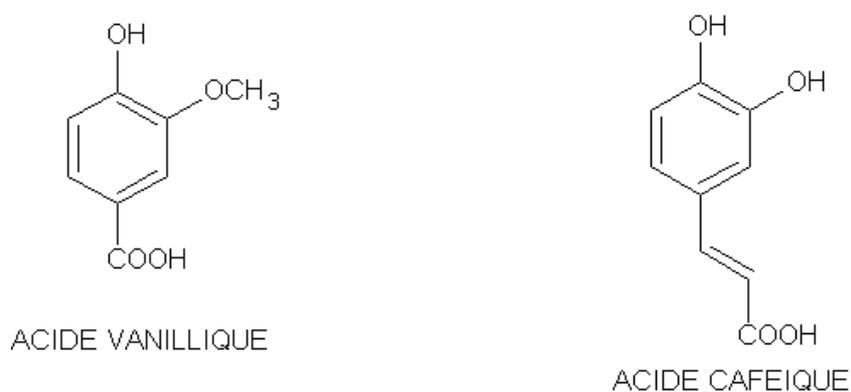


**Figure 23 :** Structure de la lutéoline et de l'apigénine

- les phénols simples : deux sous catégories avec les alcools phénoliques (Figure 24) et les acides phénoliques (Figure 25). Dans le premier groupe on retrouve l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Romero, 2002 ; Mazza, 1993 ; Macheix, 1990). Ces deux composés sont directement dérivés de l'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside. Dans le groupe des acides phénoliques on peut citer l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique ou encore l'acide vanillique qui sont également généralement retrouvés dans les huiles (Yang, 2007 ; Pinelli, 2003 ; Garcia, 2003 ; Tuck, 2002 ; Ryan, 1998).



**Figure 24 :** Structure de deux alcools phénoliques : l'hydroxytyrosol et le tyrosol



**Figure 25 :** Structure de deux acides phénoliques : l'acide vanillique et l'acide caféique.

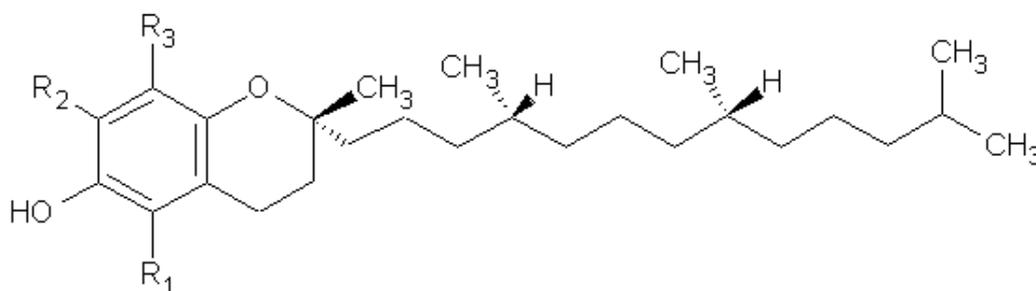
Les composés phénoliques sont très variables d'une huile à une autre, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Il est généralement admis que l'activité phénolique se situe entre 200 et 600 mg d'équivalents d'acide gallique par litre d'huile. Si la composition phénolique peut servir de marqueur pour l'identification des huiles c'est parce que l'origine géographique a une forte influence sur le développement de certains phénols (Vinha, 2005). Le second facteur influençant la composition phénolique est la culture de l'olivier, notamment les systèmes d'entretien des arbres ou les systèmes d'irrigation (Gomez, 2009). En effet, un stress hydrique engendrera une plus grande richesse des huiles en composés phénoliques. Si l'entretien des parcelles ainsi que les systèmes d'irrigation peuvent être optimisés ou standardisés, le facteur climatique ne peut pas être maîtrisé par les oléiculteurs or différentes conditions météorologiques engendreront des compositions phénoliques très variables. Enfin le facteur le plus déterminant de tous est la variété des olives cultivées. De nombreuses études ont montré que certaines variétés d'olives étaient plus riches en composés

phénoliques que d'autres (Gomez, 2008 ; Tura, 2008 ; Tura, 2007 ; Vinha, 2005). Les auteurs ont par exemple trouvé que la variété *Cornicabra* avait beaucoup plus de composés phénoliques que *Picolimon* (Espagne) ou encore que la variété *Madural Fina* était plus riche en composés phénoliques que la *Borrenta* (Portugal).

Une forte teneur en composés phénoliques semble constituer un attrait nutritionnel et donc pourrait favoriser une variété d'olive plutôt qu'une autre. Cependant compte-tenu des autres facteurs d'influence (géographie, météo...), de la disponibilité et de l'adaptabilité de certaines variétés d'olives à certaines conditions climatiques, cette sélection ne s'est jamais opérée. Ainsi près de 400 variétés d'oliviers sont présentes en France même si seulement environ 15 sont cultivées à grande échelle.

### 1.3.3 Les tocophérols

Les tocophérols (Figure 26) sont reconnus pour leur double action bénéfique. En effet ils ont tout d'abord l'atout d'être une vitamine (vitamine E) et ils ont également une forte activité antioxygène (Burton, 1986). La teneur totale en tocophérols dans les huiles d'olive est très variable puisqu'elle a été reportée dans une gamme allant de quelques mg à 450 mg/kg d'huile (Grigoriadou, 2007 ; Boskou, 2006 ; Gutierrez, 1999). L'alpha-tocophérol représente à lui seul 90% de la totalité des tocophérols (Sherwin, 1976), mais on trouve également un peu de beta et gamma tocophérols, alors que le delta tocophérol n'est présent qu'à l'état de traces (Psomiadou, 2000).

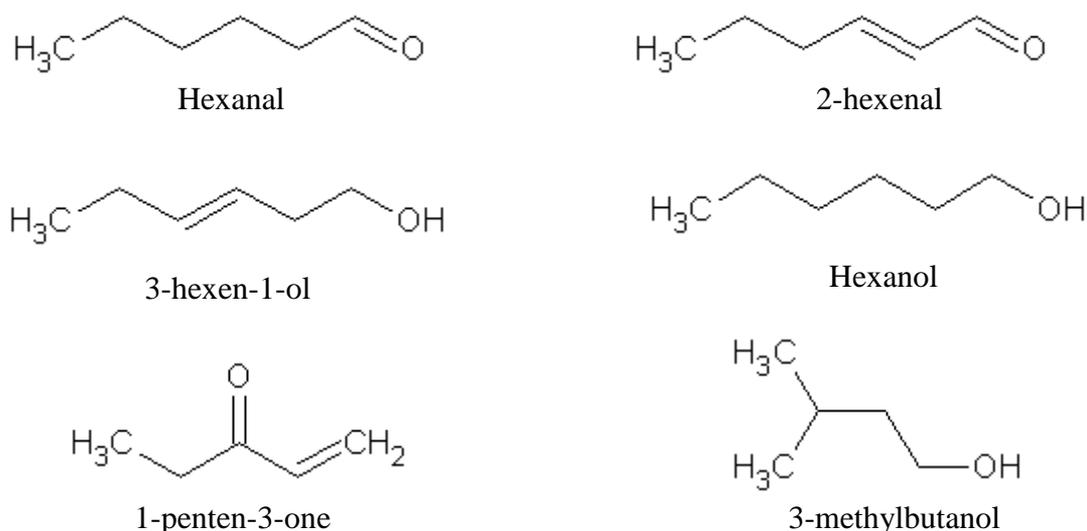


	R1	R2	R3
Alpha-tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Beta-tocophérol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Gamma-tocophérol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Delta-tocophérol	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figure 26** : Structure des tocophérols

### 1.3.4 Les composés aromatiques

Si l'huile d'olive est intéressante d'un point de vue nutritionnel, elle est surtout appréciée pour son goût et ses arômes particuliers. Les composés aromatiques sont des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 300 Da) possédant une volatilité à température ambiante. L'odeur de l'huile est due à la capacité de certaines de ces molécules volatiles à atteindre les récepteurs olfactifs du nez (Angerosa, 2002). Ces composés volatiles sont majoritairement des produits de l'oxydation des acides gras. D'une manière générale, les enzymes endogènes présentes dans l'olive, vont dégrader les acides gras par des voies de lipoxygénases et ces produits de dégradation vont être associés aux perceptions positives des arômes de l'huile d'olive. A l'inverse, les produits d'oxydation chimique ou dus à des enzymes exogènes (activité microbologique) seront généralement associés à des défauts sensoriels (Venkateshwarlu, 2004).



**Figure 27** : Structure chimique des composés volatiles majoritaires

Plus de 70 molécules composent la fraction volatile des huiles d'olive. Elles sont réparties en aldéhydes, alcools, esters, hydrocarbures et cétones. La majorité des composés a 5 ou 6 atomes de carbone (Figure 27) et parmi eux on trouve l'hexanal, le trans-2-hexenal, l'hexan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol (Angerosa, 2002 ; Kiritsakis, 1998 ; Aparicio, 1997). Aucune de ces molécules ne peut être à elle seule responsable d'un arôme caractéristique d'une huile, cependant des corrélations positives ou négatives ont été observées entre

concentration de certaines molécules et développement de certains attributs de l'huile. Ainsi le 1-penten-3-one est positivement corrélé à la sensation d'amer alors que le 3-hexen-1-ol et l'hexanal sont eux corrélés de façon négative avec l'amertume (Angerosa, 2000). De même, concernant la sensation de piquant, le 1-penten-3-one est positivement corrélé à la sensation de piquant alors que le 2-hexenal et l'hexanal sont eux corrélés de façon négative avec le piquant (Angerosa, 2000).

## **1.4 Les bénéfices santé associés à l'huile d'olive**

### **1.4.1 Les acides gras**

Doll *et coll.* ont pour la première fois remarqué en 1966 que la fréquence de certains cancers était très variable d'une région du globe à une autre, sans qu'aucun des facteurs classiques (tabac, alcool...) ne puisse l'expliquer. C'est alors que les modes de vie et d'alimentation des populations ont commencé à intéresser les scientifiques et le monde médical. Aujourd'hui, l'Agence Française Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) estime que le facteur alimentaire pourrait être à l'origine de près de la moitié des cancers. La forte teneur de l'huile d'olive en acide oléique constitue un réel atout d'un point de vue intérêt nutritionnel. En effet dès le début des années 80, Charbonnier (1982) suggérait que l'acide oléique était capable de ralentir la pénétration des acides gras dans les parois des cellules artérielles. Or la pénétration puis l'oxydation de ces acides gras est à l'origine de la formation de la plaque d'athérome dans l'intima des vaisseaux sanguins. Cette plaque d'athérome (ou d'athérosclérose) est responsable de nombreux problèmes cardio-vasculaires (Ross, 1999; Westhuyzen, 1997). Le premier est la thrombose des vaisseaux sanguins en association avec le cholestérol et le LDL-cholestérol oxydé. L'accumulation dans la paroi artérielle du cholestérol et des macrophages ayant phagocyté celui-ci va réduire le diamètre de la lumière artérielle et donc ralentir la circulation sanguine, jusqu'à arrêt total à l'origine d'un accident cardio-vasculaire. La rupture de la plaque d'athérome peut aussi entraîner une hémorragie interne ou une thrombose des vaisseaux due à l'agrégation plaquettaire au niveau de la zone de rupture.

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés, leur prévention est donc d'un grand intérêt pour tous ces pays. Pour les acides gras mono-insaturés comme l'acide oléique, les effets les plus significatifs ont été observés lors d'études de substitution entre acides gras saturés et acides gras mono-insaturés. Un

remplacement isocalorique de 5% de l'apport énergétique des acides gras saturés par des acides gras mono-insaturés peut réduire de 20 à 40% les risques de maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton, 1999). Gardner *et coll.* quelques années plus tôt (1995) avaient déjà constaté que le remplacement d'acides gras saturés par des acides mono ou poly-insaturés ( $\omega$  6) pouvait réduire significativement le taux de LDL-cholestérol. Un fort apport alimentaire en acides gras mono-insaturés va augmenter la proportion de ces acides dans les LDL ce qui va protéger ces derniers de l'oxydation (Kratz, 2002 ; Reaven, 1996). La relative stabilité des acides gras mono-insaturés par rapport aux acides gras poly-insaturés en fait des molécules plus intéressantes si l'on veut limiter l'oxydation du cholestérol dans les LDL.

Une autre grande cause de mortalité dans les pays développés est le cancer. En France, les trois cancers les plus importants en nombre sont le cancer du sein, le cancer du côlon et le cancer de la prostate (Institut de Veille Sanitaire, InVS). Si les acides gras mono-insaturés semblent avoir un rôle prépondérant dans la protection des maladies cardiovasculaires, ce sont les acides gras poly-insaturés qui semblent plus impliqués dans la protection vis-à-vis de certains cancers. Dans le cas du cancer du sein de nombreuses études cas témoins ont montré une tendance à la baisse du risque d'apparition du cancer du sein avant et après ménopause (Witte, 1997 ; Franceschi, 1996). Des études de cohorte utilisant des biomarqueurs sanguins (phospholipides sériques) ont montré une forte association entre apport en AGPI et baisse du risque de cancer chez la femme ménopausée (Saadatian-Elahi, 2002 ; Pala, 2001). Des discordances entre des études existent cependant, notamment en fonction du type de prélèvement. Cela peut être dû au fait que les prélèvements sériques ne reflètent que les profils alimentaires des quelques jours précédents alors que la demi-vie des acides gras du tissu adipeux est d'environ 2 ans. Un changement récent des habitudes alimentaires pourra donc être rapidement visualisé au niveau sérique mais pas au niveau des tissus adipeux.

Concernant les cancers colorectaux peu de données significatives sont disponibles. Franceschi *et coll.* en 1998 ont trouvé une corrélation négative entre cancer du côlon et consommation d'AGPI. Nkondjock *et coll.* (2003) a également mis en évidence une diminution significative du risque de cancer colorectal chez la femme (mais pas chez l'homme) associée à la consommation d'acide linoléique. Le reste des études cliniques montre parfois une légère réduction du risque mais pas de façon significative. Peu d'analyses montrent également un rôle significatif des AGPI sur le cancer de la prostate.

Les AGPI de longue chaîne (Acide éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA)) ne sont pas présents naturellement dans l'huile d'olive, cependant le corps humain est capable de les synthétiser à partir d'AGPI à 18 carbones. Ces acides gras à longue chaîne carbonée sont particulièrement suivis dans l'étude des maladies liées au vieillissement. Des études récentes sur le rat montrent que l'EPA pourrait améliorer la mémoire et donc réduire le risque de maladie d'Alzheimer (Taepavarapruk, 2010). D'autres études ont mis en relation la présence de DHA et d'EPA dans la structure cérébrale et apparition de dépressions nerveuses (Logan, 2004). Le profil lipidique et la teneur en oméga 3 à longue chaîne ralentirait la prévalence de cette maladie. Cela a été confirmé par des études épidémiologiques comparant le Japon, le Chili et la Corée aux autres pays du monde. Dans ces trois pays, l'apport nutritionnel en oméga 3 est supérieur par rapport au reste du monde et un plus faible taux de dépression nerveuse y est décelé (Timonen, 2004). Les patients souffrant de dépression présentent trois fois plus de risques que des patients sains de déclencher la maladie de Parkinson (Mercury, 2007). Da Silva *et coll.* en 2008 sont même parvenus à réduire les symptômes de dépression chez des patients déjà atteints d'Alzheimer en enrichissant leur alimentation en huile de poisson (riche en oméga 3).

## 1.4.2 Les composés phénoliques

### 1.4.2.1 Les espèces réactives oxygénées

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des dérivés réactifs issus de la réduction de l'oxygène. Trois principales ERO ont été mises en évidence (Gilbert, 1999a) : le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $HO^\cdot$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces espèces oxygénées sont ensuite capables de réagir avec d'autres molécules pour former des radicaux carbonés ( $RO^\cdot$  ou  $ROO^\cdot$ ) notamment avec les acides gras à longue chaîne présents dans l'huile d'olive. Ces ERO sont générées de façon naturelle dans l'organisme humain lors de la respiration au niveau cellulaire ou lors de l'action de certaines enzymes telles que la lipoxygénase (Gutteridge, 1994). Ces radicaux peuvent aussi être générés par l'environnement par les rayonnements ultraviolets, certains herbicides ou des médicaments (Brook 2004 ; Gilbert, 1999b). Un trop fort développement de ces ERO peut engendrer des lésions au niveau cellulaire, c'est ce que l'on appelle le « stress oxydant ». Les sites d'action et les conséquences du stress oxydant sont multiples ; comme énoncé précédemment les ERO peuvent agir sur les acides gras et initier la peroxydation lipidique. Les lipides sont

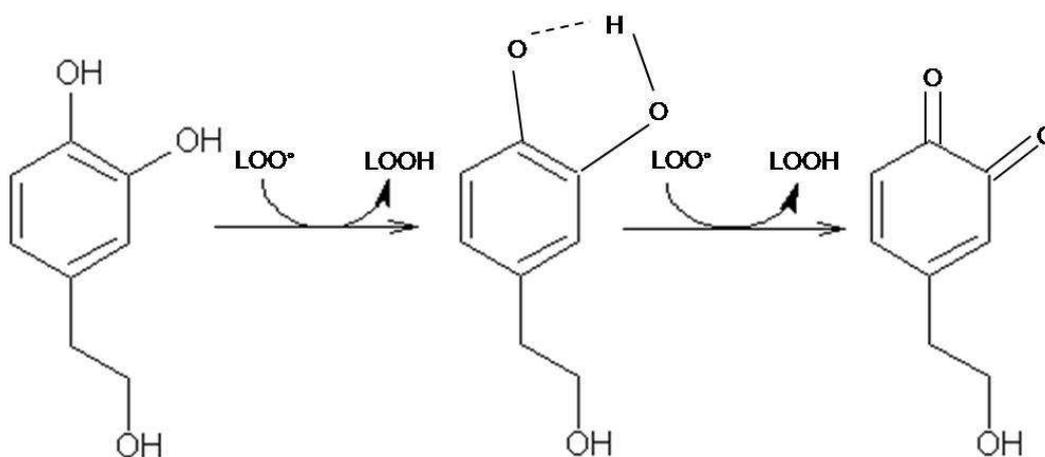
présents dans toutes les membranes cellulaires et dans le sang donc les ERO peuvent agir dans tout l'organisme. Les produits de peroxydation (les hydroperoxydes) ne sont pas stables et sont capables d'interagir avec d'autres molécules dans ce qui est appelé la « phase de propagation » du stress oxydant. Le malonaldéhyde est le dérivé secondaire le plus connu pour ses effets nocifs sur le matériel intracellulaire (Pryor, 1975). En effet, il a été démontré que le malonaldéhyde (MDA) peut s'additionner à des résidus neutrophiles des protéines (empêchant le bon fonctionnement de certaines enzymes) ou aux bases des acides nucléiques (perturbation de la reproduction cellulaire et de la transcription de l'ADN) (Marnett, 1999). Le MDA peut aujourd'hui être utilisé comme marqueur du stress oxydant chez l'homme (Del Rio, 2005). Comme présenté rapidement ci-dessus, les espèces réactives oxygénées et leurs dérivés ont été reliés à de nombreuses pathologies telles que le cancer (Floyd, 1990) et les maladies cardio-vasculaires (Moreno, 2003 ; Ross, 1993). L'organisme humain possède de nombreux systèmes de détoxification capables de stabiliser ces radicaux, mais dans certains cas (sport, stress...) trop de radicaux sont générés par rapport à la capacité de ces systèmes, ce qui génère le stress oxydant. Afin de limiter les effets néfastes des ERO, des antioxydants doivent être apportés par l'alimentation. Les composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive font partie de ces antioxydants exogènes.

#### 1.4.2.2 L'action antioxydante des composés phénoliques

Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition de l'huile d'olive en terme de masse, les composés phénoliques pourraient être ceux qui sont les plus importants au niveau des bénéfices santé. En effet, leur activité antioxydante a deux effets principaux : tout d'abord ils protègent l'huile de l'oxydation (donc augmentent sa durée de vie) mais ils vont également augmenter le bagage antioxydant de l'organisme et ainsi prévenir le développement de certaines maladies. Des extraits d'huile d'olive ont souvent été utilisés *in vitro* pour tester leur activité vis-à-vis de la prolifération de cellules cancéreuses. C'est notamment le cas sur les lignées SKBR3 et JIMT-1 qui sont des lignées de référence en matière de cancer du sein car elles surexpriment HER2 qui est un gène oncogène (Garcia-Villalba, 2010 ; Menendez, 2009). Une étude sur le cancer du côlon a également montré que des extraits phénoliques d'huile d'olive semblaient réduire la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait la prolifération du cancer du côlon (Hashim, 2005). Manna *et coll.* (1999) ont souligné une protection des phénols vis-à-vis de l'oxydation des érythrocytes sanguins. L'oxydation des érythrocytes peut entraîner des déformations de

ceux-ci et donc des défauts de transport d'oxygène dans le sang et à grande échelle une hémolyse (Van Dyke, 1996). Cela est particulièrement vrai lorsque les érythrocytes sont exposés à du peroxyde d'hydrogène.

Individuellement, des composés tels que l'hydroxytyrosol et l'acide vanillique (à moindre échelle le tyrosol) ont démontré de fortes activités antioxydantes (Owen, 2000). Ils ont aussi été associés à certains effets bénéfiques dans la protection de certaines maladies. Ainsi l'hydroxytyrosol exerce une action inhibitrice sur les lipooxygénases ce qui va protéger les acides gras de l'oxydation et donc *in vivo* réduire le dépôt des LDL dans les parois artérielles (Visioli, 1998). L'hydroxytyrosol est capable de donner un hydrogène au radical  $\text{LOO}^\bullet$  puis de se stabiliser (Figure 28). En ce qui concerne la prévention des maladies cardio-vasculaires il a aussi été associé à une réduction de l'agrégation plaquettaire tout comme la lutéoline et l'apigénine (Petroni, 1995). La présence de quelques polyphénols et de l'hydroxytyrosol est également corrélée à une réduction de la formation de molécules pro-inflammatoires comme la thromboxane et les leucotriènes (Rotondo, 2000 ; Kohyama, 1997).



**Figure 28** : Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol (Tripoli, 2005)

L'acide caféique et l'acide férulique ont un effet cytoprotecteur sur les cellules endothéliales en bloquant l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à l'oxydation des LDL (Viera, 1998). L'acide caféique, l'acide férulique ainsi que l'hydroxytyrosol sont donc tous impliqués dans la protection contre les maladies cardio-vasculaires.

Deux études ont montré un effet hypocholestérolémique et hypoglycémique de l'oleuropéine et de l'oleuropéine aglycone (Le Tutor, 1992 ; Ficarra, 1991). Ces deux composés et l'hydroxytyrosol sont également impliqués dans la protection de l'organisme contre certains agents pathogènes responsables de maladies intestinales ou du système respiratoire (Bisignano, 1999).

Si toutes ces études ont permis de mettre en évidence certaines actions des composés phénoliques, beaucoup de choses sont encore à découvrir car les effets bénéfiques mis en évidence par des études épidémiologiques ne sont toujours pas pleinement explicités. Les composés phénoliques peuvent également présenter des effets synergiques entre eux ce qui complique la mise en évidence d'effets spécifiques de chacun d'entre eux. Ce qui semble acquis c'est qu'une ingestion régulière de composés phénoliques comme ceux présents dans l'huile d'olive est fortement corrélée à une diminution des risques de développement de maladies dégénératives, cardiovasculaires ou de cancers.

### 1.4.3 Les tocophérols

Les tocophérols sont liposolubles et leur présence dans les huiles les protège du rancissement. Dans l'organisme humain, les principaux systèmes antioxydants endogènes agissent dans les parties aqueuses de la cellule. L'alpha-tocophérol (90 % des tocophérols dans l'huile d'olive) va s'insérer dans les membranes cellulaires ainsi que dans les lipoprotéines en stabilisant les radicaux peroxy (Serbinova, 1991). L'alpha-tocophérol est en effet connu pour être l'antioxydant lipophile le plus puissant pour limiter le processus d'oxydation radicalaire. Une déficience en tocophérol dans les membranes cellulaires peut augmenter la perméabilité des cellules et donc les rendre plus vulnérables à la dégradation. Il est aussi l'antioxydant le plus important dans les LDL et pourrait donc jouer un rôle clé en inhibant leur oxydation. Une fois oxydé, l'alpha-tocophérol peut être régénéré par l'acide ascorbique (vitamine C) ou l'ubiquinol (Gille, 2008 ; Pincemail, 2003, Bascetta, 1983). En plus de leur activité antioxydante, les tocophérols ont été associés à un ralentissement de la propagation cellulaire, de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des monocytes dans les vaisseaux sanguins. Zingg (2004) suggérait que ces effets pourraient être dus à des interactions entre l'alpha-tocophérol, certaines enzymes et des protéines structurales.

## 1.5 Conclusion

L'huile d'olive est la principale source d'apport de matière grasse dans les régimes alimentaires méditerranéens. Ce type de régime a souvent été associé à une meilleure résistance à certaines maladies, notamment les maladies cardio-vasculaires et les maladies dégénératives. De nombreuses études scientifiques se sont donc intéressées au contenu nutritionnel de l'huile d'olive afin de comprendre les mécanismes d'action pouvant expliquer ces phénomènes. La première explication est sa composition spécifique en acides gras. La proportion d'acides gras saturés est très faible (14%) alors que l'acide gras très majoritaire est l'acide oléique qui est un acide gras mono-insaturé. La mono-insaturation de l'acide oléique confère à l'huile une certaine stabilité car il est peu sensible à l'oxydation. Les acides gras polyinsaturés essentiels sont également présents en proportions intéressantes dans l'huile et leurs bienfaits, notamment au niveau de la protection vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires et des cancers, ont largement été étudiés au cours de ces dernières décennies. Par contre ces molécules sont très sensibles à l'oxydation ce qui pourrait provoquer un rancissement prématuré des huiles.

Pour protéger ses principales molécules de l'oxydation, l'olive a développé des moyens de défense : les composés phénoliques. Ces composés phénoliques sont partiellement retrouvés dans l'huile (même si la majorité des composés phénoliques est très hydrosoluble et est donc éliminée dans les margines) ce qui permet de prolonger sa durée de vie. S'ils permettent de protéger l'huile de l'oxydation, c'est surtout sur leur rôle *in vivo* que les scientifiques ont travaillé. En effet les radicaux générés par le stress oxydant ont souvent été désignés comme pouvant être à l'origine des principales causes de mortalité dans les pays développés : les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Leur stabilisation semble donc être un enjeu majeur et c'est ce qui explique l'engouement de plus en plus important pour les antioxydants.

L'huile d'olive est riche en antioxydants, cependant de nombreuses études ont montré que la qualité d'une huile peut être grandement influencée par son procédé de fabrication. Dans un premier temps, les travaux de cette thèse ont donc été réalisés dans le but de répertorier les différentes techniques de fabrication de l'huile, de les analyser étape par étape et d'optimiser les procédures dans les moulins de façon à obtenir une huile de très haute valeur nutritionnelle. Dans un second temps, des techniques d'extraction innovantes ont été utilisées dans le but d'effectuer un enrichissement post-fabrication de l'huile d'olive sur le plan nutritionnel et organoleptique.