

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

جامعة أبي بكر بلقايد- تلمسان

Université Aboubakr Belkaïd- Tlemcen –

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



**MEMOIRE**

Présenté par :

***GHERBI Asma, MOKHTARI Fatima-Zohra***

En vue de l'obtention du :

**Diplôme de MASTER**

**En Sciences Biologiques**

Option : **Physiologie Cellulaire et Physiopathologie**

**Thème**

***Valorisation des molécules bioactives des pétales de safran***

Soutenu publiquement, le 13 /06 / 2024 , devant le jury composé de :

Mme LOUKIDI Bouchra	Pr	Université de Tlemcen	Président
Mr CHAOUICHE Tarik	MCA	Université de Tlemcen	Examineur
Mr BENSENANE Bachir	MCA	Université de Tlemcen	Encadrant
Mme BARKACHems El Houda	Doctorante	Université de Tlemcen	Co-encadrant

**Année universitaire : 2023/2024**

## Résumé

L'extraction et la purification des molécules bioactives des pétales de safran jouent un rôle fondamental dans la mise en valeur des multiples bénéfices thérapeutiques et culinaires de cette plante précieuse. La séparation des molécules bioactives du safran nécessite une approche méthodique et diversifiée, faisant appel à des techniques telles que la chromatographie sur colonne et sur couche mince, chacune offrant ses propres avantages en termes de résolution chromatographique et de sélectivité des composés. Parallèlement, des étapes de purification seront effectuées pour éliminer les impuretés et concentrer les composés d'intérêt. Donc notre étude vise à fournir une compréhension approfondie de la composition chimique de cette plante précieuse et à ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche biomédicale et des applications industrielles. Les résultats obtenus pourraient également contribuer au développement de produits innovants et de traitements efficaces basés sur les propriétés thérapeutiques du safran.

## Abstract

The extraction and purification of bioactive molecules from saffron petals play a fundamental role in enhancing the multiple therapeutic and culinary benefits of this precious plant. The separation of the bioactive molecules of saffron requires a methodical and diversified approach, using techniques such as column and thin-film chromatography, each offering its own advantages in terms of chromatographic resolution and selectivity of compounds. At the same time, purification steps will be carried out to remove impurities and concentrate the compounds of interest. So our study aims to provide a thorough understanding of the chemical composition of this precious plant and open up new perspectives in the field of biomedical research and industrial applications. The results obtained could also contribute to the development of innovative products and effective treatments based on the therapeutic properties of saffron.

## ملخص

يلعب استخراج وتنقية الجزيئات النشطة بيولوجيًا من بتلات الزعفران دورًا أساسيًا في تعزيز الفوائد العلاجية والطهي المتعددة لهذا النبات الثمين. يتطلب فصل جزيئات الزعفران النشطة بيولوجيًا نهجًا منهجيًا ومتنوعًا، باستخدام تقنيات مثل كروماتوغرافيا الأعمدة والأغشية الرقيقة، حيث يقدم كل منها مزاياه الخاصة من حيث الدقة الكروماتوغرافية وانتقائية المركبات. في الوقت نفسه، سيتم تنفيذ خطوات التنقية لإزالة الشوائب وتركيز المركبات ذات الأهمية. لذا تهدف دراستنا إلى توفير فهم شامل للتركيب الكيميائي لهذا النبات الثمين وفتح وجهات نظر جديدة في مجال الأبحاث الطبية الحيوية والتطبيقات الصناعية. يمكن أن تساهم النتائج التي تم الحصول عليها أيضًا في تطوير منتجات مبتكرة وعلاجات فعالة بناءً على الخصائص العلاجية للزعفران.

# ***Remerciements***

En ouverture de nos remerciements, nous souhaitons mettre en lumière le travail collaboratif et l'engagement qui ont caractérisé ce projet.

Nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance envers notre encadrant ***Dr BENSENANE Bachir*** pour son dévouement et son soutien tout au long de ce projet de recherche. Sa passion pour le domaine et son expertise ont été des piliers essentiels dans la réalisation de cette étude. Ses conseils éclairés, ses encouragements constants et sa disponibilité ont grandement enrichi notre expérience et ont contribué à notre développement académique.

Nous sommes reconnaissants de l'opportunité qui nous a été offerte de bénéficier de ses enseignements et de sa direction. Merci pour votre précieuse guidance et pour avoir été un mentor exceptionnel.

Nous souhaitons également adresser nos sincères remerciements aux membres du ***jury*** pour leur investissement et leur évaluation minutieuse de notre travail. Leur engagement et leurs commentaires constructifs ont grandement enrichi notre expérience et ont contribué à l'amélioration de notre travail.

De plus, nous tenons aussi à remercier chaleureusement ***Mme BARKA Chems El Houda*** pour son soutien indispensable dans la réalisation de notre mémoire, tant sur le plan pratique que théorique. Sa contribution a été inestimable et a grandement enrichi notre travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers les ingénieurs du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (PPABIONUT) sous la direction du ***Pr MERZOUK Hafida*** pour leur précieuse assistance tout au long de ce projet. Leur expertise technique et leur dévouement ont grandement contribué à sa réussite. Merci pour votre soutien inestimable.

Enfin, un immense merci à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet. Votre soutien, vos conseils et votre engagement ont été les piliers de notre réussite. Nous sommes profondément reconnaissants pour votre précieuse collaboration.

# *Dédicaces*

Je dédie ce travail a :

À ma merveilleuse **Maman**, merci pour ta présence inébranlable, ton soutien infini a guidé chaque pas. Ce mémoire est autant le tien que le mien, témoignage de notre amour, sans fin.

À mon cher **Père**, merci pour ton soutien et tes encouragements tout au long de cette période. Ta présence a été ma source d'inspiration. Je suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi.

À ma sœur **Amina**, merci pour ton soutien précieux tout au long de ce chemin vers la réalisation de ce mémoire. Ta présence bienveillante a été ma source de force et de motivation.

À mes chers frères **Youcef** et **Amine**, merci pour votre soutien constant tout au long de cette aventure. Votre présence a rendu ce voyage encore plus spécial.

À mon binôme **Fatima-Zohra**, merci d'avoir été mon partenaire fidèle tout au long de ce parcours. Ta collaboration, ton soutien et ton dévouement ont rendu cette expérience enrichissante et mémorable. Je suis reconnaissante de t'avoir à mes côtés.

À mes adorables amies **Hanaa, Khaoula, Zineb, Syrine, Aya, Roukia** votre soutien inestimable a illuminé chaque étape de ce chemin vers l'accomplissement de ce mémoire. Merci pour vos encouragements, vos rires partagés et votre amitié indéfectible. Vous avez rendu cette aventure inoubliable.

*Asma*

# *Dédicace :*

Ce mémoire est dédié à :

À mon *cher père*, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance pour ta présence constante, ton soutien infaillible et ton amour inconditionnel. Merci pour tout ce que tu fais, tu es une inspiration pour moi.

À ma *chère mère*, qui incarne l'amour et le sacrifice, je lui adresse toute ma gratitude pour sa présence constante, son soutien indéfectible et sa tendresse infinie. Merci pour tout ce que tu fais, tu es ma lumière.

À ma *chère grand-mère*, véritable pilier de notre famille, je souhaite exprimer toute ma gratitude pour ton amour infini, ta sagesse inestimable et tes douces attentions. Tu es un exemple de force et de bonté, et chaque moment passé à tes côtés est un précieux trésor. Merci pour ton amour inconditionnel et pour tous les enseignements que tu m'as transmis.

À ma *famille*, je vous adresse toute ma reconnaissance pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et les précieux moments partagés ensemble. Vous êtes ma force, mon refuge et ma plus grande source de bonheur. Merci d'être toujours là, à chaque étape de ma vie.

À mon binôme *Asma*, partenaire de confiance, je te remercie pour notre collaboration fructueuse et notre complicité sans égale ensemble, nous avons relevé des défis, partagé des réussites et surmonté des obstacles. Merci pour tous.

À mon *fiancé Houssam edinne*, je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton soutien inestimable tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Ta patience, ton encouragement et ta compréhension ont été des piliers essentiels dans ce processus. Merci d'être mon compagnon de route et de partager cette aventure avec moi.

À mes merveilleuses amies, je vous remercie du fond du cœur pour votre amitié sincère, vos rires contagieux et votre soutien indéfectible. Chacun de nos moments ensemble est un trésor que je chéris précieusement. Merci d'être toujours là pour moi, vous êtes mes sœurs de cœur.

*Fatima*

## Liste des abréviations

**AAR** :Activité anti radicalaire

**AMPK** :Protéine kinase activée par l'AMP

**CCM** :La chromatographie sur couche mince

**CPG** :La chromatographie en phase gazeuse

**CI50** :La concentration inhibitrice médiane

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**DCM** : Dichlorométhane

**GLUT4** : Transporteur de glucose de type 4

**HDL** :Lipoprotéine de haute densité

**HPLC** :La chromatographie liquide haute performance

**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma

**LDL** :Lipoprotéine de faible densité

**NO** : Monoxyde d'azote

**RF** : Rapport frontal

## Liste des Figures

Figure 1 : Aspect général de <i>Crocus sativus L.</i> .....	3
Figure 2: <i>Crocus sativus L.</i> .....	14
Figure 3: Extrait sec des pétales de safran .....	15
Figure 4: Séparation liquide-liquide.....	18
Figure 5: Evaporation de la phase organique .....	18
Figure 6: Plaque de silice pour CCM.....	19
Figure 7: La chambre noire UV .....	19
Figure 8:La colonne chromatographique .....	21
Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .....	23
Figure 10: Pourcentage d'inhibition de l'extrait comparé à l'acide ascorbique.....	24
Figure 11:Activitéantiradicalaire de l'extrait et l'acide ascorbique .....	25
Figure 12: CCM avec 100% DCM    Figure 13: CCM avec 95 %DCM et 5% hexane .....	25
Figure 14: CCMdes tubes 31,32,33.....	26
Figure 15: CCM des tubes 33,38 en 95% DCM et 5% hexane .....	27
Figure 16:CCM des tubes 33,38 en 100% DCM.....	27
Figure 17: CCM des tubes 151,154,157 en 80% DCM et 20% éthanol.....	28
Figure 18: CCM des tubes 182,184,188 en 80% DCM et 20% éthanol.....	28

## Liste des Tableaux

Tableau 2: La composition chimique de la poudre des pétales de safran .....	5
---	---



## Tables des matières

Résumé .....	II
<i>Remerciements</i> .....	III
<i>Dédicaces</i> .....	IV
<i>Dédicace :</i> .....	V
Liste des Figures .....	VII
Liste des Tableaux.....	VIII
Introduction générale.....	XI
<i>Synthèse bibliographique</i> .....	2

### *Chapitre 1*

1. Présentation de la plante étudiée ( <i>Crocus Sativus L.</i> ).....	3
1.1. Généralités .....	3
1.2. Production du safran en Algérie .....	4
1.3. Composition chimique du safran .....	4
2. Les pétales du safran.....	4
2.1. Définition.....	4
2.3. Effets thérapeutiques des pétales de safran .....	5
2.4. Valorisation des pétales de safran.....	6

### *Chapitre 2*

2. Les techniques de chromatographie .....	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Types de chromatographie .....	8
2.2.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	8
2.2.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	9
2.2.3. La chromatographie sur couche mince (CCM) .....	10
2.2.4. La chromatographie sur colonne .....	12
<i>Matériels et Méthodes</i> .....	13
1. Matière végétale.....	14
2. Extraction solide-liquide.....	14
3. Calcul du rendement d'extraction .....	15
4. Dosage des polyphénols totaux.....	15
5. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....	16
6. Séparation liquide-liquide .....	17

<b>7. Analyses chromatographiques .....</b>	<b>18</b>
<b>7.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) .....</b>	<b>18</b>
<b>7.2. Analyse par chromatographie sur colonne .....</b>	<b>19</b>
<b>Résultats et interprétations .....</b>	<b>22</b>
<b>1. Rendement d'extraction .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Détermination de la quantité de polyphénols totaux.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Activité antioxydante .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Analyses par chromatographie sur couche mince CCM .....</b>	<b>25</b>
<b>5. Analyse par chromatographie sur colonne .....</b>	<b>26</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>35</b>

# *Introduction générale*

Les plantes sont utilisées depuis longtemps dans la vie quotidienne des gens pour soulager la douleur et cicatriser les blessures. Ils possèdent de nombreuses propriétés biologiques intéressantes et sont utilisées dans divers domaines, notamment l'alimentation, la médecine et la pharmacie. Ces plantes produisent plein de composés différents, appelés métabolites primaires et secondaires, qui ont des actions biologiques pour les humains et les écosystèmes **(Zidan et al., 2011)**.

Le safran est une épice précieuse et convoitée, extraite des stigmates rouges des pétales de la plante *Crocus sativus L.* connue pour sa couleur dorée vibrante et son arôme distinctif. Le safran est largement utilisé dans la cuisine du monde entier pour parfumer et colorer les plats **(El Midaoui et al., 2022)**.

Le safran (*Crocus Sativus L.*) a été utilisé dans la préparation de différents aliments dans le monde entier en raison de ses propriétés organoleptiques (couleur, goût et saveur), et il montre également des propriétés thérapeutiques contre diverses maladies en médecine traditionnelle et possède aussi des propriétés anticancérogènes, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiapoptotiques et antithrombotiques **(Ashktorab et al., 2019)**.

L'objectif de cette étude est d'extraire et de purifier les molécules bioactives du *Crocus Sativus L.* et d'évaluer leur bioactivité pour des applications potentielles.

# *Synthèse bibliographique*

## 1. Présentation de la plante étudiée (*Crocus Sativus L.*)

### 1.1. Généralités

Le safran (*Crocus Sativus L.*) est une plante médicinale issue de l'Antiquité, cultivée à l'origine à l'Est et au Moyen-Orient dans des pays comme l'Iran et la Turquie, puis dans certains pays méditerranéens comme l'Italie. Ses composants, incluent les bulbes, les fleurs et les stigmates, et sont appréciés pour leurs propriétés gustatives et colorantes naturelles (Figure 1). Le safran est obtenu à partir des stigmates de la plante. Il est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire et nutraceutique. Sa fleur contient divers composés chimiques qui confèrent aux produits une saveur unique et des bienfaits nutritionnels grâce à leurs ingrédients bioactifs (Ashktorab et al., 2019; Garavand et al., 2019)

Le safran est l'épice la plus chère au marché et a été nommé « or rouge ». Il se caractérise par un goût amer et contribue à une coloration orange jaunâtre lumineuse des aliments. De nos jours, le safran est principalement utilisé pour ses propriétés antioxydantes et peut être trouvé dans divers supplémentation alimentaires (Christodoulou et al., 2015 ; Mzabri, et al., 2019).

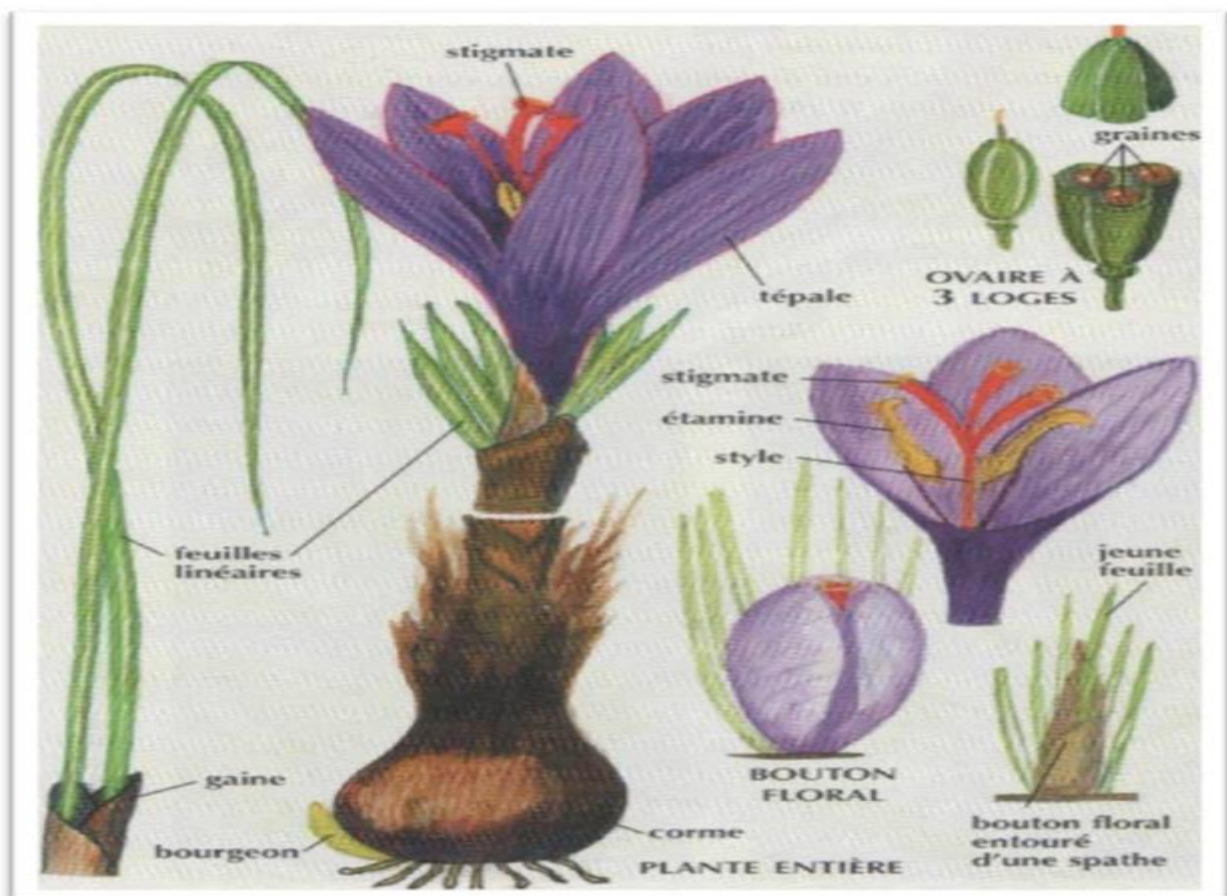


Figure 1 : Aspect général de *Crocus sativus L.* (Arvy&Gallouin, 2003)

## **1.2. Production du safran en Algérie**

La culture du safran nécessite des conditions climatiques et pédologiques spécifiques pour s'épanouir et produire des stigmates de qualité optimale, conditions qui ne se rencontrent que dans quelques régions du monde. Le safran prospère dans un endroit sec et ensoleillé, avec un sol qui ne retient pas l'eau, et il se plante à l'automne (**Zahmatiet *al.*, 2018**). Grâce au climat et au sol favorables en Algérie pour la culture, le pays connaît un développement prometteur de la culture du safran, en particulier dans les régions montagneuses du nord. En produisant environ 200 kg par an, le pays se classe parmi les petits producteurs mondiaux. Néanmoins, la qualité de son safran, connu pour son goût intense et sa couleur vive, le caractérise sur la scène internationale (**Zobeidi *et al.*, 2014**).

## **1.3. Composition chimique du safran**

Le safran est composé d'eau, des fibres alimentaires, de minéraux et des métabolites primaires et secondaires. Le Tableau 1 représente la composition chimique du safran. Il est riche en métabolites secondaires bioactifs parmi lesquels des vitamines, des pigments, des flavonoïdes, des anthocyanes et des essences aromatiques volatiles (**Shahi *et al.*, 2016**). Plus de 150 composés ont été isolés à partir du safran. Parmi cette multitude de composants, quatre se démarquent par leur abondance et leurs propriétés biologiques remarquables (**Garavand *et al.*, 2019**).

- **La crocine** : c'est un composé unique de la famille des caroténoïdes qui se caractérise par une solubilité aqueuse exceptionnelle due à leur nature d'esters mono- et diglycosylés de l'acide dicarboxylique crocétine. Ces molécules représentent 3,5% du poids des stigmates de la plante (**Maggi *et al.*, 2020**)
- **La picrocrocine** : est un élément hétéroside et est considéré comme le principal responsable du goût amer (**Predieri *et al.*, 2021**)
- **Le safranal** : c'est un aldéhyde monoterpénique et représente le composant volatil le plus abondant dans les stigmates du safran (>60 % d'huile essentielle) responsable de l'odeur et l'arôme du safran (**Lage *et Cantrell*, 2009**)
- **Les flavonoïdes** : tels que la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol qui ont été découvertes dans les pétales du safran (**Goupyet *et al.*, 2013**).

## **2. Les pétales du safran**

### **2.1. Définition**

Les pétales de safran constituent 90% du poids sec des fleurs du safran, en faisant ainsi un sous-produit agricole important dans la production du safran brut (**Peng *et al.*, 2023**).

Les pétales de safran, ingrédients précieux dans le domaine culinaire et médical, renferment une richesse en polyphénols, notamment en glycosides de flavonols et en anthocyanines, réputés pour leurs puissantes propriétés antioxydantes (Siddiqui et al., 2022). Les pétales de safran représentent une alternative viable aux stigmates, plus onéreux, en particulier dans le domaine de l'extraction de composés bioactifs (Hashemi Gahruie et al., 2020).

## 2.2. Composition chimique des pétales du safran

Les pétales de safran sont riches en fibres alimentaires. Ils contiennent également des métabolites primaires et secondaires. Le tableau 2 représente la composition détaillée de la poudre de pétales de safran (Ahmadian-Kouchaksaraie et al., 2016).

Les pétales de safran regorgent de composés phénoliques précieux. Parmi ces composés, on retrouve des flavonols tels que le kaempférol, la quercétine et l'isorhamnétine, ainsi que des anthocyanines comme la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Naim et al., 2023).

**Tableau 1: La composition chimique de la poudre des pétales de safran**  
(Ahmadian-Kouchaksaraie et al., 2016)

<b>Humidité</b>	<b>6,3 ± 0,39 g/100 g</b>
<b>Matières grasses</b>	14,1 ± 0,12 g/100 g
<b>Protéines</b>	21,7 ± 0,14 g/100 g
<b>Cendres</b>	12,4 ± 0,44 g/100 g
<b>Glucides</b>	16,6 ± 1,41 g/100 g
<b>Fibres totales</b>	28,9 ± 0,31 g/100 g

## 2.3. Effets thérapeutiques des pétales de safran

Des nombreuses études ont démontré les propriétés bénéfiques des pétales de safran dans la lutte contre un large éventail de maladies chroniques, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, ainsi que les cancers du côlon, de l'estomac, des poumons, du sein et de la peau (Ashktorab et al., 2019).

- **Effet antioxydant** : Le safran renferme un grand nombre de composés antioxydants qui combattent les radicaux libres et préservent les cellules contre le stress oxydatif (Lopreseti et al., 2014).



- **Effet antidiabétique** : Les pétales de safran peuvent également être utilisés pour traiter les complications du diabète. Ils pourraient améliorer la glycémie, la sensibilité à l'insuline et la fonction pancréatique, tout en diminuant les triglycérides, Les LDL contiennent plus de cholestérol que les VLDL, tandis que les VLDL contiennent plus de triglycérides et les taux d'hémoglobine glyquée. De plus, ils pourraient augmenter la sensibilité à l'insuline en augmentant l'expression de GLUT4 et d'AMPK (**Sanietal.,2022**).
- **Effet anti-inflammatoire** : Des études ont montré que les pétales de *Crocus sativus* L. ont un effet anti-inflammatoire. Ils peuvent réduire l'inflammation en inhibant la viabilité cellulaire des lymphocytes et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (**Boskabady et al., 2011**). De plus, ils ont été observés pour diminuer la production de NO, de cytokines inflammatoires et de chimiokines dans les systèmes respiratoires (**Lin et al.,2013**).
- **Effet hypolipidémiant** : L'effet hypolipidémiant des pétales de safran pourrait être attribué à leur capacité à inhiber l'activité de la lipase pancréatique, entraînant ainsi une diminution de la formation des chylomicrons (**Sheng et al.,2006**).
- **Effet antidépresseur et anxiolytique** : Des études récentes suggèrent que les pétales de safran pourraient être un traitement efficace contre la dépression par augmentation des niveaux de sérotonine et de dopamine dans le cerveau (**Tousseyn et al., 2015**).
- **Effet sur le système nerveux** : Des recherches préliminaires suggèrent que les pétales de safran pourraient jouer un rôle sur la maladie d'Alzheimer(**Akhondzadeh et al., 2010**) et la maladie de Parkinson en préservant les cellules nerveuses et en améliorant la fonction cognitive (**Lu et al., 2021**).
- **Amélioration de la santé cardiaque** : Le safran peut être bénéfique pour la santé cardiaque en réduisant le taux de cholestérol LDL (mauvais) et en augmentant le taux de cholestérol HDL (bon). De plus, son pouvoir anti-inflammatoire pourrait aider à diminuer la pression artérielle et le risque de maladie cardiaque(**Lionaki et al., 2014**).
- **Amélioration de santé oculaire** : La crocine, un composant majeur des pétales de safran, se distingue par ses propriétés protectrices pour la santé des yeux. En effet, elle protège la rétine contre les dommages oxydatifs, ce qui pourrait aider à prévenir les maladies oculaires liées à l'âge, comme la dégénérescence maculaire(**Skourtis et al., 2020**).

#### 2.4. Valorisation des pétales de safran

En raison de sa composition et de ses propriétés uniques, le safran est utilisé dans divers domaines, tels que l'industrie alimentaire, la parfumerie, la cosmétique, la pharmacie et la médecine(Zahmati *et al.*, 2018).

- **Industrie agroalimentaire** : Les pétales peuvent être utilisés comme colorant naturel et aromatisant dans la production d'aliments et de boissons. Ils peuvent également être incorporés dans la fabrication de confitures, de sirops et d'infusions(Mestres *et al.*, 2019).
- **Industrie pharmaceutique** : Les pétales de safran présentent un fort potentiel dans le développement de nouveaux traitements contre diverses maladies. Leurs propriétés bioactives uniques suscitent un intérêt croissant dans l'industrie pharmaceutique, et leur utilisation pourrait révolutionner la médecine moderne(Mohajeri *et al.*, 2020).
- **Industrie cosmétique** : Les pétales de safran, grâce à leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, sont des ingrédients prisés dans les produits cosmétiques tels que les crèmes, les lotions et les masques (Tousseyn *et al.*, 2015).

## **2. Les techniques de chromatographie**

### **2.1. Définition**

La chromatographie est une méthode utilisée en analyse physico-chimique pour séparer les différents éléments d'un mélange. Cette séparation se fait en exploitant les différences de distribution des constituants entre une phase mobile qui peut être liquide ou gazeuse, elle transporte les éléments du mélange, et une phase stationnaire fixée sur un support solide, elle retient les éléments du mélange avec des forces variables (Arakawa *et al.*, 2008).

### **2.2. Types de chromatographie**

Il existe plusieurs types de chromatographies, chacune présentant ses méthodes et applications spécifiques (Skoog *et al.*, 2018).

- La chromatographie liquide haute performance (HPLC).
- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- La chromatographie sur couche mince (CCM).
- La chromatographie sur colonne.

#### **2.2.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique analytique puissante utilisée pour séparer les différents composants d'un mélange en fonction de leurs interactions avec une phase stationnaire (colonne remplie d'une phase solide) et une phase mobile (solvant ou mélange de solvants) sous haute pression (Skoog *et al.*, 2018).

#### ***Principe de fonctionnement***(Moore *et al.*, 2020)

- La phase mobile est pompée à haute pression (jusqu'à plusieurs centaines de bars) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire finement divisée.
- L'échantillon à analyser est injecté dans le flux de la phase mobile.
- Les différents composants de l'échantillon interagissent de manière sélective avec la phase stationnaire en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (polarité, taille, charge, etc.).
- Les composants ayant une forte affinité pour la phase stationnaire sont retenus plus longtemps dans la colonne, tandis que ceux ayant une faible affinité sont élués plus rapidement.
- Un détecteur approprié (UV-visible, fluorescence, indice de réfraction, spectrométrie de masse, etc.) est utilisé pour détecter et quantifier les composants à la sortie de la colonne.

***Avantages de la HPLC(Madadlou et al., 2011)***

- Haute résolution et sensibilité.
- Vitesse d'analyse rapide.
- Capacité à séparer des composés non volatils et thermolabiles.
- Grande variété de phases stationnaires et de détecteurs disponibles.
- Possibilité d'automatisation et de couplage avec d'autres techniques

***Limitations de la HPLC(Dam et al., 2013)***

- Coût élevé des équipements et des consommables.
- Nécessité d'une phase mobile compatible avec le détecteur.
- Risque d'interactions indésirables entre les composés et la phase stationnaire.
- Besoin de personnel qualifié pour l'exploitation et l'interprétation des résultats.

***Applications de la HPLC(Zacharis, 2020)***

- Analyse de médicaments, de produits naturels et de composés organiques.
- Séparation et purification de protéines, peptides et acides nucléiques.
- Analyse de polluants organiques dans l'environnement.
- Analyse de nutriments, additifs et contaminants dans les aliments.

**2.2.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Également connue sous le nom de chromatographie gaz-solide ou chromatographie gaz-liquide, est une technique analytique puissante utilisée pour séparer et analyser les composants volatils et semi-volatils dans un mélange complexe (Skoog et al.,2018).

***Principe de fonctionnement(Garg et al., 2012)***

- La phase mobile est un gaz inerte (généralement de l'hélium, de l'azote ou de l'hydrogène) qui est envoyé à travers la colonne chromatographique.
- L'échantillon à analyser est injecté dans le flux de gaz à l'entrée de la colonne.
- La colonne chromatographique est remplie d'une phase stationnaire, qui peut être un solide poreux (chromatographie gaz-solide) ou un liquide non volatil déposé sur un support solide inerte (chromatographie gaz-liquide).
- Les différents composants de l'échantillon interagissent de manière différente avec la phase stationnaire en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (point d'ébullition, polarité, taille moléculaire, etc.).

- Les composants ayant une forte affinité pour la phase stationnaire sont retenus plus longtemps dans la colonne, tandis que ceux ayant une faible affinité sont élués plus rapidement.
- Un détecteur (détecteur à ionisation de flamme, détecteur à capture d'électrons, spectromètre de masse, etc.) est utilisé pour détecter et quantifier les composants à la sortie de la colonne.
- Les temps de rétention des composants sont caractéristiques de leurs interactions avec la phase stationnaire et permettent leur identification et leur quantification.

***Avantages de la CPG (Garg et al., 2012)***

- Haute résolution et sensibilité.
- Analyse rapide.
- Capacité à analyser des composés volatils et semi-volatils.
- Large gamme de détecteurs disponibles.
- Automatisation et facilité d'utilisation.

***Applications de la CPG (Grob et al., 2004)***

- Analyse des composés organiques volatils (COV) dans l'environnement.
- Analyse des résidus de pesticides dans les aliments et les échantillons environnementaux.
- Analyse des produits pétroliers et des carburants.
- Analyse des arômes et des composés volatils dans les aliments et les boissons.
- Analyse des drogues et des substances toxiques en médecine légale.

***Limitations de la CPG (Skoog et al., 2018)***

- Problèmes de dérivation chimique.
- Risque de discrimination de masse.
- Limitation de la gamme de température.
- Risque d'adsorption irréversible.
- Coût élevé des colonnes et des détecteurs spécialisés.
- Besoin de personnel qualifié.

**2.2.3. La chromatographie sur couche mince (CCM)**

Également connue sous le nom de chromatographie plane, est une technique analytique simple et rapide utilisée pour séparer et identifier les composants d'un mélange (Skoog et al., 2018).

***Principe de fonctionnement (Holler et al., 2018)***

- La phase stationnaire est une couche mince (de 0,1 à 2 mm d'épaisseur) d'un adsorbant, généralement de la silice ou de l'alumine, déposée sur une plaque de verre, de plastique ou de métal.
- L'échantillon à analyser est déposé sous forme d'un petit spot près du bas de la plaque.
- La plaque est placée dans une cuve fermée contenant une petite quantité de solvant (phase mobile), de sorte que le niveau du solvant soit inférieur au dépôt de l'échantillon.
- La phase mobile migre par capillarité le long de la phase stationnaire, entraînant les différents composants de l'échantillon à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités relatives pour les deux phases.
- Après un certain temps de migration, la plaque est retirée de la cuve, et les composants séparés apparaissent comme des taches distinctes à différentes hauteurs sur la plaque.
- Les composants peuvent être identifiés en comparant leurs rapports frontaux (Rf) avec ceux de composés de référence ou en utilisant des révélateurs chimiques appropriés.

***Avantages de la CCM (Sherma et al.,2003)***

- Technique simple, rapide et peu coûteuse.
- Nécessite de petites quantités d'échantillon et de solvant.
- Permet de visualiser directement la séparation des composants.
- Peut être utilisée pour des analyses qualitatives et semi-quantitatives.

***Limitations de la CCM (Poole et al.,2003)***

- Résolution et sensibilité limitées par rapport à d'autres techniques chromatographiques.
- Difficulté à séparer les composants ayant des Rf similaires.
- Manque de reproductibilité quantitative précise.
- Difficultés à identifier les composants inconnus sans références.

***Applications de la CCM(Santiago et Strobel, 2013)***

- Analyse qualitative et semi-quantitative de mélanges simples.
- Contrôle de pureté et suivi de réactions chimiques.
- Analyse de routine dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et environnementale.

#### **2.2.4. La chromatographie sur colonne**

C'est une technique de séparation basée sur le principe de la migration différentielle des composants d'un mélange à travers une phase stationnaire contenue dans une colonne (**Skoog et al., 2018**).

##### ***Principe de fonctionnement (Holler et al.,2018)***

- Une colonne en verre ou en métal est remplie d'une phase stationnaire, généralement constituée d'un adsorbant solide (silice, alumine, gel de polymère poreux, etc.) ou d'un liquide non volatil déposé sur un support solide inerte.
- L'échantillon à séparer est déposé au sommet de la colonne.
- Une phase mobile liquide (solvant ou mélange de solvants) est introduite par gravité ou sous faible pression dans la colonne.
- Les différents composants de l'échantillon interagissent de manière différente avec la phase stationnaire en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (polarité, taille, charge, etc.).
- Les composants ayant une forte affinité pour la phase stationnaire sont retenus plus longtemps dans la colonne, tandis que ceux ayant une faible affinité sont élués plus rapidement.
- Les composants séparés sont recueillis en fractions à la sortie de la colonne.

##### ***Avantages de la chromatographie sur colonne (Poole et al., 2003)***

- Bonne résolution et capacité de séparation.
- Possibilité de traiter des quantités importantes d'échantillon.
- Large gamme de phases stationnaires et mobiles disponibles.
- Adaptée aux composés non volatils et thermosensibles.

##### ***Limitations de la chromatographie sur colonne (Skoog et al.,2018)***

- Processus lent et fastidieux pour les séparations complexes.
- Difficulté à contrôler précisément le débit de la phase mobile.
- Risque de diffusion de bande et de perte de résolution.
- Difficulté à automatiser et à coupler avec des détecteurs

##### ***Applications de la chromatographie sur colonne (Heftman et al., 2004)***

- Purification et isolation de produits naturels, de médicaments et de composés organiques.
- Séparation et analyse de mélanges complexes (huiles essentielles, pigments, etc.)
- Purification préparatoire de protéines, peptides et acides nucléiques en biochimie.

## *Matériels et Méthodes*



### 1. Matière végétale

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé les pétales de *Crocus sativus L.* (Figure 2). La plante a été identifiée et collectée dans les environs d'Ain Fezza, sur le djebel Zaafran, dans la commune de Tlemcen l'abri de la lumière et de l'humidité pour une utilisation ultérieure.. Les pétales ont été séchés à l'air libre à une température ambiante pendant 5 jours. Les échantillons ont été broyés en une poudre fine à l'aide d'un moulin de laboratoire. La poudre résultante a été stockée dans des flacons hermétiques et maintenue à



Figure 2: *Crocus sativus L.*

Ensuite, nous avons réalisé une délipidation de notre matière végétale en suivant ces étapes. D'abord, nous avons mélangé 20 g de matière végétale avec 250 ml d'hexane. La solution a été agitée puis incubée pendant 4 heures et 30 minutes pour extraire les lipides de manière optimale. Après cette incubation, nous avons effectué quatre lavages du liquide pour éliminer les impuretés solubles. Enfin, nous avons éliminé l'hexane par évaporation.

### 2. Extraction solide-liquide

L'extraction des constituants des pétales de *Crocus sativus* a été effectuée comme suit :

- **Macération** : Une prise de masse de 20g de matière végétale (pétales de *Crocus sativus L.*) séchées et broyées, a été ajoutée à 400 ml d'un mélange hydro-éthanolique (30 :70 v/v). Laisser macérer pendant 48 heures à une température de 4°C dans un réfrigérateur.
- **Filtration** : Le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman N 4.

- **Evaporation** : Le filtrat a été placé dans un évaporateur rotatif dans un ballon de distillation et chauffé doucement dans un bain-marie à 45°C jusqu'à évaporation complète des solvants, laissant ainsi l'extrait de pétales de safran sec (**Figure 3**).



**Figure 3: Extrait sec des pétales de safran**

### 3. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec est calculé par le rapport entre le poids de l'extrait sec déjà calculé (en gramme), avec le poids de matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme. Les rendements sont calculés par rapport à 100 grammes de la matière végétale sèche.

$$\text{Rendement (R) \%} = (\text{poids du résidu sec} / \text{poids de la prise d'essai}) * 100$$

### 4. Dosage des polyphénols totaux

**Principe** : L'évaluation quantitative des composés phénoliques dans les extraits végétaux repose majoritairement sur la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette technique exploite la capacité des composés phénoliques à réduire un mélange de phosphomolybdate ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) et de phosphotungstate ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ), présents dans le réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction aboutit à la formation d'un complexe bleu stable, dont l'intensité colorimétrique, mesurée à une longueur d'onde de 750 nm, est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques totaux.

**Mode opératoire** : Un volume de 0,1 ml de chaque extrait est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex et incubé pendant 5 minutes, puis 100 µl du réactif Folin-Ciocalteu 0,1N est ajouté au mélange. Le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm. (Tableau 5) L'absorbance maximale lue à 750nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans les extraits bruts. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en

utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

### **5. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

**Principe :** Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un composé stable qui se comporte comme un radical libre. Lorsqu'il rencontre un radical libre, il capte un atome d'hydrogène pour se stabiliser. Le test DPPH exploite cette propriété pour évaluer le pouvoir anti radicalaire des molécules antioxydantes. Ce test mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical DPPH en lui cédant un atome d'hydrogène. En présence d'un antioxydant, le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, de couleur jaune pâle. Cette réduction est facilement quantifiable par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm.

### **Teste de DPPH**

Solutions à préparer :

Solution de DPPH: 5 mg dans 200 mL de méthanol.

Solution d'acide ascorbique: solution mère SM à 400 mg/mL soit 2 g de poudre dans 5 mL H<sub>2</sub>O. Préparer des dilutions:

S1: d 1/2 (200 mg/mL): 200 ul SM + 200 ul H<sub>2</sub>O S2: d 1/4 (100 mg/mL): 100 ul SM + 300 uL H<sub>2</sub>O

S3: d 1/10 (40 mg/mL): 100 ul SM + 900 ul H<sub>2</sub>O

S4: d 1/10 de S1 (20 mg/mL): 100 ul de S1 + 900 ul H<sub>2</sub>O

Solution d'extraits polyphénols: solution mère SM de 200 mg/mL (utiliser l'extrait sec). Préparer 5 ml soit 1000 mg (ou 1 g) dans 5 ml H<sub>2</sub>O. Préparer des dilutions.

S1: d 1/2 (100 mg/mL): 200 ul SM + 200 ul H<sub>2</sub>O

S2: d 1/4 (50 mg/mL): 100 ul SM + 300 uL H<sub>2</sub>O

S3: d 1/10 (20 mg/mL): 100 ul SM + 900 ul H<sub>2</sub>O

S4: d 1/2 de S3 (10 mg/mL): 200 ul de S1 + 200 ul H<sub>2</sub>O

S5: d 1/10 de S2 (5 mg/mL): 200 ul S2 + 200 ul H<sub>2</sub>O .

### *Expression des résultats*

#### ➤ *Calcul des pourcentages d'inhibition*

Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de l'équation suivante :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

AC = absorbance du contrôle ; AT = absorbance du test effectué

#### ➤ *Calcul des CI50*

La concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres, est calculée graphiquement en traçant les pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées. Cette concentration est connue sous le terme CI50 ou concentration inhibitrice.

#### ➤ *Calcul de l'activité anti radicalaire*

Nous pouvons déduire l'activité anti radicalaire de notre extrait qui est inversement proportionnelle à la CI50 trouvée.

$$AAR = 1 / CI50$$

AAR : pouvoir anti radicalaire ; CI50 : La concentration d'inhibition de 50% DPPH.

L'activité anti radicalaire de l'extrait est comparée à celle de l'acide ascorbique.

## **6. Séparation liquide-liquide**

**Principe :** Il s'agit d'une technique de préparation d'échantillons alternative à l'extraction liquide-liquide conventionnelle, offrant plusieurs avantages : elle est plus rapide et plus facile à mettre en œuvre, nécessite moins de solvants organiques et se révèle plus efficace pour les analytes hautement polaires (**Hammad et al., 2022**).

**Mode opératoire :** L'extrait éthanolique sec a été solubilisé dans du dichlorométhane, puis introduit dans une ampoule à décanter. Par la suite, de l'eau a été ajoutée en volume équivalent pour former deux phases distinctes. Le mélange a été agité puis laissé décanter. Cette opération a conduit à la formation d'une phase aqueuse et d'une phase organique. Ensuite, du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été ajouté et les phases séparées ont été récupérées (**Figure 4**). La phase organique est ensuite introduite dans un ballon et évaporée à sec dans un évaporateur rotatif (**Figure 5**).

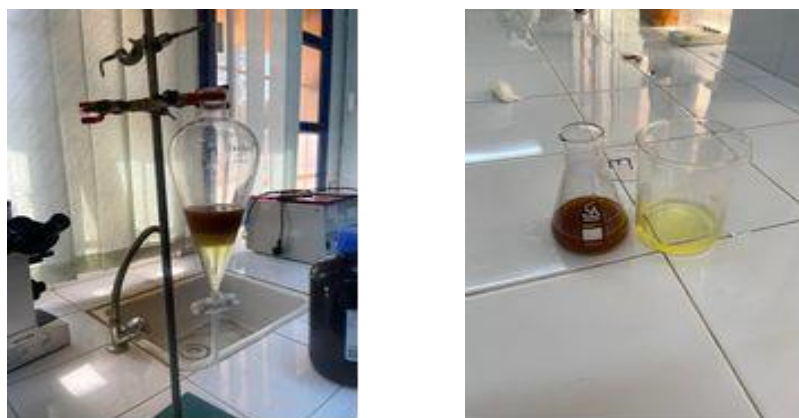


Figure 4: Séparation liquide-liquide



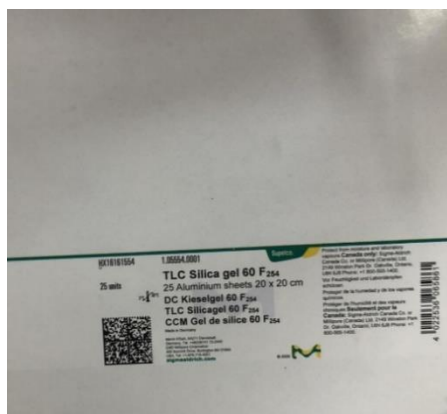
Figure 5: Evaporation de la phase organique

## 7. Analyses chromatographiques

### 7.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

**Principe :** La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium après que l'échantillon a été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Talbi et al.,2015).

**Préparation de la plaque :** Le choix de la plaque CCM dépend de la polarité des composés à séparer. Nous avons utilisé des plaques de silice préalablement préparées (**Figure6**). Nous avons tracé la ligne de départ à environ 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et nous avons déposé ensuite de petites quantités de la phase organique à analyser sous forme de points espacés le long de la ligne de départ, à l'aide d'une pipette Pasteur.



**Figure 6: Plaque de silice pour CCM**

**Développement de la plaque :** Une phase mobile composée de 95 % de dichlorométhane et de 5 % d'hexane est préparée dans une cuve chromatographique et une autre plaque avec 100% dichlorométhane. Les plaques sont ensuite immergées dans ces phases mobiles. Le solvant s'infiltré à travers la couche stationnaire, transportant les différents composés à des vitesses variables. Les composés les moins polaires se déplacent lentement, tandis que les composés les plus polaires se déplacent plus rapidement.

**Visualisation des taches :** Une fois que le solvant a atteint une certaine hauteur sur la plaque, celle-ci est retirée de la cuve et séchée. Les taches de la phase organique sont visualisées sur la plaque à la lumière UV à 365 nm (les composés fluorescents apparaissent alors comme des taches sombres sur un fond clair) (**Figure 7**).



**Figure 7: La chambre noire UV**

## 7.2. Analyse par chromatographie sur colonne

**Principe :** La chromatographie sur colonne est une technique de séparation utilisée pour séparer les composants d'un mélange. Elle est basée sur le principe que les différents

composants d'un mélange se déplacent à des vitesses différentes sur une colonne remplie d'un matériau adsorbant. Les composants les plus fortement adsorbés sur le matériau adsorbant, se déplacent le plus lentement, tandis que les composants les moins fortement adsorbés se déplacent le plus rapidement.

- **Colonne** : Une colonne est un tube fabriqué avec un matériau aussi inerte que possible aux produits chimiques, généralement en acier inoxydable ou en verre. Sa section ainsi que sa longueur sont variables, on choisit celle à utiliser selon la quantité d'extrait utilisé. Pour notre travail, nous avons utilisé une colonne d'un diamètre de 1,7 cm et d'une longueur de 47 cm (**Figure 8**).
- **Verrerie** : colonne en verre, béchers, pipettes pasteur, pro pipettes, entonnoirs, verre à pied, support et tubes à essai.
- **Matériaux** : gel de silice, dichlorométhane, hexane, éthanol, sable et coton.
- **Montage** : La réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace. On commence par placer un morceau de coton au fond de la colonne, que l'on recouvre d'éluant (dichlorométhane et hexane) pour éliminer l'air emprisonné dans le coton. Ensuite, on ajoute environ un demi-centimètre de sable au-dessus du coton pour empêcher la phase stationnaire de s'échapper de la colonne. Dans cette procédure, le sable est considéré comme n'ayant pas de propriétés adsorbantes. Enfin, on remplit la colonne avec la phase stationnaire en préparant une suspension de silice dans le premier éluant. Le gel ainsi formé est introduit dans la colonne à l'aide d'un entonnoir. On rince avec l'éluant et on laisse celui-ci s'écouler. Une fois la colonne remplie, on ajoute un demi-centimètre de sable en tête de colonne, au-dessus de la surface de silice, après avoir vérifié que cette dernière est plane. Cette couche de sable permet de réaliser des dépôts et d'ajouter de la phase organique sans perturber la surface de silice, ce qui garantit une bonne séparation. Il est important de vérifier régulièrement que la phase stationnaire ne soit pas à sec en s'assurant qu'il reste toujours de l'éluant au niveau du sable. L'éluant utilisé ici dans un premier temps est le dichlorométhane (190 ml) et l'hexane (10 ml) jusqu'au tube 32. Lorsque la première molécule est récupérée, on augmente la polarité graduellement jusqu'à ce qu'on arrive à un éluant composé que de dichlorométhane pur et on a récupère ainsi les molécules apolaires dans un autre tube. Après on ajoute l'éthanol jusqu'à 70% dichlorométhane et 30% éthanol. Il est souvent utile de réaliser des chromatographies sur couche mince sur chaque tube pour vérifier où sont les composés à séparer, dans le cas où ceux-ci ne sont pas colorés.



**Figure 8:La colonne chromatographique**



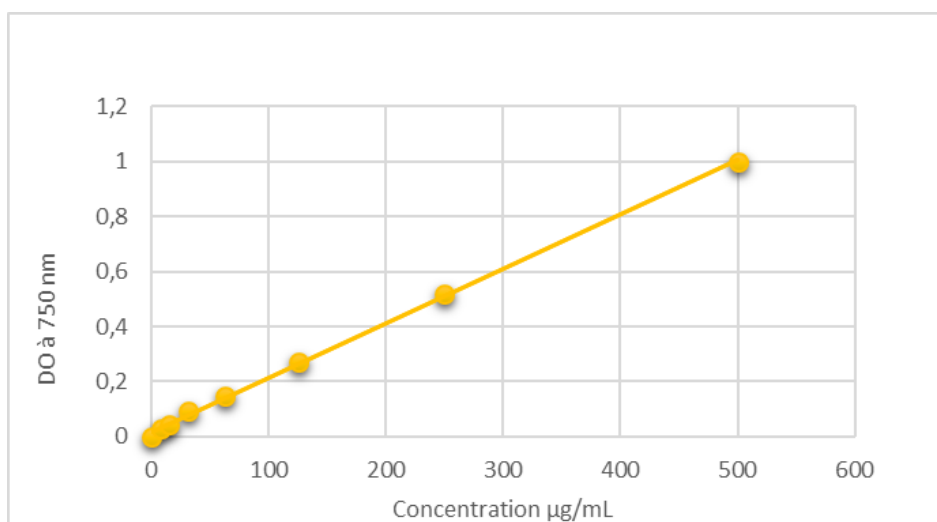
## ***Résultats et interprétations***

### 1. Rendement d'extraction

Extrait	Le rendement R (%)
Ethanolique	3,27

### 2. Détermination de la quantité de polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait étudié ont été déterminées par l'analyse de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, qui a montré une forte corrélation linéaire ( $R^2 = 0,9992$ ) entre l'absorbance mesurée à 750 nm et la concentration en polyphénols totaux exprimée en équivalents d'acide gallique ( $\mu\text{g/ml}$ ). L'équation de la droite d'étalonnage  $y = 0,002x + 0,018$  nous permet de déterminer la concentration inconnue de polyphénols totaux dans l'échantillon sur la base de l'absorbance mesurée.

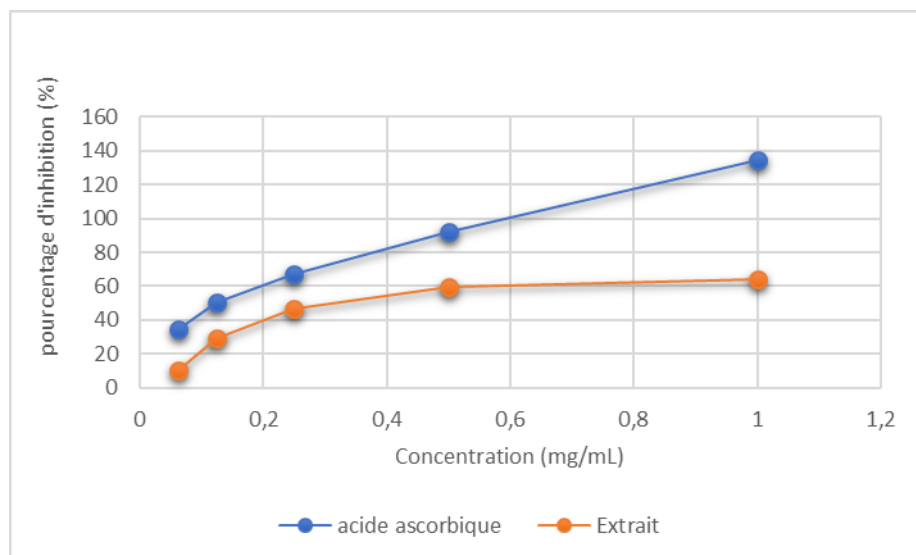


**Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux**

L'échantillon analysé présente une concentration notable en composés phénoliques, équivalente à  $24,80 \pm 0,61$  milligrammes d'acide gallique par gramme de matière sèche.

### 3. Activité antioxydante

La **Figure 10** montre le pourcentage d'inhibition de de l'extrait des pétales de safran en fonction de sa concentration, comparé à l'acide ascorbique. Les résultats présentés suggèrent que l'acide ascorbique présente une activité antioxydante plus élevée que l'extrait à toutes les concentrations testées.



**Figure 10: Pourcentage d'inhibition de l'extrait comparé à l'acide ascorbique**

➤ *Détermination de la CI50*

**\*\*CI50 de l'extrait :** La CI50 de l'extrait est de 13,75 µg/ml. Cela signifie que 13,75 µg d'extrait par ml sont nécessaires pour inhiber 50 % des radicaux libres DPPH.

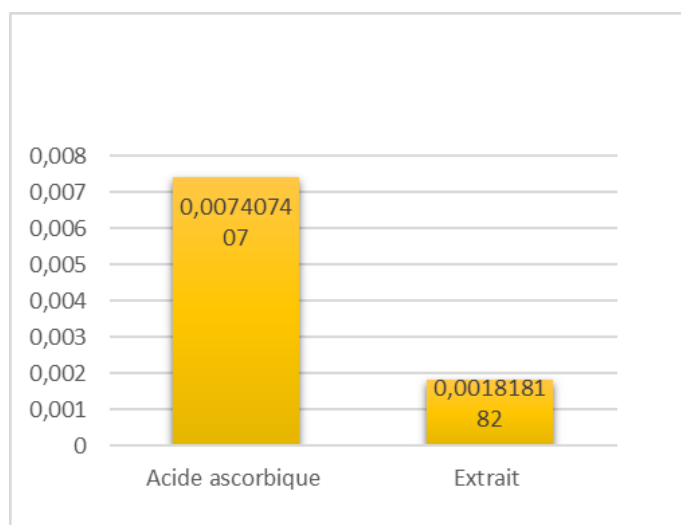
**\*\* CI50 de l'acide ascorbique :** La CI50 de l'acide ascorbique est de 3,375 µg/ml. Cela signifie que 3,375 µg d'acide ascorbique par ml sont nécessaires pour inhiber 50 % des radicaux DPPH.

➤ *Activité anti radicalaire*

La **Figure 11** montre les résultats de l'activité anti radicalaire de l'extrait, comparée à celle de l'acide ascorbique.

**Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique :** L'acide ascorbique montre une meilleure capacité à neutraliser les radicaux libres par rapport à l'extrait à toutes les concentrations évaluées. À une concentration de **0,0074**, l'acide ascorbique présente un taux d'inhibition d'environ **80%**. Cela indique qu'il peut neutraliser environ **80%** des radicaux libres présents dans le milieu.

**Activité antiradicalaire de l'extrait :** L'efficacité antiradicalaire de l'extrait progresse en fonction de sa concentration, cependant elle demeure moins élevée que celle de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations évaluées. À une concentration de **0,0018**, l'extrait montre un taux d'inhibition d'environ **30%**. Cela indique qu'il ne neutralise que **30%** des radicaux libres, soit environ **2,5** fois moins que l'acide ascorbique.



**Figure 11: Activité antiradicalaire de l'extrait et l'acide ascorbique**

#### 4. Analyses par chromatographie sur couche mince CCM

Dans notre étude, Nous avons testé deux éluants différents afin de déterminer celui qui permet la meilleure séparation.



**Figure 12: CCM avec 100% DCM    Figure 13: CCM avec 95 %DCM et 5% hexane**

*CCM avec du dichlorométhane 100%*: L'éluant est plus polaire, ce qui nous a donné :

- Une large tache.
- Une tache jaune plus petite et diffuse en dessous de la tache orange.
- Une tache bleue vers le bas de la plaque.

**CCM avec 95% DCM et 5% hexane** : L'éluant est moins polaire, ce qui nous a donné :

- Une tache orange intense.
- Une tache jaune clair et moins diffuse que sur la CCM avec du DCM pur.
- Une tache bleue en bas de la plaque.
- Une tache orange intense.

### 5. Analyse par chromatographie sur colonne

Les différentes taches observées sur le chromatogramme de la colonne indiquent la présence de différents composés dans la phase organique. Chaque tache correspond à un composé spécifique qui a été séparé en fonction de ses propriétés chimiques, notamment sa polarité. Dans notre colonne on a trouvé plusieurs molécules qui ont été isolées dans différents tubes de notre chromatographie sur colonne. Dans les tubes 31,32 et 33 nous avons isolé cinq molécules présentant différents rapports frontaux, soient :  $R_f = 0,4$  ;  $0,09$  ;  $0,19$  ;  $0,26$  et  $0,86$ .



**Figure 14: CCM des tubes 31,32,33.**

Après on a trouvé dans le tube 38 plusieurs taches

- La tache jaune ( $R_f 0,2$ )
- La tache bleue ( $R_f 0,6$ )
- Après il y'a un mélange ( $R_f 0,8$ )



**Figure 15: CCM des tubes 33,38 en 95% DCM et 5% hexane**



**Figure 16: CCM des tubes 33,38 en 100% DCM**

Les molécules disparaissent progressivement à partir du tube 40 jusqu'au tube 86. À partir du tube 87 jusqu'au tube 169, des molécules pures sont présentes, mais avec des valeurs de Rf différentes.



**Figure 17: CCM des tubes 151,154,157 en 80% DCM et 20% éthanol**

Dans les tubes 171 à 181, une molécule pure avec un Rf de 0,4 est présente. De même, dans les tubes 182 à 199, une molécule avec un Rf de 0,65 est détectée.



**Figure 18: CCM des tubes 182,184,188 en 80% DCM et 20% éthanol**

## *Discussion*



Le safran est une épice bien connue, produite depuis longtemps, principalement dans la région méditerranéenne, constituée par les stigmates. La production de safran fournit une grande quantité de pétales frais, qui ont jusqu'à présent été considérés comme des déchets agricoles. Il possède des propriétés antioxydantes, antidépressives et anticancéreuses. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux pétales de safran. Souvent négligés et jetés après la récolte des stigmates, ces sous-produits recèlent pourtant des propriétés intéressantes, bien que peu étudiées (**Hashemi Gahruie et al., 2020**).

De nos jours, le pétale de safran est utilisé comme agent biologique dans les industries agricoles. La transformation des pétales de safran en une ressource valorisable permet de réduire les déchets tout en créant de la valeur ajoutée. Grâce à leurs polyphénols antioxydants, ces pétales peuvent être extraits pour être utilisés dans divers produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Hosseini,etal.,2018**).

Notre projet de recherche vise à explorer l'extraction et la purification des molécules bioactives présentes dans les pétales de safran et de valoriser cette source de polyphénols, des composés bénéfiques pour la santé, présents dans les pétales de safran, et d'évaluer leur activité antioxydant.

Par conséquent, nous nous sommes intéressés à évaluer les composants actifs des extraits de pétales de safran dans le but de valoriser leur potentiel, en exploitant la faculté des composés phénoliques à réduire un mélange de phosphomolybdate ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) et de phosphotungstate ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), présents dans le réactif de Folin-Ciocalteu, comme indicateur de leur contenu en polyphénols totaux. Ainsi, nous avons préparé un extrait éthanolique à partir des pétales séchés, puis procédé à des dosages quantitatifs par des méthodes spectrophotométriques pour déterminer les polyphénols totaux et évaluer la capacité antioxydant de l'extrait

Les résultats de notre étude ont révélé une concentration en polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de pétales de safran de  $24,80 \pm 0,61$  mg équivalent gallique par gramme d'extrait. Cette concentration relativement élevée suggère que les pétales de safran sont une source potentiellement riche en composés polyphénoliques.

Les concentrations en polyphénols sont différentes selon le type d'extraction. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la littérature (**D'Jadouali et al., 2018**).

Dans notre étude, nous avons évalué l'activité antioxydant de l'extrait de pétales de safran en utilisant un test d'inhibition du radical libre, l'acide ascorbique un antioxydant bien connu. Le graphique illustre le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydant en fonction de la concentration de l'extrait, par rapport à l'acide ascorbique.

Les résultats ont montré que l'activité antioxydant de l'acide ascorbique était supérieure à celle de l'extrait de pétales de safran à toutes les concentrations testées. Cependant, il est important de noter que cela ne signifie pas nécessairement que l'extrait n'a pas d'activité antioxydant significative. D'autres facteurs, tels que la concentration optimale ou la synergie avec d'autres composés présents dans l'extrait, pourraient influencer les résultats.

Le test DPPH est une méthode pour évaluer l'activité antioxydant des composés en se basant sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical libre DPPH. Ce test permet de quantifier l'activité antioxydantes d'un échantillon en mesurant le changement de couleur spectrophotométriquement(Saeed et al.,2012)

Les résultats de notre étude indiquent que la CI50 de l'extrait de pétales de safran est de 550 µg/ml, tandis que celle de l'acide ascorbique est de 135 µg/ml. Cela signifie que pour inhiber 50 % de l'activité des radicaux libres, une concentration de 550 µg d'extrait par ml est nécessaire, tandis que seulement 135 µg d'acide ascorbique par ml suffisent pour obtenir le même effet. De plus, les données du graphique montrent que l'acide ascorbique présente une capacité nettement supérieure à neutraliser les radicaux libres par rapport à l'extrait, avec un taux d'inhibition d'environ 80 % à une concentration de 0,00740741. Ces résultats mettent en évidence la différence d'efficacité entre l'extrait de pétales de safran et l'acide ascorbique en termes d'activité antiradicalaire.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince indiquent que le mélange de 95 % de dichlorométhane et 5 % d'hexane est plus sélectif pour séparer les composés bioactifs du safran par rapport au dichlorométhane pur. Les différentes taches observées suggèrent une diversité de composés présents dans l'échantillon de safran.Ces résultats montrent une similitude avec d'autres études (Djozan et al., 2014).

Les résultats de la chromatographie sur colonne révèlent la présence de plusieurs composés dans la phase organique des pétales de safran. Chaque tachedes différentes fractions similaires correspond à un composé spécifique, séparé en fonction de ses propriétés chimiques, telle que sa polarité.

Dans les tubes 31, 32 et 33, cinq molécules distinctes ont été isolées, chacune présentant des caractéristiques différentes. De même, des composés ont été détectés dans les tubes suivants, avec des valeurs de Rf variées, ce qui indique une diversité de substances présentes.

L'objectif de cette étude était de trouver des extraits de plantes riches en antioxydants, utilisant des techniques de chromatographie sur colonne et sur couche mince pour identifier les composés actifs.

## ***Conclusion***

Le safran est un épice précieuse issue du *Crocus Sativus*, le safran se distingue par sa saveur unique, son arôme délicat et sa couleur dorée intense. Son utilisation s'étend bien au-delà de la gastronomie, où il agrmente les plats de sa saveur inimitable, pour toucher des domaines aussi variés que la médecine, la parfumerie et l'industrie textile.

Notre étude approfondie des pétales de safran a révélé une richesse insoupçonnée de propriétés antioxydantes remarquables, attribuables à la présence de composés phénoliques essentiels tels que la crocine, le safranal et la picrocrocine. Ces molécules ont été identifiées comme étant responsables des bienfaits pour la santé associée à cette épice précieuse depuis des siècles. Grâce à des dosages précis des polyphénols et à des tests DPPH rigoureux, nous avons pu confirmer l'activité antioxydant et antiradicalaire du safran, mettant en lumière son potentiel thérapeutique prometteur dans la prévention des dommages oxydatifs et des maladies associées.

Par ailleurs, notre analyse approfondie de l'extrait éthanolique des pétales a été menée à l'aide de techniques analytiques avancées telles que la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne. Ces méthodes ont permis une exploration détaillée de la composition chimique de l'extrait, révélant la présence de divers composés bioactifs. En particulier, la chromatographie sur couche mince a permis une visualisation claire des différents composés présents, tandis que la chromatographie sur colonne a permis leur isolement et leur caractérisation plus approfondie.

Cette analyse approfondie a non seulement confirmé la présence de composés purs dans l'extrait éthanolique des pétales de safran, mais elle a également renforcé son potentiel thérapeutique en démontrant la richesse et la diversité des molécules bioactives qu'il contient. Ces découvertes offrent de nouvelles perspectives passionnantes pour l'utilisation du safran dans divers domaines, de la médecine traditionnelle et dans la recherche pharmaceutique, ouvrant ainsi la voie à de futures études visant à explorer pleinement son potentiel thérapeutique et ses applications cliniques.

## *Références bibliographiques*

1. Ahmadian-Kouchaksaraie, Zahra, Razieh Niazmand, et Masoud Najaf Najafi. 2016. « Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 36 (août):234- 44. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.005>.
2. Akhondzadeh, S., M. Shafiee Sabet, M. H. Harirchian, M. Togha, H. Cheraghmakani, S. Razeghi, S. Sh Hejazi, et al. 2010. « Saffron in the Treatment of Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease: A 16-Week, Randomized and Placebo-Controlled Trial ». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 35 (5): 581- 88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2009.01133.x>.
3. Arakawa, Tsutomu, Yoshiko Kita, Daisuke Ejima, et Pete Gagnon. 2008. « Solvent Modulation of Column Chromatography ». *Protein and Peptide Letters* 15 (6): 544- 55. <https://doi.org/10.2174/092986608784966994>.
4. Ashktorab, Hassan, Akbar Soleimani, Gulshan Singh, Amr Amin, Solmaz Tabtabaei, Giovanni Latella, Ulrike Stein, et al. 2019. « Saffron: The Golden Spice with Therapeutic Properties on Digestive Diseases ». *Nutrients* 11 (5): 943. <https://doi.org/10.3390/nu11050943>.
5. Christodoulou, Eirini, Nikolaos P. E. Kadoglou, Nikolaos Kostomitsopoulos, et Georgia Valsami. 2015. « Saffron: A Natural Product with Potential Pharmaceutical Applications ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67 (12): 1634- 49. <https://doi.org/10.1111/jphp.12456>.
6. Dam, Arpita R., Aparna J. Ahuja, Moharpal Singh, et Rajdeep Singh. 2013. « Limitation of HPLC Methodology for HBA1c Estimation ». *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 56 (4): 483- 84. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.125413>.
7. Djozan, Djavanshir, Ghader Karimian, Abolghasem Jouyban, Fahime Iranmanesh, Hooshang Gorbanpour, et Ali Alizadeh-Nabil. 2014. « Discrimination of Saffron Based on Thin-Layer Chromatography and Image Analysis ». *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 27 (4): 274- 80. <https://doi.org/10.1556/jpc.27.2014.4.7>.
8. Garavand, Farhad, Somaye Rahae, Nooshin Vahedikia, et Seid Mahdi Jafari. 2019. « Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients ». *Trends in Food Science & Technology* 89 (juillet):26- 44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.005>.
9. Garg, Uttam, Ada Munar, et C. Clinton Frazee. 2012. « Simultaneous Determination of Cyclosporine, Sirolimus, and Tacrolimus in Whole Blood Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 902:167- 73. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-934-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-934-1_15).

10. Hammad, Sherin F., Inas A. Abdallah, Alaa Bedair, et Fotouh R. Mansour. 2022. « Homogeneous Liquid-Liquid Extraction as an Alternative Sample Preparation Technique for Biomedical Analysis ». *Journal of Separation Science* 45 (1): 185- 209. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100452>.
11. Hashemi Gahruie, Hadi, Karim Parastouei, Mohsen Mokhtarian, Hosein Rostami, Mehrdad Niakousari, et Ziba Mohsenpour. 2020. « Application of innovative processing methods for the extraction of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus*) petals ». *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 19 (décembre):100264. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100264>.
12. Hosseini, Azar, Bibi Marjan Razavi, et Hossein Hosseinzadeh. 2018. « Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a review ». *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21 (11): 1091- 99. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.31243.7529>.
13. Lage, Mounira, et Charles L. Cantrell. 2009. « Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocine and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions ». *Scientia Horticulturae* 121 (3): 366- 73. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.017>.
14. Lin, Chiao-Wen, Pei-Ni Chen, Mu-Kuan Chen, Wei-En Yang, Chih-Hsin Tang, Shun-Fa Yang, et Yih-Shou Hsieh. 2013. « Kaempferol Reduces Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Down-Regulating ERK1/2 and the Activator Protein-1 Signaling Pathways in Oral Cancer Cells ». *PLoS ONE* 8 (11): e80883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080883>.
15. Lionaki, Sophia, Chrysanthi Skalioti, et John N Boletis. 2014. « Kidney transplantation in patients with systemic lupus erythematosus ». *World Journal of Transplantation* 4 (3): 176- 82. <https://doi.org/10.5500/wjt.v4.i3.176>.
16. Lu, Cuncun, Lixin Ke, Jieyun Li, Haitong Zhao, Tingting Lu, Alexios Fotios A. Mentis, Youyou Wang, et al. 2021. « Saffron (*Crocus Sativus* L.) and Health Outcomes: A Meta-Research Review of Meta-Analyses and an Evidence Mapping Study ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 91 (octobre):153699. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153699>.
17. Madadlou, Ashkan, Siobhan O'Sullivan, et David Sheehan. 2011. « Fast Protein Liquid Chromatography ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 681:439- 47. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_25).
18. Maggi, Maria Anna, Silvia Bisti, et Cristiana Picco. 2020. « Saffron: Chemical Composition and Neuroprotective Activity ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (23): 5618. <https://doi.org/10.3390/molecules25235618>.



19. Mestres, Christian, Aurélien Briffaz, et Dominique Valentin. 2019. « 12 - Rice cooking and sensory quality ». In *Rice (Fourth Edition)*, édité par Jinsong Bao, 385- 426. AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811508-4.00012-5>.
20. Mohajeri, Seyed Ahmad, Samaneh Sepahi, et Adel Ghorani Azam. 2020. « Chapter 27 - Antidepressant and antianxiety properties of saffron ». In *Saffron*, édité par Alireza Koocheki et Mohammad Khajeh-Hosseini, 431- 44. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00028-9>.
21. Moore, Stephanie, Jinshu Qiu, David Semin, Zhixin J. Tan, et Jette Wypych. 2020. « Development and Validation of a HPLC-UV Method for Urea and Related Impurities ». *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 74 (1): 2- 14. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2018.009803>.
22. Mzabri, Ibtissam, Mohamed Addi, et Abdelbasset Berrichi. 2019. « Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*) ». *Cosmetics* 6 (4): 63. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040063>.
23. Naim, Nadia, Aziz Bouymajane, Yassine Oulad El Majdoub, Said Ezrari, Rachid Lahlali, Abdesslem Tahiri, Said Ennahli, et al. 2023. « Flavonoid Composition and Antibacterial Properties of *Crocus Sativus* L. Petal Extracts ». *Molecules* 28 (1): 186. <https://doi.org/10.3390/molecules28010186>.
24. Peng, Jiao, Huan Deng, Bin Du, Peigen Wu, Lifang Duan, Ronghe Zhu, Ziwan Ning, Jinxiu Feng, et Haitao Xiao. 2023. « Saffron Petal, an Edible Byproduct of Saffron, Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Inhibiting Macrophage Activation and Regulating Gut Microbiota ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71 (28): 10616- 28. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07915>.
25. Predieri, Stefano, Massimiliano Magli, Edoardo Gatti, Francesca Camilli, Pamela Vignolini, et Annalisa Romani. 2021. « Chemical Composition and Sensory Evaluation of Saffron ». *Foods* 10 (11): 2604. <https://doi.org/10.3390/foods10112604>.
26. Saeed, Naima, Muhammad R Khan, et Maria Shabbir. 2012. « Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12 (novembre):221. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>.
27. Sani, Anis, Ali Tajik, Seiiid Sina Seiiedi, Razieh Khadem, Haniye Tootooni, Mohammadhossein Taherynejad, Nasim Sabet Eqlidi, Seyyed Mohammad Matin Alavi Dana, et Niloofar Deravi. 2022. « A Review of the Anti-Diabetic Potential of Saffron ». *Nutrition and Metabolic Insights* 15:11786388221095223. <https://doi.org/10.1177/11786388221095223>.

28. Santiago, Marina, et Scott Strobel. 2013. « Thin Layer Chromatography ». *Methods in Enzymology* 533:303- 24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>.
29. Sheng, Liang, Zhiyu Qian, Shuguo Zheng, et Liang Xi. 2006. « Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase ». *European Journal of Pharmacology* 543 (1): 116- 22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.038>.
30. Siddiqui, Shahida Anusha, Ali Ali Redha, Edgar Remmet Snoeck, Shubhra Singh, Jesus Simal-Gandara, Salam A. Ibrahim, et Seid Mahdi Jafari. 2022. « Anti-Depressant Properties of Crocin Molecules in Saffron ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (7): 2076. <https://doi.org/10.3390/molecules27072076>.
31. Skourtis, Georgios, Anthi Krontira, Stavroula Ntaoula, Anastasia Varvara Ferlemi, Konstantina Zeliou, Constantinos Georgakopoulos, Georgios Marigoula Margarity, Nikolaos Fotini Lamari, et Nikolaos Pharmakakis. 2020. « Protective antioxidant effects of saffron extract on retinas of streptozotocin-induced diabetic rats ». *Romanian Journal of Ophthalmology* 64 (4): 394- 403. <https://doi.org/10.22336/rjo.2020.61>.
32. Tousseyn, Thomas, Krystyna Bajsarowicz, Henry Sánchez, Ania Gheyara, Abby Oehler, Michael Geschwind, Bernadette DeArmond, et Stephen J. DeArmond. 2015. « Prion Disease Induces Alzheimer Disease-Like Neuropathologic Changes ». *Journal of neuropathology and experimental neurology* 74 (9): 873- 88. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000228>.
33. Zacharis, Constantinos K. 2020. « Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid Phase Microextraction: A Two-Decade Overview ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (9): 2096. <https://doi.org/10.3390/molecules25092096>.
34. Zahmati, Roghaieh, Hosein Amir Shekari, et Mohammad Hosein Fotokian. 2018. « Growth and Development of Saffron (*Crocus Sativus* L.) in Response to Temperature Pre-Treatment and Environmental Conditions ». *Journal of BioScience and Biotechnology* 7 (1): 47- 50.
35. Zobeidi, Zeyneb, et Abderrahmane Benkhalifa. 2014. La culture du Safranier (*Crocus sativus* L.) en Algérie. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20923.67368/1>