



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des substances naturelles et bioactives

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Option : **Molécules Bioactives : Synthèses et Applications**

Présenté Par : **Melle BENHAOUA Siham**

Activité antioxydante et analyse chimique des acides gras et des insaponifiables
*de **Carthamus caeruleus***

Devant le jury

Président :	Mourad BENDAHOU	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs :	Boufeldja TABTI	Professeur	Université de Tlemcen
	Nabila AINSEBAA	MC(A)	Université de Tlemcen
Directeur de mémoire	Zoheir ARRAR	MCA	Université de Tlemcen

Le 05 Juin 2016

Année universitaire : 2015/2016

Dédicaces

A mes chers parents

A mes chers frères Fouad et Amine

A toute ma famille

A tous mes amis

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous a donné le courage, la force, la santé et la persistance.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche au sein du laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyse (COSNA) de la faculté des sciences de Tlemcen (Abou Bekr Belkaid) sous la direction du professeur **KAJIMA MULENGI Joseph**. Qu'il retrouve ici l'expression de mes remerciements de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie mon promoteur le Docteur **ARRAR Zoheir** enseignant au département de chimie à l'université Abou Bekr Belkaid pour l'honneur qu'il m'a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils et sa patience tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Je n'oublie pas de remercier le responsable du master MBSA ; **Pr. Mohamed el Amine DIB** de m'avoir accueillie dans ce Master et pour sa permanente disponibilité, la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.

Je remercie le Professeur Mourad BENDAHOU, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

J'adresse également mes remerciements au Professeur **Boufeldja TABTI** et au Docteur **Nabila AINSEBAA** d'avoir accepté de juger ce travail.

Il serait vain de citer tous les enseignants ayant participé à ma formation. Je dis merci.

Sommaire

▪ Liste des figures	
▪ Liste des tableaux	
▪ Liste des schémas	
▪ Liste des symboles et abréviations	
▪ Introduction.....	1
▪ Partie bibliographique.....	2
Chapitre I : Etude botanique de <i>Carthamus caeruleus</i>.....	2
I. Genre <i>Carthamus</i>	2
II. Présentation botanique de <i>Carthamus caeruleus</i>	2
II.1. Description.....	2
II.2. Classification systématique.....	3
II.3. Distribution.....	3
II.4. Utilisation traditionnelle.....	3
III. Travaux scientifiques réalisés sur différentes espèces de genre <i>Carthamus</i>	3
III.1. Les acides gras.....	4
III.2. Les insaponifiables.....	5
IV. Travaux scientifiques réalisés sur <i>Carthamus caeruleus</i>	5
Chapitre II : Rappels théoriques.....	6
I. Radicaux libres et leurs effets néfastes sur la santé humaine.....	6
II. Evaluation de l'activité antioxydante des plantes médicinales.....	6
III. Acides gras.....	7
III.1. Définition.....	7
III.2. Rôle des acides gras	7
III.3. Application des acides gras.....	8
IV. Les insaponifiables.....	9
IV.1. Définition.....	9
IV.2. Domaine d'application.....	9

▪ **Partie expérimentale.....10**

Chapitre I : Matériels et méthodes.....10

I.	Matériel végétal.....	10
II.	Dégraissage du matériel végétal.....	10
III.	Propriétés chimiques et physiques de l'extrait huileux.....	11
	III.1. Indice d'acide.....	12
	III.2. Indice de saponification.....	12
	III.3. Indice d'estérification.....	13
	III.4. Indice de peroxyde.....	13
	III.5. Indice de réfraction.....	14
	III.6. Densité.....	14
IV.	Etude des acides gras.....	15
	IV.1. Saponification.....	16
	IV.2. Libération des acides gras.....	16
	IV.3. Transformation des acides gras en esters méthyliques.....	17
	IV.3.1. Estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore.....	17
	IV.3.2. Estérification par le méthanol en présence d'un acide fort.....	17
	IV.4. Identification et analyse des acides gras par CPG et CPG/SM.....	18
	Conditions opératoires.....	19
V.	Etude de la fraction des insaponifiables.....	20
	V.1. Extraction.....	20
	V.2. Détection des familles de l'insaponifiable.....	20
	V.2.1. Tests phytochimiques.....	20
	V.2.2. chromatographie sur couche mince (CCM).....	21
VI.	Etude des stérols.....	22
	VI.1. Fractionnement par chromatographie sur colonne.....	22
	VI.2. Calcul le rapport frontal des stérols (Rf).....	22
	VI.3. Analyses des stérols par CPG et CPG/SM.....	23
	VI.3.1. Préparation des acétates des stérols.....	23

VI.3.2. Identification et analyse des stérols par CPG et CPG/SM.....	24
VII. Evaluation de l'activité antioxydante.....	24
VII.1. Test de piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl).....	24
VII.2. Pouvoir réducteur: FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	25
VII.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	26
Chapitre II : Résultats et discussion.....	27
I. Extraction par soxhlet.....	27
I.1. Caractéristiques de l'extrait hexanique obtenu des racines de <i>C. caeruleus</i>	27
I.2. Calcul du rendement.....	27
II. Propriétés chimiques et physiques de l'extrait huileux.....	27
II.1. Indice d'acide.....	27
II.2. Indice de saponification.....	28
II.3. Indice d'estérification.....	28
II.4. Indice de peroxydation.....	29
II.5. Indice de réfraction.....	29
II.6. Densité.....	30
III. Etude des acides gras.....	32
III.1. calcul du rendement.....	32
III.2. Transformation des acides gras en esters méthyliques.....	32
III.2.1. Estérification par le méthanol en présence d'un acide fort.....	32
III.2.2. Estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore.....	34
III.2.3. Interprétation des deux chromatogrammes.....	35
III.2.4. Comparaison entre les deux catalyseurs (BF_3 et HCl).....	36
IV. Etude de la fraction des insaponifiables.....	37
IV.1. Calcul du rendement.....	37
IV.2. Détection des familles de l'insaponifiable.....	37

IV.2.1. Tests phytochimiques.....	37
IV.2.2. chromatographie sur couche mince.....	37
V. Etude des stérols.....	38
V.1. Chromatographie sur colonne.....	39
V.2. Calcul le rapport frontal des stérols (Rf).....	40
V.3. Analyses des stérols par CPG et CPG/SM.....	41
V.3.1. Préparation des acétates des stérols.....	42
VI. Evaluation de l'activité antioxydante.....	43
VII.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	43
VII.2. Pouvoir réducteur: FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	44
VII.3. Test de blanchissement du bêta-carotène.....	45
▪ Conclusion.....	47
▪ Références bibliographiques.....	48

Listes des figures

Figure 1 : Morphologie des *Carthamus* extraite de l'encyclopédie histoire naturelle.

Figure 2 : quelques structures de stérols.

Figure 3 : Poudre des racines de *Carthamus caeruleus*.

Figure 4 : Montage d'un extracteur de soxhlet.

Figure 5 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les EMAG du *Carthamus caeruleus* en présence de HCl par IR.

Figure 6 : Chromatogramme des EMAG après estérification en présence de HCl.

Figure 7 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les EMAG du *Carthamus caeruleus* en présence de BF_3 par IR.

Figure 8 : Chromatogramme des EMAG après estérification en présence de BF_3 .

Figure 9 : Fractionnement de la fraction insaponifiable par colonne.

Figure 10 : confirmation et le suivie de présence des stérols par CCM.

Figure 11 : Calcul R_f des stérols.

Figure 12 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les acétates de stérols du *C. caeruleus* en présence de la pyridine par IR.

Figure 13 : Pouvoir réducteur de l'huile, des acides gras et des insaponifiables des racines de *Carthamus caeruleus* et de BHT.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique de *Carthamus caeruleus*.

Tableau 2 : Composition des acides gras de différentes espèces de genre *Carthamus*.

Tableau 3 : Composition des insaponifiables de *Carthamus tinctorius*.

Tableau 4 : Structures et nomenclatures de quelques acides gras.

Tableau 5 : les indices d'acide des principaux corps gras.

Tableau 6 : les indices de saponification des principaux corps gras.

Tableau 7 : les indices d'ester de certaines huiles végétales.

Tableau 8 : les indices de peroxyde de certaines huiles végétales.

Tableau 9 : indice de réfraction de quelques huiles végétales.

Tableau 10 : les indices de réfraction des huiles en fonction de l'acide gras insaturé prédominant.

Tableau 11 : la densité de certaines huiles végétales.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats des indices de l'extrait huileux des racines de *C.caeruleus*.

Tableau 13 : Identification et composition moyenne des acides gras correspondants de *C.caeruleus* (%) obtenus en présence de HCl.

Tableau 14 : Identification et composition moyenne des acides gras correspondants de *C.caeruleus* (%) obtenus en présence de BF₃.

Tableau 15 : Résultats des tests phytochimiques.

Tableau 16 : profil CCM.

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Carthamus* et du BHT à différentes concentrations.

Tableau 18 : Résultats du test de blanchissement du β-carotène.

Liste des schémas

Schéma 1 : Réaction de saponification.

Schéma 2 : Réaction acido-basique pour l'obtention des acides gras.

Schéma 3 : Réaction d'estérification.

Schéma 4: Réaction d'estérification par un acide fort(HCl).

Schéma 5 : fractionnement des stérols.

Liste des symboles et abréviations

CPG	Chromatographie en phase gazeuse	pH	Le potentiel hydrogène
CPG/SM	Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse	AG	Acide gras
cm	Centimètre	UV	Le rayonnement ultraviolet
(%)	Pourcentage (pour cent)	nm	nanomètre
mg	Milligramme	BHT	hydroxytoluène butylé
g	Gramme	µl	microlitre
Kcal	Kilocalorie	Réfs	Références bibliographiques
ml	Millilitre	<i>C.caeruleus</i>	<i>Carthamus caeruleus</i>
M	Concentration molaire		
° C	degré Celsius	DO	Densité optique
EMAG	Les esters méthyliques d'acide gras	µg	microgramme

La quête des remèdes au sein du règne végétal date de plusieurs millénaires. Depuis le 19^{ème} siècle, les scientifiques s'appliquent à isoler des molécules responsables de l'activité thérapeutique des plantes. La majorité des médicaments les plus vendus sont d'origines végétales. A ce jour, moins de 15% des 250 000 espèces connues du règne végétal auraient fait l'objet d'analyse visant à y déterminer la présence de molécules bioactives. Parmi ces molécules bioactives se trouvent les corps gras qui ont fait l'objet de beaucoup de recherches explorant ce monde sans frontières. Les corps gras occupent une place importante dans le monde ; les trois quarts de la production sont destinés à l'alimentation, le reste se partage entre les applications industrielles, pharmaceutiques et cosmétiques. En plus des acides gras, les vertus des huiles résident notamment dans leur insaponifiable, c'est à dire dans leur partie non lipidique qui contient de nombreuses molécules tels que les terpènes, les stéroïdes, les caroténoïdes, les tocophérols, etc. Toutes ces molécules confèrent à chaque huile des propriétés particulières comme par exemple l'utilisation à visée cardio-vasculaire, anticancéreux ou bien encore antidiabétique [1].

Les propriétés antioxydantes des extraits végétaux sont massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher un apport supplémentaire de composés antioxydants [2].

L'objectif du présent travail est une contribution à l'étude de l'activité antioxydante et de la composition chimique des acides gras et des insaponifiables de *Carthamus caeruleus*.

La présentation de nos travaux est répartie comme suit :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique et une présentation botanique du genre *Carthamus* et sur notre plante *Carthamus caeruleus* ; ainsi que la présentation des travaux scientifiques réalisés sur la plante et sur différentes espèces du même genre *Carthamus*.

La deuxième partie concerne l'expérimentation réalisée sur la plante étudiée qui présente les méthodes d'extraction, l'estérification des acides gras, leurs analyses par CPG et CPG/SM, les conditions expérimentales (CPG, CPG/SM), menant à l'identification de la composition chimique des acides gras et des insaponifiables, ainsi que les différentes méthodes utilisées pour évaluer leurs activités antioxydante.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale.

Chapitre I : Etude botanique de *Carthamus caeruleus*

I. Genre *Carthamus*

Le nom générique est peut être dérivé d'un mot arabe, signifiant «teinture (Kartam), et rappellerait les propriétés de certaines de ces plantes» [3]. C'est une de plante à fleurs qui a des rapports avec les chardons [4]. *Carthamus* est un membre de la tribu des cynarées, sous-famille tubuliflores, et de la famille des Astéracées. Il comprend 25 espèces [5].



Figure 1 : Morphologie des *Carthamus* extraite de l'encyclopédie histoire naturelle. Benard.XVIII ème siècle. Coloris postérieur.

II. Présentation botanique de *Carthamus caeruleus*

Etymologie : *caeruleus* s'applique aux fleurs « de la couleur du ciel ».

Floraison : Avril-Juillet

Habitat : Champs, terrains incultes, commun partout [3].

II.1. Description

Plante vivace, herbacée, 20-60 cm de haut. Tige érigée, généralement simple, à au moins 10 feuilles. Feuilles alternes à courts piquants sur le bord. Toutes les fleurs bleues [6].

- **Synonymes** :

Kentrophyllum caeruleum.

Carduncellus caeruleus.

Onoborma caerulea.

Carthamus tingitanus. [7]

Nom Français : Cardoncelle bleue. [8]

Nom Arabe : Gergaa, Kendjar. [9]

II.2. Classification systématique :

Tableau 1: Position taxonomique de *Carthamus caeruleus*. [9]

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Cynarées
Sous-embranchement	Centaureines
Famille	Astéracées
Sous-famille	Carduoidées
Genre	<i>Carthamus</i>
Espèce	<i>Carthamus caeruleus</i>

II.3. Distribution :

Cette espèce préfère les endroits ensoleillés dans le bassin méditerranéen, elle est d'origine de sud-ouest d'Asie mais elle se trouve dans le nord d'Afrique, l'Europe et l'Amérique [10].

II.4. Utilisation traditionnelle :

Certains herboristes suggèrent que les racines de *Carthamus caeruleus* peuvent être utiles pour traiter les maladies de la peau et comme un cicatrisant qui contribue à guérir les brûlures et même pour les inflammations articulaires ; les racines sont appliquées sous forme de poudre ou de crème préparé avec du lait.

III. Travaux scientifiques réalisés sur différentes espèces de genre *Carthamus* :

La recherche bibliographique exhaustive effectuée sur cette espèce a montré que, jusqu'à ce jour, il semblerait qu'aucune étude n'ait été réalisée sur l'identification des acides gras et des insaponifiables de *Carthamus caeruleus*. Cependant les travaux antérieurs réalisés sur les autres espèces sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

III.1. Les acides gras

Tableau 2 : Composition des acides gras de différentes espèces de genre *Carthamus*.

Espèces	Composition en acides gras (%)					
	Pays	Réfs	Palmitique	Stéarique	Oléique	Linoléique
<i>C. oxyacantha</i>	Inde	[5]	7.61	2.31	13.84	76.23
	Iran	[11]	6.09-8.33	2.50-4.87	14.11-19.28	63.90-75.43
<i>C. glaucus</i>	Inde	[5]	8.86	6.33	23.40	61.41
<i>C. creticus</i>	Inde	[5]	8.84	3.03	16.04	72.09
	Inde	[5]	8.45	2.52	20.09	68.94
<i>C. turkestanicus</i>	Iran	[12]	4.52	0.86	11.20	83.43
	Inde	[5]	9.72	2.74	23.17	64.37
<i>C. lanatus</i>	Iran	[11]	7.44-8.78	2.50-4.87	16.70-19.77	62.47-71.08
<i>C. palaestinus</i>	Inde	[5]	6.03	2.26	20.57	71.14
<i>C. dentatus</i>	Iran	[12]	4.90	1.20	21.10	72.80
	Australie	[13]	5.9	1.7	80.7	10.5
<i>C. tinctorius</i>	Iran	[11]	5.48-7.59	1.72-2.86	12.24-15.43	71.05-76.12
	Espagne	[14]	7.36	2.19	10.63	79.49
	Maroc	[14]	7.20	2.39	11.29	77.94

Travaux antérieurs

D'après la composition des acides gras de différentes espèces de genre *Carthamus* étudiée (tableau 2). Nous notons une nette prédominance des acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés. La proportion d'acides gras saturés ; varie légèrement entre 0.86% et 8.86%, la proportion des acides gras insaturés varie entre 10.63% et 83,43%.

L'analyse des acides gras montre que les acides gras : palmitique, oléique, stéarique et linoléique sont les principaux acides gras identifiés. L'acide palmitique a été le principal acide gras saturé (4.52 à 8.86%) suivi par de l'acide stéarique (0.86 à 6.33%). L'acide linoléique est l'acide gras principale (de 61.43 à 83,43%) suivi par l'acide oléique (10.63 à 23.40%) comme le deuxième principal acide gras. Une exception pour *C.tinctorius* de l'Australie; l'acide oléique est le principal acide gras (80.7%) suivi par l'acide linoléique (10.5%).

Les proportions relatives de ces deux acides gras principaux montrent des propriétés nutritionnelles appropriées d'huiles alimentaires [14].

III.2. Les insaponifiables :

Parmi les espèces du genre *Carthamus* ; *C. tinctorius* est la seule espèce qui a fait l'objet de plusieurs études préalables, notamment, des insaponifiables.

Tableau 3 : Composition des insaponifiables de *Carthamus tinctorius*

Espèces	Pays	Réfs	Insaponifiables (%)	Stérols (mg/100 g)	Tocophérols (mg/100 g)
<i>C.tinctorius</i>	France	[15]	0.5-1.5	240-380	30-60
	Malawi	[16]	1.2	5.32 %	1.36
	Iran	[17]	0.6	124.80-297.62	20.18-46.59
	Egypte	[16]	1.45	12%	4.05
	Allemagne	[18]	1	/	47.8-73.09
	Maroc	[19]	1.5	364-414	46.15- 49.96

IV. Travaux scientifiques réalisés sur *Carthamus caeruleus*

Le travail réalisé par Baghiani et *al.* (2009) dans la wilaya de Sétif située au nord-est de l'Algérie a porté sur les racines. Les principaux composés isolés de cette espèce sont les polyphénols et les flavonoïdes. Il a été trouvé que l'extrait de racines de *Carthamus caeruleus* est un inhibiteur efficace de xanthine oxydase, et possède des propriétés de piégeage de radicaux libres en raison de sa teneur élevée en acides phénoliques et des flavonoïdes [20].

Chapitre II : Rappels théoriques

I. Radicaux libres et leurs effets néfastes sur la santé humaine :

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre, mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution et certaines pathologies comme le diabète, le cancer, le SIDA, l'inflammation, pathologies cardiovasculaires) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif [21].

II. Evaluation de l'activité antioxydante des plantes médicinales :

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires. L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) [22].

III. Acides gras

III.1. Définition :

Les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides. Ils sont composés d'une chaîne hydrocarbonée comportant à une extrémité un groupement méthyle CH_3 et à l'autre extrémité un groupement carboxyle COOH . Ils se définissent par leur nombre de carbone, leur degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons) et la position des doubles liaisons (saturés, monoinsaturés, polyinsaturés) [23].

Tableau 4: Structures et nomenclatures de quelques acides gras

Nombre de carbone	Nom commun	Dénomination biologique	Nom chimique	Structure
12	Acide laurique	$\text{C}_{12} : 0$	Acide Dodécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$
16	Acide palmitique	$\text{C}_{16} : 0$	Acide Hétéradécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$
20	Acide arachidique	$\text{C}_{20} : 0$	Acide Eicosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide oléique	$\text{C}_{18} : 1\omega 9$	Acide cis 9-octadécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide linoléique	$\text{C}_{18} : 2\omega 6$	Acide cis 9,12-octadécadiénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$
20	Acide arachidonique	$\text{C}_{20} : 4\omega 6$	Acide cis 5, 8, 11,14-eicosatétraénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$

III.2. Rôle des acides gras :

Dans l'organisme, les **lipides dont les briques de base sont les acides gras ; ils sont indispensables** pour notre organisme par exemple: **notre cerveau est constitué d'au moins 50 % de lipides** et plus de 60 % de ces lipides sont des acides gras oméga-3 [24]. Les acides gras possèdent 4 **fonctions** principales :

Réserve d'énergie : stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux, les lipides constituent ainsi une réserve énergétique mobilisable (1 g de lipides donne environ 9,3 Kcal).

Un rôle structural : les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organelles. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité).

Un rôle de messager : ils participent à la synthèse de médiateurs intercellulaires et d'hormones régulant les fonctions cellulaires, la transmission des signaux et l'expression des gènes.

Un rôle de transport de vitamines : ils véhiculent quatre vitamines liposolubles : A, D, E et K [25].

III.3.Application des acides gras :

- **En industrie cosmétique :**

Les acides gras saturés; sont utilisés comme facteur de consistance ou pour enrichir et stabiliser les émulsions, durcir les baumes, mais aussi pour fabriquer les savons et les bougies. Par exemple : l'acide stéarique est capable de former in situ un émulsionnant ; Il entre dans la composition de sticks déodorants sous forme de savon de sodium.

Les acides gras monoinsaturés ; l'acide oléique est un ingrédient très fréquemment utilisé. Connue pour ses propriétés nourrissantes, il participe au renforcement du film hydrolipidique qui aide la peau à conserver son élasticité et sa souplesse. Il possède également des vertus réparatrices et cicatrisantes.

Les acides gras polyinsaturés ; A l'intérieur de notre peau, l'acide linoléique entre dans la composition des céramides, qui, eux, font partie du ciment lipidique, véritable barrière protectrice de l'épiderme. Une carence en oméga 6 aura pour conséquence une sécheresse intense de la peau (la peau n'est plus capable de retenir l'eau), un teint moins éclatant, des cheveux cassants et ternes.

Les acides gras estérifiés sont les plus employés dans le domaine cosmétique ; la diversité de ce type de matières premières permet l'obtention de produits cosmétiques ayant des textures et des capacités d'étalement très intéressantes [26].

- **En industrie pharmaceutique :**

Acides gras polyinsaturés ; ils ont un rôle dans la composition et la fluidité des membranes neuronales, dont les oméga-3 auraient des activités anti-inflammatoires, antiagrégante plaquettaire, de diminution de la vasoconstriction et de régulation du rythme cardiaque qui pourraient avoir un rôle protecteur dans la survenue d'une maladie d'Alzheimer [27]. Les oméga-3, ce n'est que du bon pour notre santé : consommés régulièrement en petite quantité, ils seraient efficaces pour prévenir les crises d'épilepsie, améliorer la qualité du sommeil, lutter contre le cholestérol. Ils

stimuleraient un récepteur présent au niveau de la prostate dont le rôle est de réguler le nombre de cellules cancéreuses et d'éviter leur prolifération [28]. Les acides gras oméga-3 peuvent jouer dans la prévention du diabète et de certains types de cancer [29].

IV. Les insaponifiables :

IV.1. Définition

Ce sont des mélanges de substances effectivement non saponifiables ; chaque lipide quel qu'il soit, est traité par une solution de soude ou de potasse, ce qui conduit à la formation de savons. Il s'agit d'une saponification et le résidu insoluble dans la solution alcaline mais extractible par l'éther est appelé insaponifiable [30]. Quelques exemples sont: les phytostérols (stigmastérol, brassicastérol, campestérol), les caroténoïdes dont le β -carotène, les tocophérols dont l' α -tocophérol [31].

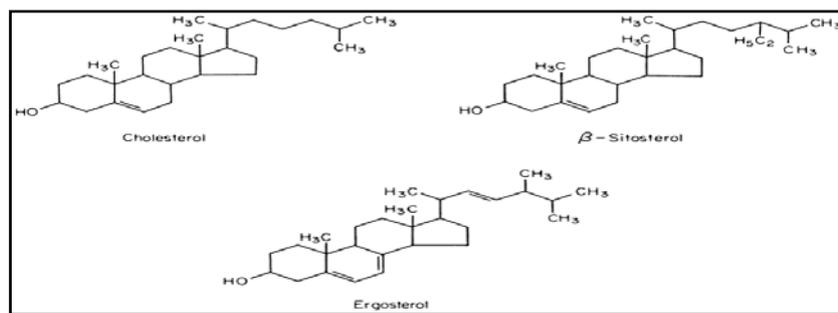


Figure 2 : quelque structure de stérols

IV.2. Domaine d'application

Le totum des insaponifiables possède des propriétés thérapeutiques reconnues comme antagoniste du cholestérol et comme agent de restauration du tissu conjonctif et des cartilages. Les insaponifiables sont introduits en tant qu'actifs dans les produits cosmétiques mais aussi administré per os pour le traitement au long cours des gingivites et de certains rhumatismes articulaires [31].

Ils confèrent souvent aux corps gras certaines propriétés pharmacologiques et cosmétologiques spécifiques et rentrent dans la composition de laits démaquillants, de soins restructurants et de crèmes nutritives contre le vieillissement. Certains produits incorporent des insaponifiables totaux en cosmétologie. Ces composés insaponifiables sont aussi bien recommandés dans l'alimentation qu'en médecine, pour leurs activités anticancéreuses et anti-inflammatoires [32].

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Notre choix s'est porté sur les racines de *Carthamus caeruleus* car cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude sur la composition chimique des acides gras et des insaponifiables. Les racines de *Carthamus* ont été collectées au mois de Mars- Avril 2016 dans la région de Tlemcen. L'identification de cette plante a été faite par le Professeur **Noury BENABADJI** du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. Les racines de notre espèce ont été broyées en utilisant un mixeur pour avoir une poudre.



Figure 3 : Poudre des racines de *Carthamus caeruleus*.

II. Dégraissage du matériel végétal

Les matières grasses sont extraites à l'aide d'un solvant organique dans un montage de type soxhlet [33].

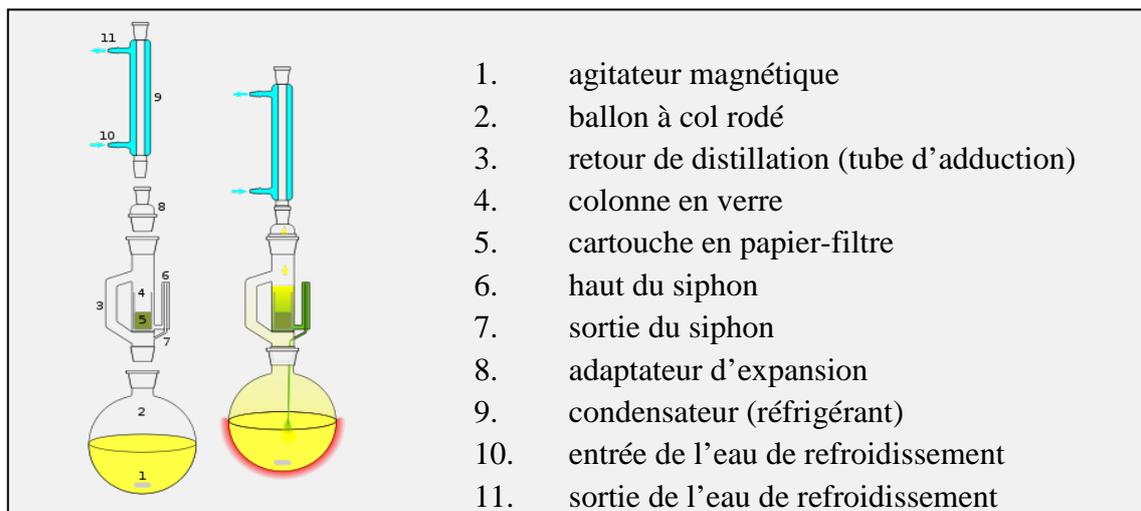


Figure 4 : Montage d'un extracteur de soxhlet

❖ Mode opératoire

L'opération consiste à introduire dans un siphon une cartouche de papier épais et poreux dans laquelle sont mis 20g de poudre végétale et 150 ml d'hexane dans le ballon. Le solvant est porté à ébullition, puis condensé avec le condenseur à boules, dans le réservoir à siphon. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant. La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Le résidu obtenu, sous forme d'un extrait huileux, représente généralement la matière grasse.

❖ Calcul du rendement

Le rendement en huile est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse de la matière végétale sèche.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où m : Masse en gramme de l'huile obtenue.
 m_0 : Masse de la matière végétale sèche.

III. Propriétés chimiques et physiques de l'extrait huileux : [34]

Le calcul d'indices tels que l'indice d'acide, de peroxyde, de saponification, d'estérification, permet de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification, et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide, également déterminer la teneur de l'huile en insaponifiables et quelques caractéristiques physiques telles que l'indice de réfraction et la densité.

III.1. Indice d'acide

C'est la masse de potasse, exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de corps gras.

❖ **Mode opératoire**

L'acidité est déterminée par la méthode titrimétrique en utilisant une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique. Dans un erlenmeyer, peser une masse environ 0.4g d'huile et verser successivement 40 ml d'éthanol (96%), 40 ml de cyclohexane et 2 gouttes de phénolphthaléine (1g dans 100ml d'éthanol). Agiter avec un agitateur magnétique jusqu'à dissolution, ensuite faire un dosage avec une solution de potasse alcoolique à 0.01 M jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante.

❖ **Expression des résultats**

Le calcul de cette valeur est comme suit :

$$I_A = (m_b / m_h) \text{ avec } m_b = C \cdot V \cdot M$$

m_h : masse de l'huile ; m_b : masse du potasse ; C : concentration du KOH ;

V : volume de KOH au point équivalent ; M : masse molaire du KOH.

III.2. Indice de saponification

Il correspond à la masse de potasse en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés dans un gramme de corps gras.

❖ **Mode opératoire**

Les corps gras étant insolubles dans l'eau, il faut les dissoudre dans un solvant organique approprié. Commencer par peser une masse de 4g dans un bécher. Ajouter 100ml de solvant constitué de 50ml d'éthanol et 50ml de cyclohexane. Agiter pour dissoudre le corps gras. Introduire dans un bécher 10ml de cette solution. Ajouter 25ml de potasse alcoolique de concentration (0.5 M). Mettre au bain marie bouillant pendant 45 à 60 minutes. Ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine. Doser l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique à une concentration de 0.5 M en agitant jusqu'à la disparition de la coloration de la phénolphthaléine. Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc.

❖ **Expression des résultats**

$$I_S = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m_h}$$

V_T : volume à blanc ; V_E : volume de l'échantillon ; C_{HCl} : concentration de HCl ;

M_{KOH} : masse molaire du KOH ; m_h : masse de l'huile.

III.3. Indice d'estérification

C'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour saponifier 1g d'huile dépourvue d'acide gras.

$$I_E = I_S - I_A$$

I_E : indice d'estérification ; I_S : indice de saponification ; I_A : indice d'acide

III.4. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde d'un corps gras est le nombre de milliéquivalent d'oxygène contenu dans un kilogramme de produit qui permet d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode [35].

❖ Mode opératoire

Dans un erlenmeyer de 100ml, faire passer de l'azote pur et sec pendant environ 10 minutes et fermer l'erlenmeyer immédiatement. Peser exactement 2g du corps gras et ajouter 25ml d'un mélange de 10ml de chloroforme et de 15ml d'acide acétique privé d'oxygène ; dissoudre en agitant. Ajouter 1ml d'iodure de potassium, agiter et abandonner au placard 5 minutes. Ajouter rapidement environ 75ml d'eau pour arrêter la réaction. Ajouter l'indicateur. Si une couleur violacée apparaît après agitation énergique, il y a présence de peroxyde. Titrer immédiatement avec le thiosulfate de sodium jusqu'à disparition de la coloration violette. Effectuer un essai à blanc.

❖ Expression des résultats

$$I_S = 5 \times (V_E - V_b)$$

V_E : volume de l'échantillon ; V_b : volume à blanc

III.5. Indice de réfraction [36]

la mesure de l'indice de réfraction consiste à déterminer le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile à une température constante (souvent 20° C), en utilisant un réfractomètre par lecture directe.

❖ **Mode opératoire**

Diriger le réfractomètre vers la lumière. Ouvrir et orienter convenablement le volet d'éclairage de l'échelle des indices. Régler le tirage des oculaires pour avoir une vision nette du réticule et de l'échelle de lecture. Relever le prisme mobile d'éclairage et nettoyer soigneusement les deux faces. Déposer 2 à 3 gouttes de liquide à l'aide d'une pipette sur face horizontale du prisme de référence. Rabattre doucement le prisme mobile. En regardant dans l'oculaire, agir sur le bouton moleté de droite de façon à amener dans le champ de vision la limite de séparation des deux zones (claire et obscure). Agir sur le bouton moleté de gauche pour rendre nette cette ligne de séparation. Ajuster cette ligne à l'intersection du réticule par action sur le bouton moleté de droite. En regardant dans l'oculaire, lire la valeur de l'indice de réfraction $n_D^{T^\circ\text{C}}$.

III.6. Densité [36]❖ **Mode opératoire**

Généralement, la mesure de la densité est déterminée à l'aide d'un pycnomètre, ou on peut utiliser un bécher sec et propre qui doit être rempli par un volume déterminé d'huile et le tarer. On fait la même chose avec l'eau distillée.

❖ **Expression des résultats**

❖
$$\rho_{\text{eau}} = \frac{m_e}{V_e}$$

$$\rho_{\text{huile}} = \frac{m_h}{V_h}$$

$$d = \frac{\rho_{\text{huile}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

m_e : Masse de l'eau ; V_e : Volume d'eau ; ρ_{eau} : Masse volumique de l'eau ;

m_h : Masse de l'huile ; V_h : Volume d'huile ; ρ_{huile} : Masse volumique de l'huile.

VI. Etude des acides gras [37]

La préparation des esters méthyliques est réalisée en trois étapes :

- La saponification des lipides,
- La libération des acides gras,
- Estérification des acides gras.

VI.1. Saponification

Au cours de la réaction de saponification, les corps gras sont hydrolysés en milieu alcalin par la soude (KOH) en chauffant le milieu réactionnel. La température élevée sert à accélérer la réaction de saponification car c'est un facteur cinétique. La saponification des corps gras produit du glycérol et un mélange de carboxylates de sodium qui constitue le savon.

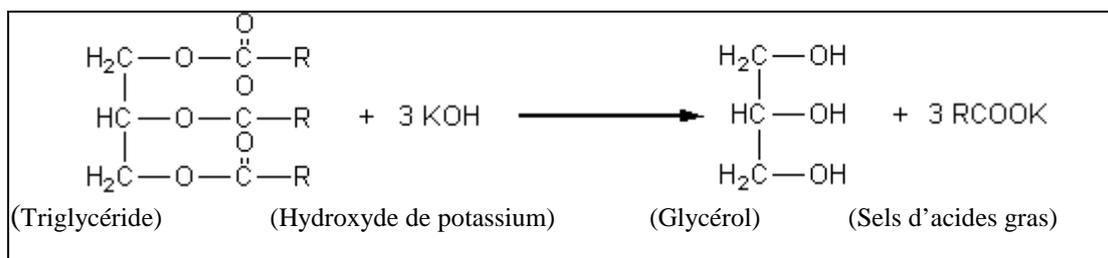


Schéma 1 : Réaction de saponification.

VI.2. La libération des acides gras

Pour obtenir un acide carboxylique, il faut acidifier le milieu par un acide concentré.

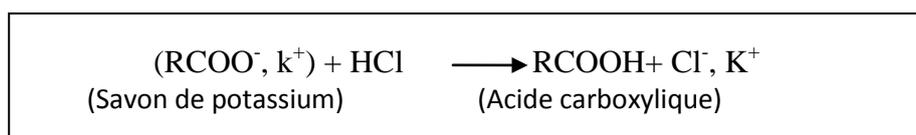


Schéma 2 : Réaction acido-basique pour l'obtention des acides gras.

VI.3. Estérification des acides gras

La réaction d'estérification est la réaction entre un acide carboxylique et un alcool conduisant à la formation d'un ester et l'eau. Les réactions d'estérification sont lentes cela nécessite la présence d'un catalyseur acide.

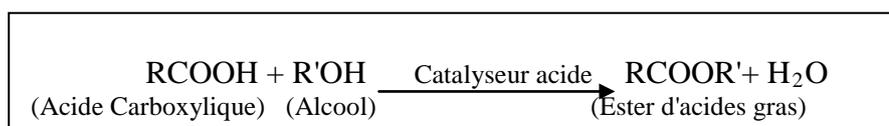


Schéma 3 : Réaction d'estérification

❖ **Mode opératoire :****a) Saponification**

On ajoute à l'extrait lipidique, 50 ml de potasse éthanolique 2N (50 ml éthanol/5,6 g de KOH), puis on porte au reflux pendant 2 heures.

Après refroidissement, on ajoute 100 ml d'eau et 100 ml d'hexane ; dans une ampoule à décanter, on sépare la fraction hexanique contenant de l'insaponifiable et la fraction aqueuse contenant les savons (pour la préparation des acides gras).

b) Libération des acides gras

La phase aqueuse issue de la saponification est acidifiée par une solution de HCl (pH= 2). Les acides gras libres sont extraits à l'hexane. Les acides gras libres sont récupérés après évaporation de l'hexane, pesés et convertis en esters méthyliques d'acides gras (EMAG) dérivés volatils appropriés pour l'analyse en CPG et CPG/SM.

❖ **calcul du rendement**

Le rendement en acides gras est défini comme étant le rapport entre la masse des acides gras obtenus

-par rapport à la masse de la matière végétale sèche.

-par rapport à la masse de l'huile

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où

m : Masse en gramme des acides gras obtenus.

m₀: Masse de la matière végétale sèche.

: Masse de l'huile.

c) Transformation des acides gras en esters méthyliques [38]

Pour analyser les acides gras obtenus en CPG, on doit tout d'abord les estérifier dans le but de rendre les AG des EMAG. On cite les deux méthodes les plus utilisées :

1) Estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore

L'estérification est réalisée en ajoutant 25ml d'une solution méthanolique à 10% de fluorure de bore BF₃ dans un ballon contenant déjà une masse de 1g d'acide gras. Le

mélange est maintenu à reflux pendant 2h. Après refroidissement, ajouter un volume d'eau égal au volume de solution méthanolique de trifluorure de bore.

Après décantation, les esters méthyliques sont récupérés par une extraction liquide – liquide en utilisant l'hexane (3 × 20ml d'hexane). La phase organique est lavée plusieurs fois de l'eau distillée jusqu'à la neutralisation. après séchage sur sulfate de magnésium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé sous pression réduite.

❖ Calcul du rendement

Le rendement en esters des acides gras est défini comme étant le rapport entre la masse des esters d'acides gras obtenus et la masse des acides gras.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où **m** : Masse en gramme des esters d'acides gras obtenus.
m₀: Masse des acides gras.

2) Estérification par le méthanol en présence d'un acide fort [37]

La méthylation des acides gras se fait par une solution de méthanol chlorhydrique 3 % au reflux pendant 1 heure.

L'extraction se fait à l'hexane et on lave à l'eau distillée (3 fois). La phase organique contient les EMAG.

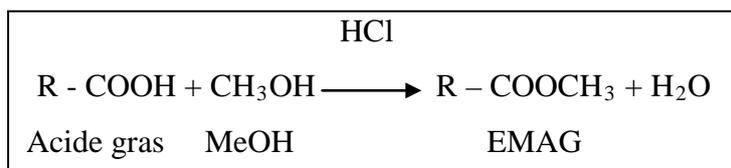


Schéma 4: Réaction d'estérification par un acide fort.

❖ Calcul du rendement

Le rendement en esters des acides gras est défini comme étant le rapport entre la masse des esters d'acides gras obtenus et la masse des acides gras.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où **m** : Masse en gramme des esters d'acides gras obtenus.
m₀: Masse des acides gras.

VI.4. Identification et analyse des acides gras par CPG et CPG/SM

Les dérivés des esters méthyliques d'acides gras se présentent sous forme de mélanges complexes volatils et injectables en CPG et CPG/SM.

Les différents spectres de masse individuels obtenus sont exploités pour déterminer les structures des principaux acides gras saturés et insaturés.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux échantillons gazeux ou susceptibles à être vaporisés par chauffage sans qu'ils ne se décomposent. Cette technique permet de séparer des mélanges très complexes. L'appareillage est composé d'un injecteur diviseur où sera placé l'échantillon à analyser, d'une colonne capillaire de plusieurs mètres où les molécules de l'échantillon seront entraînées grâce à un gaz vecteur (hélium, azote ou hydrogène) et d'un détecteur.

Lorsque ce dernier est couplé à la spectroscopie de la masse, il est à la fois possible de séparer les composés d'un mélange mais aussi à les analyser. Les composants peuvent être identifiés par comparaison avec des standards (temps des rétentions obtenus, conditions de CPG), ou avec les spectres de référence contenus dans une spectrothèque (si les spectres de masse correspondants ressemblent à des composés connus). Ainsi le couplage CPG/SM présente de nombreuses possibilités analytiques pour les composés volatils [39].

❖ Conditions opératoires

Analyse par CPG

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et deux colonnes capillaires en silice fondue, polaire (Rtx-wax, polyéthylenglycol) et apolaire Rtx-1 (DB5), polydiméthylsiloxane).

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Programmation de température : de 60 à 230 °C à 2°C/min
- Température de l'injecteur: 280 °C.
- Température de détecteur: 280°C.
- Injection: mode split (1:50).
- Gaz vecteur: Hélium (1ml/min).
- Volume injecté : 0.2 µL.

❖ Analyse par CPG/SM

Un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem XL équipé d'une colonne capillaire en silice fondue Rtx.-Wax couplé à un spectromètre de masse Perkin-Elmer Turbo, muni d'un détecteur de type quadripôle. Les spectres de masses ont été acquis dans un intervalle de masse compris entre 35 et 350 Da

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Programmation de température : de 60 à 230 °C à 2°C/min
- Température de l'injecteur: 280 °C.
- Température de détecteur: 280°C.
- Injection: mode split (1:50).
- Gaz vecteur: Hélium (1ml/min).
- Volume injecté : 0.2 µL.
- Mode ionisation : mode I.E positif 70ev

V. Etude de la fraction des insaponifiables

V.1. Extraction

La phase organique issue de la saponification est lavée et séchée avec du sulfate de magnésium, ensuite, filtrée et évaporée. Il est pesé pour obtenir la teneur en insaponifiable de l'extrait lipidique [37].

❖ Calcul du rendement

Le rendement en insaponifiables est défini comme étant le rapport entre la masse des insaponifiables obtenus et

-par rapport à la masse de la matière végétale sèche.

-par rapport à masse de l'huile.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où **m** : Masse en gramme des insaponifiables obtenus.

m₀: Masse de la matière végétale sèche.

V.2. Détection des familles de l'insaponifiable

1) Tests phytochimiques

Les différents composés sont caractérisés suivant leurs fonctions, Ils présentent des réactions colorées.

❖ Tocophérols

Test de Furter-Meyer : dans un tube à essai faire dissoudre 1-2 mg de l'échantillon dans 1 ml de chloroforme ; l'apparition d'une couleur bronze-rouge indique la présence de tocophérols [40].

❖ Stérols et Terpènes

Test de Liebermann-Burchardt: Faire dissoudre l'échantillon dans 1ml d'anhydride acétique avec 1ml de chloroforme dans un tube à essai. Ajouter 1 à 2ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à essais à l'aide d'une pipette et ne pas agiter. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette virant au vert de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes [41].

❖ Test de Salkowski :

5 gouttes de H_2SO_4 concentré sont ajoutées à 1 ml de chloroforme au tube qui contient l'échantillon, l'observation d'une coloration rouge qui indique la présence de stérols [42].

2) Détection par chromatographie sur couche mince (CCM) [32]

Les différentes classes de constituants de cet insaponifiable sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM) car cette méthode s'avère la plus efficace pour séparer des constituants de polarités différentes.

De façon générale, pour chacune des espèces étudiées on observe les différents (R_f) ; présence de différents composants (stérols, de tocophérols, d'hydrocarbures) en comparant avec des témoins commerciaux.

Cependant, la CCM étant trop sommaire, elle est souvent complétée par une analyse par CPG ou par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) couplée à la spectrométrie de masse (SM) des constituants à doser.

❖ Mode opératoire

La fraction insaponifiable recueillie est diluée dans 0.5 ml d'hexane et 200 µl sont prélevés et déposés sur une plaque de silice. La plaque est déposée dans une cuve contenant le mélange éluant : hexane/acétate d'éthyle (85/15 v/v).

Après migration de l'éluant, la plaque est séchée à l'air libre. Après migration, la révélation s'est faite par l'iode ou bien sous lampe UV. On obtient alors un profil CCM. On localise alors par correspondance les différentes tâches présentes sur l'autre partie de la plaque. La migration effectuée par dépôts des différents étalons (cholestérol, vitamine E, β-carotène) nous a permis de déterminer qualitativement la nature des tâches.

VI. Etude des stérols

VI.1. Fractionnement par chromatographie sur colonne

Le fractionnement de l'insaponifiable de *Carthamus caeruleus* a été réalisé sur une colonne en verre (70 cm de longueur et 2.5 cm de diamètre interne). Le remplissage de la colonne se fait avec de la silice (60 mesh) dans de l'hexane. Environ 1g d'insaponifiable a été élué par un gradient (hexane/acétate d'éthyle) (85/15). Cette fraction a été choisie suite aux résultats obtenus pour les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées préalablement sur l'insaponifiable brute.

❖ Confirmation par CCM

On confirme la présence des stérols par la chromatographie sur couche mince (CCM). Le cholestérol commercial est utilisé comme témoin. Nous avons utilisé comme éluant le mélange hexane / acétate d'éthyle (85/15). Après migration, la révélation s'est faite en vaporisant une solution à 50 % d'acide sulfurique-eau puis en laissant la plaque 10 à 15 minutes à l'étuve. Les taches correspondantes aux stérols apparaissent sous forme de spot violet ou gris-bleu.

VI.2. Calcul le rapport frontal des stérols (Rf)

On a calculé le rapport frontal qui est égal à la distance parcourue par le constituant divisé par la distance parcourue par le solvant.

$$R_f = d/D$$

Où

d : Distance parcourue par le constituant

D : Distance parcourue par le front de l'éluant

Ce facteur permet de mentionner une information sur la structure des stérols en tenant compte la nature du solvant utilisé.

❖ calcul du rendement

Le rendement en stérols est défini comme étant le rapport entre la masse des stérols obtenus ;

- par rapport à la masse de la matière végétale sèche.

- par rapport à la masse de l'huile.

- par rapport à la masse des insaponifiables.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où

m : Masse en gramme des stérols obtenus.

m₀: Masse de la matière végétale sèche.

: Masse de l'huile.

: Masse des insaponifiables.

VI.3. Analyses des stérols par CPG et CPG/SM

1) Préparation des acétates des stérols [37]

Pour l'analyse des stérols en chromatographie en phase gazeuse (CPG), on prépare les acétates de stérols.

Aux stérols secs on ajoute:

- 3 ml de pyridine, 2 ml d'anhydride acétique. On porte au reflux pendant 15 minutes.

La récupération se fait à l'hexane. On lave 3 fois à l'eau la phase hexanique. Après séchage avec le sulfate de magnésium. Le solvant organique est évaporé et les acétates des stérols obtenus.

❖ calcul du rendement de la réaction d'estérification

Le rendement en acétates des stérols est défini comme étant le rapport entre la masse des acétates des stérols obtenus et la masse des stérols.

$$R = (m_0/m) \times 100$$

Où

m : Masse en gramme des acétates des stérols obtenus.

m₀: Masse des stérols.

2) Identification et analyse des stérols par CPG et CPG/SM

C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. L'identification des pics se fait par comparaison de leurs temps de rétention relatifs, avec ceux donnés dans la littérature et par injection des témoins commerciaux et confirmée par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectroscopie de masse (CPG/SM).

VII. Evaluation de l'activité antioxydante

Les mécanismes d'actions des antioxydants sont variés ainsi que les méthodes de mesure de leurs activités antioxydantes. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé, d'autres, par contre, reposent sur la mesure de la capacité de ces antioxydants à piéger les composés radicalaires, tel que DPPH• ou ABTS+ et le test de blanchiment de β -carotène qui sont plus couramment utilisés pour l'évaluation du comportement antioxydant totale d'extraits et d'huiles essentielles. [43]. L'activité antioxydante de nos extraits (Extrait huileux, acides gras, insaponifiables) de *Carthamus caeruleus* est évaluée par trois différents tests.

VII.1. Test de piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl)

❖ Principe:

Le DPPH (2,2-diphényl-1-1picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH., qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon [43].

❖ Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Un volume de 50 μ l de chacune des solutions méthanoliques des extraits testées (huile, acides gras, insaponifiables) à différentes concentrations (300 μ g/ml, 250 μ g/ml, 200 μ g/ml, 150 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml) est ajouté à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le témoin négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μ l du méthanol avec 1,95 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est

effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHT est utilisé comme témoin positif dans cette expérience dans les mêmes conditions [44].

❖ Expression des résultats

-Calcul des pourcentages d'inhibitions

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (IN%) est calculée de la manière suivante :

$$\text{IN\%} = [(A_t - A_c)/A_t] \times 100$$

A_c : Absorbance du témoin négatif. A_t : Absorbance des différentes concentrations.

❖ Calcul des concentrations 50 " IC₅₀" :

IC₅₀ (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits utilisés [45].

VII.2. Pouvoir réducteur: FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de nos extraits testés. La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur de son potentiel antioxydant.

❖ Principe:

La présence d'un composé réducteur dans les échantillons entraîne la réduction du fer ferrique (Fe⁺³) présent dans le ferricyanure de potassium en forme ferreuse Fe⁺², dans un milieu acidifié par l'acide trichloracétique, ceci se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers la couleur bleue verte dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur [46].

L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm [47]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [48].

❖ Mode opératoire

Le protocole expérimental suivi est celui de (**Karagözler *et al.*, 2008**). 2.5 ml de chacune des solutions méthanoliques des extraits testées (huile, acides gras, insaponifiables) à différentes concentrations (300 µg/ml, 250 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml) est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%, puis on incube les tubes à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes. Nous Prélevons alors 2.5ml du surnageant et y ajoutons 2.5ml d'eau distillée. On ajoute au mélange 500µl d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6 H_2O$) à 0.1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHT est utilisé comme témoin positif dans cette expérience dans les mêmes conditions [49].

❖ Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des deux parties de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [48].

VII.3. Test de blanchissement du β -carotène

❖ Principe

La capacité antioxydante de nos extraits de *Carthamus caeruleus* est déterminée en mesurant l'inhibition de nos échantillon et des hydroperoxydes conjugués de diène résultant de l'oxydation d'acide linoléique et responsables de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) [50].

❖ Mode opératoire

Le test de blanchiment de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de notre plante est celui du (**Sun et Ho., 2005**).

Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissous dans 10 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution dans une fiole contenant préalablement 200 mg Tween 20 et 20 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au évaporateur rotatif

jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion β -carotène/acide linoléique de 4 ml est additionnée aux solutions méthanoliques des extraits ou de l'antioxydant de témoin positif BHT de différentes concentrations. Après une agitation proprement dite, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à $t = 0$ min contre le blanc contenant l'émulsion sans β -carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un placard à l'obscurité pendant 48 h. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à nouveau [51].

❖ **Expression des résultats [52]**

L'effet antioxydant des échantillons est montré en suivant la cinétique de décoloration du β -carotène dans les systèmes étudiés et exprimé par des courbes de mesure de l'absorbance.

$$\text{IN \%} = \left[\frac{A_{c(48h)} - A_{t(48h)}}{A_{c(0)} - A_{t(48h)}} \right] \times 100$$

Où $A_{c(48h)}$ et $A_{c(0)}$: représentent les absorbances en présence de l'extrait à 0 min et 48h.

$A_{t(48h)}$: représente l'absorbance du témoin négatif à 48 h.

La valeur (IC_{50}) est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits.

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Extraction par soxhlet

I.1. Caractéristiques de l'extrait hexanique obtenu des racines de *C. caeruleus*

Aspect	Couleur
Liquide limpide (huileux)	Orange

I.2. Calcul du rendement

Le rendement de l'extrait huileux des racines de *C. caeruleus* obtenu par Soxhlet a été estimé à 2.3 % (m/m).

II. Propriétés chimiques et physiques de l'extrait huileux

Les huiles occupent une place considérable sur les marchés de la pharmacie, de l'industrie cosmétique ainsi que dans de nombreux secteurs de l'industrie agroalimentaire. Pour le contrôle de leur qualité, on prescrit la détermination d'un certain nombre de constantes physiques : densité et indice de réfraction, ainsi qu'une étude chimique qui concerne la détermination des indices : d'ester, de peroxyde, d'iode, d'acide et de saponification.

II.1. Indice d'acide

L'indice d'acide rend compte de l'état de comestibilité d'une huile dans la mesure où les acides gras libres sont des produits de dégradation et plus particulièrement d'hydrolyse des triglycérides, constituants majoritaires de l'huile [32].

La valeur obtenue pour l'indice d'acide de l'huile de *C. caeruleus* est de **2.24 mg KOH/g**. Plus cet indice est élevé, plus le taux d'acides libres est important. Une bonne huile possède un faible taux d'acidité (≤ 4 mg KOH/g d'huile ; norme imposée par Codex Alimentarius) qui contribue à lui donner une forte stabilité face à l'oxydation [53].

Tableau 5 : les indices d'acide des principaux corps gras

Huiles	Huile de <i>C.caeruleus</i>	Huile d'Argan	Huile d'olive	Huile de carthame
Indice d'acide mg KOH/g.	2.24	0.98-2.6	1-3	Au maximum 4
Réfs		[54]		[55]

II.2. Indice de saponification

L'indice de saponification nous informe sur la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui constituent les triglycérides (fraction majoritaire d'un corps gras) ; il est d'autant plus élevé que la chaîne des acides gras est courte. La détermination de l'indice de saponification de notre huile a donné la valeur égale à **151.47 mg KOH/g** ; cela montre que notre huile contient des acides gras de moyennes et de longues chaînes hydrocarbonées.

Tableau 6 : les indices de saponification des principaux corps gras [56,16]

Corps gras	Huile de <i>C.caeruleus</i>	huile de colza	Huile d'olive	Huile de tournesol	Huile de soja	Huile de palme	Huile de carthame
Indice de saponification (mg KOH/g d'huile).	151.47	168-181	185-196	188-193	188-195	195-205	211.5-218.35

II.3. Indice d'estérification

Des deux indices précédents. Nous pourrions déduire l'indice d'ester de cette huile qui est égale à **149.23 mg KOH/g**. l'indice d'ester est normalement élevé, puisque il indique la teneur en triglycérides. Plus cet indice est élevé plus l'huile ne peut être conservée plus longtemps [32].

Le tableau suivant représente les valeurs des indices d'ester de certaines huiles végétales étudiées en bibliographie.

Tableau 7: les indices d'ester de certaines huiles végétales

Corps gras	Huile de <i>C.caeruleus</i>	Huile d' <i>Argania Spinosa</i>	Huile d'olive	Huile de coloquinte
Indice d'ester (mg KOH/g)	149.23	192.45	180	215.76
Références bibliographiques		[57]	[58]	[54]

Cet indice est utilisé pour évaluer la masse molaire moyenne des esters présents et déduire donc la longueur moyenne des chaînes des acides gras. Notre résultat vient de confirmer le résultat obtenu à partir de l'indice de saponification qui nous montre que les acides gras que renferme notre l'huile de *C. caeruleus* sont de longues chaînes.

II.4. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est un critère de qualité, il permet de voir l'état d'oxydation des huiles et de contrôler les premières étapes de l'altération oxydative [59].

La valeur obtenue pour l'indice de peroxyde de notre huile est **2.05 meq d'O₂/kg**.

Tableau 8 : les indices de peroxyde de certaines huiles végétales

Corps gras	Huile de <i>C. caeruleus</i>	Huile de carthame	Huile de coloquinte
Indice de peroxyde meq d'O ₂ /kg,	2.05	3.78 - 4.5	1,17
Réfs		[16]	[54]

Cette valeur montre que l'huile obtenue n'a pas été trop altérée par l'oxydation car cette valeur est dans la norme (Codex Alimentarius) qui est inférieure à 10 meq d'O₂/kg d'huile [53].

II.5. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est particulièrement utile car il nous renseigne sur l'état de dégradation d'une huile. En effet, la présence d'acides gras libres abaisse fortement l'indice de réfraction [32]. La mesure de l'indice de réfraction a été faite à une température de 20°C avec un réfractomètre par lecture directe.

La valeur lue est la suivante : $n_D^{20^\circ\text{C}} = 1.471$

On trouve pratiquement la même valeur pour différentes huiles végétales, le tableau suivant résume les indices de réfraction de quelques huiles végétales étudiées en littérature scientifique.

Tableau 9 : indice de réfraction de quelques huiles végétales

L'huile végétale	Indice de réfraction	Références
Huile d'arganier	1.4685	[57]
Huile d'olive	1.466-1.468	[60]
Huile de <i>C.caeruleus</i>	1.471	
Huile de carthame	1.469-1.471	[16]

L'indice de réfraction qui est également un critère important de pureté de l'huile est proportionnel au poids moléculaire des acides gras. Il varie de façon intéressante selon le degré d'insaturation des lipides et peut nous donner une idée sur la prédominance d'un acide gras insaturé sur un autre dans l'huile.

Tableau 10: les indices de réfraction des huiles en fonction de l'acide gras insaturé prédominant [61]

Les huiles riche en	Acide oléique	Acide linoléique	Acide linoléique
Indice de réfraction	1.468-1.472	1.471-1.477	1.480-1.523

Nous pouvons déduire qu'à partir du tableau 10, la composition chimique en acides gras de l'huile des racines de *Carthamus caeruleus* est très intéressante puisqu'il y'a prédominance de l'acide oléique et l'acide linoléique.

II.6. Densité

C'est une grandeur physique qui caractérise les corps liquides par unité de volume.

Elle permet le contrôle de la pureté de l'huile extraite. Sa mesure a été effectuée à l'aide d'un bécher sec et propre et la valeur obtenue est 0.919. Cette valeur est proche des valeurs des huiles pures trouvées dans la littérature, donc on peut conclure que notre huile est pure.

Tableau 11 : la densité de certaines huiles végétales

L'huile végétale	Densité	Références
Huile de tournesol	0,920	
Huile d'olive	0.910	[54]
Huile de <i>C.caeruleus</i>	0.919	
Huile de carthame	0.919-0.921	[16]

- **Tableau 12 :** Tableau récapitulatif des résultats des indices de l'extrait huileux des racines de *C.caeruleus*.

Indices	Valeurs
Indice d'acide	2.24 mg KOH/g
Indice de saponification	151.47 mg KOH/g
Indice d'ester	149.23 mg KOH/g
Indice de peroxyde	2.05 meq d'O₂/kg
Indice de réfraction	1.471
Densité	0.919

- **Discussion**

Les résultats obtenus de l'analyse de l'extrait huileux des racines de *C.caeruleus* ; montre qu'en général les valeurs restent dans la gamme des normes admises au niveau international et notamment par les normes du Codex Alimentaire.

III. Etude des acides gras

III.1. Calcul du rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse des acides gras obtenus ;

- par rapport à la masse de la matière végétale sèche $R=2.25\%$

- par rapport à la masse de l'huile $R= 97.83 \%$

Donc on remarque que les acides gras sont les principaux constituants de la matière grasse.

III.2. Transformation des acides gras en esters méthyliques

Pour analyser les acides gras obtenus en CPG et CPG/SM, on doit tout d'abord les estérifiés dans le but de rendre les AG volatils.

- ✓ Avant l'analyse par la CPG et CPG/SM, nous avons réalisé une analyse infrarouge afin de s'assurer de l'absence de la bande OH caractéristique des acides gras.

III.2.1. Estérification par le méthanol en présence d'un acide fort (HCl)

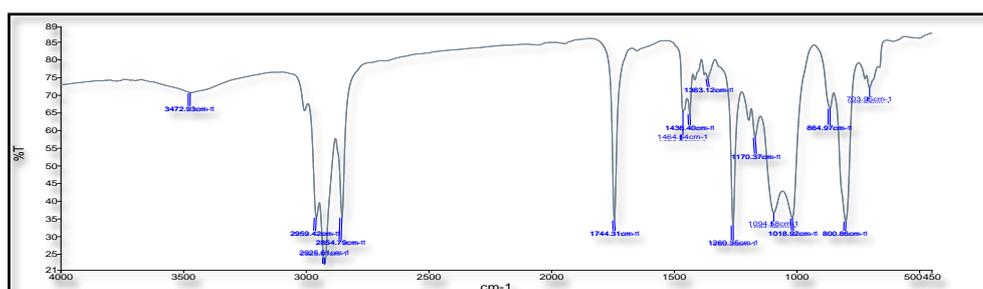


Figure 5 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les EMAG du *Carthamus caeruleus* en présence de HCl

Données spectrales : 1744.31 cm^{-1} (C=O ester), 1170.37 cm^{-1} (C-O-C ester), 2854.79 cm^{-1} et 2925.61 cm^{-1} (C-H aliphatiques). Avec une bande d'acide apparente à 3472.93 cm^{-1} .

❖ Calcul du rendement de la réaction d'estérification

Le rendement des esters correspondant est défini comme étant le rapport entre la masse des esters d'acides gras obtenus et la masse des acides gras.

❖ Rendement d'estérification par le méthanol en présence d'un acide fort (HCl)

$$R = 85.75\%$$

Les acides gras transformés en leurs esters méthyliques comme décrit au [partie expérimentale, chapitre I (IV)] sont analysés par CPG pour l'obtention de leurs temps de rétention (analyse quantitative), et les comparer avec des étalons et la CPG/SM (analyse qualitative) pour confirmer leurs structures.

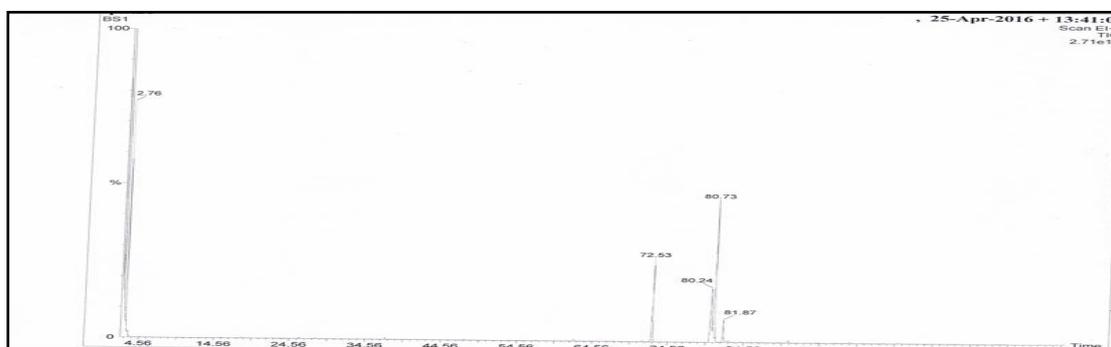


Figure 6 : Chromatogramme des EMAG après estérification en présence de HCl.

La détermination des pourcentages est basée sur la méthode de normalisation interne admettant que la somme des aires des pics représente la totalité des constituants.

Les résultats des analyses sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Identification et composition moyenne des acides gras correspondants de *C.caeruleus* (%) obtenus en présence de HCl.

Acides gras correspondants		Nombre de carbone	Temps de rétention (min)	Composition en acides gras (%)
Noms usuels	Noms systématiques			
Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	C16 :0	80.45	14.2
Acide linoléique	cis-9,12-octadécadiénoïque	C18 :2	88.82	18.6
Acide oléique	Acide cis-9-octadécénoïque	C18 :1	89.39	55.4
Acide stéarique	Acide octadécanoïque	C18 :0	90.48	4.3

Total composés identifiés= 92.5%

III.2.2. Estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore

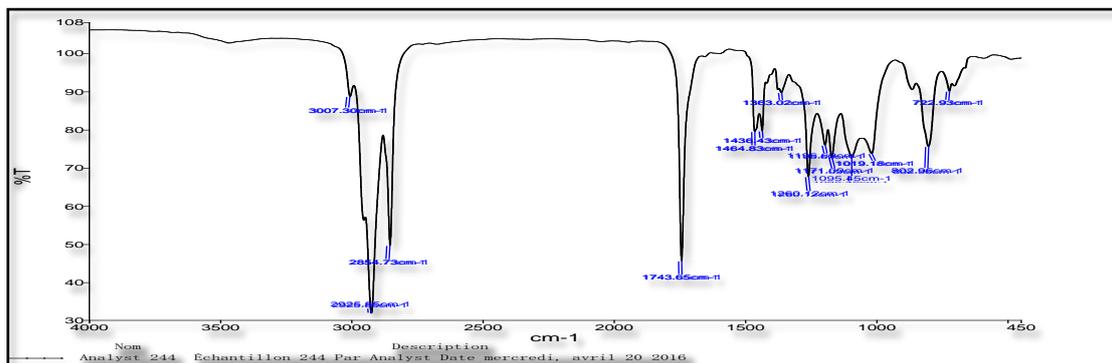


Figure 7 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les EMAG du *Carthamus caeruleus* en présence de BF_3

Données spectrales : 1743.65 cm^{-1} (C=O ester), 1171.09 cm^{-1} (C-O-C ester), 2854.73 cm^{-1} et 2925.85 cm^{-1} (C-H aliphatiques).

❖ Calcul du rendement de la réaction d'estérification

Le rendement en esters des acides gras est défini comme étant le rapport entre la masse des esters d'acides gras obtenus et la masse des acides gras.

❖ Rendement d'estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore

$$R=97.8 \%$$

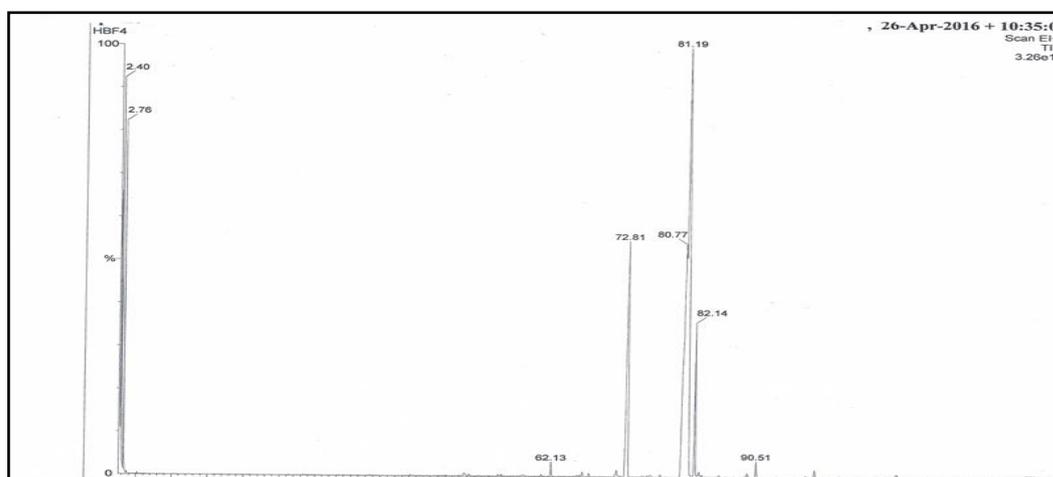


Figure 8 : Chromatogramme des EMAG après estérification en présence de BF_3 .

Tableau 14 : Identification et composition moyenne des EMAG de *C.caeruleus* (%) obtenus en présence de BF₃.

Acides gras correspondants		Nombre de carbone	Temps de rétention (min)	Composition en acides gras (%)
Noms usuels	Noms systématiques			
Acide myristique	Acide eicosanoïque	C14 :0	69.28	1.4
Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	C16 :0	80.45	13.9
Acide linoléique	cis-9,12-octadécadiénoïque	C18 :2	88.82	17.9
Acide oléique	Acide cis-9-octadécénoïque	C18 :1	89.39	54.2
Acide stéarique	Acide octadécanoïque	C18 :0	90.48	3.8
Acide arachidique	Acide tétradécanoïque	C20 :0	98.36	1.9

Total composés identifiés= 93.1%

III.2.3. Interprétation des deux chromatogrammes :

Nous notons une nette prédominance des acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés. La proportion d'acides gras saturés varie légèrement entre (18.5% et 21.8%), les acides gras insaturés varient entre (72.1%-74%) de la composition totale en acides gras des racines de *C. caeruleus*. L'analyse des acides gras des racines de *C. caeruleus* montre que l'acide palmitique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique sont les principaux acides gras identifiés. L'acide palmitique est l'acide gras saturé majoritaire (13.9-14.2%), suivi par l'acide stéarique (3.8%-4.3%), l'acide oléique (ω -9) est le principal acide gras insaturé (55.4%-54.2%) suivi par l'acide linoléique (ω -6) avec une proportion de (17.9%-18.6%). Les proportions relatives de ces deux acides principaux montrent de propriétés nutritionnelles appropriées d'huiles alimentaires [25].

Nos résultats sont similaires avec ceux des travaux réalisés sur différentes espèces du même genre *Carthamus* [Partie bibliographique, chapitre I. (III.1)] ; une variation considérable dans la composition chimique des acides gras a été observée ; les résultats rapportés par (Carapetian et Zarei ; 2005) sur trois espèces sauvages de *Carthamus* ont montré que la plus haute teneur en acide oléique a été enregistrée dans le *C. glaucus* (21,6%-23,4%).

C. lanatus recueillies auprès de l'Inde possédait des teneurs élevées en acide oléique (23,17%) et l'acide palmitique (9,72%). Cependant, *C. glaucus* a enregistré un niveau moyen en acide stéarique (6,33%) [12].

Toutes les espèces de *Carthamus* (Inde, Iran, Espagne, Maroc) ; (*C. oxyacantha*, *C. glaucus*, *C. creticus*, *C. turkestanicus*, *C. lanatus*, *C. palaestinus*, *C. dentatus*) qui sont des espèces sauvages et *C. tinctorius* possèdent la plus haute teneur en acide linoléique (61.41%-83.43%) ; [25], Sauf une exception pour *C. tinctorius* de l'Australie qui possède une plus haute teneur en acide oléique (80.7 %) [22], comme il a été trouvé pour notre espèce. Du point de vue de la composition en acides gras des racines de *C. caeruleus*, elle est riche en acides gras monoinsaturés (acide oléique, ω -9) qui lui confère les mêmes propriétés que celle de l'huile d'olive, et en acides gras polyinsaturés (acide linoléique, ω -6) comme l'huile de tournesol et l'huile de soja, (ω -6) appartient aux acides gras essentiels que notre corps ne peut pas synthétiser, donc il faut les apporter par l'alimentation. [Les bienfaits des acides gras insaturés sont mentionnés dans le 2^{ème} chapitre de la partie bibliographique, (III.3)]. Ces deux types de prédominance permettent plusieurs voies de valorisation : dans l'alimentaire direct et en lipochimie, notamment en savonnerie, dans l'industrie des tensioactifs, dans l'industrie des lubrifiants industriels et en cosmétologie [32].

III.2.4. Comparaison entre les deux catalyseurs (BF₃ et HCl)

Nous avons remarqué que le chromatogramme des EMAG obtenu en présence du trifluorure de Bore présente de légères différences puisque la composition centésimale fait apparaître la présence d'autres acides gras tel que l'acide myristique avec une moyenne de 1.9% et l'acide arachidique avec une moyenne de 1.4%. Les deux chromatogrammes diffèrent notamment en ce qui concerne la concentration des acides gras restants dont en présence de l'acide chlorhydrique les pourcentages étaient plus ou moins élevés par rapport à ceux obtenus en présence de BF₃ et cela est dû à la forte intensité des AG majoritaires c'est ce qui nous conduit à dire que la séparation du 2^{ème} échantillon était meilleure que celle du 1^{er}, donc le catalyseur le plus convenable pour l'estérification des acides gras est le trifluorure de Bore.

IV. Etude de la fraction des insaponifiables

IV.1. Calcul du rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse des insaponifiables obtenus ;

-par rapport à la masse de la matière végétale sèche. R=0.05%

-par rapport à la masse de l'huile. R= 2.17 %

IV.2. Détection des familles de l'insaponifiable

a) Tests phytochimiques

Un des outils indispensables est la connaissance du screening phytochimique ou criblage phytochimique. Ce dernier joue un rôle essentiel dans la caractérisation des groupes de familles chimiques dans une plante donné [62].

Tableau 15 : Résultats des tests phytochimiques.

Famille à détecter	Partie testé	Résultat
Tocophérols	Test de Furter-Meyer	+
Stérols et terpènes	Test de Liebermann-Burchardt	+
	Les racines de <i>Carthamus caeruleus</i>	
	Test de Salkowski	+

(+) : présence de la famille testé

(-): absence de la famille testé

b) Détection par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les différentes classes de constituants de cet insaponifiable sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM) car cette méthode s'avère la plus efficace pour séparer des constituants de polarités différentes.

Tableau 16 : profil CCM

Famille à détecter	Témoin utilisé	Résultat
Tocophérols	Vitamine E	+
Carotènes	β -carotène	-
Stérols	Cholestérol	+

(+) : présence de la famille testé

(-): absence de la famille testé

❖ **Interprétation des résultats**

Nos résultats sont similaires avec ceux des travaux réalisés sur différentes espèces du même genre *Carthamus* [Partie bibliographique, chapitre II. (III.2)], qui indique la présence des tocophérols, les terpènes et les stérols.

VI.3. Etude des stérols

a) Chromatographie sur colonne

D'après travaux réalisés sur différentes espèces du même genre *Carthamus* [Partie bibliographique, chapitre II. (III.2)], et nos tests phytochimique réalisés sur notre espèce ; on remarque que les stérols sont les constituants majeurs de la fraction insaponifiables. Le fractionnement de l'insaponifiable de *C. caeruleus* a été réalisé sur une colonne en verre (70 cm de longueur et 2.5 cm de diamètre interne). Le remplissage de la colonne se fait avec de la silice (60 mesh) dans de l'hexane. Environ 1g d'insaponifiable a été élué par un gradient (hexane/acétate d'éthyle) (85/15). Cette fraction a été choisi suite aux résultats obtenus pour les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées préalablement sur l'insaponifiable brute.

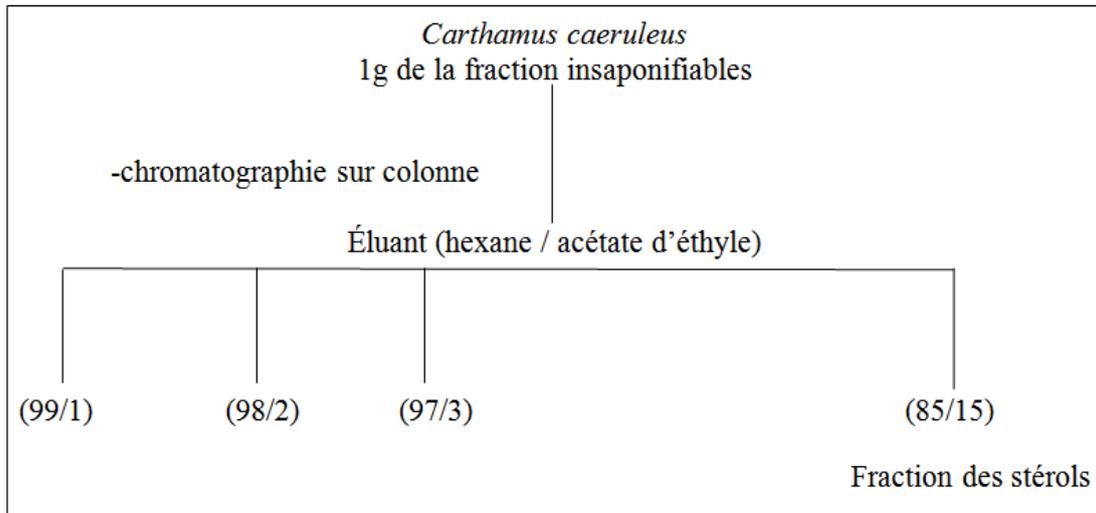


Figure 8 : Schéma de fractionnement de la fraction insaponifiable.

b) Confirmation par CCM

On confirme la présence des stérols par la chromatographie sur couche mince (CCM). Le cholestérol commercial est utilisé comme témoin. Nous avons utilisé comme éluant le mélange hexane/acétate d'éthyle (85/15). Après migration, la révélation s'est faite en vaporisant une solution à 50 % d'acide sulfurique-eau puis en laissant la plaque 10 à 15 minutes à l'étuve. Les taches correspondantes aux stérols apparaissent sous forme de spot violet ou gris-bleu.

c) Calcul le rapport frontal des stérols (R_f)

On a calculé le rapport frontal qui est égal à la distance parcourue par le constituant divisé par la distance parcourue par le solvant.

$$R_f = 0.17$$

❖ calcul du rendement

Le rendement en stérols est défini comme étant le rapport entre la masse des stérols obtenus ;

- par rapport à la masse de la matière végétale sèche. $R = 0.03\%$

- par rapport à la masse de l'huile. $R = 1.15\%$

- par rapport à la masse des insaponifiables. $R = 53\%$

- On peut remarquer que la fraction de stérols représente 53% de la totalité des insaponifiables, donc sont les composants majoritaires de cette fraction.

d) Analyses des stérols par CPG et CPG/SM

❖ Préparation des acétates des stérols

Pour l'analyse des stérols par CPG et CPG/SM, les acétates de stérols ont été préparés.

- ✓ Avant de faire l'analyse par la CPG et CPG/SM, il fallait s'assurer de la présence de l'ester donc il fallait procéder à une analyse par infrarouge.

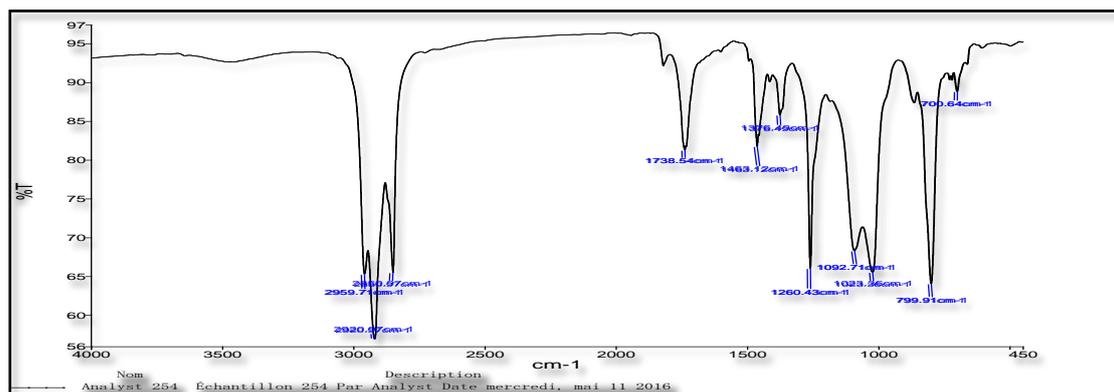


Figure 9 : Vérification de la formation de la fonction ester dans les acétates de stérols du *C. caeruleus* en présence de la pyridine.

Données spectrales : 1738.54 cm⁻¹ (C=O ester), 1092.71 cm⁻¹ (C-O-C ester), 2850.90 cm⁻¹ et 2920.97 cm⁻¹ (C-H aliphatiques).

❖ calcul du rendement de la réaction d'estérification

Le rendement en acétates des stérols est défini comme étant le rapport entre la masse des acétates des stérols obtenus et la masse des stérols.

$$R = 92\%$$

La transformation des stérols en acétates de stérols est décrite au [partie expérimentale, chapitre I (VI.3)]. Ces derniers sont analysés par CPG pour l'obtention de leurs temps de rétention (analyse quantitative), et les comparer avec des étalons et la CPG/SM (analyse qualitative) pour confirmer leurs structures.

Remarque

On n'a pas pu déterminer le chromatogramme pour identifier la fraction des stérols ; car la colonne utilisé est applicable avec des molécules ayant le maximum 28 carbones.

VII. Evaluation de l'activité antioxydante

VII.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

La méthode de piégeage du radical libre DPPH est utilisée pour comparer l'activité antioxydante de nos extraits (extrait huileux, acides gras et insaponifiables) des racines de *C.caeruleus* avec le BHT en tant que antioxydant de référence. Une solution de DPPH fraîchement préparée affiche une couleur pourpre ($\lambda_{\max} = 517 \text{ nm}$) qui disparaît progressivement en présence d'un bon donneur d'hydrogène, c'est à dire, un puissant antioxydant. Le tableau 17 montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH En fonction de différentes concentrations de nos extraits.

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Carthamus* et du BHT à différentes concentrations

Echantillons		Activité antioxydante					
Huile	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		50	100	150	200	300
	Pourcentage d'inhibition du DPPH(%)		17.7	22.84	39.84	47.09	51.61
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		270.3				
Acides gras	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		50	100	150	200	300
	Pourcentage d'inhibition du DPPH(%)		30.45	30.84	31.74	45.74	50.00
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		300				
Insaponifiables	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		50	100	150	200	300
	Pourcentage d'inhibition du DPPH(%)		33.16	37.0	42.01	68.43	72.15
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		170.2				
BHT	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		2	5	10	20	25
	Pourcentage d'inhibition du DPPH(%)		18.55	30.40	35.95	55.85	64.69
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		17.36				

La comparaison de l'activité de balayage DPPH de l'huile, des acides gras et des insaponifiable avec celle exprimé par le BHT a montré que l'huile et les insaponifiables présentent une activité antioxydante modérée. La plus faible activité de piégeage des radicaux libres est obtenue par les acides gras (50.0 %) suivie par l'huile (51.61 %) et les insaponifiables (72.15 %) à la concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$,

alors que l'activité la plus forte est obtenue par le BHT (64.69 %) à la concentration (25 µg/mL).

L'activité DPPH est généralement présentée par la valeur IC_{50} (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) ; calculée pour chaque extrait, elle permet de les classer entre eux. Plus l' IC_{50} est petite, plus la molécule est antioxydante. Les résultats présentés dans le tableau 17 révèlent que nos extraits sont des antiradicalaires. Les insaponifiables possèdent l'activité de piégeage des radicaux la plus élevée avec la valeur de IC_{50} de 170.2 µg/mL suivie de l'huile ($IC_{50} = 270.3$ µg/mL) et les acides gras ($IC_{50} = 300$ µg/mL). Ce qui est largement inférieure que le BHT (17.36 µg/mL).

VII.2. Pouvoir réducteur: FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Le pouvoir réducteur de l'extrait huileux, des acides gras et des insaponifiables, déterminée selon la méthode de réduction du ferricyanure de potassium, a augmenté avec une concentration croissante.

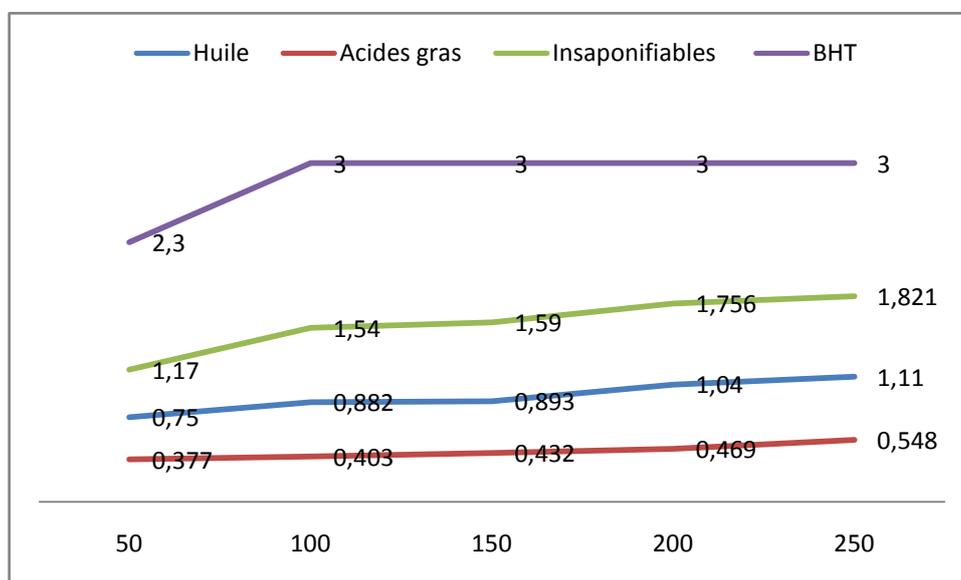


Figure 10 : Pouvoir réducteur de l'huile, des acides gras et des insaponifiables des racines de *Carthamus caeruleus* et de BHT.

Dans notre travail, nous avons testé, par la méthode de FRAP, différents extraits des racines de la plante, et les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. D'après ces résultats, nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

Tous nos extraits présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celle de la référence (BHT). Les résultats obtenus montrent que la capacité des différents extraits de réduire le fer est largement inférieure à celle de BHT. Cette réduction est beaucoup plus importante dans l'extrait des insaponifiables (DO = 1.81) suivie de celle de l'extrait brut huileux (DO = 1.11) et des acides gras (DO = 0.548). Nous pouvons déduire que tous les extraits des racines ont la capacité pour réduire le fer, mais elle reste toujours inférieure à celle de BHT (DO = 3.0). Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport au BHT, nous obtiendrons l'ordre suivant :

BHT > Insaponifiables > Extrait huileux > Acides gras.

VII.2. Test de blanchissement du bêta-carotène

L'inhibition du blanchiment du β -carotène est évaluée par l'aptitude d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres issus de l'oxydation de l'acide linoléique et les autres radicaux libres formé dans le système (c'est-à-dire le milieu réactionnel) qui attaquent les doubles liaisons du β -carotène. Ceci se traduit par la décoloration de plus en plus forte de ce dernier.

Tableau 18 : Résultats du test de blanchissement du β -carotène

Echantillons		Activité antioxydante				
Huile	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	50	100	150	200	300
	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	29.4	40.4	65.6	70.8	75.2
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	119.8				
Acides gras	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	50	100	150	200	300
	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	3.3	4.1	5.5	16.3	50.5
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	298.6				
In-saponifiables	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	50	100	150	200	300
	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	48.8	65.6	71.4	75.4	86.5
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	53.6				
BHT	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	10	20	40	50	60
	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	48.55	55.5	75.4	82.2	98.3

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. A 300 µg/mL, les insaponifiables et l'huile révèlent la meilleure activité avec des pourcentages d'inhibitions de 86.5 et 75.2 %, respectivement. Alors que les acides gras présentent une activité inhibitrice de 50.5 %. Les valeurs de la IC₅₀ calculées nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité des extraits par rapport au témoin (Tableau 18). Les insaponifiables (IC₅₀ = 53.6 µg/mL) constituent un bon piègeur des radicaux libres en comparant avec les autres extraits (IC₅₀ de 119.8 µg/mL pour l'huile et une IC₅₀ de 298.6 µg/mL pour les acides gras), mais cette activité reste inférieure au BHT.

Conclusion

D'après les résultats obtenus de l'activité antioxydantes par les 3 méthodes ; on peut déduire que les insaponifiables présentent une activité plus importante que l'extrait huileux et les acides gras.

Sur le plan économique, il est souhaitable de procéder à une analyse approfondie des mécanismes d'action de ces composés individuellement et une recherche plus avancée sur la synergie des composés de base.

La qualité d'une huile dépend essentiellement de sa composition chimique.

Le contrôle analytique était basé sur la détermination des indices chimiques caractéristiques de l'extrait huileux (indice de peroxyde, d'acide, d'ester, de réfraction, de saponification et la densité), la détermination du profil acides gras et la détection des constituants mineurs de la fraction insaponifiables des racines de *Carthamus caeruleus*.

Les résultats obtenus, comparés aux normes du Codex Alimentarius, permettent une identification de notre extrait huileux.

Le profil obtenu des acides gras de notre échantillon est conformes aux travaux réalisés sur différentes espèces du même genre *Carthamus* [partie bibliographique, chapitre I : (III.1)].

Du point de vue de la composition en acides gras, il ressort que l'extrait huileux des racines de *Carthamus caeruleus* se compose principalement d'acide oléique qui leur confère les mêmes propriétés que celle de l'huile d'olive, et en acide linoléique comme l'huile de tournesol et de carthame. Ces deux types de prédominance permettent plusieurs voies de valorisation : dans l'alimentaire direct et en lipochimie, notamment en savonnerie, dans l'industrie des tensioactifs, dans l'industrie des lubrifiants industriels et en cosmétologie.

De l'étude de la fraction insaponifiable, il ressort les conclusions suivantes :

De façon générale, l'extrait huileux des racines de *Carthamus caeruleus* représente une teneur élevée en insaponifiable de 2.17%

Du point de vue qualitatif de la fraction insaponifiable ; les terpènes, les tocophérols et les stérols sont les constituants détectés par CCM et les tests phytochimiques réalisés.

Pour ce qui est de la composition en stérols:

Les stérols constituent une part plus ou moins importante de l'insaponifiable avec un pourcentage de 53%; nombreuses applications surtout dans le domaine alimentaire, médical voire cosmétologique peuvent être envisagées.

L'espèce *Carthamus caeruleus* s'avère être intéressante; Son rendement en huile 2.3% et sa composition en acides gras principalement oléique (54.2%-55.4%) permettent une exploitation immédiate dans l'alimentaire. Son utilisation en médecine traditionnelle en vertu de ses propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes conforterait son utilisation dans les industries pharmaceutique et cosmétique en dépit d'une teneur en matières insaponifiables moyenne (2.17%).

la teneur en acide oléique et insaponifiables rend l'huile des racines de *Carthamus caeruleus* nutritionnellement très précieuse et utilisable en Algérie comme une alternative de l'huile d'olive (meilleure source en oméga 9) dont le prix est élevé et ne peut pas satisfaire nos besoins.

- [1] Lecerf, J. (2010). Huiles végétales. *Journal de la phytothérapie* ; 8 Doi 10.1007: 75-76.
- [2] Mohammedi Zohra. (2013). *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie*. (Thèse de doctorat), Université de Tlemcen, Algérie.
- [3] Beniston, N.-W. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Entreprise national du livre : Algérie.
- [4] Lamarck, J.-B & Marie, J.-L. (1785). *Encyclopédie méthodique botanique*. (Vol. 2). Clément Plomteux : France.
- [5] Murthy, I.-Y.-L.-N & Anjani, K. (2008). *Fatty acid composition in Carthamus species*. 7th international safflower conference, Australie.
- [6] Bayer, E., Buttler, K., Finkenzeller, X., & Grau, J. (2005). *Guide de la flore méditerranéenne*. Delachaux et Niestlé : France.
- [7] Benoît, B & J.-F, Léger. (1998). *Herborisation dans les friches méditerranéennes de Vendres (Hérault)*. (Tome 30).bulletin de la société botanique du centre-ouest : France.
- [8] Jauzein, P. (1995). *Flore des champs cultivés*. Quae : France.
- [9] Quezel, P & Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales*. (Tom. 2). Centre national de la recherche scientifique: France.
- [10] Boumerfeg, S. (2010). *Antioxydative properties of Tamus communis L and Ajuga iva L extracts*. (Thèse de doctorat), Université Abbes Ferhat Sétif, Algérie.
- [11] Sabzalian, R., Saeidi, G., & Mirlohi, A. (2008). *Journal of the American oil chemists'society*. 8 (85), 717-721.
- [12] Carapetian, J & Zarei, G. (2005). Variation in Protein, Oil and Fatty Acid Contents in Three Wild Species of Safflower (*Carthamus*) from West Azerbaijan, Iran. *International Journal of Botany*. 1(2), 133-137.
- [13] Rapson, S., Wu, M., Okada, S., Das, A., Shrestha, P., Zhou, X., Craig, W., Green, A., Singh, S., & Liu, Q. (2015). A case Study on the genetic origin of the high oleic acid trait through *FAD2-1* DNA sequence variation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of frontiers in plant science*. ; Doi: 10.3389: 6-691.
- [14] Benmoumen, A., Mansouri, F., Zraïbi, L., Abid, M., Nabloussi, A., Fauconnier, M., Sindic, M., Amrani, A., & Caid, H. (2013). *Comparative study of four safflower oils (Carthamus tinctorius) varieties grown in eastern of Morocco*. Inside Food Symposium conference, Belgique.
- [15] Bolzer, V. (2004). *Phytocosmétologie : description de 40 plantes d'usage courant*. (Thèse de doctorat), Université de Nantes, France.
- [16] Al Surmi N,-Y., El Dengawi, R., Khalefa, A & Nageeb, Y. (2015). Characteristics and Oxidative Stability of Some Safflower (*Carthamus tinctorius*). *Journal of Nutrition & Food Sciences*.14 Doi 10.4172 : 314.
- [17] Mahboobeh, V., Mehrdad, G., Maryam, G., Mohammad, S., & Amir, H. (2011). Lipid Composition and Oxidative Stability of Oils in Safflower (*Carthamus tinctorius*) Seed Varieties Grown in Iran. *Journal of Advances in Environmental Biology*. 5(5): 897-902.
- [18] Matthaus, B., Özcan, MM., & Al Juhaimi, FY. (2015). Fatty acid composition and tocopherol profiles of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed oils. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 29(2): 6-193.
- [19] Abdessamad, B., Farid, M., Gaetan, R., Marie-Laure, F., Marianne, S., Abdelghani, N., Ahmed, E., & Hana, S.(2015).Variations in the phytosterol and tocopherol compositions and the oxidative stability in seed oils from four safflower (*Carthamus tinctorius*L) varieties grown in north-eastern Morocco. *International Journal of Food Science & Technology*.50 (10): 2264–2270.
- [20] Baghiani, A., Boumerfeg, S., Belkhir F., Khennouf S., Charef N., Harzallah, D., Arrar, L., & Mosaad A.-W. (2009). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae revista*. 1(2) : 128-136.
- [21] Ghalem Meriem. (2014). *Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de Zizyphus lotus et Anthyllis vulneraria*. (Thèse de doctorat). Université de Tlemcen, Algérie.

- [22] Popovici, C., Ionka, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Journal de la revue de génie industriel*. (4): 25-39.
- [23] Magali, P. (2008). *Profil et métabolisme des acides gras dans les tissus de la perche commune Perca fluviatilis L.* (Thèse de doctorat). Institut national polytechnique de Lorraine, France.
- [24] Michel, D.-L., & Patricia, S. (2004). *Le pouvoir des oméga-3: une nouvelle médecine nutritionnelle*. Monaco: Alpen.
- [25] Antonio, M., Rabasco, A., & Rodríguez, M.-L.-G. (2000). Lípidos en preparaciones farmacéuticas y cosméticas. *Grasas y Aceites revista*. (51), 74-96.
- [26] Estelle, R. (2013). *Les plantes exotiques dans les cosmétiques : réel intérêt ou effet marketing ?* (Thèse de doctorat), Université de Nantes, France.
- [27] Bruno, D., Agnès, M. (2015). *Traité de neurologie : démences*. France: Doin.
- [28] Liu, Z. (2013). *Effects of Omega-3 Fatty Acids on Prostate Cancer Cells*. (Thèse de doctorat). Université de Washington, États-Unis.
- [29] Lunn, J & Theobald, H. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Journal of Nutrition Bulletin*. (31), 178-224.
- [30] Borel, J.-P & Randoux, A. (1997). *Biochimie dynamique*. Bruxelles : Boeck supérieur.
- [31] Martin, M.-C. (2003). *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*. (4^e éd.). Médicales internationales : France.
- [32] Bereau, D. (2001). *Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens*. (Thèse de doctorat). Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- [33] Frederic, F., Maryline, Abert., Anne-Sylvie, F., Patrick, C., Xavier, P & Farid, C. (2013). Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *Journal of Oilseeds and fats crops and lipids*. 20(5) :502.
- [34] Kadari, A. (2012). *Etude exploratoire des acides gras polyinsaturés des aiguilles de pin*. (Mémoire de master), Université de Tlemcen, Algérie.
- [35] Nia, N. (2008). *Suivi et comparaison des paramètres physico-chimiques de l'huile de soja raffinée chimiquement et enzymatiquement, produits par Cevital*. (Thèse de doctorat), Université de Bejaïa, Algérie.
- [36] Bouazzaoui, W. (2012). *Etude exploratoire des acides gras des pépins de melon*. (Mémoire de master), Université de Tlemcen, Algérie.
- [37] Njinkoue, J. (1995). *Etude des lipides extraits de trois (3), espèces de poissons des côtes sénégalaises: Sardinella maderensis ; Sardinella aurita et Cephalopholis taeniops*. (Thèse de doctorat), Université de Dakar, Sénégal.
- [38] Wolf, J. (1968). *Manuel d'analyse des corps gras*. Azoulay : France.
- [39] Antsa, R. (2014). *Etude de la composition en acides gras de plusieurs savons dits « D'ALEP » comparaison et discussion*. (Thèse de doctorat), Université de Nantes, France.
- [40] Reginald, L. (1950). *The determination of tocopherols in milk fat*. (Thèse de doctorat), Iowa State University, Etats-Unis.
- [41] Mouellet, M. (2005). *Screening phytochimique de deux espèces de plantes : Crotalaria retusa (Papilionaceae) et Hallea ciliata Aubrev & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon*. (Thèse de doctorat), Université de Bamako, Mali.
- [42] Ousman, M. (2005). *Etude phytochimique et de l'activité antipaludique in vivo et in vitro de Momordica balsamina. (Cucurbitaceae)*. (Thèse de doctorat), Université de Bamako, Mali.
- [43] Chaabi, M. (2008). *Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae)*. (Thèse de doctorat), Université de Constantine, Algérie.
- [44] Sanchez-Moreno C., Larrauri, J., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2): 270-276.

- [45] Scherer R., & Goboy, H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Journal of Food Chemistry*, 112 :654-658.
- [46] Moreira, L., Dias, L., Pereira & Etestevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Journal of Food and chemical toxicology*, 46: 3482-3485.
- [47] Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44 : 307-315.
- [48] Hubert, A. (2006). *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine*. (Thèse de doctorat), Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- [49] Karagözler, A., Erdag, S & Çalmaz, Y. (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Journal of Food Chemistry*, 111 :400-407.
- [50] Sarikurkcü, C., Sabih, B., Mustafa, B., Bektas, C., Endil, D & Ebru, M. (2010). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 48:1801–1805.
- [51] Sun, T & Ho, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Journal of Food Chemistry*, 90: 743-749.
- [52] Bourkhiss, M., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A & Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 79 : 141 – 154.
- [53] CA. Codex alimentarius (FAO.OMS). (1993). *Rapport de la quatorzième session du comité du codex sur les graisses et les huiles : Programme mixte fao/oms sur les normes alimentaires commission du codex alimentarius* : FAO.
- [54] Mostefa-Kara, I. (2011). *Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de Citrullus colocynthis (coloquinte) et de son pouvoir antimicrobien*. (Mémoire de magister), Université de Tlemcen, Algérie.
- [55] INCI. (2013). *Fiche technique-huile de carthame*. N°CAS8001-23-8N° EINECS/ELINCS, 232-276-5.
- [56] ISO NF3657. (2003). *Corps gras d'origine animale- végétale- détermination de l'indice de saponification (indice de classement : TGO-206) J.O n°290*. Texte n°118 paru au *Jor F/LD* : 21429.
- [57] khaldi, D. (2007). *Etude chimique et nutritive d'Aragania spinosa*. (Mémoire de magister), Université de Tlemcen, Algérie.
- [58] Bouchefra, A & Idoui, T. (2012). Effet nutritionnel de l'huile d'olive vierge « variétés Sigoise » sur les performances de croissance, les lipides plasmatiques et la flore endogène du rat Wistar. *Journal des technologies de laboratoire*. 26(7) : 1-7.
- [59] Chimi, H. (2005). Conservation comparées de l'huile d'argan et de l'huile d'olive. *Journal des cahiers agricultures*. 14(5) : 467-471.
- [60] CA. Codex alimentarius (FAO.OMS). (1983). *Norme codex stan-pour les huiles d'olives vierges et raffinées et l'huile d'olive de grignons d'olive raffinées*. (Vol 11) : FAO.
- [61] Ollé, M. (2002). Analyse des corps gras. *Technique d'Ingénieur*, P3325: 1-15.
- [62] Mamadou, B. (2012). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali*. (Thèse de doctorat), Université de Bamako, Mali.

Activité antioxydante et analyse chimique des acides gras et des insaponifiables de *Carthamus caeruleus*

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer la teneur en huile des racines de *Carthamus caeruleus* et leur propriétés physiques et chimiques, la composition en acides gras par CPG et CPG/SM, détection des constituants mineurs de la fraction insaponifiables, fractionnement, la teneur en stérols et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait huileux, acides gras et les insaponifiables par 3 méthodes (DPPH, FRAP et blanchissement du β -carotène). La composition en acides gras indique la prédominance de l'acide oléique suivi par l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique. La teneur en insaponifiables de l'extrait huileux, détection de présence de tocophérols, terpènes et stérols, les stérols constituent 53 %. Les insaponifiables possèdent une activité antioxydante plus importante que l'extrait huileux et les acides gras.

Mots clés: extrait huileux, acides gras, insaponifiables, propriétés physiques et chimiques, *Carthamus caeruleus*, stérols, activité antioxydante, DPPH, FRAP, blanchissement du β -carotène.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the oil contained in the roots of *Carthamus caeruleus* and its physical and chemical properties, the fatty acid composition by GC and GC / MS, detection of minor constituents of the unsaponifiable fraction, fractionation, sterol content and evaluation of the antioxidant activity of the oily extract, fatty acids and unsaponifiables by 3 methods (DPPH, FRAP and bleaching of β -carotene). The fatty acid composition of the oils indicated that the predominant fatty acid was oleic acid, followed by linoleic acid, palmitic acid, and stearic acid. Content of the unsaponifiable of oil extract, detecting presence of tocopherols, terpenes and sterols. Unsaponifiables have a higher antioxidant activity than the oily extract and fatty acids.

Keywords: oily extract, fatty acid, unsaponifiables, physical and chemical properties, *Carthamus caeruleus*, sterols, antioxidant activity, DPPH, FRAP, bleaching of β -carotene.

ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم محتوى الزيت من جذور *Carthamus caeruleus* والخصائص الفيزيائية والكيميائية، وتكوين الأحماض الدهنية بواسطة CPG و CPG/SM ، الكشف عن مكونات بسيطة للجزء غير المتصين، تجزئة، محتوى ستيرول، وتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الزيتي، الأحماض الدهنية، والجزء غير المتصين بواسطة 3 طرق (DPPH، FRAP، تبييض بيتاكاروتين). تكوين الأحماض الدهنية يشير إلى أغلبية حمض الأوليك، تليها حمض اللينولييك، حمض البالمتيك و حمض الستياريك. الكشف عن وجود التوكوفيرول، التربين و الستيرول. الجزء غير المتصين لديه نشاط مضاد للأكسدة أعلى من المستخلص الزيتي والأحماض الدهنية.

الكلمات المفتاحية: المستخلص الزيتي، الأحماض الدهنية، الجزء غير المتصين، الخصائص الفيزيائية والكيميائية، *Carthamus caeruleus*، الستيرول، نشاط مضاد للأكسدة، DPPH، FRAP و تبييض بيتاكاروتين).