

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



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



Département de Biologie

Laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition

MEMOIRE

Présenté par

Mlle. Benbrahim Zakia

Mlle. Kernabi Meriem

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Physiologie cellulaire et physiopathologie

Thème

Mise au point et méthodologie de l'extraction et du dosage des
polyphénols des pétales de safran

Soutenu le 29/06/2020, devant le jury composé de :

Présidente	Mme MERZOUK. H	Professeur à l'université de Tlemcen
Encadreur	Mme BABA HAMED. Y	Maitre de conférences à l'université de Tlemcen
Examinatrice	Mme MEJDOUBE. A	Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

REMERCIEMENTS



Ce travail a été réalisé au laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition de l'Université ABOU BEKR BELKAID, Tlemcen.

Nos sincères remerciements vont à Madame la directrice MERZOUK. H, Professeur à l'université de Tlemcen pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire.

Nous tenons à remercier vivement, Madame Baba Hamed. Y, Maitre de conférence à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté de diriger ce travail. Je lui exprime ma sincère gratitude, pour la patience dont elle a fait preuve, pour me guider, et pour sa rigueur, qui m'a poussé sur la voie d'un sens accru de la précision.

Nous tenons à remercier Madame MERZOUK. H, qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions encore Mme Mejdoub. A, Maitre de conférences à l'université de Tlemcen, de nous honorer de faire partie du jury.

Que toutes les personnes du laboratoire de de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition, trouvent mes sincères remerciements.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci

DEDICACES



*Avant tous, merci Allah (mon Dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire
bout de rêve et de bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire «alhamdulillah»*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est
sacrifiée pour mon bonheur, ma réussite, et pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui
a fait de moi ce que je suis aujourd'hui que Dieu la protège et l'accorde une longue vie pleine
de santé et de bonheur, à ma très chère mère Djaziri Nadira.*

*À la chose la plus précieuse que j'ai, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et
m'encourager. Mon cher père Abdellah.*

À mes chères tantes Khamssa et Maghnia.

À mes frères Mohammed, Mohammed, Ahmed et Abdellah.

À mes chères sœurs Fatna, Cherifa et NourElhouda.

À mes belles sœurs Houda, Fatima, Linda.

À mes grands-mères et mes grands-pères.

À mes chères proches Fatiha et Rahma Mehidi, khadidja Herarsi.

À mes très chères amies :Nour, Maghnia, Houda, Hadjer, Widad, Khadidja.

À l'amie qui a supporté avec moi les difficultés de notre mémoire Meriem.

*À mes professeurs et enseignants qui ont suivi mes études tout au long de ma carrière
académique.*

À tous ceux que je connais et que je n'ai pas pu le citer.

Zakia

DEDICACES



Avant tous, merci Allah (mon Dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire bout de rêve et de bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire «alhamdulillah»

Je dédie ce modeste travail d'abord à mon grand-père Kernabi Abdelkader, mon deuxième père et ma grand-mère Elbahloul Zahra et je les remercie pour tous les sacrifices qu'ils m'ont faits tout au long de ma vie et pour leur soutien et encouragement.

À ceux qui m'ont donné la vie, les symboles de tendresse, qui se sont sacrifiée pour mon bonheur, ma réussite, et pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui que Dieu les protège et les accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur, à mon cher père Lakhdar et ma chère mère Saidani Kheira.

À ma chère tante Yamna.

À mon frère Mohammed, et à mes chères sœurs fatima zohra et Chaimaa.

À ma grand-mère et mon grand-père.

À mes très chers amis : Ismail, Amel, Nadja, qui ont toujours était avec moi et m'ont apporté un soutien psychologique c'est mes plus beaux souvenirs.

À l'amie qui a supporté avec moi les difficultés de notre mémoire Zakia.

À mes professeurs et enseignants qui ont suivi mes études tout au long de ma carrière académique.

À tous ceux que je connais et que je n'ai pas pu le citer.

Meriem

Table des matières

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE (CROCUS SATIVUS.L)	3
I.1.GENERALITE SUR LE SAFRAN	4
I.1.1.DEFINITION	4
I.1.2. DESCRIPTION BOTANIQUE	5
I.1.3.LES PRINCIPALES COMPOSITIONS DU SAFRAN	6
I.2. LES PETALES DE SAFRAN.....	8
I.2.1. DEFINITION	8
I.2.2.LES COMPOSITIONS CHIMIQUES.....	9
I.2.3.LES EFFETS THERAPEUTIQUES.....	9
I.2.3.1.L’EFFET ANTINOCICEPTIVE ET ANTI-INFLAMMATOIRE	9
I.2.3.2.L’EFFET ANTIDEPRESSEUR	10
I.2.3.3.L’EFFET ANTIDIABETIQUE	10
I.2.3.4.L’EFFET ANTIOXYDANT	10
I.2.3.5.L’EFFET ANTIMICROBIEN	10
I.2.3.6.L’EFFET RENOPROTECTEUR	10
I.2.3.7.L’EFFET HYPERTENSEUR	10
I.2.3.8.L’EFFET HYPOLIPIDEMIE	11
I.3. LA CYTOTOXICITE	11
I.3.1. TOXICITE DE SAFRAN	11
I.3.2. TOXICITE DES PETALES DE SAFRAN	12
II. LES COMPOSEES PHENOLIQUES	12
II.1. GENERALITE	12
II.2. DEFINITION DES POLYPHENOLS	12
II.3.LA BIOSYNTHESE DES POLYPHENOLS.....	13
II.3.1.LA VOIE DE SHIKIMATE OU DES PHENYLPROPANOIDES.....	13
II.3.2.LA VOIE DES POLYCETATES.....	13
II.4.CLASSIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES	15

II.4.1.ACIDES PHENOLIQUES.....	15
II.4.2.LES FLAVONOÏDES	15
II.4.3.LES TANINS	15
II.4.4.LES STILBENES	16
II.4.5.PHENYLPROPANOÏDES	16
II.4.5.1.LES COUMARINES.....	17
II.4.5.2.LES LIGNANES	17
II.4.5.3.LES LIGNINES.....	17
II.4.5.4.LES XANTHONES	18
II.4.5.5.LES QUINONES	18
II.5.ROLE DES POLYPHENOLS.....	19
MATERIELS ET METHODES.....	21
I.MATERIEL VEGETAL	22
I.1. RECOLTE ET PREPARATION	22
II. METHODES.....	22
II.1. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE	22
II. 2. PREPARATION DES EXTRAITS	23
II. 2.1.MACERATION	23
II.2.2.DECOCTION	24
II.2.3.INFUSION	25
II.2.4.ULTRASON	25
II.3.CALCUL DU RENDEMENT DES EXTRAITS	27
II.4. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX	28
II.4.1. PRINCIPE	28
II.4.2. MODE OPERATOIRE	28
II.5. TEST DE CYTOTOXICITE DES EXTRAITS	28
II.5.1. PRINCIPE	28
II.5.2. PREPARATION DE LA SUSPENSION DES GLOBULES ROUGES HUMAINS (GRH)	29
II.5.3. MODE OPERATOIRE	29
II.5.3. EXPRESSION DES RESULTATS	29
RESULTATS ET INTERPRETATION.....	30
I.CALCUL DU RENDEMENT DES EXTRAITS DE CHAQUE METHODE D'EXTRACTION.....	31
II. DETERMINATION DES POLYPHENOLS TOTAUX	31
III. DETERMINATION DE LA CYTOTOXYCITE DES EXTRAITS DES PETALES	33

DISCUSSION	36
CONCLUSION GENERALE	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	42
RESUME	

Liste des figures

Figure 01: Le *Crocus sativus* L

Figure 02: La morphologie de *Crocus Sativus* L

Figure 03: Structure du noyau phénol.

Figure 04: représentation des voies de biosynthèse des polyphénols

Figure 05: représentation de la structure chimique de base des flavonoïdes.

Figure 06: Représentation de la structure de tanin hydrolysable et tanin condensé.

Figure 07: Représentation de la structure des stilbènes.

Figure 08: Représentation de la structure des coumarines.

Figure 09: Structure de la lignane.

Figure 10: L'intégration des monolignols dans la lignine.

Figure11: Structure de base de xanthone.

Figure 12: Les pétales de safran sous forme séchées et broyées.

Figure 13: Schéma d'extraction par macération

Figure 14: Schéma d'extraction par décoction

Figure 15: Schéma d'extraction par l'infusion.

Figure 16: Schéma d'extraction par l'ultrason.

Figure 17: L'appareil utilisé pour la sonication.

Figure 18: Extraits de pétales de safran après évaporation.

Figure 19: Courbe étalon de l'acide gallique.

Figure 20: Teneurs en polyphénols des extraits des pétales de safran.

Figure 21: Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique C- : 4.6% ; C+ : 100%

Figure 22: Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par les extraits méthanoliques des pétales de safran.

Figure 23: Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits méthanoliques des pétales de safran.

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification botanique de *Crocus Sativus* L .

Tableau 02: la composition chimique de safran.

Tableau 03: Les compositions minérales des pétales de safran.

Tableau 04: rendement en extrait sec et solvant de solubilité des différentes modes d'extraction.

Liste des abréviations

Kg : Kilogramme.

Cm : Centimètre.

Mm : Millimètre.

Mg/l : Milligramme par Litre.

g : gramme.

Mg/g : Milligramme par gramme.

Na : Sodium.

K : Potassium.

g/kg : gramme par kilogramme.

UV : Les rayons Ultraviolet.

C: Carbone.

Acetyl-coA: Acétyl Co enzyme A.

ml : millilitre.

V/V : volume/volume.

H : heure.

KHz: kilohertz.

W : watt.

T° : température.

C° : degré Celsius.

µl : microlitre.

GRh : globule rouge humain.

Rmp : nombre de rotations par minute.

µg EAG : microgramme équivalent d'acide gallique.

Mg EAG : milligramme équivalent d'acide gallique.

C+: contrôle positive.

C- : contrôle négative.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale :

Depuis très longtemps, les plantes sont utilisées dans la vie quotidienne de l'homme pour soulager les douleurs et panser les blessures. Elles possèdent des propriétés biologiques très intéressantes impliquées dans divers domaines à savoir, les domaines alimentaires, médicinale, pharmaceutique, cosmétologique et dans l'agriculture [(Benkhniue *et al.*, 2011) ; (Lahsissene *et al.*, 2010)].

Ces plantes médicinales synthétisent de nombreux composés appelés des métabolites primaires et secondaires qui possèdent des activités biologiques nécessaires pour l'homme et l'écosystème. Les polyphénols constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires qui se localisent généralement au niveau des différentes parties de la plante. L'importance de ces plantes attire l'attention des chercheurs pour faire l'intérêt de nombreuses études.

Notre travail est consacré à l'étude des pétales de la plante *Crocus sativus*.L récoltée de la région d'Ain Fezza Willaya de Tlemcen.

Le safran ou *Crocus sativus* L est une plante herbacée stérile appartenant à la famille des Iridaceae (Giorgi *et al.*, 2015). il est considéré comme une plante médicinale depuis l'Antiquité et aussi utilisé comme additif alimentaire pour sa couleur, son goût et son odeur [(Hosseini *et al.*, 2018) ; (Esmaeili *et al.*, 2011)].

Les pétales de safran sont des composants les plus importants de la fleur de safran car ils constituent une source de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, glycosides, kaempférol, des composés minéraux, et des anthocyanines ayant des activités physiologiques différentes (Hossein Goli *et al.* 2012) ; (Hosseini *et al.*, 2018)].

Le safran et ses pétales améliorent également la mémoire et les capacités d'apprentissage et ont des propriétés pharmacologiques tels que le pouvoir antioxydant, anticancéreux, antibactérien, antispasmodique, immunomodulateur, antidépresseur, antinociceptif, et des activités hépatoprotectrices, renoprotectrices, antihypertensives et antidiabétiques , ont été évaluées in vivo et in vitro par différentes expériences . En outre, d'autres études ont mis en évidence les effets toxicologiques du safran [(Srivastava *et al.*, 2010) ; (Hosseini *et al.*, 2018)].

Introduction générale

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse des pétales de safran en polyphénols à partir de quatre méthodes d'extractions qui sont la macération, décoction, infusion, ultrason, et de déterminer l'effet cytotoxique de ces pétales.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

- La première partie de ce manuscrit porte sur une mise au point bibliographique sur la plantes de *Crocus sativus*.L et leurs pétales ainsi qu'une synthèse sur les polyphénols.
- La deuxième partie est consacrée à la description des principes et les détails pratiques des techniques expérimentales employées pour réaliser ce travail.
- La troisième partie est réservée aux résultats et interprétation suivi d'une discussion.

Et en fin, on termine notre travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude.

Partie 1
Etude Bibliographique

I. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE (CROCUS SATIVUS.L)

I.1.Généralité sur le safran

I.1.1.Définition

Le safran est une épice rare, et la plus chère au monde ce qui lui a valu son surnom d'Or Rouge. Le nom safran, safran cultivé ou safran de Gâtinais est dérivé du latin « safranum » qui est emporté de l'arabe « Azaafarân, Azzaàfarane Alhorr ou Azzaàfarane chaàra » et de l'anglais « Saffron crocus », cette épice est tirée de la fleur de *Crocus sativus*.L d'où il prend son nom scientifique, le nom de genre "Crocus" signifie "filament" et le terme "sativus" signifie "cultivé", ces racines expriment une notion essentielle c'est la couleur jaune (**Rahmouni et Reghis, 2016**). D'après les producteurs de safran, il faut 75000 fleurs ou encore 225000 stigmates triés pour en produire 0.5 kg de safran donc il dispose une grande valeur commerciale [(Atlas, 2010) ; (**Benmostefa et Ghellil, 2017**) ; (**Bouden et Kadri, 2019**)].

La plante de safran se caractérise spécifiquement par le goût amer, l'odeur aromatique et la couleur rouge intense (stigmate) (**Zhang et al., 2013**). Elle est largement utilisée dans la fabrication des cosmétiques, et comme facteur de coloration, d'aromatization et comme épice dans la préparation des aliments (**Hosseinzadeh, 2014**). elle est utilisée aussi en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs maladies comme les maux d'estomac, la dépression, l'insomnie (**Hosseini et al., 2018**).

Le safran est une plante vivace sans tige, appartient à la famille des iridacées, considéré comme une plante médicinale, Les principales régions de la culture sont : l'Iran, l'Azerbaïdjan, la Chine, la France, la Grèce, l'Égypte, l'Inde, l'Italie, le Mexique, le Maroc, l'Espagne et la Turquie (**Pitsikas, 2016**).

Des études phytochimiques ont montrés que le safran contient de la crocétine, de la crocine, de la picrocrocine et safranal, La couleur du safran est liée à la présence de crocin (**Hosseinzadeh et Nassiri-Asl, 2013**).



Figure 01 : Le Crocus sativus L

I.1.2. Description botanique :

Le safran est une herbe vivace bulbeuse et monocotylédone, appartient à la famille des iridacées de 10 à 30 cm de hauteur à floraison automnale, a un pollen stérile qui ne peut pas féconder l’ovaire de la fleur, donc il dépend complètement de l’homme pour sa reproduction [(Atlas, 2010) ; (Guide, 2003)]

Le bulbe nommé aussi oignon ou cornes est un organe souterrain globulaire, gros et solide, aplatie à la base et renflé à la partie supérieure, de 4.5 à 5.5 cm, comprennent 2 types des racines : Les racines fines et les grosses racines [(Atlas, 2010) ; (Guide, 2003)].

La plante comporte de 6 à 9 feuilles étroites terminées en pointe, droites, herbeuse et d’une couleur vert foncé, elles apparaissent lors de la floraison au mois d’octobre/Novembre (Srivastava *et al.*, 2010).

Les fleurs au nombre de 6 à 10, formées d’un périanthe qui contient 6 pétales ovales de couleur violette soudée à la base en un tube long et étroit [(Atlas, 2010) ; (Palomares, 2015)].

L’androcée se compose de 3 étamines de couleur jaune mesurent 22 mm de long.

Le gynécée ou bien le pistil c’est l’organe femelle de la plante se compose d’un ovaire inférieur se situe au fond du tube de périanthe à partir du quel sort un style jaune et mince de 9 à 10 mm de long, qui est divisé en trois branches de couleur rouge foncés appelés stigmates qui donnera l’épice « safran », ils sont d’environ 30 à 40 millimètres de long [(Atlas, 2010) ; (Guide, 2003) ; (Gismondi *et al.*, 2010) ; (Palomares, 2015)].

La classification botanique est la suivante:

Partie 1: Etude Bibliographique

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophyte
Sous-embranchement	Angiospermes(Magnoliophyta)
Classe	Monocotylédones(Liliopsida)
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Iridaceae
Sous-famille	Crocoideae
Genre	Crocus
Espèce	C. sativus L

Tableau 1 : Classification botanique de Crocus Sativus L (Dupont et Guignard, 2007)

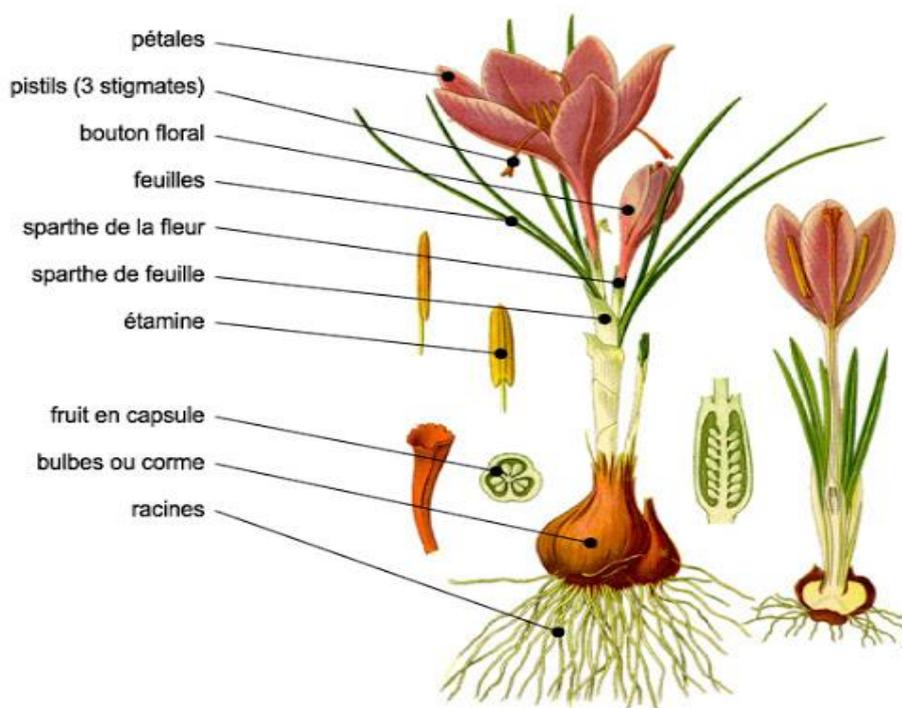


Figure 02: La morphologie de Crocus Sativus L

I.1.3. Les principales compositions du safran :

L'analyse chimique du safran a montré la présence d'environ 150 substances volatiles aromatiques et des composés non volatils, les principaux étant les flavonoïdes (quercétines et kaempférols) et majoritairement les caroténoïdes en grandes quantités tels que l' α -carotène, le

Partie 1: Etude Bibliographique

β -carotène, les lycopènes et la zéaxanthine. Les principaux caroténoïdes indispensables sont : les crocines, les crocétines et picrocrocines [(Pitsikas, 2016) ; (Palomares, 2015) ; (Liakopoulou-Kyriakides et Kyriakidis, 2002)].

Les substances volatiles se composent de plus de 34 composants qui sont des terpènes, des alcools terpéniques et leurs esters dont le safranal qui est le principal composant (Liakopoulou-Kyriakides et Kyriakidis, 2002).

La crocétine, la crocine, la picrocrocine et le safranal sont synthétisés à partir du clivage oxydatif de la zéaxanthine (Premkumar et Ramesh, 2010).

D'après (Melnyk *et al.*, 2010), les principaux composants biologiquement actifs trouvés dans le safran, sont cités ci-dessous :

La crocine : appartient à la famille des caroténoïdes est le dérivé de la crocétine, responsables de la couleur jaune-orangée de l'épice, constituent environ 6 à 16% de la matière sèche totale du safran. Elle est soluble dans l'eau. Se caractérise par une activité antioxydante et antitumorale (Gregory *et al.*, 2005) (Gutheil *et al.*, 2012).

La picrocrocine : est un glycoside sans couleur et sans odeur, issu de la dégradation de la zéaxanthine et un précurseur de safranal, Responsable de la saveur amère du safran et peut comprendre jusqu'à 4 % de safran sec (Srivastava *et al.*, 2010).

Le safranal : c'est une molécule volatile présente sous forme d'huile essentielle, responsable de l'odeur et l'arôme du safran, il représente 82,82 % des composants volatils (Hu *et al.*, 2008). Cette molécule produit par l'hydrolyse de la picrocrocine, les conditions de séchage et de stockage sont des facteurs principales pour la détermination de la concentration en safranal (Palomares, 2015).

Les flavonoïdes : les flavonols porte le nom des kampférols sont des composants de safran, avec la quercétine et l'isorhamnétine qui ont été identifiées au niveau des pétales de cette plante étudiée (Goupy *et al.*, 2013).

Partie 1: Etude Bibliographique

Le tableau ci-dessous représente la composition chimique du safran :

Les composants	La masse en pourcentage
Glucides	12.0 - 15.0
H ₂ O	14.0 - 19.0
Polypeptides	11.0 - 14.0
Cellulose	4.0 - 7.0
Lipides	3.0 - 8.0
Minéraux	1.0 - 1.5
Divers non azotés	40

Tableau 2 : la composition chimique de safran (**Rahimi, 2015**).

En plus de tous ces composants chimiques il y a des chercheurs qui ont trouvés que le safran est très riche en thiamine (vitamine B1) (**Goupy et al., 2013**).

I.2. Les pétales de safran

I.2.1. Définition

Les pétales de safran sont les principaux sous-produits de la transformation du safran, sont moins cher et produite à une grande quantité par rapport aux stigmates de plus de 10 000 tonnes par an, mais généralement ne sont pas utilisés est presque totalement négligés sur le plan commercial et rejetés après la récolte (**Hossein Goli et al., 2012**). Les pétales de safran contiennent plusieurs composés tels que les flavonoïdes, glycosides, kaempférol, des composés minéraux, et des anthocyanines (responsable de la couleur violette des pétales). Ils sont utilisés comme agent biologique dans les industries agricoles (**Astareï et al., 2006**), et ils possèdent plusieurs propriétés pharmacologiques comme le pouvoir antioxydant, anticancéreux, antibactérien, antispasmodique, immunomodulateur, antidépresseur, antinociceptif, et des activités hépatoprotectrices, renoprotectrices, antihypertensives et antidiabétiques [(**Hosseini et al., 2018**) ; (**Fahim et al., 2012**)].

La plupart des études portent sur la stigmatisation du safran et il existe peu d'informations sur le pétale ce qui attire aujourd'hui l'attention des chercheurs.

Partie 1: Etude Bibliographique

I.2.2.les compositions chimiques

L'analyse chimique des pétales de safran a été montrée la présence des propriétés physicochimiques tel que les protéines 10,20%, les graisses 5,3%, les cendres 7,00%, les fibres 8,80% (**Fahim et al., 2012**), ils sont également riches en composés phénoliques avec une grande quantité (**Hossein Goli et al., 2012**), ils se composent de flavonoïdes (kaempférol 12,6%) [(**Hadizadeh et al., 2003**) ; (**Zeka et al., 2015**)], des caroténoïdes (crocine, 0,6 % et crocétine) (**Zeka et al., 2015**), d'anthocyanines 1712.19mg/l qui donnent la couleur violette des pétales (**Khazaei et al., 2015**), et de terpénoïdes tels que les crocusatines avec une activité antityrosinase (**Li et al., 2004**), d'alcaloïdes (**Termentzi et Kokkalou, 2008**), et des tanins (**Hosseinzadeh et Younesi, 2002**).

La teneur en minéraux des pétales de safran est indiquée dans le tableau qui représente les valeurs de Sodium, Potassium, Calcium, Cuivre, Fer, Magnésium, Zinc, Phosphore dans 100g des pétales (**Fahim et al., 2012**).

Les composés	Le montant
Sodium (Na)	25.75mg/100g
Potassium (K)	542.13 mg/100g
Calcium (Ca)	486.25 mg/100g
Cuivre (Cu)	0.87 mg/100g
Fer (Fe)	17.99 mg/100g
Magnésium (Mg)	2.93 mg/100g
Zinc (Zn)	1.80 mg/100g
Phosphore (P)	209.90 mg/100g

Tableau 03: Les compositions minérales des pétales de safran (**Fahim et al., 2012**).

I.2.3.les effets thérapeutiques

I.2.3.1.L'effet antinociceptive et anti-inflammatoire :

Les résultats indiquent que les pétales de *Crocus sativus* L ont une activité antinociceptive et une activité anti-inflammatoire dans le test d'inflammation chronique et ceci peut être dû à

leur contenu en flavonoïdes, tanins, anthocyanines, alcaloïdes et saponines [(Hosseinzadeh et Younesi, 2002) ; (Hosseinzadeh *et al.*, 2002)].

I.2.3.2.L'effet antidépresseur :

Les pétales de safran possèdent des effets antidépresseurs similaires aux stigmates, l'activité antidépressive du pétale de safran dépend de kaempférol qui est un composé actif [(Basti *et al.*, 2006) ; (Hosseinzadeh *et al.*, 2007)].

I.2.3.3.L'effet antidiabétique :

Selon des études, les chercheurs ont trouvés que l'extrait de pétales de safran protège contre la néphropathie induite par les streptozotocines. Cet extrait provoque la diminution du volume d'urine, le taux d'azote uréique du sang et la glycémie sans modification de la créatinine, (Zarez *et al.*, 2017).

I.2.3.4.L'effet antioxydant :

La plupart des médicaments à base de plantes contiennent des composés antioxydants .Une étude a montré que les pétales de safran augmentent la teneur en antioxydants par l'élimination des radicaux libres et la réduction des dommages cellulaires (Ardalan *et al.*, 2012).

I.2.3.5.L'effet antimicrobien :

L'extrait méthanolique des pétales de safran a montré une activité antimicrobienne contre Staphylococcus, Bacillus, Salmonella, Escherichia Coli, Shingella, cet effet lié à la présence de composés phénoliques. (Asgarpanah *et al.*, 2013).

I.2.3.6.L'effet rénoprotecteur :

D'après une étude, l'extrait des pétales de safran a réduit la toxicité rénale par la réduction des taux d'acide urique et de créatinine ce qui lui donne une activité rénoprotecteur (Omidi *et al.*, 2015).

Les pétales de safran ont aussi des effets protecteurs sur les syndromes métaboliques et réduisent les risques de l'obésité, l'hypertension et le diabète (Hosseini *et al.*, 2018).

I.2.3.7.L'effet hypertenseur :

Les niveaux de Na et de K détectés suggèrent que les pétales de safran pourraient s'avérer utiles pour la diminution de la pression artérielle élevée (Fahim *et al.*, 2012).

I.2.3.8.L'effet hypolipidémie :

Le safran a été efficace pour réduire les taux élevés de lipides pendant un stress hyperlipidémie (Asdaq *et al.*, 2009).

I.3.La cytotoxicité :

La cytotoxicité est la capacité d'un matériel d'essai (agent biologique ou chimique) de provoquer des dommages de la membrane des cellules vivantes ou la mort cellulaire, donc des modifications de viabilité des cellules.

Le test de cytotoxicité est basé sur un simple raisonnement c'est la quantification de l'hémolyse comme reflétant des dommages chimiques causés aux membranes des cellules, et la corrélation de cette mesure avec les critères d'irritation établis.

Parmi les avantages de ce test est facile à réaliser et les matériaux sont facilement disponibles comme par exemple les globules rouges et les cellules épithéliales, prend moins de temps que d'autre tests; et moins cher (Singleton *et al.*, 1994).

I.3.1. Toxicité de safran :

Selon Paracelse, médecin du XVI^e siècle, pour voir les effets secondaires et inverses de safran il faut absorber une grande quantité (20g/kg de poids) et donc devenir toxique. En plus, le colchique d'automne est un type de safran, également surnommé « safran bâtard », il caractérise par ses styles blanchâtres et ses six étamines. Toutes les parties de cette plante sont toxiques (Palomares, 2015).

Il semble qu'à des doses de plus de 10 g provoquent des effets secondaires tels que, les hémorragies utérines provoquant l'avortement, des hématuries, des nausées et des vomissements, la peau et les muqueuses peuvent se colorer en jaune et imiter ainsi un ictère. Il y a des études in vivo qui montrent que le safran et les extraits ont une toxicité très faible chez les animaux (Schmidt *et al.*, 2007).

Dans des très rares cases, le risque allergique du safran était très faible (Schmidt *et al.*, 2007). Des études ont montrées que l'exposition à des niveaux très élevés de safran peut augmenter le taux de fausses couches chez les femmes enceintes donc il faut éviter de le prendre à forte dose (Bostan *et al.*, 2017).

Aussi le safran et ses composants ont des effets toxiques chez le fœtus et l'enfant allaité [(Taloubi *et al.*, 2013) ; (Wu *et al.*, 2010)]

D'autres études in vitro ont montré que le safran et ses constituants ont inhibé sélectivement la prolifération des cellules cancéreuses et n'ont pas exercé d'effet toxique sur les cellules normales (Milajerdi *et al.*, 2016).

I.3.2. Toxicité des pétales de safran :

Les doses thérapeutiques ne présentent pas de toxicité significative dans les études cliniques et expérimentales, c'est donc la quantité qui cause la toxicité (**Bostan et al., 2017**).

Ceci est confirmé par une expérience dans laquelle L'examen pathologique a montré des lésions du foie et des poumons chez les animaux ayant reçu des fortes doses du pétale de safran (**Karimi et al., 2004**). (Jusqu'à 3,6 g/kg pendant deux semaines). Cette étude a montré aussi que les extraits de pétales de safran réduisent le poids corporel, l'hématocrite, l'hémoglobine et les érythrocytes (**Hosseini et al., 2018**).

Selon les études toxicologiques la toxicité du stigmate est plus élevée que le pétale de safran (**Hosseini et al., 2018**).

II. LES COMPOSEES PHENOLIQUES :

II.1. Généralité :

Les plantes possèdent une originalité majeur réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, elles sont d'une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes (**Macheix et al., 2005**).

Les cellules végétales possèdent des capacités à produire des métabolites primaires telles que les glucides les lipides et les protides [(**Bruneton, 2009**) ; (**Gravot, 2008**)], ces derniers jouent un rôle important dans : la photosynthèse, la croissance, la respiration et le développement de la plante [(**Croteau et al., 2000**) ; (**Dewick, 2002**)]. Aussi, sont utilisés pour la fabrication des médicaments.

En effet, à côté des métabolites primaires, les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, Ils participent à l'adaptation de la plante à son environnement, la régulation des symbioses et d'autre interaction plante-animaux, la défense contre les pathogènes et les prédateurs (**Hornok, 1992**) et la protection contre les rayons UV (**La zerat, 2009**). Ils sont utilisés en médecine moderne et traditionnel.

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humain [(**Macheix et al., 2005**) ; (**Marouf, 2000**)]

II.2. Définition des polyphénols :

Les composés phénoliques ou dits polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire, présents dans tous les végétaux et dans tous les

Partie 1: Etude Bibliographique

organes de la plante, regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules [(Naczek e Shahidi, 2003) ; (Sun *et al.*, 2011)]. La structure de base des polyphénols est un phénol (Figure 03).

Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'au moins un cycles benzéniques portant au moins une fonction hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction [(Bruneton, 2009) ; (Macheix *et al.*, 2005)].

Ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydant (Michel, 2011). Ils jouent aussi un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, pour se défendre contre les agressions environnementales (Stalikas, 2007).

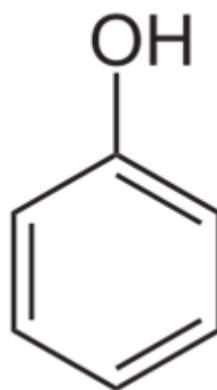


Figure03 : Structure du noyau phénol (Achat, 2013).

II.3.La biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

II.3.1.La voie de Shikimate ou des phénylpropanoïdes

Cette voie conduit à la production des composés aromatiques comme L-phénylalanine et/ou L-tyrosine, puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés comme les acétophénones, les acides benzoïques, lignanes et lignine à partir de l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénolpyruvate qui sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables, les flavonoïdes et tannins condensés [(Dewick, 1995) ; (Ouldkaddour, 2019) ; (Sahli, 2018)]

II.3.2.La voie des polycétates

Ce mécanisme de biosynthèse conduit à la formation des composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones par cyclisation des chaînes polycétonique

Partie 1: Etude Bibliographique

(Livermore, 2002), obtenus par condensation répétée d'unités acétate qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA (Chaouche, 2014)

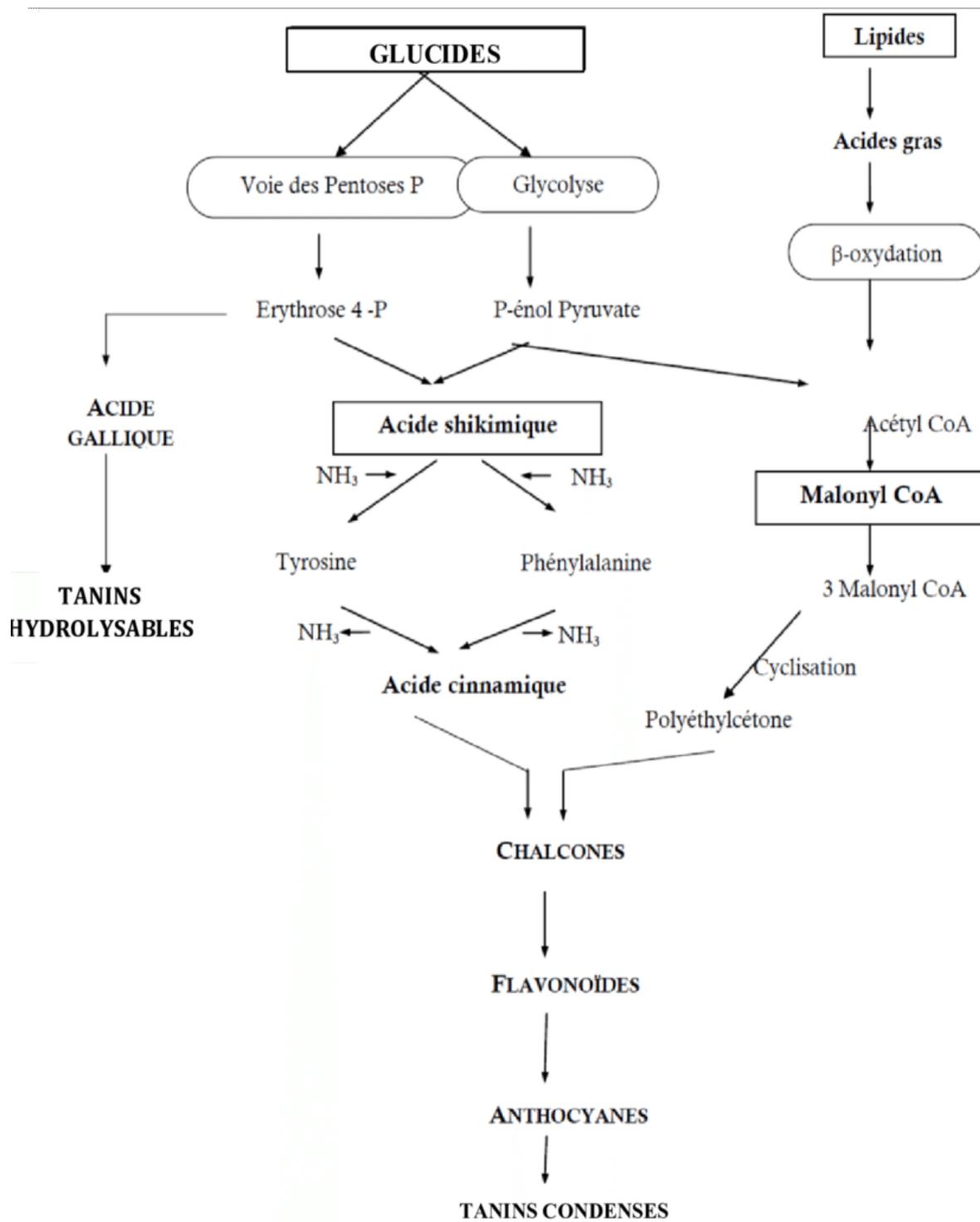


Figure04 : représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Chaouche, 2014).

II.4.classification des composés phénoliques

II.4.1.Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant au moins un hydroxyle phénolique et une fonction carboxylique. Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxybenzoïques) et les dérivés d'acide cinnamique (les acides hydroxycinnamiques) (Pandey et Rizvi, 2009).

II.4.2.Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde provient du latin "flavus", signifiant "jaune", ils sont des pigments polyphénoliques presque toujours hydrosolubles qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaunes ou en blanc. Ils ont un champ d'action important et possèdent de nombreuses vertus médicinales.

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (Tomas-Barberan FA *et al.*, 2000), ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

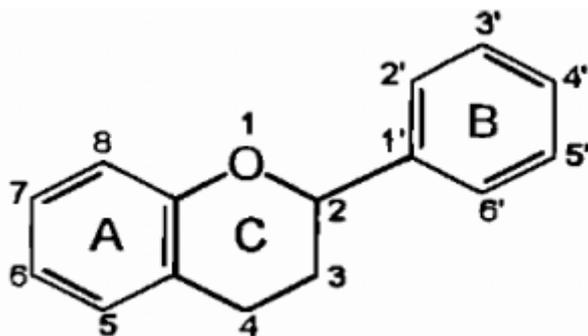


Figure05 : représentation de la structure chimique de base des flavonoïdes (Saxena *et al.*, 2012)

II.4.3.Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce et aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes et le bétail. Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils possèdent une légère odeur caractéristique et sont astringents.

Partie 1: Etude Bibliographique

Les tanins sont hydrosolubles fortement hydroxylés avec un poids moléculaire élevés, qui sont caractérisés par leur capacité de se lier aux glucides, protéines, alcaloïdes et acides nucléiques (Alkurd *et al.*, 2008).

Selon le type de liaisons et la nature de l'acide phénolique, on distingue deux grands groupes de tannins : les tannins condensés et les tannins hydrolysables (Rira, 2006).

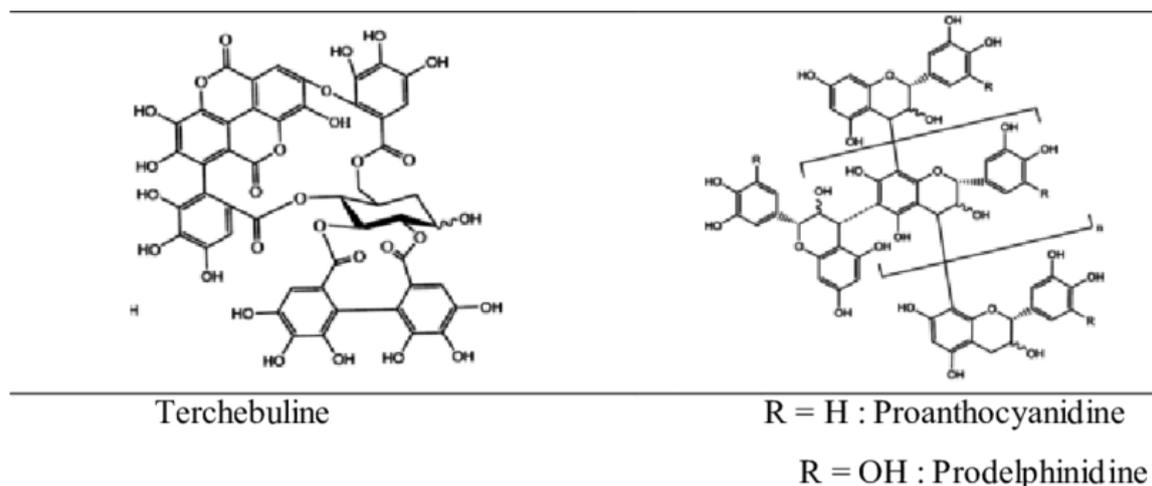


Figure 06: Représentation de la structure de tannin hydrolysable et tannin condensé (Chaouche, 2014).

II.4.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des molécules ayant une structure de base de type (C6-C2-C6), présentes dans notre alimentation en petite quantité. Le composé le plus connu est le trans-resvératrol possédant une propriété anticancéreuse [(Han *et al.*, 2007) ; (kundu, 2008)] (Figure 07).

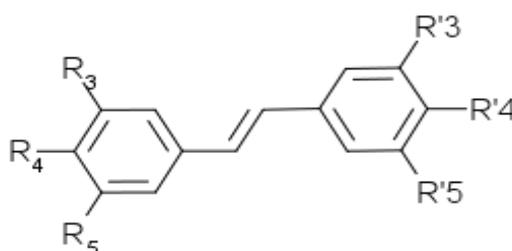


Figure 07 : Représentation de la structure des stilbènes.

II.4.5. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont des composés organiques biosynthétisés à partir d'un acide aminé la phénylalanine qui contient un ou plusieurs résidus C6-C3 (Chaouche, 2014) Parmi eux on trouve :

II.4.5.1. Les coumarines

Les coumarines sont des lactones des acides cinnamiques. Ils sont largement distribués dans tous le règne végétal et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans des solvants organiques ou des solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire.

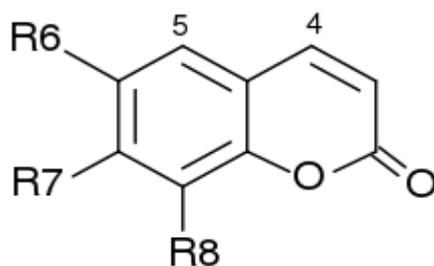


Figure 08: Représentation de la structure des coumarines (Chaouche, 2014).

II.4.5.2. Les lignanes

Les lignanes sont les dérivés de l'acide cinnamique s'accumulant dans les tissus ligneux, les graines et les racines de nombreuses plantes interviennent dans son système de défense [(Chaouche, 2014) ; (Puupponen-Pimiä, 2005)].

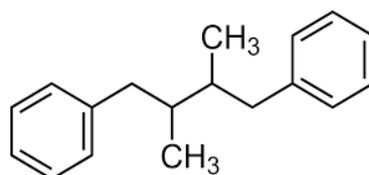


Figure 09: Structure de la lignane (Rahmani et Boulanouar, 2019).

II.4.5.3. les lignines

Les lignines sont des macromolécules tridimensionnelles hydrophobes de haut poids moléculaire, possèdent une classe importante des produits végétaux naturels avec une structure de type (C6-C3)_n, ils sont des polymères de monolignols, il existe au moins trois types de monomères différents : les alcools p-coumarique, sinapique et coniferique (Assad Mogni, 2015).

Partie 1: Etude Bibliographique

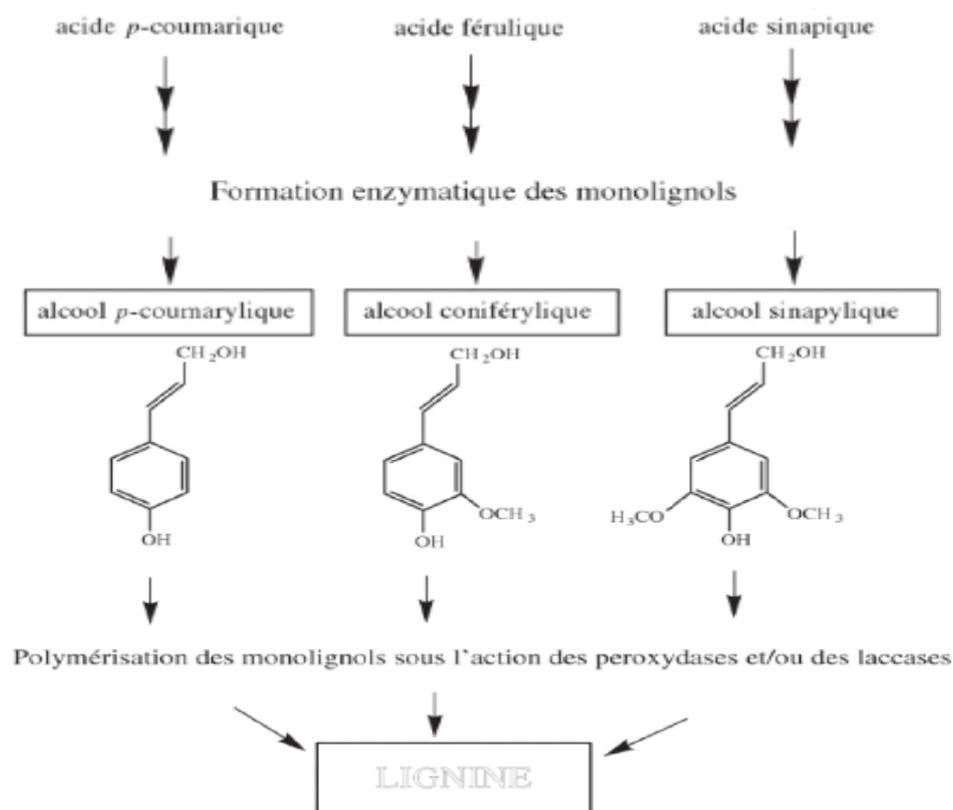


Figure 10 : L'intégration des monolignols dans la lignine (Macheix *et al.*, 2005).

II.4.5.4. Les xanthones

les xanthones sont des composées polyphénolique ayant une structure de base de type C6-C1-C6 (Figure 11), ils sont isolés dans les plantes supérieures (Bruneton, 2009).

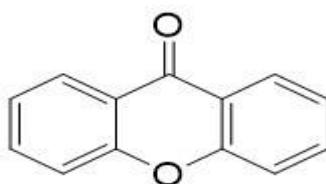


Figure 11: Structure de base de xanthone (Chaouche, 2014).

II.4.5.5. Les quinones

Les quinones sont des substances oxygénés qui participent à l'oxydation des dérivés aromatiques et possédant deux fonctions cétones. Ils sont colorés en rouges, jaunes ou oranges (Kansole, 2009). Ils sont présents dans le règne végétal et animal, en particulier chez les Arthropodes et les Echinodermes, il y a 4 groupes : Benzoquinones (arthropodes),

Naphtoquinones (angiospermes), Quinones isopréniques (photosynthèse et respiration) et Anthraquinones (**Harborne, 1998**).

II.5.Rôle des polyphénols

Chez les plantes

Les polyphénols sont importants pour la physiologie de la plante, ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions :

- La Protection des tissus végétaux contre les rayonnements UV (**Lattanzi *et al.*, 2008**)
- Ils sont responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des pollens pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graines (**Hadi, 2004**).
- Ils donnent l'arôme et le parfum aux plantes.
- Ils facilitent la fertilité de la plante et la germination de pollen (**Petti et Scully, 2009**).
- La protection contre les microorganismes pathogènes et les insectes [(**Balasundram *et al.*, 2006**) ; (**Taylor et Chom, 2006**) ; (**Petti et Scully, 2009**)].
- les flavonoïdes sont responsables de la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits, graines) (**Petti et Scully, 2009**). Ils possèdent aussi une fonction intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes (**Ghedadba *et al.*, 2015**).
- La lignine joue un rôle structural chez les plantes.

Chez l'homme

- Les polyphénols possèdent des capacités de pillage des radicaux libres et donc un pouvoir antioxydant.
- Par leurs pouvoir anti-inflammatoires ils sont impliqués dans la prévention et la réduction du risque de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer (**Lugasi *et al.*, 2003**).
- les polyphénols ayant un effet antimicrobien par l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (**Wu *et al.*, 2013**), et par l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (**Tsuchiya et Linuma, 2000**).
- les flavonoïdes possèdent divers propriétés physiologiques comme les activités hypotenseurs, diurétiques, anti-allergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire, inhibitrices de l'aldolase réductase ce qui les rend sujet de traitement de diabète [(**Chaouche, 2014**) ; (**Belyagoubi, 2011**)].

Partie 1: Etude Bibliographique

- Les tannins protègent contre les toxicités déduites par différents agents (hydrogène peroxyde, extraits du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine.
- Ils jouent un rôle dans la prévention contre la mort cellulaire : apoptose et nécrose et diminuent les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières (**Harrar, 2012**).
- les coumarines possèdent une activité anti-inflammatoire, vasoprotectrices, anti-parasitaires, analgésiques et antioedémateuses (**Tsuchiya et Linuma, 2000**).

Partie 2

Matériels et Méthodes

I. MATERIEL VEGETAL

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'utilisation des pétales de safran pour notre étude parce qu'il y a plusieurs études sur la plante de *Crocus sativus* L.

I.1. Récolte et préparation

La matière végétale utilisée au cours de notre étude, est les pétales de *Crocus sativus* L, une plante locale a été récoltée dans la région d'Ain Fezza, djebel zaafran, Daïra de Tlemcen, Wilaya de Tlemcen en Novembre 2019. Les pétales sont séchés à une température 30°C dans l'étuve pendant 10 minutes, puis moulus en poudre fine par un moulin de laboratoire. la poudre obtenue a été conservée dans des flacons et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.



Figure 12: Les pétales de safran sous forme séchés et broyés.

II. METHODES

II.1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est l'un des travaux les plus anciens, nommée aussi l'extraction par solvant. Cette extraction est largement utilisée pour la purification précoce des produits naturels issus de matières végétales et des micro-organismes. Ces opérations regroupent plusieurs méthodes différentes (macération, décoction, infusion, sonication ...) consistantes toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles.

II. 2. Préparation des extraits

L'extraction des constituants des pétales de *Crocus sativus* a été effectuée selon quatre méthodes : macération, décoction, Infusion, ultrason.

II. 2.1. Macération

La macération est une infusion dans un solvant à froid. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature de matière végétale, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature de solvant et la durée d'extraction (**Ben Amor, 2008**).

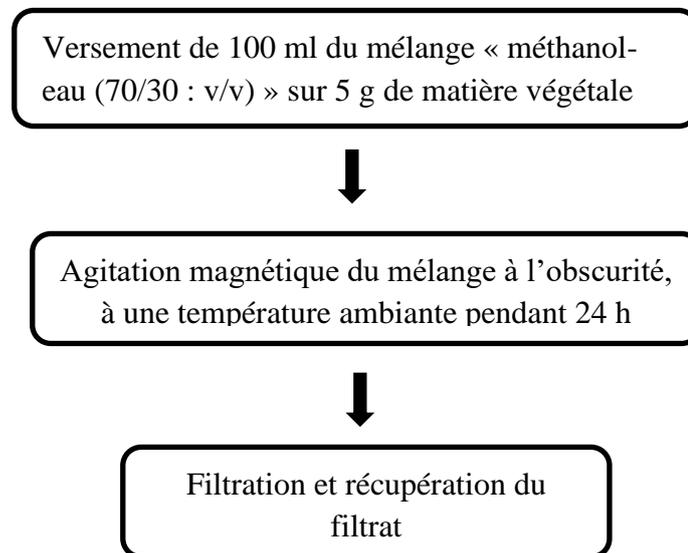


Figure 13: Schéma d'extraction par macération.

II.2.2. Décoction

Elle consiste à faire prolonger la matière végétale dans un solvant bouillant. Elle permet une extraction des principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et indispensable (Leybros et Frémeaux, 1990).

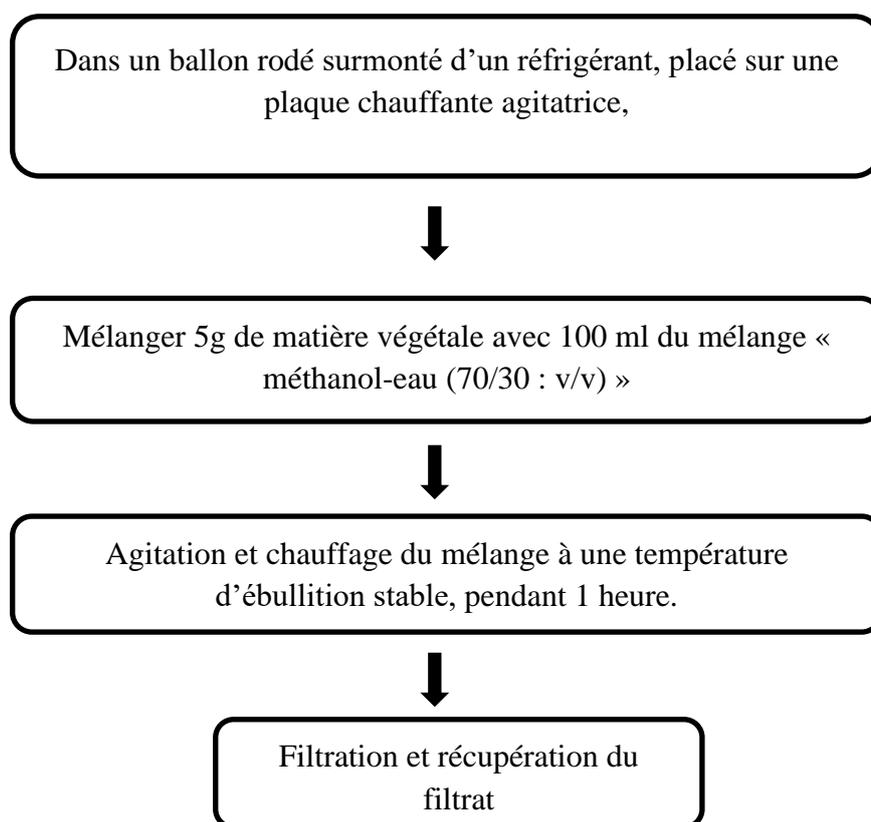


Figure 14: Schéma d'extraction par décoction.

II.2.3. Infusion

L'infusion est une décoction où le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange (**Ben Amor, 2008**)

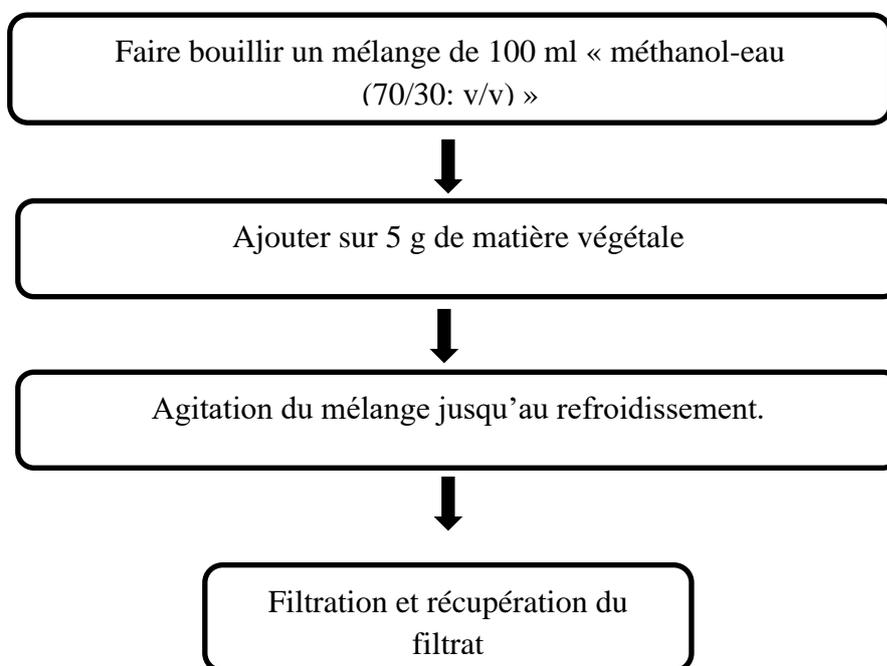


Figure 15: Schéma d'extraction par l'infusion.

II.2.4. Ultrason

Méthode de sonication directe (**Gullian Klanian et Terrats Preciat, 2017**).

Les ondes sonores (20 kHz) génèrent des vibrations mécaniques qui ont la capacité de faire propager la matière végétale dans le solvant « méthanol-eau » c'est une méthode peu coûteuse, simple et efficace (**Ben Amor, 2008**).

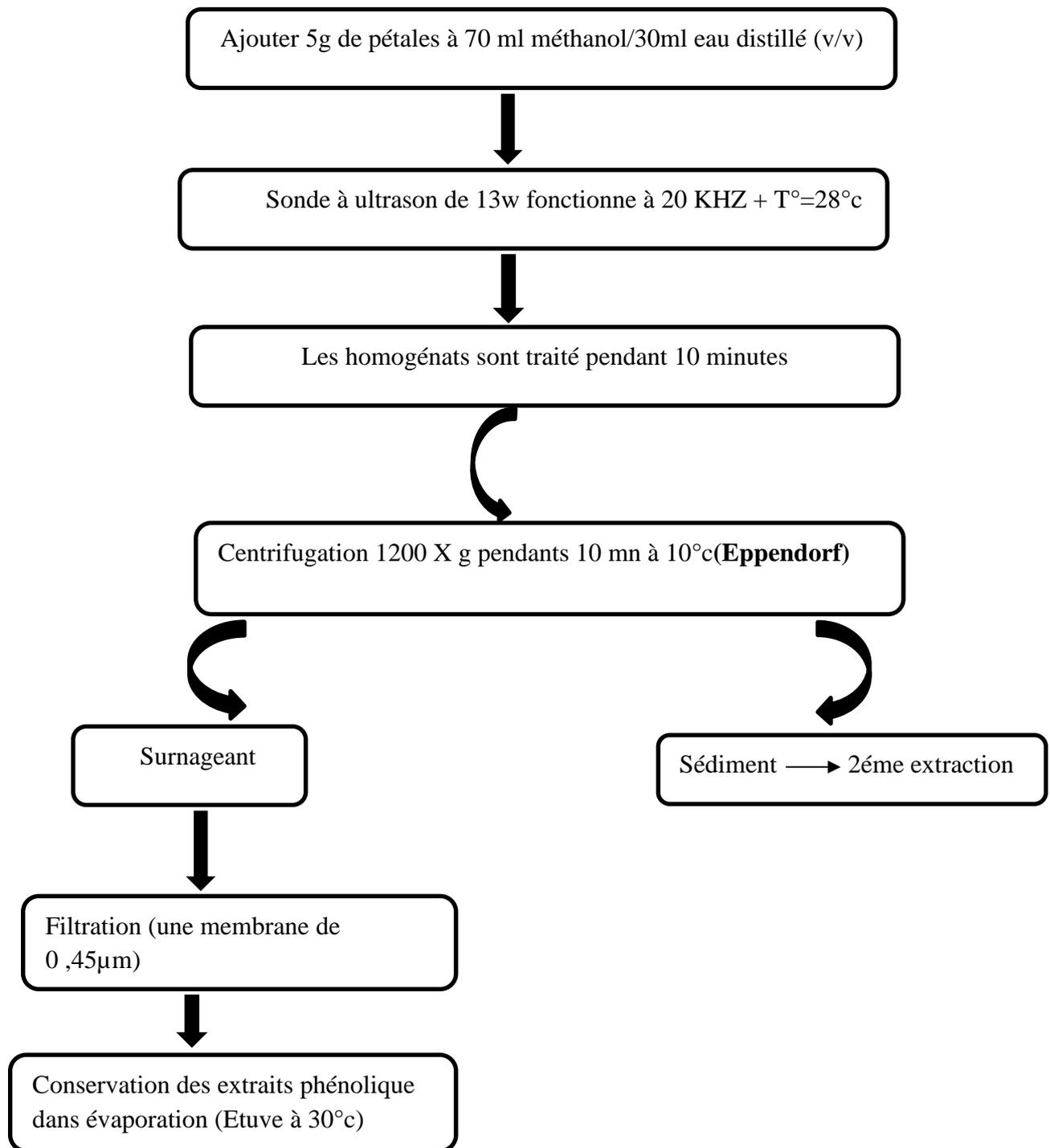


Figure 16: Schéma d'extraction par l'ultrason.



Figure 17 : L'appareil utilisé pour la sonication.

⇒ Les filtrats obtenus par chaque extraction ont été soumis à une évaporation à l'aide d'une étuve à 30°C pendant 48 h, pour faire les dosages suivants.

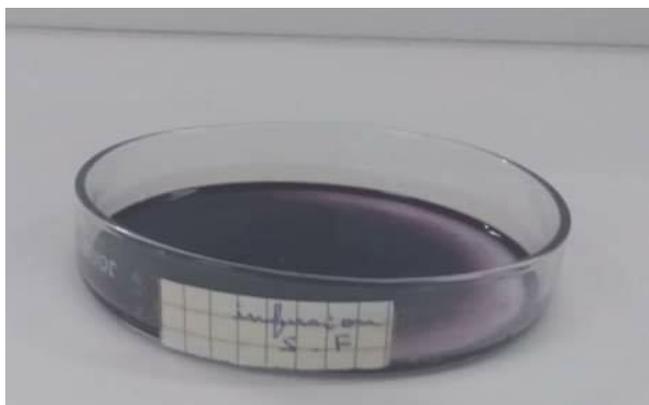


Figure 18: Extraits de pétales de safran après évaporation.

II.3.calcul du rendement des extraits

Le rendement en pourcentage des pétales de *Crocus Sativus* L en extrait sec a été calculé par la formule :

$$R(\%) = (M / M_0) \times 100$$

- R(%) : rendement en pourcentage.
- M : masse en gramme de l'extrait sec résultant

- M0 : masse en gramme du matériel végétal de départ.

II.4. Dosage des polyphénols totaux

II.4.1. Principe

Ce dosage des polyphénols totaux est effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu afin de quantifier les teneurs en polyphénols totaux. Ce réactif utilisé est constitué d'un mélange de complexes de l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de couleur jaune et l'acides phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène [(Ribéreau, 1968) ; (Ortiz *et al.*, 2013)]. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux des composés phénoliques oxydés. Cette coloration est mesurée au spectrophotomètre en utilisant l'acide gallique comme étalon [(Brune *et al.*, 1991) ; (Ghedadba *et al.*, 2015)].

II.4.2. Mode opératoire

Les polyphénols sont dosés par colorimétrie:

Un volume de 500 µl de chaque extrait a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 2500 µl du réactif Folin-Ciocalteu (10 %) et 2000 µl de solution de carbonates de sodium (Na₂CO₃) à 7.5%.

- Le mélange a été bien agité puis incubé à l'obscurité à une température ambiante pendant 1 h.

- L'absorbance de chaque solution est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm contre un blanc.

- Une gamme d'étalonnage qui consiste à lire les absorbances des différentes concentrations d'acide gallique a été préparée comme suit :

- Une solution mère d'acide gallique de concentration 0.3 mg/ml a été préparée.

- A partir de cette solution mère, les dilutions filles suivantes ont été préparées :

0.21 - 0.15 - 0.105 - 0.075 - 0.06 - 0.045 - 0.024 mg/ml.

- 500 µl de chaque dilution fille, ainsi la solution mère, ont été traités en suivant la même procédure décrite ci-dessus pour l'échantillon.

II.5. Test de cytotoxicité des extraits

II.5.1. Principe

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec les extraits méthanoliques des pétales de safran, à différentes concentrations dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GRh.

II.5.2. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)

- La prise de sang a été effectuée au niveau du laboratoire, sur une volontaire de 24 ans, les échantillons sont récupérés dans des tubes héparinisés.
- Centrifugation a 3000 rpm pendant 10 min.
- Le culot des globules rouges est récupéré et lavé avec une solution iso-saline.
- Le volume est mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh).

II.5.3. Mode opératoire

Le protocole suivi est celui de (**Bulmus *et al.*, 2003**).

- Un volume de 1,6 ml de l'extrait méthanolique des pétales de safran et l'acide gallique (molécule de référence de composés phénoliques) est mélangé avec un volume de 0,4 ml de la suspension de GRh (10%).
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min.
- Centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min.
- l'absorbance est mesuré à 560 nm.
- En parallèle, deux contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100 % d'hémolyse).

II.5.3. Expression des résultats

Le pourcentage d'hémolyse est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_t / A_c) * 100$$

Où : A_c = Absorbance du contrôle positif ; A_t = Absorbance du test

Partie 3

Résultats et interprétation

I. CALCUL DU RENDEMENT DES EXTRAITS DE CHAQUE METHODE D'EXTRACTION

La préparation des extraits de la plante étudiée (*Crocus sativus.L*) ont été réalisées en utilisant la méthode de macération, décoction, infusion et ultrason.

Les différents rendements obtenus, sont reportés dans le tableau suivant

	Rendement (%)	Solvant de solubilisation
Macération	52	Eau-méthanol
Décoction	54.2	Eau-méthanol
Infusion	46	Eau-méthanol
Ultrason	58	Eau-méthanol

Tableau 04 : rendement en extrait sec et solvant de solubilité des différentes modes d'extraction.

Nos résultats montrent que l'extraction des pétales de safran par ultra-son donne des rendements plus ou moins importants 58% que ceux de la décoction, macération, et infusion 54.2% ,52.2% ,46% respectivement.

II. DETERMINATION DES POLYPHENOLS TOTAUX

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols sont exprimés en mg équivalent gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait), la courbe d'étalonnage est élaborée par une solution standard de l'acide gallique à des concentrations différentes. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de ($y = 35,656x - 0.0768$) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9964$ (Figure19).

Partie 3: Résultats et interprétation

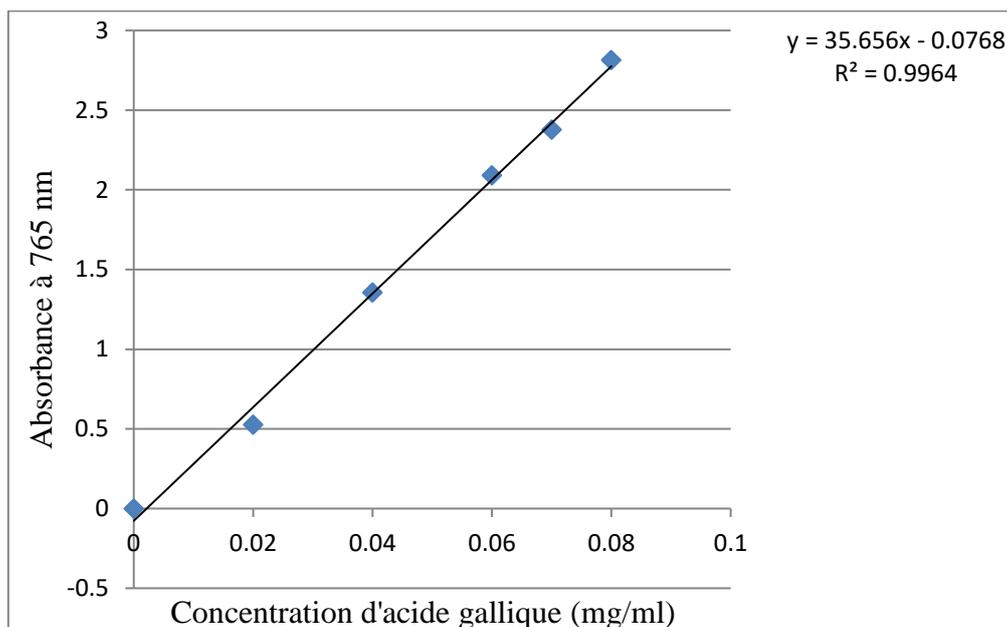


Figure 19 : Courbe étalon de l'acide gallique.

A la lumière de nos résultats, nous avons remarqué que les extraits des pétales préparés par différentes méthodes contiennent des composés phénoliques à des concentrations variables.

Les extraits préparés par ultrason, macération, infusion et décoction présentent des concentrations plus importantes en polyphénols totaux (25.14 μg EAG/mg, 24.7 μg EAG/mg, 24.3 μg EAG/mg, 24 μg EAG/mg respectivement).

La figure 20 montre que l'extrait des pétales par ultrason renferme le taux le plus élevé en polyphénols. Tandis que l'extrait des pétales par décoction présentent une teneur moins faible.

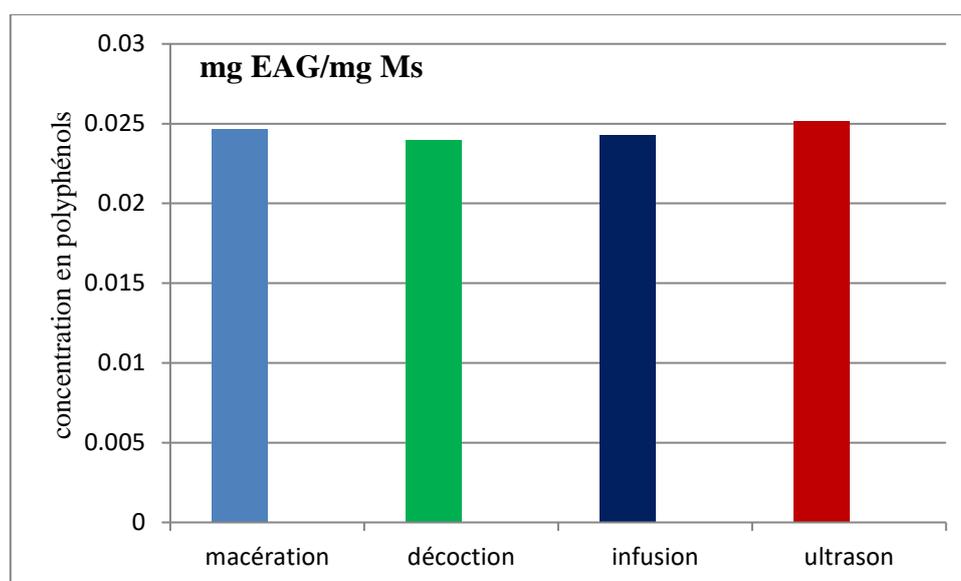


Figure 20 : Teneurs en polyphénols des extraits des pétales de safran.

III. DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DES PETALES

Le test in vitro de cytotoxicité représenté par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges est effectué en utilisant des globules rouges d'un donneur sain en bonne santé.

Différentes concentrations de l'acide gallique qui est un polyphénol de référence, et des extraits méthanoliques des pétales de safran ont été testés. Le pourcentage d'hémolyse est évalué pour chaque extrait en mesurant l'absorbance, en comparaison au contrôle négatif (C-, solution de GR dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 4.6%) et au contrôle positif (C+, solution de GR dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

Les résultats de notre travaille montrent que l'acide gallique en comparaison avec le contrôle négatif (C-, 4.6 %) représente un effet hémolytique faible (33.8%) à la concentration de 500µg/mL. Cet effet hémolytique augmente à un taux de 80 % à la concentration de 1000µg/mL, et atteint un taux maximal et presque stable de 85% et 86% à la concentration 2000µg/mL et 4000 µg/mL.

Les extraits méthanoliques des pétales de safran montrent un taux d'hémolyse des GR à la concentration de 500 µg/mL allant de 10% pour la macération, infusion et ultrason à 11% pour la décoction.

Ce taux augmente avec la concentration de 1000 µg/mL pour atteindre 14% d'hémolyse pour la macération, infusion et ultrason et 13% pour la décoction.

A la concentration de 2000µg/mL, les extraits montrent un taux de 19% d'hémolyse pour la décoction et l'infusion, 18% pour l'ultrason et 17% pour la macération. **(Figure 22).**

Les extraits présentent un effet d'hémolyse des GR à la concentration de 4000 µg/mL de 28% pour décoction et ultrason, 26% infusion et 25% pour la macération 25%.

On comparaison avec l'acide gallique, quel que soit la concentration utilisée pour les extraits méthanoliques les pétales provoquent un taux d'hémolyse moins important que celui provoqué par l'acide gallique **(Figure 21).**

Partie 3: Résultats et interprétation

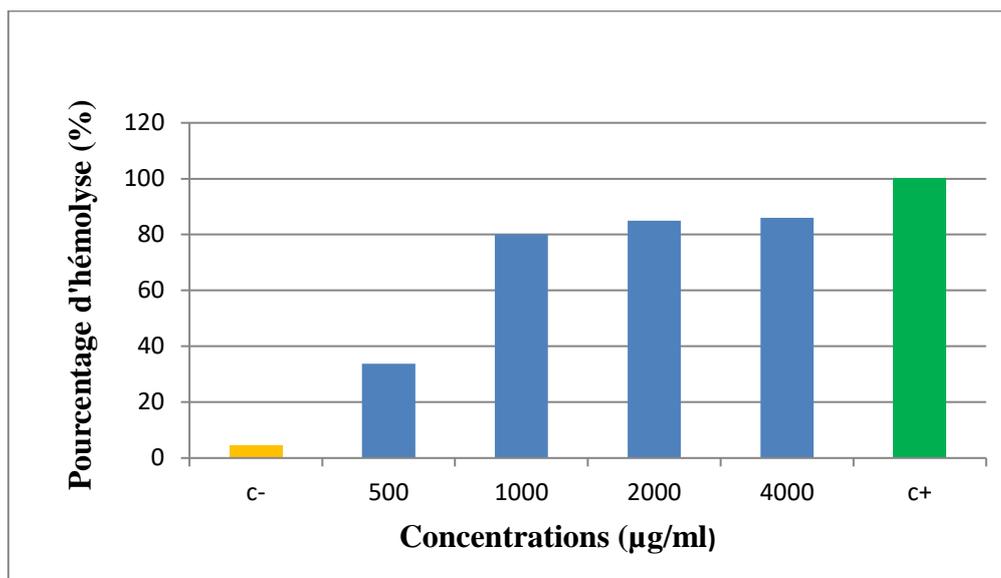


Figure 21 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique C- : 4.6% ; C+ : 100%.

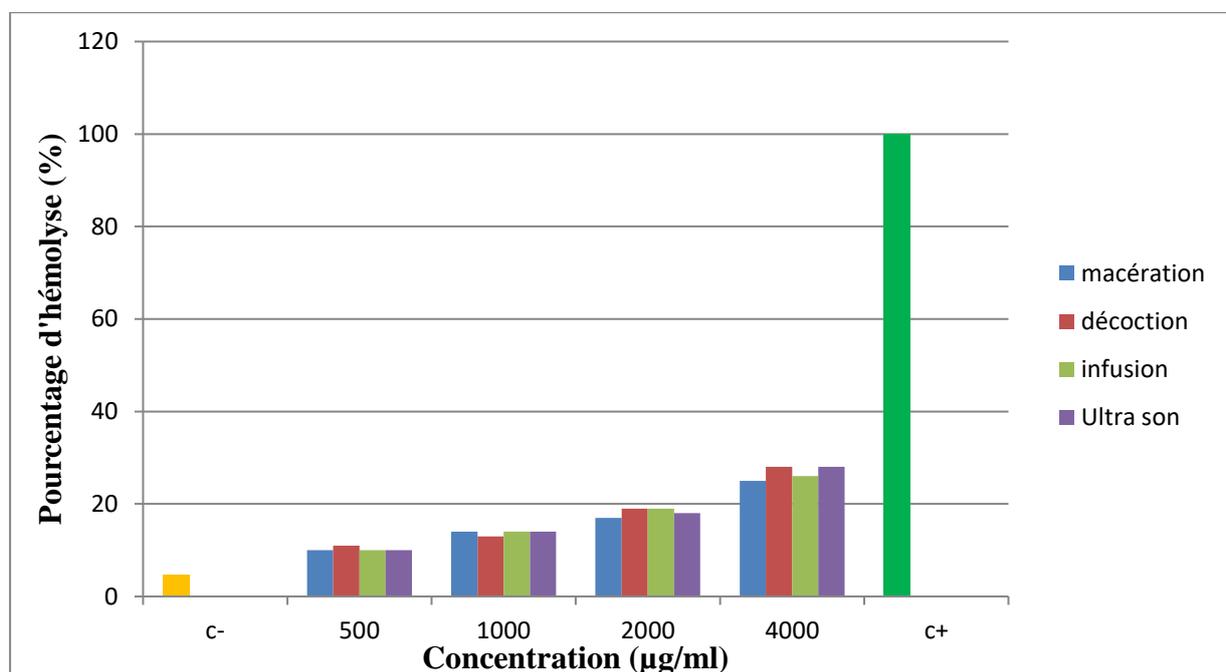


Figure 22 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par les extraits méthanoliques des pétales de safran.

Partie 3: Résultats et interprétation

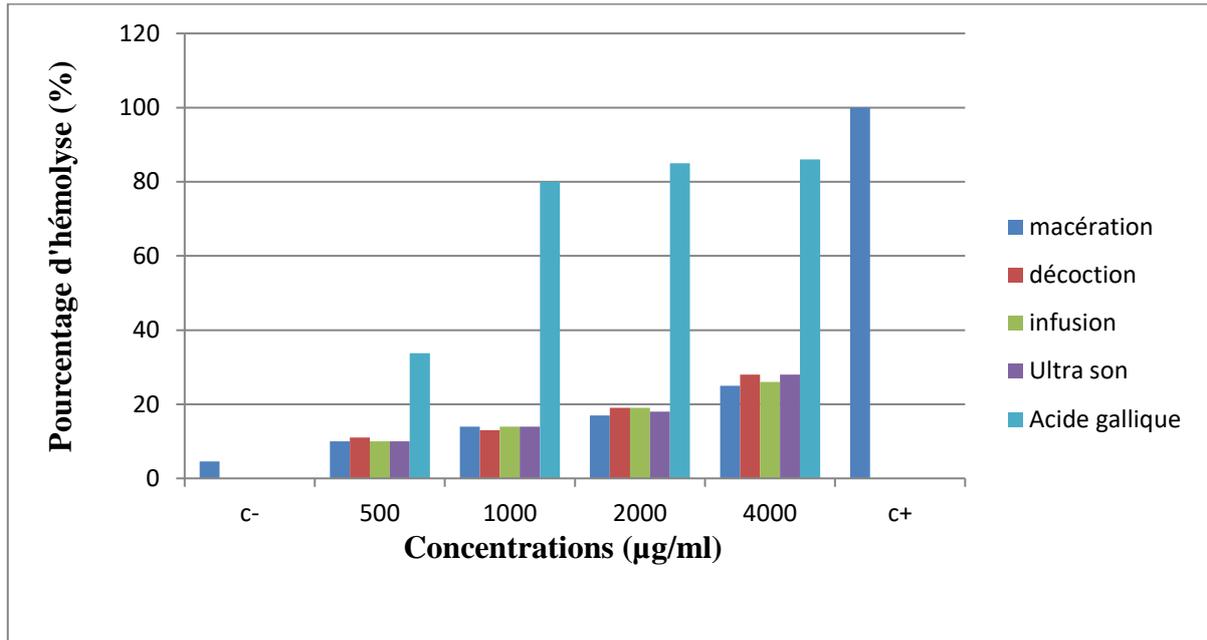


Figure 23 : Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits méthanoliques des pétales de safran.

DISCUSSION

Crocus sativus L. appelé safran, est une plante herbacée vivace et aromatique appartenant à la famille des iridacées, cultivés dans différentes parties du monde, notamment en Iran (**Esmaeili et al., 2011**), utilisé comme colorant et aromatisant dans l'industrie alimentaire, et aussi utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs maladies (**Hosseinzadeh, 2014**) (**Hosseini et al., 2018**). C'est pour cela que nous avons effectué une étude sur les pétales de *Crocus sativus* L. afin de rechercher les constituants actifs, car ils contiennent plusieurs composés tels que les flavonoïdes, glycosides, kaempférol, des composés minéraux, et des anthocyanines. Ils possèdent aussi des propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques.

Notre travail de master porte sur les activités biologiques des extraits méthanoliques des pétales de safran contribuant à la valorisation des déchets et la détermination de la teneur en composés phénoliques totaux des pétales de safran en utilisant le Folin-Ciocalteu réactif. Les méthodes d'extraction des composés phénoliques sont des étapes préliminaires et très importantes dans le processus d'extraction et de dosage des polyphénols totaux. Dans notre travail, nous avons choisi 4 méthodes d'extraction, à savoir la macération, la décoction, l'infusion et les ultrasons.

Le rendement d'extraction par les quatre méthodes montrent que le rendement le plus élevé a été obtenu par les ultrasons (58%), suivi par la décoction (54,2%), la macération (52%) et en dernier l'infusion (46%). Les ultrasons permettent donc d'extraire le plus de métabolites. D'après (**Michel et al., 2012**), le rendement dépend de plusieurs paramètres tels que les propriétés chimiques de la plante étudiée, le solvant utilisé et l'humidité. Il est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie vu la variabilité des paramètres.

De plus, les concentrations en polyphénols sont différentes selon le type d'extraction. La valeur la plus élevée est celle obtenue par les ultrasons suivie par la macération, l'infusion et enfin par la décoction. Ces résultats sont en accord avec d'autres études précédentes (**D'Jadouali et al., 2018 ; Hosseini et al., 2018**).

Nous avons aussi réalisé un test de cytotoxicité pour avoir le niveau de toxicité des polyphénols extraits de notre plante sur la santé de l'humain. Pour cela, nous avons utilisé des globules rouges d'un donneur sain comme modèle biologique. Les globules rouges sont utilisés dans de nombreuses études (**Novaes et al., 2007**). De plus, ils sont très sensibles aux substances chimiques et toute toxicité se manifeste par une cytolyse et hémolyse. L'hémolyse des globules rouges provoque la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes

dans le fluide environnant, ce qui peut être détecté visuellement par l'apparition d'une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma (**Lee et Feldman, 1997**).

L'activité hémolytique des extraits à partir des plantes est liée à leur composition chimique et aussi à leurs concentrations (**Costa-Lotufo et al., 2005**).

La toxicité se manifeste par une cytolysse et hémolyse des globules rouges, et d'après (**Fagerberg et al., 1941**) une destruction augmentée des globules rouges correspond à une augmentation de la teneur du plasma en fibrinogène.

Dans notre travail et en comparaison avec l'acide gallique (polyphénols de référence), quelque soit la concentration utilisée pour les extraits méthanoliques des pétales, il y a un taux d'hémolyse moins important que celui provoqué par l'acide gallique. Il apparait clairement que les pétales de safran ne sont pas toxiques.

(**Bostan et al., 2018**) a montré que les doses thérapeutiques de safran ne présentent pas de toxicité significative dans les études cliniques et expérimentales. En comparaison avec le safran, la crocine, la crocétine et le safranal ont un effet plus toxique sur les indices hématologiques et biochimiques. De plus, ces constituants ont provoqué une certaine malformation embryonnaire dans les modèles animaux et à des doses élevées mais pas à des doses pharmacologiques. Il a été démontré que l'exposition à des niveaux très élevés de safran peut aussi augmenter le taux de fausses couches chez les femelles gravides. De plus cette étude utilisant les comprimés de safran montre que le safran n'a pas fait état d'une toxicité clinique importante chez des volontaires sains.

(**Milajerdi et al., 2015**) ont montré que le safran a une toxicité sélective contre les cellules cancéreuses. Il inhibe sélectivement la prolifération des cellules cancéreuses par l'inhibition de la synthèse de l'ARN et de l'ADN et l'augmentation de l'apoptose, sans exercer d'effet toxique sur les cellules normales.

(**Abdullah et al., 2003**) ont confirmé que le safran a un processus anti-tumoral et anti-cancérogène.

D'après (**Hosseini et al., 2018**) et selon les études toxicologiques, la toxicité du stigmate de *crocus sativus* L est plus importante que celle des pétales. Selon cette étude, les pétales de safran peuvent être utilisés comme médicament alternatif ou complémentaire en médecine.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE :

La production du safran engendre de nombreux sous-produits ou déchets qui sont représentés par les fleurs ou les pétales de safran. Ces déchets peuvent être exploités dans de nombreux domaines médicaux ou cosmétologies à cause de leur richesse en composés phénoliques. Il serait donc mieux de les utiliser grâce à leur valeur importante.

C'est pour cela que notre étude est concentrée sur les pétales de safran. Nous avons utilisé le méthanol comme solvant pour extraire les polyphénols des pétales vu que c'est le meilleur solvant qui donne des rendements élevés en polyphénols.

Nous avons aussi déterminé quantitativement la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits méthanoliques obtenus par macération, décoction, infusion et ultrasons par un dosage en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Ensuite, nous nous sommes intéressées au pourcentage cytotoxique de cette partie de plante. Nous avons donc examiné les effets des quatre extraits méthanoliques sur les globules rouges d'un donneur sain.

Les résultats de ce présent travail démontrent que l'extrait préparé par les ultrasons présente la concentration la plus importante en polyphénols totaux, et que l'extrait préparé par décoction présente la concentration minimale.

Nos résultats ont montré que tous les extraits méthanoliques des pétales de safran ont un effet anti-hémolytique minime comparé à la molécule de composés phénoliques testée qui est l'acide gallique quel que soit la concentration utilisée. La macération est la méthode d'extraction la moins cytotoxique parmi nos extraits.

Notre travail nous a permis de valoriser les pétales de safran et de conclure que ce ne sont pas des déchets et ne doivent pas être jetés. Ils peuvent être soumis à une extraction des polyphénols et utilisés dans différents domaines. En effet, les polyphénols sont des molécules ayant des propriétés pharmacologiques comme les activités anti-inflammatoires et antioxydantes.

CONCLUSION GENERALE

Nos perspectives de recherche sont les suivantes :

- Evaluation des autres activités antioxydante, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antimicrobienne...etc.
- Isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.
- Pouvoir les utiliser dans le domaine médical comme source de prévention et de traitement.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

A

1. Achat, S. (2013). *Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et avec des ions métalliques*. (Thèse de doctorat en science). Université A. MiraBejaia.211p.
2. Alkurd, A., Hamed, T.R., Al-Sayyed, H., (2008). Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan journal of agricultural sciences*, 4, 265 - 274.
3. Ardalan T, Ardalan P, Heravi M. (2012). Kinetic study of free radicals scavenging by saffron petal extracts. *J chem health risks*, 2: 29-36.
4. Asdaq, S. M. B., et Inamdar, M. N. (2009). Potential of crocus sativus (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 358–372. doi:10.1007/s12010-009-8740-7.
5. Asgarpanah, J., Darabi-Mahboub, E., Mahboubi, A., Mehrab, R., Hakemivala, M., (2013). In-vitro evaluation of crocus sativus L. petals and stamens as natural antibacterial agents against food borne bacterial strains. *Iran J pharm*, 9(4):69-82.
6. Assad Mogni, M. (2015). *Fractionnement des complexes lignine-polyphénols polysaccharides issus de différentes biomasses lignocellulosiques par extrusion bi-vis et séparation chromatographique*. (Thèse de doctorat). Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).
7. Astorei, A. R., Eskandari-Torbaghan, M., Abbasi-Ali Kamar, R. (2006). Effect of saffron (crocus sativus L.) petals on germination and primary growth of cotton (gossypiumhirsutum L.). *II Int Symp saffron biol technol*, 739, 87-91.
8. Atlas des semences locales ou acclimatées dans les Oasis de l'Oued Righ. (2010). La culture du Safran dans les Régions Arides (Crocus sativus L). Centre de Recherche scientifique et technique Sur Les Régions Arides Omar El-Barnaoui (C.R.S.T.R.A).

B

9. Balasundam, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99, 191–203.
10. Basti, A. A., Moshiri, E., Noorbala, A. A., Jamshidi, A. H., Abbasi, S. H., Akhondzadeh, S. (2006). Comparaison of petal of Crocus sativus L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 31, 439-442.

Références Bibliographiques

11. Belyagoubi, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. (Thèse de doctorat). Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen.
12. Ben Amor, B. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée dic. (Thèse de doctorat). Université de la Rochelle.
13. Benkhniq O, Zidane L, Fadli M, El yacoubi H, Rochdi A, Douira A. 2010-2011. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechrae Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot Barc*; 53: 191-21.
14. Benmostefa, I., Ghellil, Z. (2017). Dosage des polyphénols de la fleur de crocus sativus L. (Mémoire de Master). Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen.
15. Bostan, H. B., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2017). Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iran j basic med sci*, 20, 110-12 <http://dx.doi.org/10.22038/ijbms.2017.8230>.
16. Bouden, H., Kadri, A. (2019). Contrôle de qualité du café et du safran. (Mémoire de master), Université Blida 1, Algérie).
17. Brune, M., Hallberg, L., et Skanberg, A. B. (1991). Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. *Journal of food science*, 56(1), 128–131. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb07992.
18. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4ème édition. Lavoisier Technique & Documentation. *Médicales internationales*, Paris, p 261, 308,571.
19. Bulmus, V., Woodward, M., Lin, L., Murthy, N., Stayton, P., Hoffman, A. (2003). A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of controlled release*, 93(2), 105-120.

C

20. Chaouche, T. M. (2014). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. (thèse de doctorat). Université Abou-Bakr-Belkaide Tlemcen.
21. Costa-Lotufo L. V., Khan M. T. H., Ather A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., Moraes, M. O. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 99(1): 21-30.

Références Bibliographiques

22. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.

D

23. Dewick, P. M. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. *National product reports*, 11, 579-607.
24. Dewick, P. M. Wiley, J. (2002). Medicinal natural products. a biosynthetic approach. (2nd edition,. Xii + 507 pp). New York.
25. Dupont, C., Guignard. (2007). Abrégé de botanique systématique moléculaire. (14^e édition. Masson Ed, P 108.).

E

26. Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., &Safarian, S. (2011). Determination of some phenolic compounds in crocus sativus L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy magazine*, 7, 74-80. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.75906>.

F

27. Fagerberg, E., Fagerberg, S.E., Fahraeus, R. (1941). La splénomégalie hyperémique, l'hémolyse intensifiée, l'augmentation du fibrinogène et la sédimentation accélérée des globules rouges. *Acta medica scandinavica*. Vol. CVIII, 1-11.
<https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1941.tb18773.x>.

28. Fahim, N. K., Janati, S. F, Feizy, J. (2012). Chemical composition of agriproduct saffron (*Crocus sativus* L.) petals and its considerations as animal feed. *Giad j food*, 3, 197-201.

G

29. Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubiumdeserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13, 118-129.
30. Giorgi, A., Bertoni, D., Manzo, A et Panseri, S. (2015). L'oro Rosso delle Alpi. BiblionEdizioni. Manuel technique-scientifique de production de papier peint.
31. Gismondi, A., Serio, M., Canuti, L., Canini, A. (2012). Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of italian saffron (*Crocus sativus* L.). *American journal of plant sciences*, 3(11), 1573-1580. doi: 10.4236/ajps.2012.311190.

Références Bibliographiques

32. Goupy, P., Vian, M.A., Chemat, F., Caris-Veyrat, C. (2013). Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra-performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial crops and products*, 44, 496–510. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.004.
33. Gravot, A. (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. *Equipe pédagogique physiologie végétale*, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
34. Gregory, M. J., Menary, R. C., Davies, N. W. (2005). Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 5969–5975.
35. Guide de l'investisseur. (2003). Office régional de mise en valeur agricole d'ouarzazate. *Document*.
36. Gullian, K. M. et Terrats, P. M. (2017). Optimization of the Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from brosimumalicastrum leaves and the evaluation of their radical-scavenging activity. *Molecules*, 22(1286), 1-13.
37. Gutheil, W. G., Reed, G., Ray, A., Anant, S., Dhar, A. (2012). Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr pharm biotechnol*. 13(1), 173-9.

H

38. Hadi, M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. (Thèse doctorat. Option Pharmacochimie). Université Louis Pasteur, Strasbourg.
39. Hadizadeh, F., Khalili, N., Hosseinzadeh, H, Khair-Aldine, R. (2003). Kaempferol from saffron petals. *Iran j pharm res*; 2, 251-252.
40. Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International journal of molecular sciences*, 8(9), 950-988.
41. Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis*. (Third Edition).
42. Harrar, A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. (Mémoire de magister). Université Ferhat-Abbas-Sétif.
43. Hornok, L. (1992). Cultivation and processing of medicinal plants. Budapest : Akademiai kiado. (93-105).

Références Bibliographiques

44. Hosseini, A., Razavi, B. M, Hosseinzadeh, H. (2018). Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a review. *Iran j basic med sci*, 21, 1091-1099. doi: 10.22038/IJBMS.2018.31243.7529.
45. Hossein Goli, S. A., Mokhtari, F., et Rahimmalek, M. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of agricultural science*, 4(10), 175-181. doi:10.5539/jas.v4n10p175.
46. Hosseinzadeh, H. (2014). Saffron: A herbal medicine of third millennium. *Jundishapur j nat pharm prod*, 9(1), 1-2. doi : 10.17795/jjnpp-16700.
47. Hosseinzadeh, H., Motamedshariaty, V., Hadizadeh, F. (2007.) Antidepressant effect of kaempferol, a constituent of saffron (*Crocus sativus*) petal, in mice and rats. *Pharmacologyonline*, 2:367-370.
48. Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M. (2013). Avicenna's (IbnSina) the canon of medicine and saffron (*Crocus sativus*): a review. *Phytother res*, 27(4), 475-483. doi : 10.1002/ptr.4784.
49. Hosseinzadeh, H., Younesi, H. M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2(7), 1-80. doi:10.1186/1471-2210-2-7.
50. Hu, Y., Lu-Ping, Q., Qiao-Yan, Z., Rahman, K., Ting-Han, H., Zhu, Y. (2008). Comparative study of composition of essential oil from stigmas and of extract from corms of *Crocus sativus*. *Chemistry of natural compounds*, 44 (5), 666-667.

J

51. Jadouali, S. M., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., Elmoslih, A., Laknifli, A., Mamouni, R. (2018). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 9(1), 113-118.

K

52. Kansole MMR. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucosmartnicansis* (Jacquin) R. brown, *hoslundia opposstavahl* et *orthosiphon pallidus* royle ex benth. (Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées), Burkina Faso.
53. Karimi, G., Tabibi, N., Hosseinzadeh, H., Shirzad, F. (2004). Sub-acute toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma and petal in rats. *J med plants*, 12, 32-39.

Références Bibliographiques

54. Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Kakhki, A. H., Sarfarazi, M. (2015). Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology. *Food analytical methods*, 9(7), 1993–2001. doi:10.1007/s12161-015-0375-4
55. Kundu, J. K., Surh, Y., (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2), 243– 261.

L

56. Lahsissene, H., A. Kahouadji, et Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, Revue de Botanique, .Acta botanica barcinonensia*, 53. 191-216.
57. Lattanzio, V., Kroom, P. A., Quideau, S., Treutter, D. (2008). Plant phenolics secondary metabolites with diverse functions. In: *Recent advances in polyphenol research*, (volume 1, Ed. Wiley Blackwell).
58. La zerat, V. (2009). *Secrets de bafranier*. (Lucien souny Ed, (p :125)). Saint .Paul .
59. Lee, M., Feldman, M. (1997). The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut*. 41(4) : 425-426.
60. Leybros, J. et Frémeaux, P. (1990). *Extraction solide-liquide aspects théoriques. Technique de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06*.
61. Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D. (2002). Crocus sativus-biological active constituents. *Stud. nat. prod. chem*, 16, 293–312.
62. Li, C. Y., Lee, E. J., et Wu, T. S. (2004). Antityrosinase Principles and Constituents of the Petals of *Crocussativus*. *Journal of natural products*, 67(3), 437–440. doi:10.1021/np0302854.
63. Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. *clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634-640.
64. Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., Biró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4), 119-125.

M

65. Maarouf, A. (2000). *Dictionnaire de botanique : les Phanérogames* (Edité par Dunod., p :129).Paris.

Références Bibliographiques

66. Macheix, J. J., Fleuriet, A., et Christian, A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique (192). Lausanne. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (PPUR).
67. Melnyk, J. P., Wang, S., Marcon, M. F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food research international*, 43, 1981-1989.
68. Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë ramnoides*). (Thèse Docteur de l'université d'Orléans). Université D'ORLÉANS. 286p.
69. Michel, T., Destandau, E., Le Floch, G., Lucchesi M. E., El fakira, C., (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë ramnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food chemistry*, 131(3): 754760.
70. Milajerdi, A., Djafarian, K., et Hosseini, B. (2016). The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *Journal of nutrition & intermediary metabolism*, 3, 23–32. doi:10.1016/j.jnim.2015.12.332.

N

71. Novaes, M. R. C. G., Novaes, L. C. G., Melo, A. L., Recôvan, V. L. (2007). Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun. Ciên saúde*. 18(3) :1227-1236.

O

72. Omidi, A., Riahinia, N., Montazer Torbati, M. B., & Behdani, M. A. (2015). Evaluation of protective effect of hydroalcoholic extract of saffron petals in prevention of acetaminophen-induced renal damages in rats. *Veterinary science development*, 5(1). doi:10.4081/vsd.2015.5821.
73. Ortiz, J., Marín Arroyo, M. R., Noriega Domínguez, M. J., Navarro, M., Arozarena I., Color, 2013. Phenolics and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). Blue berry (*Vaccinium floribundum* Kunth) and apple wines from Ecuador. *J food sci*. 78(7): C985-93.
74. Ould kaddour, A. S. (2019). Etude de l'effet antifongique des extraits polyphénoliques de l'*Atriplex halimus* L., sur la croissance de certains champignons dermatophytes. (thèse de doctorat). Université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem.

P

Références Bibliographiques

75. Palomares, C. (2015). Le safran, précieuse épice ou précieux médicament ?. (Thèse de doctorat). Université De Lorraine. France.
76. Pandey, K. b. et Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxydative médecine and cellular longevity*, 2(5), 270 – 278.
77. Petti, S., Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease, A review. *Journal of Dentistry*, 37, 413-423.
78. Pitsikas, N. (2016). Constituents of Saffron (*Crocus sativus* L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia. *Molecules*, 21,303, 1-11, doi : 10.3390.
79. Premkumar, K., Ramesh, A. (2010). Anticancer, Antimutagenic and Antioxidant Potential of Saffron: An Overview of Current Awareness and Future Perspectives. *Functional plant science and biotechnology* 4 (Special Issue 2), 91-97 Global science book. ISSN 1749-0472.
80. Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kahkonen, M., Heinonen, M., Maatta-Riihinen, K., et Oksman-Caldentey, K.-M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 991–1000. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x

R

81. Rahimi, M. (2015). Chemical and Medicinal Properties of Saffron. *Bulletin of environment, pharmacology and life sciences*, 4(3), 69-81.
82. Rahmani, F. Z., (2019). Etude de l'activité antioxydante de l'ail. (Mémoire de master), Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana.
83. Rahmouni, S., Reghis, S. (2016). Etude phytochimique et évaluations des activités anti-oxydantes et antibactériennes des espèces : *Lavandulasteochas*, *Glycyrrhizzaglabra* L., *Crocus sativus* L. et *Linumusitassimum* L. (Mémoire de Master). Université des Frères Mentouri Constantine.
84. Ribereau, G. P, (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.
85. Rira, M. (2006). Effet des Polyphénols et des Tanins sur l'Activité Métabolique du Microbiote Ruminal d'Ovins. (Mémoire de Master), Université Mentouri Constantine, Constantine.

S

86. Sahli, R. (2018). Etude phytochimique de quelques plantes extremophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques. (Thèse de doctorat). Université de Carthage.
87. Saxena, M., Saxena, J., Pradhan, A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. pharm. Sci. Rev. Res*, 16(2), 130-134.
88. Schmidt, M., Betti, G., et Hensel, A. (2007). Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wiener medizinische wochenschrift*, 157(13-14), 315–319. doi:10.1007/s10354-007-0428-4.
89. Shahidi, F., et Naczki, M. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC press.
90. Singleton, B. K., Libretto, S. E., Sibley, P. R., Mifsud, C. V. J., et Andrews, C. M. (1994). An in vitro haemolysis test as an alternative to the draize test for ocular irritation. *Comp haematol int.* 4, 49-54. <https://doi.org/10.1007/BF00368267>
91. Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R. K., Dharamveer, S., Saraf, A. (2010). *Crocus sativus* L. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 200-208.
92. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J sep sci*; 30: 3268-3295.
93. Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., et Zhang, Y. (2011) Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food chem toxicol*, 49(10), 2689-2696

T

94. Taloubi, L., Rhouda, H., Belahcen, A., Smires, N., Thimou, A., Mdaghri, A. A. (2013). An overview of plants causing teratogenicity: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Int j pharm sci res.* 514-516.
95. Taylor, F. A., Chom, M. A. 2006. Phenolics in Foods. *The journal of NAET energetics and complementary medicine*, 2(4), 565-568.
96. Termentzi, A., et Kokkalou, E. (2008). LC-DAD-MS (ESI+) Analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. *PlantaMedica*, 74(5), 573-581. doi:10.1055/s-2008-1074498.
97. Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F., Gil, M. L. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Ataur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry, Vol (23)*, p747.

Références Bibliographiques

98. Tsuchiya, H. Linuma, M., (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophoraexiqua*. *Phytomedicine*, 7, 161-165.

W

99. Wu, M., Hu, Y., Ali, Z., Khan, I. A., Verlangeiri, A. J., et Dasmahapatra, A. K. (2010). Teratogenic effects of blue cohosh (*Caulophyllumthalictrioides*) in Japanese Medaka (*Oryziaslatipes*) are probably mediated through GATA2/EDN1 signaling pathway. *Chemical research in toxicology*, 23(8), 1405–1416. doi:10.1021/tx100205a
100. Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., Xu, X. (2013). Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric food chem*, 6, 8185-8190.

Z

101. Zarez,. Adeg, M., Vazifeshenas-Darmiya, K., Afshar, M., Valavi, M., Serki, E., Hosseini, M. (2017). Effects of extract of *Crocus sativus* petal on renal function in diabetic rats. *J mazandaran univ med*, 27:11-24.
102. Zeka, K., Ruparelia, K. C., Continenza, M. A., Stagos, D., Vegliò, F., Arroo, R. R. J. (2015). Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia*, 107, 128–134. doi:10.1016/j.fitote.2015.05.014.
103. Zhang, Z., Wang, C. Z., Wen, X. D., Shoyam, Y., Yuan, C. S. (2013). Role of saffron and its constituents on cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Biology*, 51(7), 920–924. doi: 10.3109/13880209.2013.771190.

RESUME

Le safran est une plante médicinale tiré de la fleur de *Crocus sativus*. L, et représente la plus précieuse épice désignée par l'appellation « or rouge », la plus chère au monde.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des pétales de la plante *Crocus sativus*.L qui sont considérés comme des déchets et presque totalement négligés sur le plan commercial. Ils sont les principaux sous-produits de la transformation du safran récolté de la région d'Ain Fezza Willaya de Tlemcen. Nous avons réalisé quatre méthodes d'extraction (ultrasons, décoction, macération, infusion) pour obtenir des extraits méthanoliques qui présentent des rendements d'extraction important 58%, 54,2%, 52%, 46% respectivement. Concernant le dosage des polyphénols totaux des pétales de safran, les résultats démontrent que l'extrait préparé par ultrasons, présente une concentration plus importante que celui préparé par décoction qui présente une concentration minimale. Les résultats obtenus par le test de cytotoxicité montrent que les pétales de safran ne sont pas toxiques sur les globules rouges et présentent des faibles taux d'hémolyse moins importants par rapport à l'acide gallique de référence.

Mots clés : Pétales *Crocus sativus*.L, polyphénols, extraction, Acide gallique.

ABSTRACT

Saffron is a medicinal plant derived from the flower of *Crocus sativus*. L, and represents the most precious spice known as "red gold", the most expensive in the world.

In this work, we are interested in the study of the petals of the plant *Crocus sativus*. L which are considered as waste and almost totally neglected commercially. They are the main byproducts of the processing of saffron harvested from the Ain Fezza Willaya region of Tlemcen. We have carried out four extraction methods (ultrasound, decoction, maceration, infusion) to obtain methanolic extracts which have significant extraction yields 58%, 54.2%, 52%, 46% respectively. Regarding the determination of total polyphenols in saffron petals, the results demonstrate that the extract prepared by ultrasound has a higher concentration than that prepared by decoction which has a minimum concentration. The results obtained by the cytotoxicity test show that the saffron petals are not toxic on red blood cells and have lower rates of hemolysis which are less significant when added to the reference gallic acid.

Keywords: Petals *Crocus sativus*.L, polyphenols, extraction, Gallic acid.

المخلص

الزعفران هو من النباتات الطبية مشتق من زهرة *Crocus sativus* L و يمثل أعلى نوع من التوابل في العالم لذلك سمي بالذهب الأحمر.

في هذا العمل نحن مهتمون بدراسة بتلات نبات *Crocus sativus* L التي تعتبر كفايات وتقريبا مهمة كليا على الصعيد التجاري. بتلات الزعفران هي من المنتجات الثانوية الرئيسية لتحول الزعفران الذي تم حصده من منطقة عين فزة من ولاية تلمسان. لقد قمنا بتنفيذ أربع طرق لاستخلاص البوليفينول (الموجات فوق الصوتية، الاستخلاص بالغلّي، النقع البارد، النقع الساخن) للحصول على مستخلصات ميثانولية ذات انتاجية استخراج عالية (58%، 54.2%، 52%، 46%) على التوالي. في ما يتعلق بجرعة البوليفينول الكلي في بتلات الزعفران أظهرت النتائج أن المستخلص المحضر بالموجات فوق الصوتية يحتوي على تركيز أعلى من ذلك المحضر بواسطة الاستخلاص بالغلّي الذي يحتوي على الحد الأدنى من التركيز. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من اختبار السمية الخلوية ان بتلات الزعفران ليست سامة على خلايا الدم الحمراء و لديها معدلات انحلال دم منخفضة و أقل أهمية مقارنة بنتائج حمض الجاليك المرجعي .

الكلمات المفتاحية : بتلات *Crocus sativus* L; بوليفينول; استخلاص; حمض الجاليك.