



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID-TLEMEN



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LAVIE, DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire des Produits Naturels

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Nutrition et Pathologie

Thème

Contribution à la valorisation du safran de la région de Tlemcen: Etude phytochimique et activités biologiques des extraits des stigmates et des fleurs

Présenté par : Melle KHATER Dounia

Melle MEKKI Fatima Zohra

Soutenu le : 26/ 09 / 2020

Devant le jury suivant:

Présidente : Mme ATIK-BEKKARA F.

Examineur : Mr. BELYAGOUBI L.

Encadreur : Mme BELYAGOUBI-BENHAMMOU N.

Année Universitaire : 2019/2020.

Remerciement

Nous remercions le Dieu le tout puissant pour nous avoir donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur **Mme BELYAGOUBI BENHAMMOU Nabila**, Professeur à l'Université de Tlemcen, qui a guidé judicieusement nos recherches. Nous gardons en mémoire ses qualités d'encadreur et ses conseils bienveillants. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude.

Nous vous remercions pour nous avoir donné la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiantes, d'être rigoureuse et enthousiaste.

Nous adressons nos vifs remerciements à **Mme. ATIK-BEKKARA Fawzia**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions profondément **Mr. BELYAGOUBI Larbi**, Maître de Conférences Classe A, à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, membre de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Au demeurant, exprimez ici tous nos profondes gratitudes à toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin et directement ou indirectement durant cette belle aventure.

Enfin, nous tenons à remercier vivement tous les enseignants de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de la Terre et de l'Univers qui ont contribué à notre formation.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : A mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Ma mère **SALIMA** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutiens tous ces sacrifice consentis ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père **TOUFIK**. Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

A mes très chères sœurs **RANIA** et **MALAK** et mon petit frère **ILYES** ; les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A toute ma famille et ma deuxième famille « Mes amies » qui m'ont apporté la force, la joie, le bonheur, ils m'ont toujours comblé avec leurs présences, et Amour.

«**FATIMA, BESMA, NIHEL, AMIRA, SOUADE, MERIEM, NAWAL**» je vous aime énormément.

A tous mes enseignants surtout mon encadreur Mme **BELYAGOUBI-BENHAMMOU. N** qui m'a dirigé dans ce labeur.

K. DOUNIA

Dédicace

Du fond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers. A la mémoire de mon père décédé trop tôt.

A l'homme de ma vie, à mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour voir ma réussite, celui que je souhaiterais être présent aujourd'hui.

A toi mon père feu « **MEKKI Chaib** » que Dieu te garde dans son vaste paradis.

A ma chère mère « **Salima** » Pour son amour, ses sacrifices, sa tendresse.

A mes chers frères

Hicham et **Aboubakr**, merci énormément pour votre soutien plus que précieux, ma vie ne serait pas aussi magique sans votre présence et votre amour.

A ma sœur **Malika** et son mari **Mourad** et ma belle sœur **Zeyneb** et ces enfants **Charf Eddine; Nazime; Nihel et Ferial**. Votre grand cœur et toutes vos qualités qui seraient trop longues à énumérer je vous aime.

Enfin à toute ma famille et à tous, les gens qui m'ont aidé dans ma vie surtout mes chers amies **Dounia; Besma; Bouchra, Nihel, Mounia; Hannane**.

Je vous aime énormément.

A tous mes enseignants surtout mon encadreur Mme **BELYAGOUBI-BENHAMMOU. N** qui m'a dirigé dans ce labeur.

M. FATIMA ZOHRÀ

ملخص

الزعفران "*Crocus sativus*" هونبات من عائلة Iridaceae، وقد عُرِفَت فوائده العلاجية منذ العصور القديمة، ويستخدم في الطب التقليدي وفي العديد من مستحضرات الطهي بفضل ثرائه في الجزيئات النشطة بيولوجيًا. يتمثل عملنا في تقييم هذا النبات، وخاصة الزهور التي تعتبر من مخلفات إنتاج الزعفران تم تحديد كمية محتويات الفينولات الكلية، الفلافونويد، الفلافونول، الأنثوسيانين والعفص المتحلل بالماء والمكثف وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والميكروبات للمستخلصات المائية الميثانولية للوصمات والأزهار. يتم تقييم دراسة القوة المضادة للأكسدة من خلال أربع طرق: القدرة الكلية المضادة للأكسدة (CAT)، ونيش الجذور الحرة (DPPH)، وتقليل الحديد، وتثبيط تبيض البيتاكاروتين. ووفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها، أظهر التقدير الكمي لهذه المركبات أن مستخلص الوصمات غني بالفينولات والفلافونولات الكلية، بينما مستخلص الأزهار غني بالعفص المتحلل والمكثف والأنثوسيانين. أظهر المستخلصان خصائص مختلفة من مضادات الأكسدة التي يحتفظ مستخلص الأزهار منها بالمحتوى العالي من إجمالي القدرة المضادة للأكسدة (3.860 ± 69.792 مغ EAA / غ DM) وهو أكثر نشاطاً في تثبيط تبيض β -كاروتين (مغ / مل $EC_{50} = 0.028 \pm 0.005$). فيما يتعلق بالقوة المضادة للميكروبات، يحتوي كلا المستخلصين على عوامل مثبطة للجراثيم ضد سلالات جرام + وهي العصوية الرقيقة، ميكروكوكس لوتس و بكتيريا سيريوس العصويه. لذلك، تعتبر أزهار الزعفران مصدرًا طبيعيًا للأيضات الثانوية التي لها أنشطة بيولوجية والتي لا يزال يتعين استغلالها.

الكلمات المفتاحية: *Crocus sativus* ، مستقلب ثانوي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات

Résumé

Le safran « *Crocus sativus* » est une plante de la famille des iridacées. Ses vertus thérapeutiques sont connues depuis l'antiquité, il est utilisé en médecine traditionnelle et dans les différentes préparations culinaires grâce à sa richesse en molécules bioactives.

Notre travail consiste à valoriser cette plante plus particulièrement les fleurs qui sont considérées comme des déchets de la production du safran. La quantification des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols, en anthocyanes et en tanins hydrolysables et condensés et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques des stigmates et des fleurs ont été déterminées. L'étude du pouvoir antioxydant est évaluée par quatre méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre (DPPH), la réduction du fer et l'inhibition du blanchiment du β -carotène.

Selon les résultats obtenus, l'estimation quantitative de ces composés a montré que l'extrait des stigmates est riche en phénols totaux et en flavonols, alors que l'extrait des fleurs est riche en tanins hydrolysables, condensés et en anthocyanes.

Les deux extraits ont montré des propriétés antioxydantes différentes dont l'extrait des fleurs détient la forte teneur de la capacité antioxydante totale (69.792 ± 3.860 mg EAA/g MS) et il est plus actif à inhiber le blanchiment du β -carotène ($EC_{50}=0.028\pm 0.005$ mg/ml). A propos du pouvoir antimicrobien, les deux extraits contiennent des agents inhibiteurs et bactéricides contre les souches Gram + à savoir *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

Donc, les fleurs du safran constituent une source naturelle en métabolites secondaires qui détiennent les activités biologiques et qui restent d'être exploiter.

Mots clés : *Crocus sativus*, métabolite secondaire, activité antioxydante, activité antimicrobienne

Abstract

Saffron "*Crocus sativus*" is a plant of the Iridaceae family. Its therapeutic virtues have been known since antiquity, it is used in traditional medicine and in various culinary preparations thanks to its richness in bioactive molecules.

Our work consists in enhancing this plant, more particularly the flowers which are considered to be deeds of saffron production. The quantification of the contents of total phenols, flavonoids, flavonols, anthocyanins and hydrolyzable and condensed tannins and the evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of the hydro-methanolic extracts of the stigmas and flowers were determined. The study of antioxidant power is evaluated by four methods: total antioxidant capacity (CAT), free radical scavenging (DPPH), iron reduction and inhibition of β -carotene bleaching.

According to the results obtained, the quantitative estimation of these compounds showed that the extract of the stigmas is rich in total phenols and flavonols, while the extract of the flowers is rich in hydrolyzable and condensed tannins and in anthocyanins.

The two extracts showed different antioxidant properties of which the extract of the flowers holds the high content of the total antioxidant capacity ($69,792 \pm 3,860$ mg EAA / g DM) and it is more active in inhibiting the bleaching of β -carotene ($EC_{50} = 0.028 \pm 0.005$ mg / ml). Regarding the antimicrobial power, both extracts contain inhibitory and bactericidal agents against Gram + strains namely *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*.

Therefore, saffron flowers are a natural source of secondary metabolites which hold biological activities and which remain to be exploited.

Key words: *Crocus sativus*, secondary metabolite, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....	1
Matériels et méthodes	5
1-Echantillons.....	5
2-Préparation des extraits bruts de <i>C. sativus</i>	5
I-Dosages phytochimiques.....	5
I.1. Dosages des phénols totaux	5
I.2. Dosage des flavonoïdes.....	6
I.3. Dosage des flavonols.....	6
I.4. Dosage des tanins condensés.....	7
I.5. Dosage des tanins hydrolysables.....	7
I.6. Dosages des anthocyanes.....	7
II-Etude de l'activité antioxydante.....	8
II.1. Capacité antioxydante totale (CAT).....	8
II.2. Test du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	8
II.3. Réduction de fer.....	9
II.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène	9
III-Etude de l'activité antimicrobienne.....	10
III.1. Préparation du matériel biologique.....	10
III.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>C. sativus</i>	12
a. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques).....	12
b. Méthode de microdilution en milieu liquide (Détermination des concentrations CMI et CMB).....	12
Résultats et discussion.....	17
Conclusion	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

BHA : Hydroxyanisole butylé.

CAT : Capacité antioxydante totale.

CMI : Concentrations minimales inhibitrices.

CMB : Concentrations minimales bactéricides.

DPPH : Diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAG : équivalents d'acide gallique.

EC : équivalents de catéchine.

EQ : équivalents de quercétine.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différentes souches utilisées dans l'étude du pouvoir antimicrobien.....	11
Tableau 2 : Concentration des extraits bruts des stigmates et des fleurs dans les puis	15
Tableau 3 : Rendement en extraits des fleurs et des stigmates du safran.....	17
Tableau 4 : Teneurs de la capacité antioxydante totale et les concentrations EC ₅₀ des tests du DPPH, de la réduction du fer et de β -carotène des fleurs et des stigmates du safran.....	22
Tableau 5 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits bruts des stigmates et des fleurs de <i>C.sativus</i>	24
Tableau 6 : CMI et CMB des extraits bruts des stigmates et des fleurs du safran sur les microorganismes testés.....	25

Liste des figures

Figure 1 : Fleur du <i>Crocus sativus</i> : 1: pétales 2: stigmates 3: étamines 4:bulbe.....	2
Figure 2 : La plante de <i>Crocus sativus</i> . (A) : Les fleurs (B) : Les stigmates.....	5
Figure 3 : Plaque 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.....	14
Figure 4 : Teneurs en phénols totaux (mg EAG/g MS) au niveau de stigmates et fleurs... ..	17
Figure 5 : Teneurs en anthocyanes ($\mu\text{mol/g}$) au niveau de stigmates et fleurs.....	18
Figure 6 : Teneurs en flavonoïdes (mg EC/g MS) au niveau de stigmates et fleurs.....	19
Figure 7 : Teneurs en flavonols (mg EQ/ g MS) au niveau de stigmates et fleurs.....	19
Figure 8 : Teneurs en tanins hydrolysables (mg EAG/g MS) au niveau de stigmates et fleurs.....	20
Figure 9 : Teneurs en tanins condensé (mg EC/g MS) au niveau de stigmates et fleurs.....	21



Introduction

Vue les circonstances actuelles causées par la pandémie COVID-19, tous les laboratoires pédagogiques et de recherche ont été fermés, ce qui nous a poussé à faire une synthèse bibliographique pour l'élaboration de notre mémoire de master. Dans ce modeste travail, nous avons interprété et discuté les résultats des travaux antérieurs réalisés au niveau du laboratoire des Produits Naturels sur le safran d'origine algérienne, plus particulièrement de Tlemcen.

Dans le monde, les plantes ont toujours été utilisées comme source de médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques **(Dibong et al., 2011)**.

Actuellement, il est encore très intéressant et très utile d'évaluer les propriétés thérapeutiques des plantes en tant qu'antioxydants, en particulier les polyphénols. Ces substances de structures hétérogènes telles que les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins ...etc. possèdent diverses propriétés biologiques comme les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antiapoptotique, antimicrobienne et aussi comme des antidépresseurs **(Micheal, 2015)**.

En effet, les plantes représentent la principale source de ces propriétés dont plusieurs travaux ont été décrits. Parmi ces végétaux, le safran et ses constituants (*Crocin*, *crocetine* et *safranal*) détiennent des propriétés bénéfiques différentes **(Rahimi, 2015)**. *Crocus sativus* est une petite plante, vivace sans tige principalement cultivé en Iran, en Grèce, en Espagne, en France ensuite, en Algérie. Il ne s'agit pas d'une plante sauvage car l'homme a su la cultiver, la choyer, et l'importer tout autour du bassin méditerranéen **(Moshini et al, 2015 ; Lachaud, 2016)**.

Le safran est une épice obtenue en déshydratant la stigmatisation des fleurs séchées. Cette plante bulbeuse appartient à la famille des Iridaceae **(Iuis, 2009)**. Elle peut atteindre une hauteur de 30 cm et sa période de floraison se situe entre septembre et novembre. Elle est traditionnellement utilisée pour des effets apaisants, calmants et la stimulation de la digestion, soulager les crampes, renforcer le corps, et bien sûr avoir longtemps comme épice et teinture, donc c'est une épice très appréciée utilisée à des fins culinaires, médicinales et pharmacologiques **(Bénédict, 2019)**.

Le safran possède de grandes fleurs voyantes de couleur violette ou pourpre-violacée (connues sous le nom de «rose du safran»), avec un style filiforme divisé en trois stigmates odorants **(Vanaclocha et Fitoterapia, 2003)**.

La fleur du safran est composée de 6 pétales, 3 étamines jaunes et un pistil qui est divisé en 3 longs stigmates rouges vifs et velouté de 3 à 4 cm.

Le stigmate a un aspect brillant à l'ouverture de la fleur, mince à la racine, large à la fin et très parfumé. Après séchage, il forme un safran commercial. Le safran se développe à partir de des bulbes. Les bulbes, sont de petites boules brunes d'environ 4.5 cm de diamètre, enveloppées

dans des tapis de fibres parallèles denses. Les bulbes qui ne peuvent survivre qu'une seule saison doivent être coupés et cassés manuellement, puis replantés. Par conséquent, ils fourniront jusqu'à dix caïeux, qui produiront de nouvelles plantes (Winterhalter et Straubinger, 2000). Les fleurs de *Crocus* sont délicates et fragiles, et dégagent un arôme de «miel» lors de la récolte. Les composés volatils présents dans les fleurs ont été caractérisés afin d'évaluer l'arôme et les propriétés thérapeutiques des déchets floraux (Bergoin, 2005).



Figure 1 : Fleur du *Crocus sativus* : 1: pétales 2: stigmates 3: étamines 4:bulbe (Chahine, 2014).

Diverses études analytiques ont été menées pour identifier un grand nombre de composés biologiquement actifs trouvés dans le safran. Les quatre principaux composés sont la *crocine* et la *crocétine* qui sont deux pigments caroténoïdes responsables de la couleur jaune-orangée de l'épice, la *picrocrocine* apportant au safran sa saveur et son goût amer, le *safranal* un composé volatil responsable de l'arôme et de l'odeur si spécifique au safran. Ainsi ces principaux constituants contribuent non seulement au profil sensoriel du safran mais aussi aux propriétés intéressantes pour la santé. C'est l'alchimie parfaite entre ces principaux composés qui fait la qualité d'un grand safran (Melnik et al., 2010). D'autres études portant sur des propriétés phytothérapeutiques ont montré que le safran contient aussi plus de 150 composés actifs tels que les caroténoïdes dont lutéine, zéaxanthine, lycopène et alpha- et bêta-carotène, les glucosides, les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins...etc (Abert et al., 2013 ; Bénédicte,

2019). En raison de sa capacité à promouvoir des avantages pour la santé humaine, une grande attention a été accordée à ces composés bioactifs (**Conforti et al., 2009**). Plusieurs propriétés biologiques ont été décrites telles que l'effet hypocholestérolémiant, il permet de lutter contre l'excès du cholestérol (**Jesus, 2017**), la réduction des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, effets antimutagènes, anti-allergènes, anti-inflammatoires et antimicrobiens (**Balasundram et al., 2006**). Il a aussi la capacité à réguler la chimie du cerveau et normalise les niveaux de sérotonine, de sorte que son effet antidépresseur (**Sylvia, 2019**). L'effet anticancérigène est aussi reporté chez le safran en raison d'une variété de substances naturelles, il peut induire l'apoptose dans diverses cellules tumorales et avoir des effets antioxydants en raison de leur teneur en caroténoïdes, dont font partie de la *crocine* et la *crocétine*, qui jouent un rôle important sur la santé en agissant en tant qu'antioxydant naturel (**Bathaiz et al., 2013**). Cette investigation est portée sur la valorisation des fleurs qui sont considérées comme des déchets en grande quantité de la production du safran. Une étude comparative avec les stigmates est aussi envisagée.

Pour cela, les teneurs en phénol totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en anthocyanes et les activités antioxydante et antimicrobienne ont été déterminées.



**Matériel et
Méthodes**

Echantillon

Les deux parties de la plante (fleurs et stigmates) (**Figure 1**) ont été récoltées dans la station d'Ain Fezza djebel Zaafran, Daira de Tlemcen, Wilaya de Tlemcen, pendant le mois de Novembre 2018. Le séchage se fait à l'obscurité et à température ambiante dans un endroit sec et aéré par **Dr LOUKIDI B.** Maître de conférences classe A, à l'université de Tlemcen.

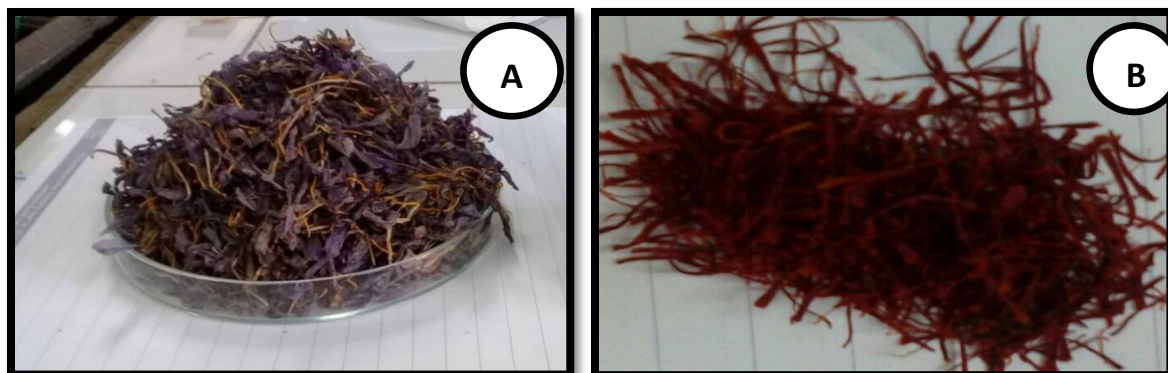


Figure 2 : La plante de *Crocus sativus*. (A) : Les fleurs (B) : Les stigmates.

Préparation des extraits bruts de *C. sativus*.

Les extraits bruts des deux parties séparées (fleurs et stigmates) sont obtenus en ajoutant 1g de la poudre à 30 ml d'un mélange méthanol/eau distillée (70 /30 ; V/V) (**Bekkara et al, 1998**) pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après filtration sur papier Whatman de diamètre 130 mm, les filtrats sont évaporés à sec en utilisant le rota vapeur de type HAHNVAPOR HS-2005V-N à 50 °C. Les extraits secs obtenus sont pesés et récupérés par 3 ml d'eau distillée pour les fleurs et 2 ml pour les stigmates, puis conservés dans des tubes à hémolyse à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

I-Dosages phytochimiques

I.1. Dosages des phénols totaux

Les phénols totaux sont des constituants importants des végétaux, leurs dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (**Singleton et Rossi, 1965**). Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**), c'est-à-dire qu'il y aura formation d'un complexe redox entre les composés phénoliques et les deux acides du réactif. La coloration produite suite à cette association, dont l'absorbance maximale est mesurée à 765 nm, et elle est

proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal. Les deux extraits sont dilués 500 fois dans de l'eau distillée. Trois (03) répétitions ont été réalisées et dans des tubes à essai, une quantité de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml du Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre UV/Visible. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique est réalisée parallèlement dans les mêmes conditions opératoires. Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g MS).

I.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est déterminé en utilisant la technique de **Zhishen et al, (1999)**. Une quantité de 500 µl des extraits bruts convenablement dilués est mélangée avec 1500 µl d'eau distillée, suivi par 150 µl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5%. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % à été additionné. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance est déterminée à 510 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SPECTROD 200 Plus. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

I.3. Dosage des flavonols

Le dosage des flavonols a été réalisé par la méthode de **Kumaran et al (2007)**. Une prise de 0.25 ml de chaque extrait brut est mélangé avec 1.5 ml d'acétate de sodium à 50 mg/ml et 0.25 ml de AlCl_3 à 2 mg/ml. Le mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante durant 150 min. L'absorbance est lue à 440 nm en utilisant le spectrophotomètre de type SPECORD 200 Plus.

Le contenu en flavonols est exprimé en milligramme (mg) équivalents de quercétine par gramme du poids de la matière sèche (mg QE/ g MS).

I.4. Dosage des tanins condensés

La quantité des tanins condensés est déterminée par la méthode de vanilline en milieu acide (**Julkunen-titto, 1985**). Cette méthode est basée sur la capacité de vanilline en présence d'HCl à réagir avec les tanins, l'absorbance est mesurée à 550 nm.

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 200 Plus.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

I.5. Dosage des tanins hydrolysables

Le taux des tanins hydrolysables est déterminé par la méthode de **Mole et Waterman (1987)** qui est basée sur la réaction avec le chlorure ferrique. Un volume de 1 ml de l'extrait est mélangé avec 3.5 ml de la solution de FeCl₃ (1.62 g est dissous dans 0.01M de HCl). Le mélange donne une coloration rouge violette au complexe d'où la formation des ions (Fe⁺³). L'absorbance a été lue à 660 nm après 15 secondes. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique par g de la matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (mg EAG/ g MS).

I.6. Dosages des anthocyanes

La détermination de la teneur en anthocyanes a été effectuée selon la méthode de **Wagner (1979)**. Une masse de 0.1 g de matière sèche de chaque partie de la plante est macéré dans 10 ml du méthanol acidifié (Méthanol/ HCl : 99/1 ; V/V). Les extraits sont maintenus à 25 °C pendant 24 h dans l'obscurité. Après la centrifugation à 4000 g pendant 5 min à température ambiante, la lecture de l'absorbance du surnageant se fait à une longueur d'onde de 550 nm. Pour calculer la quantité d'anthocyanines, nous avons utilisé le coefficient d'extinction 33 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ et le contenu en anthocyanes a été exprimé en µmol/g de matière sèche.

II- Etude de l'activité antioxydante

Quatre tests ont été utilisés pour évaluer le pouvoir antioxydant.

II.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Ce test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide.

La CAT des fleurs et des stigmates de *C. sativus* a été examinée par la méthode de Phosphomolybdène de **Prieto et al, (1999)**. Un volume de 300 μl de l'extrait dilué a été ajouté à 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes ont été fermés et incubés à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution CAT et 0.3 ml de l'eau distillée et il a été incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif. Les valeurs de la CAT sont exprimées en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées trois fois.

II.2. Test du piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyle)

Cette technique permet de mesurer la capacité des antioxydants à réduire le radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) en une forme non radicalaire (hydrazine), en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de l'extrait sur le DPPH est mesuré par la méthode décrite par **(Sanchez-Moreno et al, 1998)**. Un volume de 50 μl des différentes concentrations de chaque extrait (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml pour l'extrait des stigmates) et (0.1875, 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/ml pour l'extrait des fleurs) est ajouté à 1950 μl de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm en utilisant le spectrophotomètre.

Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 50 μl du méthanol avec 1950 μl d'une solution méthanolique du DPPH à la même concentration utilisée. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (I \%)} = [(Ac - AE) / Ac] \times 100$$

Où : **Ac**: Représente l'absorbance du contrôle négatif ; **AE**: Représente l'absorbance de l'échantillon.

Le paramètre EC₅₀ (Efficient Concentration value) ou la concentration efficace est calculé pour comparer l'efficacité de nos extraits. Il est défini comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH à 50 %. Il est déterminé en traçant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

II.3. Réduction de fer

Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃ Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). Elle est déterminée par la méthode **d'Oyaizu (1986)**. Des dilutions (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml) ont été préparées. Un volume de 500 µl de chaque dilution a été mélangé avec 1250 µl d'une solution tampon (0.2 M, pH=6.6) et 1250 µl de solution du ferricyanure de potassium (1% K₃[Fe(CN)₆]). Le mélange a été incubé pendant 30 min à 50°C, puis de l'acide trichloroacétique à 10 % (1250 µl) a été ajouté. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min, un volume du surnageant (1250 µl) a été mélangé avec de l'eau distillée (125µl) et une solution fraîchement préparée de FeCl₃ (250 µl, 0.1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif.

La concentration EC₅₀ est un indice utilisé pour comparer la capacité réductrice de l'extrait par rapport au contrôle positif. Elle est définie comme la concentration des antioxydants nécessaires à la réduction de 50 % de la concentration initiale du ferricyanure de potassium.

II.4. Inhibition du blanchiment du β-carotène

Le β-carotène est un photo-protecteur qui apparaît comme un piègeur efficace. La structure polyionique lui donne la capacité du piégeage de l'oxygène par la formation de dioxine ou par la production d'hydroperoxydes (insertion d'oxygène dans tous les liaisons conjugués C-H à partir d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leurs tour (**Bossokpi, 2002**).

Le test du blanchiment du 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 du β-carotène est dissoute dans 10 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution dans une fiole contenant

préalablement 200 mg de Tween 20 et 20 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au Rota vapeur jusqu'à la disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée à 20% 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 à 200 µl des solutions méthanoliques de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse BHA à 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 bain marie à 50°C pendant 120 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à t = 120 min. Pour le témoin positif, l'échantillon est remplacé par le BHA. Le témoin négatif est constitué par 200 µl du méthanol au lieu de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse. Tous les échantillons sont répétés en deux essais. L'activité antioxydant (%) des extraits est évaluée par la méthode de blanchiment du β-carotène en employant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (\text{Ae}_0 - \text{Ae}_{120} / \text{Ac}_0 - \text{Ac}_{120})] \times 100$$

Où : **Ae₀** : Absorbance de l'échantillon à t₀ ; **Ae₁₂₀** : Absorbance de l'échantillon après incubation de 120 min ; **Ac₀** : Absorbance du contrôle négatif à t₀ ; **Ac₁₂₀** : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 120 min.

La valeur EC₅₀ est définie comme étant la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

III-Etude de l'activité antimicrobienne

III.1. Préparation du matériel biologique

Souches testées

Les souches de références utilisées pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne sont mentionnées dans le **tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1: Différentes souches utilisées dans l'étude du pouvoir antimicrobien.

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAPSAB
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 25921	LAPRONA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	IBMC Strasbourg	MNHN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPRONA
<i>Candida albicans CIP</i>		CIP 444	LAPSAB

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; **LAPSAB** : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques :Physico-chimie Synthèse et Activité Biologique.

Pré-culture des souches microbiennes

- ✓ Une pré-culture des souches microbiennes est préparée dans le Bouillon B.M.H afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance.
- ✓ Après 18-24 h d'incubation à 37 °C, la turbidité est ensuite ajustée, ce qui correspond à $\approx 10^8$ UFC / ml (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm).
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien le milieu B.M.H stérile s'il est trop chargé.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum (**Rahal et al, 2008 ; Vitali et al, 2016**).

Ensemencement

- ✓ Les boîtes de Pétri sont coulées à une épaisseur de 4 mm, car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un résultat erroné.
- ✓ Les boîtes sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant l'ensemencement afin d'éliminer l'humidité.
- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al., 2008**).

III.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *C. sativus*

a. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques)

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave puis imprégnés de 10 µl de chaque extrait (fleurs, stigmates) avec des charges respectives de 0.5, 1 et 3 mg/disque. Ces disques sont déposés à la surface de la gélose G.M.H préalablement ensemencée en surface avec la suspension microbienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits.

Des disques d'ampicilline (10 µg) ont été utilisés comme des contrôles positifs.

Un contrôle négatif est également effectué en utilisant un disque de papier chargé avec 10µl de l'eau distillée stérile.

L'incubation des boîtes est faite à 37 °C pendant 24 h (**NCCLS, 1997 ; CLSI, 2015**).

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition.

Deux répétitions sont effectuées pour chaque charge.

b. Méthode de microdilution en milieu liquide (Détermination des concentrations CMI et CMB)

- **Principe**

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) permettant d'inhiber la croissance des microbes par des extraits ou des composés actifs. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait (ou de composé) ne laissant pas de bactéries survivantes de l'inoculum après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures (**Abedini, 2013**).

La méthode de dilution partielle a été utilisée dans le bouillon pour déterminer la CMI selon le Comité national de normalisation en laboratoire clinique (NCCLS, 2001). Tous les tests ont été effectués dans le bouillon B.M.H.

Les dilutions en série sont préparées dans une plaque stérile à fond en U (microplaque) de 96 puits

Dans la gamme de concentration choisie :

-Extrait des stigmates de 45000 µg / ml à 0.0858 µg / ml.

-Extrait des fleurs de 200000 µg / ml à 0.3814 µg / ml.

- **Mise en œuvre**

Tout d'abord, nous mettons 100 µl de bouillon M.H dans les puits. Ensuite, nous déposons 100 µl des extraits hydro-méthanoliques (stigmates et fleurs) de *C. sativus* dans le puits N°02, ensuite le puits N°03 et puis nous effectuons des dilutions successives (après agitation, on prend 100 µl à partir du puits N°03 et on le met dans puits N°04 et ainsi de suite). De plus, on met 100 µl de la suspension bactérienne dans le puits N°01 et dans le puits N°03 jusqu'au puits N°22 pour obtenir un volume final de 200 µl dans chaque puits avec une concentration finale de microorganismes de l'ordre de 10⁶ UFC /ml.

Il est nécessaire de désinfecter la micropipette avec de l'alcool pour éviter les problèmes de contamination. Il est important d'homogénéiser le tube contenant la souche à travers le vortex avant son dépôt dans les puits (Abedini, 2013).

Les microplaques des bactéries et des *C. albicans* ont été incubées respectivement pendant 24 h et 48 à 37°C, la lecture est faite visuellement.

Pour déterminer la CMB, on prélève 10 µl des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (G.M.H ou G.S) et on incube les boîtes à 37°C ± 1 pendant 24 h. Le lendemain, on peut déterminer grâce à cette culture la CMB.

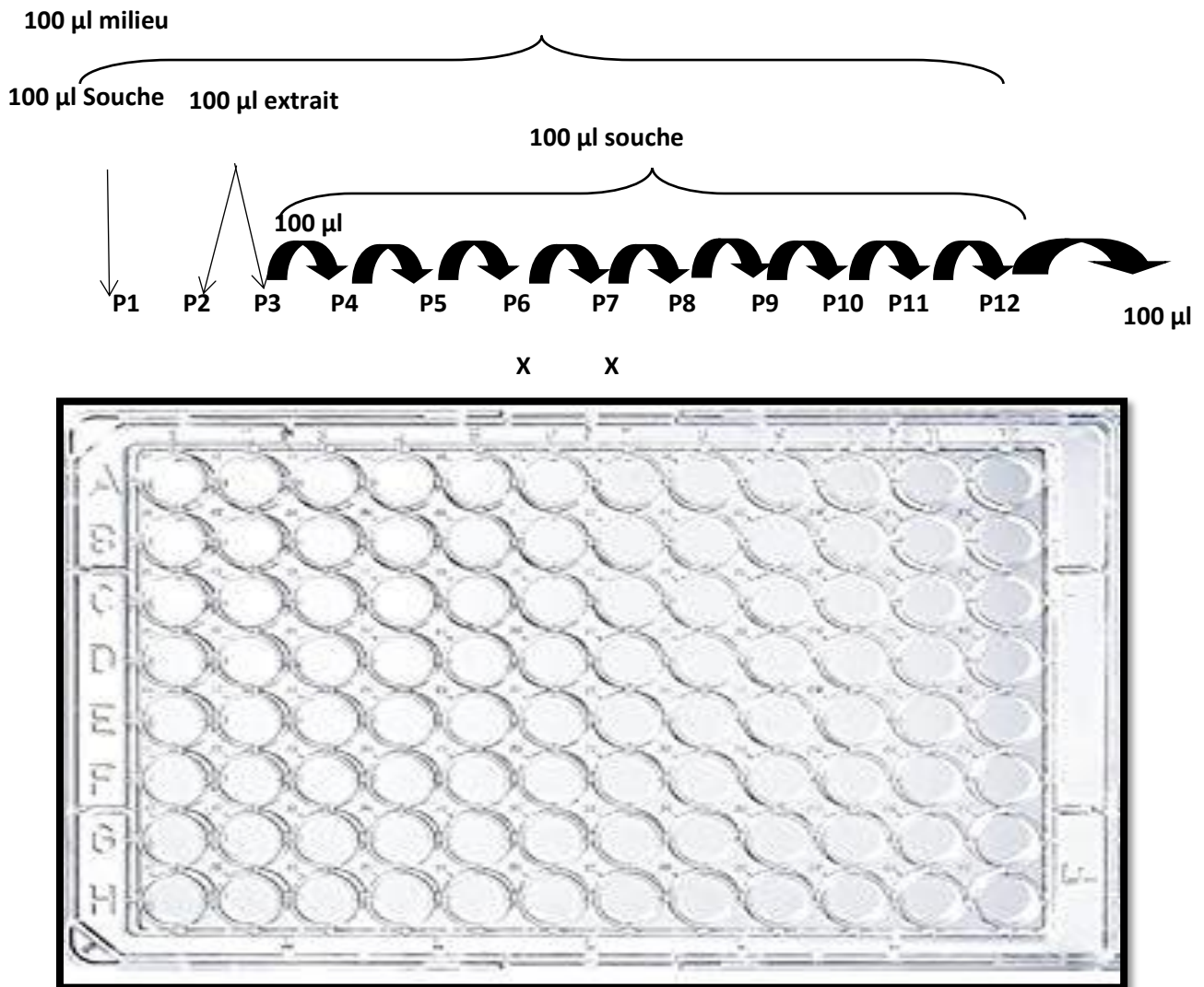


Figure 3 : Plaque 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.

Matériel et méthodes

Tableau 2 : Concentration des extraits bruts des stigmates et des fleurs dans les puits.

Numéro du puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	22
Concentration du puits (µg/ml) de l'extrait des fleurs	TC	TCE	200000	100000	50000	2500	1250	625	3125	1562	0.38
Concentration du puits (µg/ml) de l'extrait des stigmates	TC	TCE	45000	22500	11250	5625	2812,5	1406,2	703,1	351,5	0,08



Résultats et discussions

I. Tests phytochimiques

Rendements en extraits

Les résultats obtenus des rendements dans le tableau 1 ont montré que les fleurs et les stigmates détiennent des pourcentages de l'ordre de 49.747 et 48.525%, respectivement.

Tableau 3 : Rendement en extraits des fleurs et des stigmates du safran.

Extrait bruts	Rendement (%)
Stigmates	48.525
Fleurs	49.747 ± 4.167

I.1 Dosage des phénols totaux

Les extraits ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre, pour leurs teneurs en phénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g MS). Ils sont reportés dans la **figure 4**.

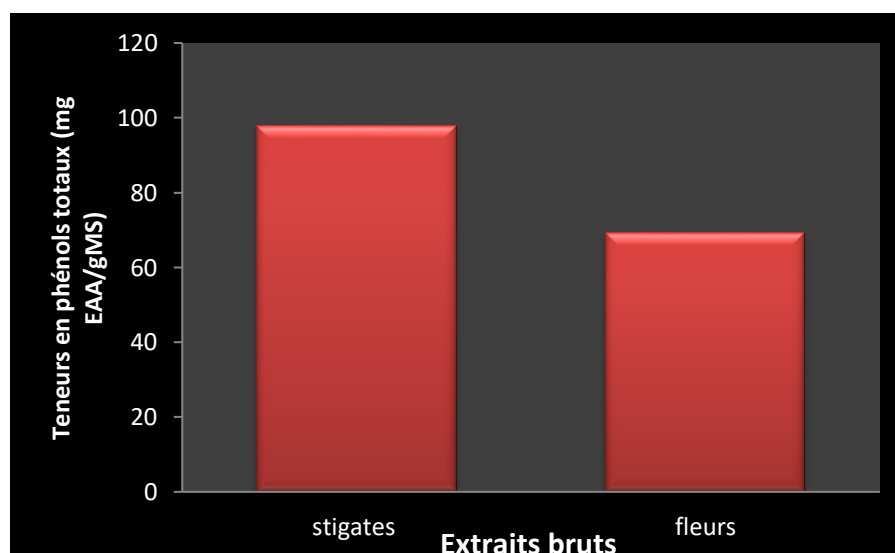


Figure 4 : Teneurs en phénols totaux (mg EAG/g MS) au niveau des stigmates et des fleurs.

Nous constatons que la teneur en phénols totaux enregistré au niveau de stigmates 97.993 ± 10.548 (mg EAG/g MS) est largement supérieure à celle trouvée au niveau des fleurs 69.187 ± 2.255 (mg EAG/g MS).

I.2. Dosage des anthocyanes :

Le dosage des anthocyanes a été effectué par la méthode de Wagner. Les résultats obtenus dans la **figure 5** sont exprimés en micromole par gramme de matière sèche ($\mu\text{mol/g}$).

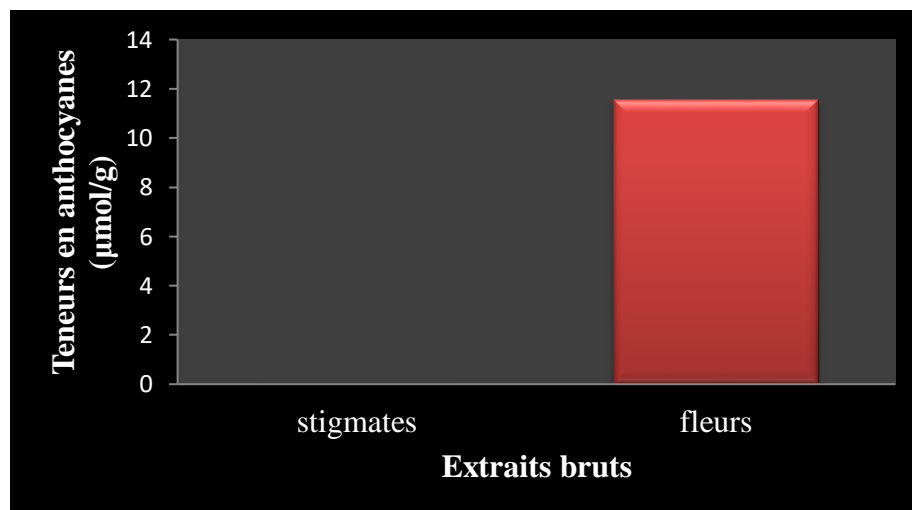


Figure5 : Teneurs en anthocyanes ($\mu\text{mol/g}$) au niveau des stigmates et des fleurs.

D'après l'histogramme illustré dans la **figure (5)** on constate que les anthocyanes sont présents avec une quantité élevée dans des fleurs $11,526 \pm 0.118$ ($\mu\text{mol/g}$) par rapport à celle des stigmates qui renferme un taux $0,465$ ($\mu\text{mol/g}$) presque inexistant.

I.3. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode spectrophotométrique au chlorure d'aluminium (AlCl_3). La **figure 6** illustre les résultats obtenus qui sont exprimés en milligramme équivalents de catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

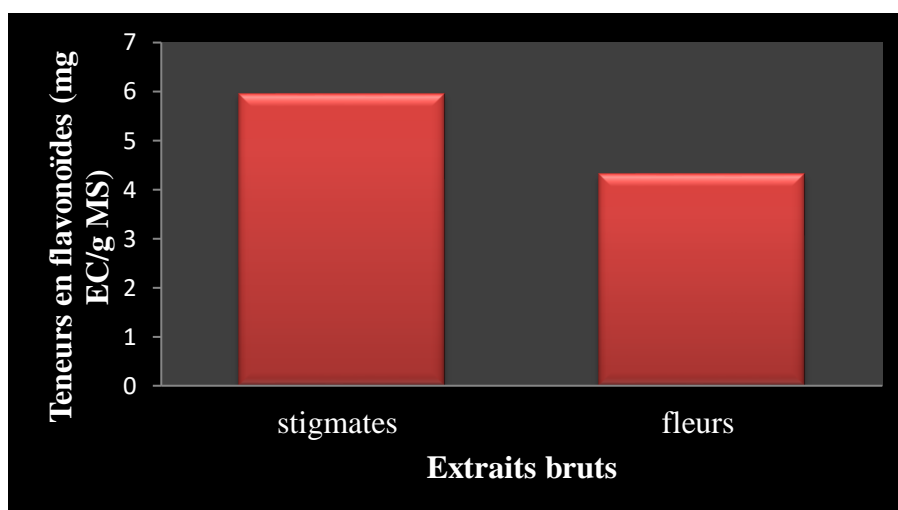


Figure 6 : Teneurs en flavonoïdes (mg EC/g MS) au niveau des stigmates et des fleurs.

D'après cette figure, les stigmates de *C. sativus* possèdent des teneurs en flavonoïdes 5.967 ± 0.042 (mg EC/g MS). Cette valeur reste supérieure par rapport aux fleurs 4.322 ± 0.185 (mg EC/g MS).

I.4. Dosage des flavonols

Les résultats des teneurs en flavonols obtenus dans la **figure 7** sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de quercétine par gramme du poids de la matière sèche (mg EQ/ g MS).

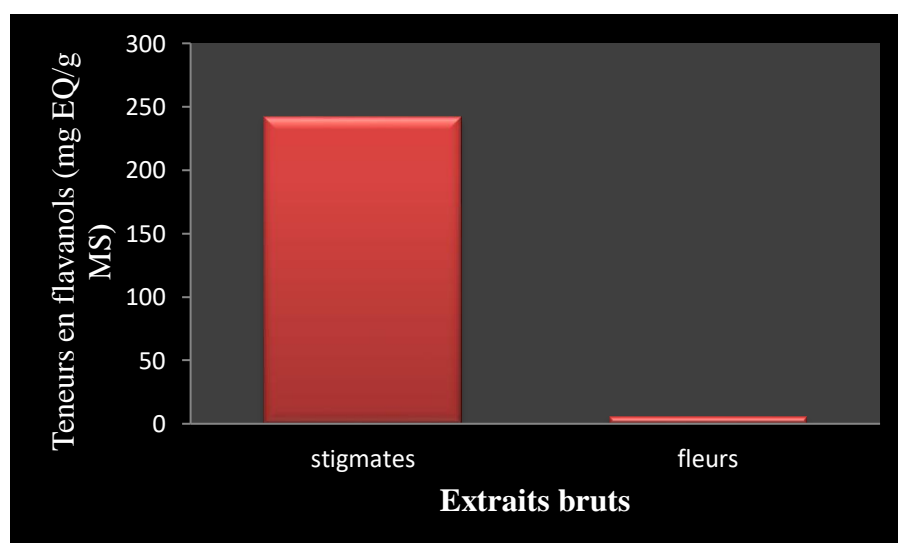


Figure7 : Teneurs en flavonols (mg EQ/ g MS) au niveau des stigmates et des fleurs.

Nous remarquons que les flavonols sont présents avec une teneur très élevée dans les stigmates de l'ordre de 241.797 ± 6.511 mg EQ/ g MS) par rapport aux fleurs 5.452 ± 0.226 (mg EQ/ g MS).

I.5. Dosage des tanins hydrolysables

Les résultats des teneurs en tanins hydrolysables obtenus sont exprimés en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g MS).

D'après l'histogramme illustré dans la **figure 8**, nous avons constaté que la teneur en tanins hydrolysables au niveau des fleurs ($277,304 \pm 6,756$ mg EAG/g MS) est une fois et demie supérieure à celle des stigmates ($161,643 \pm 10,506$ mg EAG/g MS).

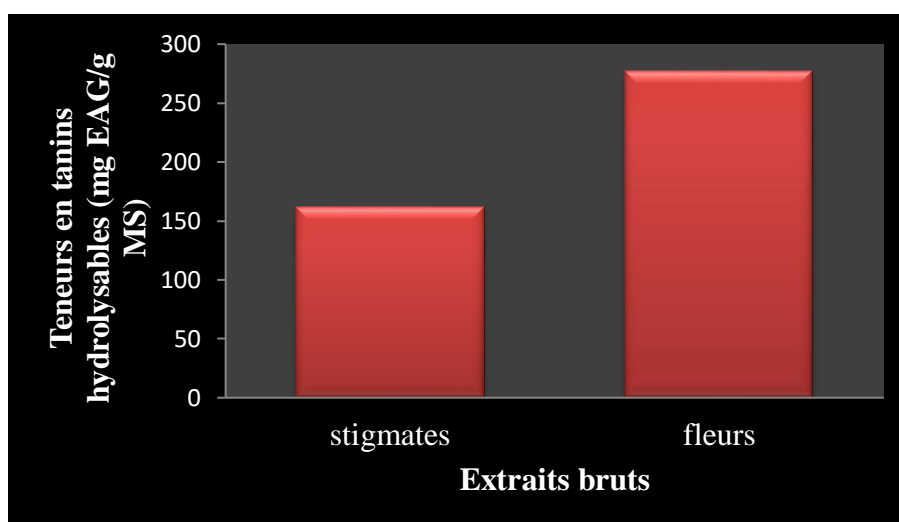


Figure 8 : Teneurs en tanins hydrolysables (mg EAG/g MS) au niveau des stigmates et des fleurs.

I.6. Dosage des tanins condensés

Les résultats des teneurs en tanins condensés illustrés dans la **figure 9** sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

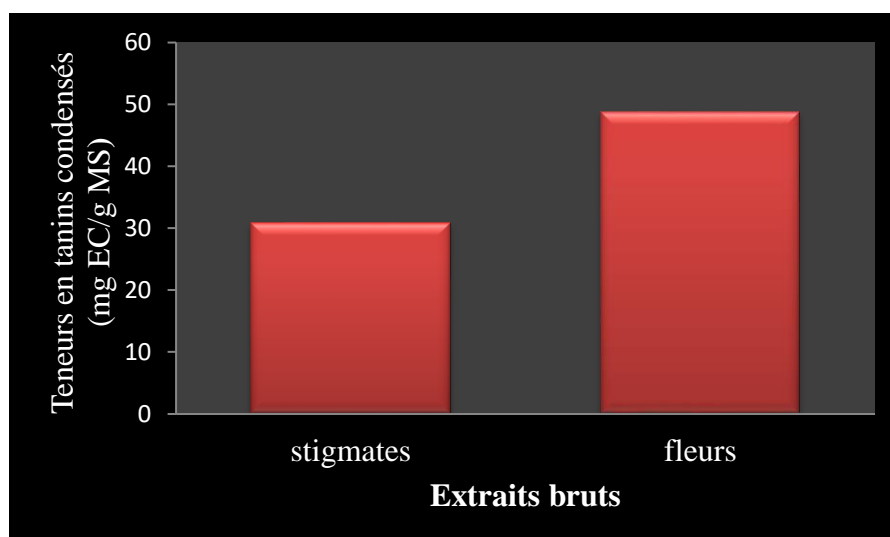


Figure 9 : Teneurs en tanins condensés (mg EC/g MS) au niveau des stigmates et des fleurs.

D'après la **figure 9**, nous avons remarqué que les stigmates possèdent une teneur en tanins condensés de 30.892 ± 3.762 (mg EC/g MS). Cette concentration est importante que celle enregistrée dans les fleurs (48.854 ± 5.927 mg EC/g MS).

Nos résultats phytochimiques sont comparables à ceux publiés par **Babaei (2014)** qui a révélé la présence de certains composés dans la fleur de *C. sativus* tels que les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins. De même, une étude de **Hosseinzadeh et al. (2002)** ont noté la présence de ces composés et des anthocyanes dans les extraits des fleurs. D'autres études ont dévoilé que les taux en flavonoïdes sont de 14.10 ± 1.08 mg EC/g MS (**Si Mohammed et al., 2018**) et 5.88 mg EC/g MS (**Karimiet et al., 2010**) au niveau des fleurs et des stigmates, respectivement. A propos des anthocyanes, **Jéssica et al. (2014)** dans leur étude ont signalé un taux de ces molécules similaire à nos résultats et égale à $11.40 \pm 0.10 \mu\text{mol/g}$ au niveau des fleurs. Ces teneurs enregistrées dans notre étude sont différentes par rapport à la littérature. Cette variabilité peut être attribuée au plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur la concentration des composés phénoliques dans nos extraits. La répartition des polyphénols se trouve sous l'influence de plusieurs facteurs, notamment climatique, géographique, sécheresse, qualité du sol, profondeur....(**Ebrahimi et al., 2008**). De plus, le mode d'extraction (solvant d'extraction et température), peut également influencer ces composés (**Conde et al., 2009 ; Lee et al., 2003**).

II. Evaluation de l'activité antioxydante

Résultats et discussions

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (**Bartosz, 2003**). De ce fait nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydante des extraits de fleurs et des stigmates de *C. sativus* par quatre méthodes différentes et complémentaires.

Les résultats de l'effet antioxydant des fleurs et des stigmates du safran réalisés par 4 tests sont reportés dans le **tableau 4**.

Tableau 4: Teneurs de la capacité antioxydante totale et les concentrations EC₅₀ des tests du DPPH, de la réduction du fer et de β -carotène des fleurs et des stigmates du safran.

Extrait brut	EC ₅₀ (mg/ml)			CAT (mg EAA/g MS)
	DPPH	Réduction du fer	B-carotène	
Stigmates	ND	0.617 ± 0.032	0.196 ± 0.044	30.845 ± 5.975
Fleurs	5.5402 ± 0.0032	1.001 ± 0.030	0.031 ± 0.004	69.792 ± 3.860
Acide ascorbique	0.0906 ± 0.0023	0.061 ± 0.001		
BHA			0.028±0.005	

ND :Non déterminé.

II.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Nous constatons que les fleurs (69.792 ± 3.860 mg EAA/ g MS) possèdent une valeur de la CAT deux fois plus élevée que les stigmates (30.845 ± 5.975 mg EAA/ g MS).

Les travaux de **Lahmas et al (2018)** ont rapporté que l'extrait des stigmates a une activité antioxydante totale de 50 mg EAA/g MS, supérieure à celle signalée dans notre étude sur les stigmates.

II.2. Piégeage du radical DPPH

Les résultats de ce test référés dans le **tableau 4** ont indiqués que les fleurs détiennent une concentration EC₅₀ égale à 5.5402 mg/ml. Cette activité reste très faible par rapport à l'acide ascorbique (0.0906 mg/ml).

Nos résultats sont très faibles en comparant avec ceux reportés par **Lahmass et al (2018)**. Ces auteurs ont révélé une activité anti-radicalaire intéressante des extraits du safran obtenus avec des concentrations IC₅₀ de 0.5 mg /ml pour les stigmates et pour les feuilles séchées. Cette

différence est due à la nature des composés extraits par des solvants de polarité différente (Lafka et al., 2013).

II.3. Réduction du fer

D'après le **tableau 4**, les capacités de l'activité d'acide ascorbique révèle une puissante activité avec un EC_{50} égale 0.061 ± 0.001 (mg/ml) par rapport à celle des stigmates avec un EC_{50} égale 0.617 ± 0.032 (mg/ml) et les fleurs avec un EC_{50} 1.001 ± 0.030 (mg/ml).

D'après **Sedoud (2018)**, la capacité réductrice des pétales est de 2.01 mg/ml et qui reste faibles par rapport à nos échantillons.

II.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène :

Les résultats illustrés dans le **tableau 4** ont indiqué que l'extrait brut des fleurs détient la capacité inhibitrice intéressante du blanchiment du β -carotène avec une concentration EC_{50} égale à 0.031 mg/ml. Cette valeur reste proche à celle du BHA (0.028 mg/ml). Pour l'extrait des stigmates, ce dernier a montré une concentration inhibitrice de 0.196 mg/ml. Ce résultat reste faible devant le travail de **Lahmas et al (2018)** qui a révélé une valeur égale à 0.030 mg/ml pour les stigmates.

III. Evaluation du pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne des extraits des stigmates et des fleurs du safran est évaluée sur 9 souches. Les résultats obtenus de la méthode de diffusion sur disques sont résumés dans le **tableau 5**.

Tableau5 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits bruts des stigmates et des fleurs de *C. sativus*.

Extraits	1mg/disque	3mg/disque	
	Fleurs	Stigmates	Fleurs
<i>S. aureus</i>	0	0	0
<i>M. luteus</i>	7.33±0.47	0	12.16±3.40
<i>B. cereus</i>	0	15±2.82	0
<i>B. subtilis</i>	0	18±0	7.25±0.35
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	0	0	0
<i>C. albicans</i> CIP 444	0	0	0

Nous remarquons que l'extrait des fleurs présente un effet antibactérien considérable sur la souche *M. luteus* à 1 mg/disque avec une zone d'inhibition égale à 7.33±0.47 mm. A 3mg/disque, deux zones d'inhibition de 12.16±3.40 et 7.25±0.35 mm ont été signalées contre *M. luteus* et *B. subtilis*, respectivement pour l'extrait des fleurs. À la même charge, l'extrait des stigmates a révélé un effet antibactérien contre les deux souches de *Bacillus*.

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) de nos extraits contre les souches étudiées. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : CMI et CMB des extraits bruts des stigmates et des fleurs du safran sur les microorganismes testés.

Extrait	Stigmates		Fleurs	
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ou CMF ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ou CMF ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND
<i>M. luteus</i>	22500	>45000	6250	100 000
<i>B. cereus</i>	ND	ND	100 000	200 000
<i>B. subtilis</i>	1406.25	>45000	781.25	>200 000
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans</i> CIP 444	ND	ND	ND	ND

D'après le **tableau 6**, l'extrait des stigmates a un effet inhibiteur sur les souches *B. subtilis* et *M. luteus* à des concentrations CMI de 1406.25 $\mu\text{g/ml}$ et 22500 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Tandis que l'effet bactéricide CMB, cet extrait a enregistré son effet à une concentration supérieure à 45000 $\mu\text{g/ml}$ sur ces deux souches.

Pour l'extrait des fleurs, les valeurs de CMI sont enregistrées contre trois souches à savoir *B. subtilis* à 781.25 $\mu\text{g/ml}$, *M. luteus* à 6250 $\mu\text{g/ml}$ et *B. cereus* à 100 000 $\mu\text{g/ml}$, alors que les CMB sont de 1000 $\mu\text{g/ml}$ contre *M. luteus*, 200 000 $\mu\text{g/ml}$ contre *B. cereus* et >200 000 $\mu\text{g/ml}$ contre *B. subtilis*.

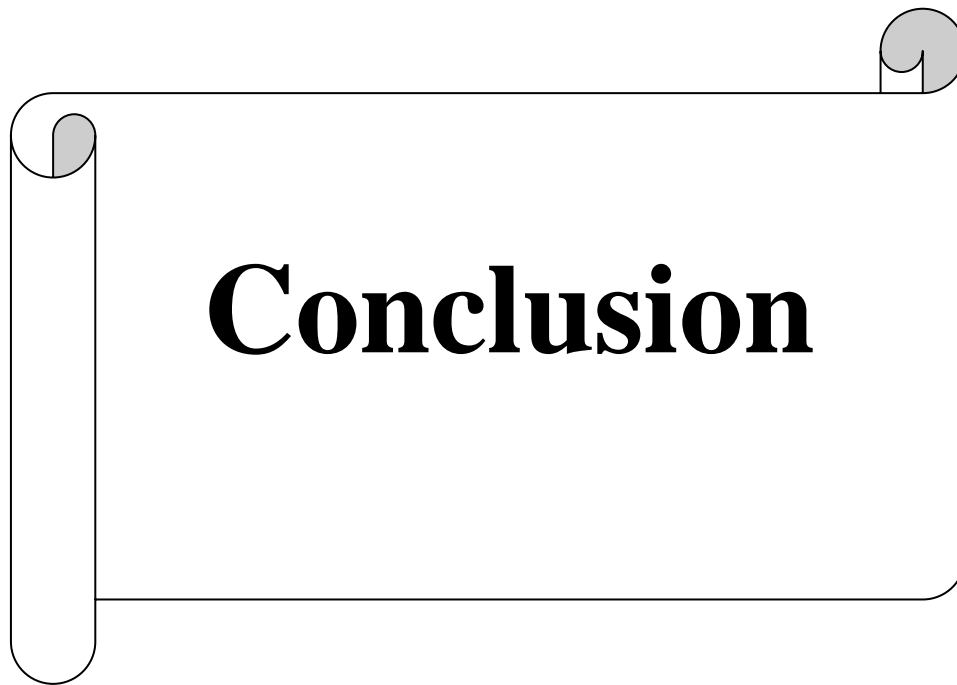
D'après ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait des fleurs est plus actif contre les souches Gram +. Ceci est confirmé par certains travaux tels que l'étude de **Jinous et al. (2013)** qui a révélé la présence d'un effet antibactérien de l'extrait méthanolique des pétales de *C. sativus* contre *S. aureus* et *B. cereus* avec des zones d'inhibitions allant de 13 à 22 mm.

La même étude a reporté des concentrations de la CMI de 125 mg/ml pour l'extrait des étamines et de la CMB de 500 mg/ml pour l'extrait des pétales contre *B. cereus* (**Jinous et al., 2013**). En **2019, Najmeh et al.** ont trouvé que les CMI de l'extrait des stigmates étaient de 320 $\mu\text{g/ml}$ et de 160 $\mu\text{g/ml}$ contre *E. coli* et *S. aureus*, respectivement dont la CMB était de 160 $\mu\text{g/ml}$ contre *Enterococcus*.

D'après ces résultats obtenus dans notre étude, nous pouvons établir une corrélation entre les teneurs polyphénoliques de nos extraits et les activités biologiques testées.

En effet, les teneurs élevées en phénols totaux et en flavonols dans l'extrait des stigmates et en tanins condensés et hydrolysables et en anthocyanes dans l'extrait des fleurs sont probablement responsables des propriétés antioxydantes et antibactérienne contre les Gram+.

Il faut noter aussi que la richesse de *C. sativus* en beta-carotènes et en zéaxanthine au niveau des stigmates et des fleurs, et en *crocine* qui agit en synergie avec d'autres composants comme le safranal au niveau des stigmates, jouent un rôle comme des antioxydants naturels **Bolhassani et al., 2014**).



Ce présent travail réalisé sur les deux parties du safran a révélé la richesse des stigmates par les flavonols et les fleurs par les tanins hydrolysables et condensés.

A propos de l'étude de l'activité antioxydante *in-vitro*, il ressort que les deux extraits hydro-méthanoliques ont un potentiel antioxydant. Les tests du β -carotène et la capacité antioxydante totale suggèrent que l'extrait des fleurs est plus actif que celui des stigmates et cela est probablement dû à sa richesse en tanins hydrolysables et condensés et en anthocyanes.

Concernant l'effet antimicrobien testé sur les 9 souches, les extraits hydro-méthanoliques des stigmates et des fleurs ont montré des effets inhibiteurs et bactéricides contre *M. luteus*, *B. cereus* et *B. subtilis* à différentes concentrations.

L'alliance de la connaissance traditionnelle et de la recherche scientifique peut ouvrir de nouvelles perspectives passionnantes sur le plan de la recherche des substances de source naturelle biologiquement active. À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail de ce travail et de réaliser les points suivants:

- ✓ Valoriser les fleurs qui sont considérés comme des déchets de la production du safran,
- ✓ Trouver ses applications dans les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.
- ✓ Etudier la composition chimique des extraits actifs et identifier les principes actifs responsables des activités biologiques pour mieux comprendre leur mode d'action.
- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes *in vivo et in vitro*.
- ✓ Etudier d'autres propriétés biologiques telles que les activités antimicrobienne contre d'autres souches pathogènes et les virus (exemple : Covid-19), anti-inflammatoire, antidiabétique, neurodégénérative et antitumorale.



**Références
bibliographiques**

A

- Abedini, A., (2013).** Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (*Lamiaceae*) sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé – Lille II-France.
- Abert Vian M., Caris-Veyrat C., Chemat F., Goupy P. (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*, 14 : 149-152.
- Asgarpanaha, J., Darabi-Mahboub, E., Mahboubib, A., Mehrabb, R., Hakemivalac, M. (2013).** In-Vitro Evaluation of *Crocus Sativus L.* Petals and Stamens as Natural Antibacterial Agents against Food-Borne Bacterial Strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical*: 9(4):69-82.

B

- Babaei, A., Arshami, J., Haghparast, A., Daneshmesgharan, M. (2014).** Effects of saffron (*Crocus sativus*) petal ethanolic extract on hematology, antibody response, and spleen histology in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(2): 103-109.
- Balasundram, 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.
- Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9 : 5-21
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome, S. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *vicia faba* diffeting in their seed tannin content, and study of their seed and root pheolic exudation. *Journal Plant and Soil*, 203: 27–36.
- Bénédict, M. (2019).** Safran : bienfait indications pour la santé. <https://doctonat.com/safran-bienfaits-indication/>
- Bergoin, M. (2005).** Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. *Institut National Polytechnique de Toulouse*. (Doctoral dissertation).

Références bibliographiques

Bolhassani, A., Khavari, A., Batahaie, Z. (2014). Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1845 : 20-30.

Bravo, L. (1998) Polyphénols: chimie, sources alimentaires, métabolisme et signification nutritionnelle. *Nutrition Avis*, 56 : 317–333.

C

Chahine, N. (2014). Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique (Doctoral dissertation, Reims). *Thèse de Doctorat en Science–STS-*

CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F. (2009). Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*, 116: 898–905.

D

Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éd Médicales Internationales. Lavoisier*, p 476.

Dibong, S. D., Mpondo, M. E., Nigoye, A., Kwin, M. F. Betti, J. L. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. [Ethnobotany and phytomedicine of medicinal plants sold in Douala markets] — *Journal of Applied Biosciences* 37: 2496 – 2507.

H

Hanson, P., Yang, R., Wu, J., Chen, JT., Ledesma, D., Tsou, SC., Lee TC. (2004). Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5): 704-711.

Hosseinzadeh, H., Younesi, H. M (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC pharmacology*, 2(1): 7.

J

Références bibliographiques

Jomehpour, N., Ghazvini, K., Jomehpour, M. (2019).Antibacterial Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of *Crocus sativus* Stigma and *Cinnamomum cassia* against Clinical Isolates of some Gram-Positive and Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *Medical Laboratory Journal*, 13(3):31-34.

Jusus, C. (2017). Doctissimo, plantes Médicinales.

<https://www.doctissimo.fr/html/sannte/phytotherapie/plante-medicinale/safran.htm>

K

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Jaafar, H. Z. (2010).Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compound and its antioxidant activity.*Addition Article Information*, 15(9): 6244-6256.

L

Lachaud, C.M.(2016). La bile du safran, Tout avoir sur le roi des épices de A à Z , Anthropoogie, Chimie, Preception, Usage, Recettes et plu; p 217

Lahmass, I., Ouahhoud, S., Elmansuri, M., Sabouni, A., Elyoubi, M., Benabbas, R., Choukri, M., Saalaoui, E. (2018). Determination of Antioxidant Properties of Six By-Products of *Crocus sativus* L. (Saffron). *Plant Products*, 8(9):1349-1357.

Liu, RH.(2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(3)517-520.

Lius, J. (2009).Gran diccionario ilustrado de las Plantas Medicinales, descripción y aplicaciones. Tratado completo de fitoterapia que incluye la más exhaustiva flora medicinal de Latinoamérica. 1^{ère}édition, Oceano Ambar, p386.

M

Melnyk, J., Marcone, M., Wang S. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, 43 (8): 1981-1989.

Moshiri, M., Vahabzadeh, M., Hsseinzadeh, H. (2015). Clinical application of saffran (*Crocus sativus*) and its constituents.*A Review Drug Res (Stuttg)*, 65(6):287-95.

N

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. *National Committee for Clinical Laboratory Standard*, Wayne, PA, USA, M27-A.

Références bibliographiques

NCCLS “National Committee for Clinical Laboratory Standards”. (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA.

O

Oyaizu, M., (1986). Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activities of Prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44: 307–15.

P

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phospho-molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337–341.

R

Rahal, K. (2008). Standardisation de l’Antibiogramme en Médecine Humaine à l’Échelle Nationale selon les recommandations de l’OMS. 5^{ème} Edition. Ed Ministère de la Santé. *De la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie.*

Rahimi, M. (2015). Chemical and Medicinal Properties of Saffron. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 4 : 69-81.

S

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci Technol Int* 4:391–399.

Serrano-Díaz, J., Sanchez, A., Martínez-Tome, M., Winterhalter, P., Alonso, G. (2014). Flavonoid Determination in the Quality Control of Floral Bioresidues from *Crocus sativus L.* *Journal Agricultural Food Chemistry*, (62): 3125-3133.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *The American Journal Enology and Viticulture*, 16 : 144–158

Sylvia, V. (2019). Femme actuelles, les 6 vertus santé du safran. <https://www.google.com/amp/s/www.femmeactuelle.fr/sante/alimentation-equilibree/les-6-vertus-sante-du-safran>

V

Vanaclocha, B., Cañigüeral, S. (2003). Fitoterapia: Vademécum de prescripción, 4^{ème} Edition, Masson, p 25.

W

Références bibliographiques

Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites.
Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites, 2(3): 251-286.

الزعفران "*Crocus sativus*" هونبات من عائلة Iridaceae، وقد عُرِفَت فوائده العلاجية منذ العصور القديمة، ويستخدم في الطب التقليدي وفي العديد من مستحضرات الطهي بفضل ثرائه في الجزيئات النشطة بيولوجيًا.

يتمثل عملنا في تقييم هذا النبات، وخاصة الزهور التي تعتبر من مخلفات إنتاج الزعفران تم تحديد كمية محتويات الفينولات الكلية، الفلافونويد، الفلافونول، الأنثوسيانين والعفص المتحلل بالماء والمكثف وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والميكروبات للمستخلصات المائية الميثانولية للوصمات والأزهار. يتم تقييم دراسة القوة المضادة للأكسدة من خلال أربع طرق: القدرة الكلية المضادة للأكسدة (CAT)، ونش الجذور الحرة (DPPH)، و تثبيط الحديد، وتثبيط تبيض البيتاكاروتين. ووفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها، أظهر التقدير الكمي لهذه المركبات أن مستخلص الوصمات غني بالفينولات والفلافونولات الكلية، بينما مستخلص الأزهار غني بالعفص المتحلل والمكثف والأنثوسيانين.

أظهر المستخلصان خصائص مختلفة من مضادات الأكسدة التي يحتفظ مستخلص الأزهار منها بالمحتوى العالي من إجمالي القدرة المضادة للأكسدة (3.860 ± 69.792 مع EAA / غ DM) وهو أكثر نشاطًا في تثبيط تبيض β -كاروتين (مع / مل $EC_{50} = 0.028 \pm 0.005$). فيما يتعلق بالقوة المضادة للميكروبات، يحتوي كلا المستخلصين على عوامل مثبطة للجراثيم ضد سلالات جرام + وهي العنصرية الرقيقة، ميكروكوكس لوتس و بكتيريا سيريريوس العنصويه. لذلك، تعتبر أزهار الزعفران مصدرًا طبيعيًا للأيضات الثانوية التي لها أنشطة بيولوجية والتي لا يزال يتعين استغلالها.

الكلمات المفتاحية: *Crocus sativus* ، مستقلب ثانوي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات

Résumé

Le safran « *Crocus sativus* » est une plante de la famille des iridacées. Ses vertus thérapeutiques sont connues depuis l'antiquité, il est utilisé en médecine traditionnelle et dans les différentes préparations culinaires grâce à sa richesse en molécules bioactives.

Notre travail consiste à valoriser cette plante plus particulièrement les fleurs qui sont considérées comme des déchets de la production du safran.

La quantification des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols, en anthocyanes et en tanins hydrolysables et condensés et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques des stigmates et des fleurs ont été déterminées. L'étude du pouvoir antioxydant est évaluée par quatre méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre (DPPH), la réduction du fer et l'inhibition du blanchiment du β -carotène.

Selon les résultats obtenus, l'estimation quantitative de ces composés a montré que l'extrait des stigmates est riche en phénols totaux et en flavonols, alors que l'extrait des fleurs est riche en tanins hydrolysables et condensés et en anthocyanes.

Les deux extraits ont montré des propriétés antioxydantes différentes dont l'extrait des fleurs détient la forte teneur de la capacité antioxydante totale (69.792 ± 3.860 mg EAA/g MS) et il est plus actif à inhiber le blanchiment du β -carotène ($EC_{50}=0.028\pm 0.005$ mg/ml). A propos du pouvoir antimicrobien, les deux extraits contiennent des agents inhibiteurs et bactéricides contre les souches Gram + à savoir *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

Donc, les fleurs du safran constituent une source naturelle en métabolites secondaires qui détiennent les activités biologiques et qui restent d'être exploiter.

Mots clés : *Crocus sativus*, métabolite secondaire, activité antioxydante, activité antimicrobienne

Abstract

Saffron "*Crocus sativus*" is a plant of the Iridaceae family. Its therapeutic virtues have been known since antiquity, it is used in traditional medicine and in various culinary preparations thanks to its richness in bioactive molecules.

Our work consists in enhancing this plant, more particularly the flowers which are considered to be deeds of saffron production. The quantification of the contents of total phenols, flavonoids, flavonols, anthocyanins and hydrolyzable and condensed tannins and the evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of the hydro-methanolic extracts of the stigmas and flowers were determined. The study of antioxidant power is evaluated by four methods: total antioxidant capacity (CAT), free radical scavenging (DPPH), iron reduction and inhibition of β -carotene bleaching.

According to the results obtained, the quantitative estimation of these compounds showed that the extract of the stigmas is rich in total phenols and flavonols, while the extract of the flowers is rich in hydrolyzable and condensed tannins and in anthocyanins.

The two extracts showed different antioxidant properties of which the extract of the flowers holds the high content of the total antioxidant capacity ($69,792 \pm 3,860$ mg EAA / g DM) and it is more active in inhibiting the bleaching of β -carotene ($EC_{50} = 0.028 \pm 0.005$ mg / ml). Regarding the antimicrobial power, both extracts contain inhibitory and bactericidal agents against Gram + strains namely *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*.

Therefore, saffron flowers are a natural source of secondary metabolites which hold biological activities and which remain to be exploited.

Key words: *Crocus sativus*, secondary metabolite, antioxidant activity, antimicrobial activity.