

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen–

-Faculté des Sciences de la nature et de La Vie et sciences de La Terre et
de l'univers-



LMD : 2^o Année –Master Biologie de La Nutrition

Screening Phytochimique de la tige de Safran

❖ Par : **KAZI TANI IKRAM**
AÏSSI SOFIANE

Soutenu publiquement, le 30/06/2022, devant les jurés composés :

MME LOUKIDI.B

- Présidente
- Professeur à l'université de tlemcen

**MME BABA
HAMED.Y**

- Encadreur
- Maître de conférence A à l'université de tlemcen

**MME MERZOUK
AMEL**

- Examinatrice
- Maître de conférence B à l'université de tlemcen

Année Universitaire : 2021/2022.

Remerciement

Nous tenons d'abord à remercier **ALLAH** de tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement notre promotrice madame **Baba Hamed. Y** maitre de conférence à l'Université de Tlemcen, qui a guidée 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 donnée la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants, d'être rigoureuse et enthousiaste.

Nous exprimons toute notre reconnaissance au Madame **Loukidi B**, MCA à l'université de Tlemcen de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail. Nous le remercions également pour sa compréhension. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.

Nous remercions également l'examinatrice Madame **saidi A**, d'avoir acceptée de faire partie du jury de ce travail. Qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude. Enfin, nous tenons à remercier vivement tous les enseignants du département de Biologie , Université Abu-Bekr de Tlemcen.

Enfin, nous exprimons notre reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés scientifiquement, matériellement et soutenues moralement lors de la rédaction de ce travail, et qui ont contribués au succès de notre travail.

A notre amie et sœur la doctorante Meliani Nouria pour son aide, conseils et son encouragement.

Dédicaces

À l'aide de Dieu tout puissant, nous avons pu réaliser ce modeste travail.

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce travail aux êtres les plus chers qui ont sacrifiés leurs vies pour mon bonheur, qui ont été toujours à mes côtés, dans la joie comme la tristesse, mes parents Djawed et Hadj Slimane Faiza que j'aime énormément.

A mes chers frères « Taha et Islem et Mouhssine ».

A ma chère sœur « Fatima Zohra ».

A ma belle sœur « Nihel » et ma nièce qui n'est pas encore venue au monde.

A ma grande mère « Baya ».

En reconnaissance de leur affection toujours constante.

A Tous mes proches.

A mes amis « Selma, Sanaa » En souvenir des agréables moments partagés et en témoignage de notre amitié

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager, ou simplement me faire sourire.

Ikram.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents «Zine Edine et Naima» sans leur affection, leur sacrifice et leurs prières et amour je ne serais pas arrivé à ce moment. surtout à ma chère mère qui a été avec moi dès le début de mon travail, elle a partagé avec moi mes peines et mes joies et j'espère que ma réussite lui fera plaisir. Les mots ne décrivent pas mon amour et ma gratitude.

A mes quatre chers frères «Mohamed et Amine et youcef et Abdelhak » j'espère que Dieu vous garde et vous montre le droit chemin.

Je ne peux oublier de mentionner tous mes ami(e)s de ma promotion de Biologie de la

nutrition , pour tous les inoubliables souvenirs qu'on a vécus ensemble pendant ces 2

dernières années d'étude de Master .

A toute la famille Aissi

A notre encadreur Baba ahmed yamina

A mon chère binôme Ikram kazi Tani et sa famille.

A tous ceux qui ont été à mes côtés de près ou de loin.

Soufiane

❖ Liste des Figures

Figure 01: Le crocus sativus linn (ISO/TS,2003).....	5
Figure 02: Plant de Crocus sativus L (López et Al., 2019).....	5
Figure 3: Aspect général de Crocus Sativus (Claire Palomares, 2005).....	6
Figure 4 : Les Feuilles de Crocus Sativus (Claire Palomares, 2005).....	9
Figure 5: Structure du noyau phénol (Achat, 2013).....	12
Figure 6: Squelette de base des flavonoïdes (Korkina 1997).....	13
Figure 7 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).(Sungur et al. 2008).....	14
Figure 8: Structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un tanin hydrolysable. (Moran ,et al 1997).....	14
Figure 9 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (Osman, 2011)..	17
figure10: Tiges de Safran sèches et fraîches.....	20
Figure11: Tiges de Safran fraîches et sèches broyées.....	21
Figure12: L'extraction par macération.....	22
Figure13: L'extraction par infusion.....	23
Figure14: L'extraction par décoction.....	24
Figure15: Extraits de tiges de safrans après évaporation.....	25
figure16: Les extraits obtenus.....	25
Figure17: Courbe étalon d'acide gallique.....	30
Figure18: Teneur en polyphénols totaux des extraits des tiges fraîches de safran.....	31
Figure19: Teneur en polyphénols de l'extrait des tiges sèches de safran.....	31
Figure20: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	32
Figure21: Teneur en flavonoïdes des extraits de tiges fraîches de safran.....	33
Figure22: Teneur en flavonoïdes de l'extrait des tiges sèches de safran.....	33
Figure23: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'évaluation de la capacité antioxydante totale.....	34
Figure24: La capacité antioxydante totale de la tige fraîche de crocus sativus.....	35
Figure25: La capacité antioxydante totale de la tige sèche de crocus sativus.....	35

❖ **Liste des Tableaux :**

Tableau 1: les compositions photochimiques du safran.....7

Tableau 2: Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de crocus.....10

Tableau3 : rendement en extrait sec des différents modes d'extraction et différents solvants.....29

❖ Liste des Abréviations:

- nm: Nanomètre.
- Capacité antioxydante Min: Minutes.
- CAT: totale.
- μ: Micron.
- C.Sativus: Crocus Sativus.
- UV-VIS: Radiations Ultraviolette (visible).
- ED: Eau distillé.
- E+M: 30ml d'eau distillé et 70 ml de méthanol.
- %: pourcentage.
- Kg: Kilogramme.
- Cm: Centimètre.
- ml: Millilitre.
- C°: Degré Celsius.
- g: Gramme.
- H: Heures..
- mM: milli Mole.
- M: Mole.
- DPPH: Diphénylpicrylhydrazyl.

Résumé:

L'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ses effets bénéfiques, mais aussi des complications graves qu'ils peuvent engendrer son utilisation non contrôlée. La tige est l'une des sous-produits du safran les moins étudiés alors qu'elle est riche en composés phénoliques. Le rendement d'extraction de la tige fraîche pour trois techniques montre 44% ED et 42% E+M par macération, 48,2% ED et 46% E+M par infusion, 22% ED et 24% E+M par décoction. Et pour la tige sèche 8% ED et 24% E+M par macération, 34% ED et 36% E+M par infusion, 8% ED et 10% E+M par décoction. La teneur en polyphénols de la tige fraîche sont: 60,53 µg/EAG mg MS par macération ED et 59,47 µg/EAG mg MS par macération E+M, 52,57 µg/EAG mg MS par infusion ED et 54,32 µg/EAG mg MS par infusion E+M, 46,57 µg/EAG mg MS par décoction ED et 36,68 µg/EAG mg MS par décoction E+M. Et pour la teneur de la tige sèche est 24,49 µg/EAG mg MS par infusion ED et 10,88 µg/EAG mg MS par infusion E+M. la teneur en flavonoïdes de la tige fraîche 76,32 EC/mg MS par macération ED et 74,93 EC/mg MS par macération E+M, 24,17 EC/mg MS par infusion ED et 42,35 EC/mg MS par infusion E+M, 84,99 EC/mg MS par décoction ED et 46,72 EC/mg MS par décoction E+M. Et pour les teneurs de la tige sèche est 76,98 EC/mg MS par infusion ED et 37,93 EC/mg MS par infusion E+M. Le test CAT confirme la capacité antioxydante des molécules bioactives de la tige de safran. En conclusion, nos résultats démontrent la richesse des extraits de la tige en molécules bioactives et confirment que les méthodes d'extraction jouent un rôle très important dans l'étude des polyphénols. De plus, les polyphénols de la tige peuvent être utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, l'alimentation des animaux, la parapharmacie et dans plusieurs autres domaines importants.

Mots clés : pétale de safran, extraction ,polyphénols, capacité antioxydante.

Abstract:

The use of a plant in full safety requires a knowledge not only of its beneficial effects, but also of the serious complications which they can generate its uncontrolled use. The stalk is one of the least studied by-products of saffron although it is rich in phenolic compounds. The yield of extraction of the fresh stem for three techniques shows 44% ED and 42% E+M by maceration, 48,2% ED and 46% E+M by infusion, 22% ED and 24% E+M by decoction. And for the dry stem 8% ED and 24% E+M by maceration, 34% ED and 36% E+M by infusion, 8% ED and 10% E+M by decoction. The polyphenol content of fresh stem are:60.53 μ g/EAG mg MS by ED maceration and 59.47 μ g/EAG mg MS by E+M maceration, 52.57 μ g/EAG mg MS by ED infusion and 54.32 μ g/EAG mg MS by E+M infusion, 46.57 μ g/EAG mg MS by ED decoction and 36.68 μ g/EAG mg MS by E+M decoction. And for dry stem content is 24.49 μ g/EAG mg MS by ED infusion and 10.88 μ g/EAG mg MS by E+M infusion. The flavonoid content of fresh stem 76.32 EC/mg MS by ED maceration and 74.93 EC/mg MS by E+M maceration, 24.17 EC/mg MS by ED infusion and 42.35 EC/mg MS by E+M infusion, 84.99 EC/mg MS by ED decoction and 46. 72 EC/mg MS by decoction E+M. And for the contents of the dry stem is 76,98 EC/mg MS by infusion ED and 37,93 EC/mg MS by infusion E+M. The CAT test confirms the antioxidant capacity of the bioactive molecules of the saffron stem. In conclusion, our results demonstrate the richness of the stem extracts in bioactive molecules and confirm that the extraction methods play a very important role in the study of polyphenols. Moreover, the polyphenols of the stem can be used in the field of agri-food, animal feed, parapharmacy and in several other important fields.

Key words: saffron petal, extraction, polyphenols, antioxidant capacity.

ملخص:

يتطلب الاستخدام الآمن للنبات معرفة ليس فقط بآثاره المفيدة ، ولكن أيضاً بالمضاعفات الخطيرة التي يمكن أن تنشأ من استخدامه غير المنضبط. القصبية هي واحدة من أقل المنتجات الثانوية التي تمت دراستها من الزعفران على الرغم من كونها غنية بالمركبات الفينولية. يظهر محصول استخراج الجذع الطازج لثلاث تقنيات DE %44 و E + M %42 بالنقع ، 48.2% DE و E + M %46 بالتسريب ، 22% DE و E + M %24 عن طريق ديكوتيون. وللجذع الجاف 8% ED و 24% E + M بالنقع ، 34% ED و E + M %36 بالتسريب ، 8% ED و E + M %10 عن طريق ديكوتيون. محتوى البوليفينول للساق الطازج هو: 60.53 ميكروغرام / EAG ملليجرام DM بواسطة نقع الضعف الجنسي و 59.47 ميكروغرام / EAG ملليجرام DM بواسطة نقع 52.57 ، E + M ميكروغرام / EAG ملليجرام DM عن طريق التسريب ED و 54.32 ميكروغرام / EAG ملليجرام DM لكل E + ضخ 46.57 ، M ميكروغرام / EAG ملغ DM لكل ديكوتيون ED و 36.68 ميكروغرام / EAG ملغ DM لكل مغلي E + M. وللمحتوى الجذعي الجاف هو 24.49 ميكروغرام / EAG ملغ MS لكل تسريب ED و 10.88 ميكروغرام / EAG ملغ MS لكل تسريب E + M. محتوى الفلافونويد للساق الطازج EC / mg DM 76.32 عن طريق النقع ED و EC / mg DM 74.93 بواسطة E + M ، النقع ، 24.17 EC / mg DM عن طريق التسريب ED و EC / mg DM 42.35 لكل تسريب EC ، 84.99 E + M ، EC / mg DM لكل مغلي ED و EC / mg DM 46.72 لكل E + M ديكوتيون. ومحتويات الجذع الجاف هي EC 76.98 mg DM / بالتسريب ED و EC / mg DM 37.93 عن طريق التسريب E + M. يؤكد اختبار CAT القدرة المضادة للأكسدة للجزيئات النشطة بيولوجياً في ساق الزعفران. في الختام ، تظهر نتائجنا ثراء مستخلصات الساق في الجزيئات النشطة بيولوجياً وتؤكد أن طرق الاستخراج تلعب دوراً مهماً للغاية في دراسة البوليفينول. بالإضافة إلى ذلك ، يمكن استخدام البوليفينول الجذعي في صناعة الأغذية والأعلاف الحيوانية والصيدلة والعديد من المجالات المهمة الأخرى.

الكلمات المفتاحية: بتلات الزعفران ، الاستخلاص ، البوليفينول ، القدرة المضادة للأكسدة.

Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Généralités sur Le Safran:.....	4
1.1 Définition	4
1.2 Description de la plante.....	5
1.3 La composition phytochimique du Safran.....	6
1.4 Activités biologiques du Safran.....	6
2. Tiges de Safran.....	8
2.1 Définition de la tige	8
2.2 Caractérisations.....	8
2.3 Applications.....	9
2.4 La composition phytochimique de la tige.....	9
3. Les molécules bioactives.....	10
3.1 Généralité sur les polyphénols.....	10
3.2 Classification des composés phénolique.....	11
3.2.1 Composés phénoliques simples.....	11
3.2.1.1. Flavonoïdes.....	11
3.2.1.2. Les acides phénoliques.....	12
3.2.1.3. Alcools phénoliques.....	12
3.2.2. Composés phénoliques complexes.....	13
3.2.2.1. Les tanins.....	13
4. Les antioxydants	14
4.1 Classification des antioxydants.....	14
4.2 Les méthodes de mesuré l'activité antioxydante.....	15
4.2.1 Test du piégeage du radical libre (DPPH).....	15
4.2.2 Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	16
Test de la capacité anti antioxydante totale.....	17

Matériel et méthode.....	18
1. Matériel végétal	19
Récolte et préparation des extraits	19
2. Méthodes	20
2.1. Extraction solide-liquide	20
2.2. Types d'extraction	20
2.2.1. Macération	20
2.2.2. Infusion	21
2.2.3. Décoction	22
3. Calcul du rendement des extraits	24
4. Dosage des molécules bioactifs des extraits	24
4.1. dosage des polyphénols totaux.....	25
4.2. dosage des flavonoïdes.....	25
5. capacité antioxydante totale(CAT).....	26
Résultats et interprétation.....	27
2. rendement d'extraction des composés phénolique de la tige de safran.....	28
3. Dosage des molécules bioactives.....	29
2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	29
2.2. Teneur en flavonoïdes.....	31
4. Capacité antioxydante totale.....	32
Discussion.....	36
Conclusion général.....	38
Références bibliographique.....	41

Introduction générale :

Depuis très longtemps, les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne humaine, elles ont toujours occupé une place importante en représentant une source de principe actif inépuisable et renouvelable dans différents domaines à savoir, les domaines alimentaires, médicaux, pharmaceutiques (Teixeira et al., 2012) et sont aussi reconnues pour leurs activités biologiques et leurs effets thérapeutiques, à savoir l'activité antioxydante, anticancérogène et anti-Alzheimer (Rahimi, 2015; Bonni, 2016). Cette importance attire l'attention des consommateurs ce qui a augmenté la demande des produits surtout agroalimentaires au niveau du marché international. Avec l'augmentation de l'utilisation quotidienne, la rareté et le coût élevé, la fraude est devenue un phénomène qui prend de l'ampleur dans le secteur industriel, et ce par la commercialisation de produits modifiés ou avec de fausses modifications pour minimiser le prix (Bouden et Kadri, 2019).

L'Algérie est riche et connue pour ces nombreux produits agricoles, cela est dû à la diversité environnementale, climatique et écologique, qui contribue à la possibilité d'adapter de différentes variétés de plantes dans diverses régions de pays. Cependant il y'a certains produits marginaux qui peuvent être une source de grande relance économique. Parmi ces produits on cite le safran, c'est l'épice produite par le *Crocus Sativus L*, il s'agit en fait des stigmates déshydratés d'une précieuse fleur mauve, qui sont de petits filaments d'une couleur rouge brique. (Halil et Guebli, 2021).

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

Crocus sativus.L est une plante herbacée pérenne appartenant à la famille des Iridacées (Giorgi et al., 2015), elle se propage par voie végétative au moyen d'une corne (Gresta et coll, 2009). Elle possède de grandes fleurs avec un style filiforme divisé en trois stigmates odorants. La récolte de ces fleurs et la séparation des stigmates sont toujours effectuées à la main dans la plupart des zones. (Melnyk et al., 2010).

En plus cette plante est riche en sels minéraux, des vitamines, protéines et d'acides aminés. Il s'agit un antioxydant ; relaxant ; stimule la digestion ; riche en fer, en magnésium est une source de la vitamine B6. (Palomares, 2015).

La couleur, le goût amer et l'arôme constituent les trois traits particuliers de cette épice (Katzer, 2001).

La composition chimique des échantillons de safran de nombreux pays indique que les valeurs déclarées sont fortement dépendantes de la méthode d'extraction et d'analyse quantitative (Orfanou et Tsimidou, 1996).

Aujourd'hui, l'évaluation et l'identification des meilleures méthodes respectueuses de l'environnement pour obtenir de nouveaux produits à partir des sous-produits de l'industrie alimentaire qui sont très recommandés (Bessada, 2018).

L'objectif principal de notre étude est basé sur les méthodes d'extraction les plus efficaces qui permettent l'identification et la quantification de certains groupes chimiques bioactifs contenus dans les différentes préparations d'extraits des tiges de safran, aussi le dosage des polyphénols totaux et déterminer in vitro la capacité antioxydante des tiges fraîches et sèches de la plante *Crocus sativus*. Le but de cette étude est de valoriser les tiges de safran et l'exploiter dans plusieurs domaines comme la nutrition, la cosmétique et la pharmacologie et aussi de réduire la pollution de l'environnement.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

- la première partie présente une synthèse bibliographique sur la plante de *Crocus sativus* et leurs tiges ainsi qu'une synthèse sur les polyphénols et la capacité antioxydante, permettant de définir plusieurs termes abordés dans notre sujet.
- 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 interprétations suivis d'une discussion qui permet de discuter notre résultat trouvé et faire une petite comparaison avec d'autres résultats trouvés par des autres chercheurs.

Enfin nous avons terminé notre étude par une conclusion générale qui résumera l'ensemble de cette étude et donne un petit verre dans le sujet que nous avons travaillé dessus.

Notre travail s'insère dans un projet socio-économique portant sur la valorisation des matières résiduelles du safran.

Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur Le Safran :

1.1 Définition :

Crocus sativus L (Le Safran) est une plante qui appartient à la famille des Iridacées (**Eirini et al., 2015**). Cette fleur possède trois stigmates, utilisés en cuisine comme épice ou comme agent colorant. Le safran, qui fut pendant plusieurs décennies l'épice la plus chère au monde [**T. Hill (2004)**], est originaire du Moyen-Orient [**T. Hill (2004)**]. Il a été cultivé pour la première fois dans les provinces grecques [**H. McGee (2004)**].

Le safran est caractérisé par un goût amer et un parfum proche de l'iodoforme ou du foin, causé par la picrocrocine et le safranal [**H. McGee, op. cit. p. 423**], [**G. Katzer (2001)**].

L'impact économique du safran est important en raison de son prix élevé, car il présente une forte valeur ajoutée. Outre son importance économique se situe également dans le domaine agronomique, environnemental et social (**Mzabri et al., 2019**).

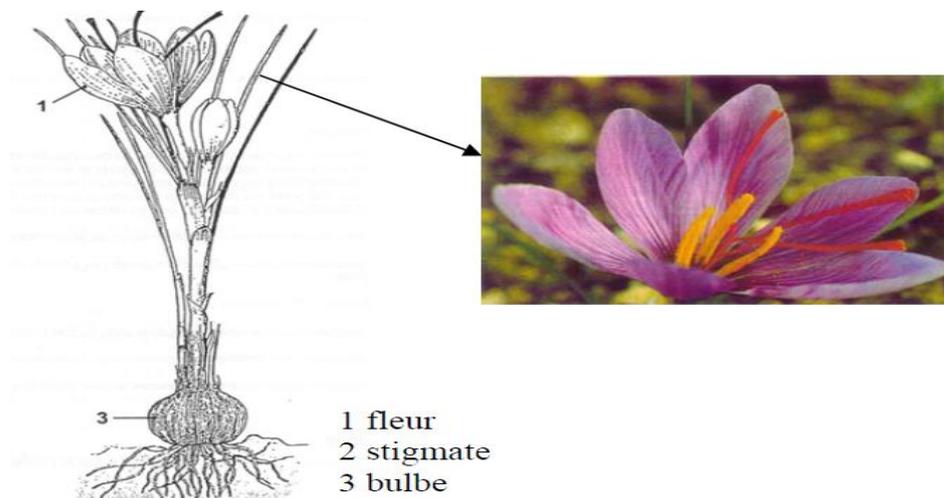


Figure 1. *Le Crocus sativus* Linn, (ISO/TS, 2003).



Figure 02 : Plant de *Crocus sativus* L (López et Al., 2019).

1.2 Description de la plante :

Crocus sativus (Fig.3) est une plante triploïde et géophyte stérile et pérenne (Esmaeili et al., 2010), il se reproduit par multiplication végétative grâce à son corme, organe de réserve ressemblant à un bulbe. Son corme en fait une plante pérenne, vivace puisqu'il lui permet d'emmagasinier des réserves tout au long de l'hiver. Contrairement aux autres espèces du genre *crocus*, *C.sativus* possède comme caractéristique une végétation inversée ; en effet, la floraison a lieu en octobre et novembre alors que la période de dormance se fait durant les mois estivaux (Teusher et al., 2005 in Claire Palomares, 2005).

- Le bulbe (corme).
- Feuilles.
- Fleur.

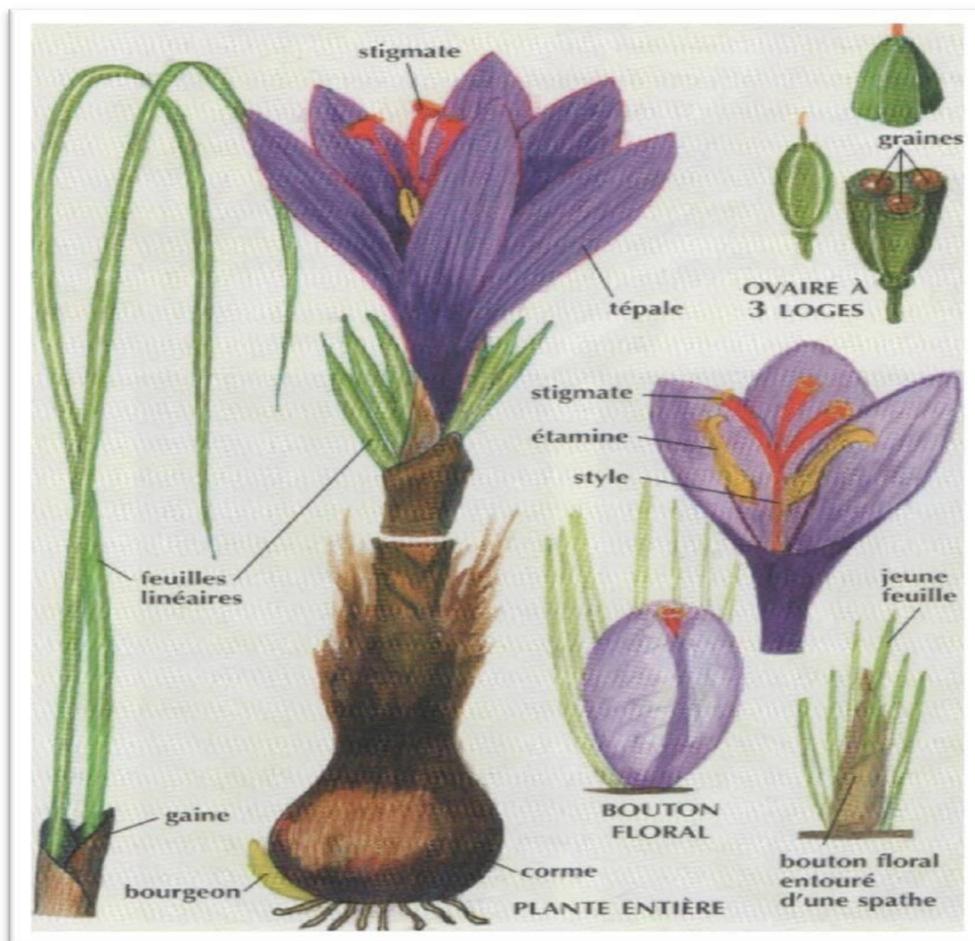


Figure 3 : Aspect général de *Crocus Sativus* (Claire Palomares, 2005)

1.3 La composition phytochimique du Safran :

La composition du safran est très complexe : il contient plus de 150 composés volatils et aromatiques. Le safran possède également plusieurs composés non-volatils, les principaux étant les caroténoïdes. Ces composés ont été identifiés par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Guellil et al., 2017). La lyophilisation peut être appliquée au safran, car aucune perte en composés volatils majeurs n'a été constatée. La détermination de la composition chimique du safran est délicate, car elle suppose une identification botanique correcte, des stigmates non adultérés et sans déchets floraux. Des données moyennes de l'analyse chimique du safran sont indiquées ci-dessous (Guellil K et al., 2017) :

Tableau 1 : les compositions photochimiques du safran.

Composant	Masse (%)
Glucides	12,0–15,0
Eau	9,0–14,0
Polypeptides	11,0–13,0
Cellulose	4,0–7,0
Lipides	3,0–8,0
Minéraux	1,0–1,5
Composants non azotés	40
Huiles essentielles	0,3-2,0

Acides gras : acides palmitiques, stéariques, oléiques, et linoléiques ; caroténoïdes : α , β , et γ -crocétine, **crocine** (10%) -**picrocrocine** (4%), α et β -carotène;lycopène, phytoène et zéaxanthine. Huiles essentielles (0,3 à 2,0%) : où domine le **safranal** (60%). (Guellil K et al., 2017).

1.4 Activités biologiques du Safran :

Depuis l'Antiquité, des vertus thérapeutiques ont été attribuées au safran : antispasmodique, eupeptique, sédatif nerveux et gingival, carminatif, diaphorétique, stomachique, emménagogue et stimulant, (Sampathu et al., 1984). Trop onéreuse, cette épice a été remplacée par des produits de synthèse. En homéopathie, le safran est toujours prescrit pour soigner les troubles circulatoires, les dysménorrhées ou règles douloureuses chez la femme.

Des études récentes ont montré que le safran aurait un intérêt pharmacologique dans plusieurs domaines : cancérologie, maladie neuro dégénérative et rétinopathie (**Abdullaev, 2001**). Le cancer étant la deuxième cause de mortalité dans le monde, l'activité de constituants alimentaires a été évaluée. L'acide ascorbique, l' α -tocophérol, l' α - et β -carotène et la vitamine A ont des activités biologiques reconnues contre cette maladie (**Abdullaev et Frenkel, 1992a**). De nombreuses études ont démontré que les extraits de safran ont un effet anticarcinogène (**Salomi et al., 1991**), et antitumoral in vivo et in vitro (**Abdullaev et Frenkel, 1992b ; Tarantilis et al., 1992 ; Escribano et al., 1996**). Dans les extraits de safran, les caroténoïdes sont les constituants biologiquement actifs. Plusieurs mécanismes ont été proposés (**Abdullaev, 2001**) :

- l'effet inhibiteur du safran sur la synthèse d'acide nucléique.
- l'effet inhibiteur sur les réactions en chaîne des radicaux libres : les caroténoïdes liposolubles agissent comme une protection active contre les radicaux libres
- la conversion métabolique naturelle des caroténoïdes en rétinoïdes
- les propriétés antioxydants du safran

La médecine traditionnelle chinoise indique que le safran était utilisé pour soigner des troubles du système nerveux central. Actuellement, des chercheurs japonais (**Abe et Saito, 2000**), étudient l'effet d'extraits de safran et de ses constituants sur l'apprentissage et la mémoire chez la souris. La crocine est la molécule la plus active. Le safran pourrait être utilisé dans le traitement de maladies neuro dégénératives accompagnées de perte de mémoire.

Le safran a une activité sur les fonctions sanguines et rétinienne. Les résultats de plusieurs études montrent qu'il pourrait être utilisé afin de soigner les troubles sanguins (**Liakopoulou-Kyriakides et Kyriakidis, 2002**) et oculaires tels que la rétinopathie et la dégénérescence de la macula, (**Abdullaev, 2001**).

Le safran possède donc de nombreuses activités thérapeutiques. Les chercheurs se basent actuellement sur les vertus attribuées au safran dans l'Antiquité afin de découvrir les molécules actives de cette épice.

Les stigmates ne représentent qu'une très faible partie de la plante. Pourtant, la fleur, la tige et le bulbe n'ont été que très peu étudiés.

2. Tiges de Safran :

La production de seulement 1 kg de safran génère une énorme quantité de résidus, tels que les déchets de fleurs (350kg), les cormes de mauvaise qualité (plusieurs centaines), et les tiges de crocus (1500kg) qui se dessèchent progressivement sont jetées ou utilisées comme nourriture pour les ruminants (**R. Sánchez-Vioque et Al ...2012**) ces matières premières végétales contiennent également divers composés biologiquement actifs. Ainsi, elles peuvent être considérées comme des sous-produits utilisés pour obtenir des complexes biologiquement actifs ou des matières premières additionnelles pour le développement de médicament à base de la plante. On sait que les tiges de plante peuvent présenter des activités antioxydantes et antibactériennes prononcées, notamment en raison de la présence de composés phénoliques.

2.1 Définition de la tige :

Les tiges sont étroites longues et fines, et d'une longueur de 50 cm et pouvant dépasser un mètre de long. Avec une couleur vert clair à verte foncée. Chaque centime produit 6 à 15 feuilles. Elles sont produites en même temps ou juste après l'apparition de la fleur. (**Blanco et Voligati, 2005**).



Figure 4 : Les Feuilles de Crocus Sativus (Claire Palomares, 2005)

2.2 Caractérisations :

Les composés phénoliques des feuilles de crocus (Tableau 2) ont été étudiés par Bate-Smith, (**Bate-Smith, 1968**), et Williams, (**Williams et al., 1986**), en vue de démontrer leur signification en taxonomie.

Tableau 2. Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de crocus.

Composition	Référence bibliographique
Kaempférol	Williams et al., 1986 Bate-Smith, 1968
Acide caféique	
Acide p-coumarique	Bate-Smith, 1968
Acide ferulique	
Glycoflavones	

2.3 Applications :

Autrefois, les feuilles de crocus étaient utilisées en tant que fourrage pour les animaux. Les vaches laitières appréciaient cette herbe et le lait était de couleur jaune plus intense (**Algrech, 2001**). Une étude a été réalisée (**Valizadeh, 2000**), sur la digestibilité de la matière sèche et organique des feuilles de crocus par des moutons et des chèvres. Il en résulte que les feuilles sont de qualité moyenne pour la nutrition des ruminants. Un apport alimentaire supplémentaire est nécessaire pour une bonne utilisation. Les tiges, et notamment leur pouvoir colorant, ont été peu étudiées et n'ont pas d'utilisation spécifique de nos jours.

2.4 La composition phytochimique de la tige :

Il est connu que les feuilles des plantes peuvent présenter des activités antioxydantes et antibactériennes prononcées, notamment en raison de la présence de composés phénoliques. L'analyse de la littérature a montré que l'étude de la composition chimique de tige de *Crocus sativus* est très limitée (**smolskaite et al., 2011**).

(**Smolskaite et al 2011**) ont analysé 46 échantillons de tiges de *Crocus* provenant d'Azerbaïdjan, d'Inde, de Nouvelle-Zélande, du Maroc, de France, de Turquie, d'Iran, d'Italie et d'Espagne par chromatographie liquide à haute performance avec spectroscopie ultraviolette (UV) (HPLC-UV) et chromatographie liquide avec spectrométrie de masse (LC-MS). Plusieurs flavonoïdes ont été identifiés ; parmi eux, le kaempférol-8-C-gluco-6,3-O-diglycoside et le kaempférol-8-C-gluco-6-O-glucose ont été trouvés pour la première fois. En même temps, les auteurs ont noté que les différents échantillons de feuilles de *Crocus* ne différaient pas en termes de composition chimique, mais différaient de la concentration de chaque composant.

(**Jadouali et al 2018**) n'ont étudié que le contenu total en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les feuilles de Crocus. Composés phénoliques totaux et le contenu total en flavonoïdes dans les feuilles et les fleurs de *C. sativus* du Maroc. La naringénine a été trouvée dans les feuilles de *C. sativus* en utilisant la LC-MS (**Baba et al 2015**), Une analyse qualitative des feuilles de *C. sativus* du Maroc a montré que des dérivés glycosylés de la lutéoline (luteolin-C-(O-caffeoyl-hexosyl)-O-hexoside) et du kaempferol glycosylé (kaempferol3, 7-di-O-glucoside) sont les principaux polyphénols identifiés dans les feuilles (**Lahmass et al 2017**).

Une quantité importante de polyphénols, dont les principaux glycosides sont le kaempférol, la lutéoline et la quercétine, a été déterminée dans les tiges de safran (**sofowora et al ...2013**). Ainsi, les données de la littérature sur la composition chimique des feuilles de *C. sativus* sont très rares et contradictoires.

3. Les molécules bioactives :

3.1 Généralité sur les polyphénols :

3.1.1 Définition :

Les polyphénols sont des produits du métabolite secondaire des plantes, présents dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante, regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules [(**Naczka et Shahidi, 2003**) ; (**Sun et al., 2011**)]. la structure de base des polyphénols est un phénol(**Figure5**).

Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'au moins un cycle benzénique 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 antioxydante (**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**). Allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Akowauh et al., 2004**). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). Ces corps jouent un rôle fondamental, car ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. Que

consomme l'homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert, et al., 2005). L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neuro dégénératives.

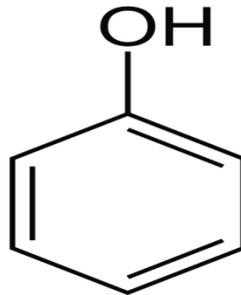


Figure 5 : Structure du noyau phénol (Achat, 2013).

3.2 Classification des composés phénolique :

L'expression « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure, un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Skoula et al., 1996). Ce sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, présent sous forme d'esters de glycosides (Sandhar et al., 2011). Les plus représentants sont les flavonoïdes (Nathalie et al., 2006). On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes. (Pascual-Reguera et All... 1997)

3.2.1 Composés phénoliques simples

3.2.1.1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (Mahmoudi, 1982). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux (Simgil, 1997), qui colorent la plupart des fleurs, des fruits et des graines (Falcone Ferreyra et al., 2012). Ils ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Skoula et al., 1996).

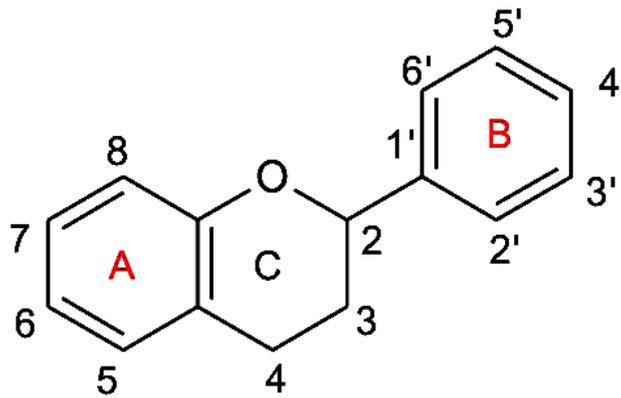


Figure 6: Squelette de base des flavonoïdes (Korkina 1997)

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides. (Afanas'eva et al 2001)

3.2.1.2 Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques constituent la classe majeure des composés phénoliques se trouvent surtout dans les aliments d'origine végétale. Ce sont les composés non-flavonoïdes (ne possèdent pas de squelette flavone) et ils ont une origine commune qui est l'acide aminé aromatique, la phénylalanine. Cet acide aminé est produit à partir du produit à partir du produit final de la voie des shikimates : le chorismate. On distingue deux sous-classes des acides phénoliques : l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Thompson J. C., et Mottola H. A. 1984)

3.2.1.3 Alcools phénoliques :

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) (Fig. 7) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libre ou associée à l'acide élénolique. (Escandar et Sala. 1991) (Chvátalová K., Slaninova I. et al. 2008)

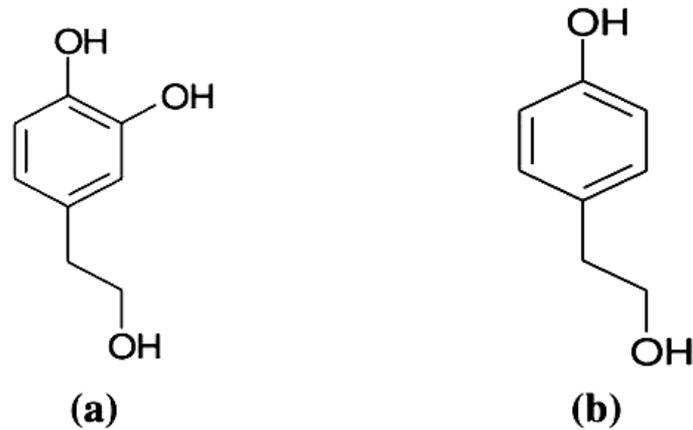


Figure 7 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b). (Sungur et al. 2008)

3.2.2 Composés phénoliques simples complexes :

3.2.2.1 Les tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Karamac M., Pegg R.B. 2009). Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques par leurs propriétés de combinaison aux protéines (Manach C, et al., 2004). Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés. (Figure 8) (Hayakawa F, et al 1997)

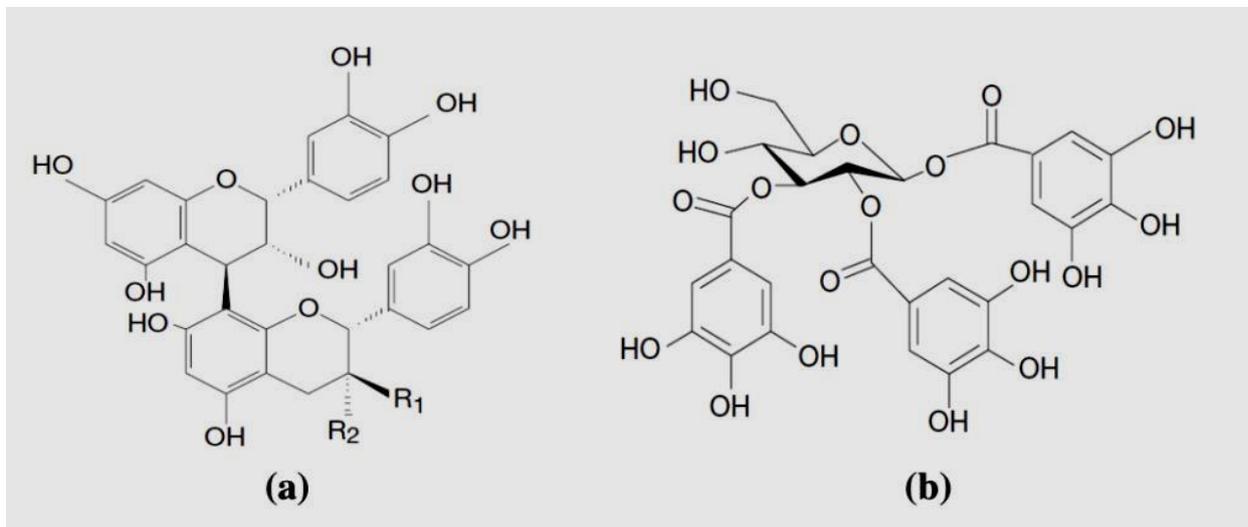


Figure 8 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un tanin hydrolysable. (Moran, et al 1997)

4. Les antioxydants :

Les métabolites secondaires, également appelés phytochimiques, sont des substances produites par les plantes (**Kumar et al., 2014**), ils constituent une classe extrêmement large de substances naturelles qui interviennent de façon déterminante dans l'adaptation des plantes à leur environnement. Leurs applications concernent des domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Croteau et al., 2000**). Cette classe renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologique (**Simgil, 1997**). Parmi ces composés se trouvent les antioxydants, qui sont des molécules qui diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : la neutralisation des radicaux libres ce qui empêche les réactions en chaîne initialisées par ces derniers, la destruction des hydro peroxydes, diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (**Ribeiro et al., 2001**).

Les polyphénols sont parmi les métabolites qui possèdent des capacités antioxydantes importantes. Cette activité est due à leurs propriétés redox leur permettant d'adsorber et de neutraliser les radicaux libres et de piéger les espèces réactives d'oxygènes (**Bathaie et al., 2013**).

4.1 Classification des antioxydants :

Les antioxydants peuvent être classés selon le solvant du milieu en deux groupes de base : **lipophiles et hydrophiles**. Un autre critère de classification des antioxydants est le site de leur origine et la voie de leur pénétration dans l'organisme. De ce point de vue, ils peuvent être classés en : **exogènes**, pénétrant dans l'organisme depuis l'extérieur (**Santrucek et Krepelka, 1988**) et qui sont principalement des dérivés des aliments et des plantes médicinales, tels que les fruits, les légumes, les céréales, les herbes médicinales traditionnelles (**Cai et al., 2004 ; Zhang et al., 2016**), et **endogènes**, synthétisés dans l'organisme et transportés jusqu'au site d'action par le système humoral. Ainsi, les antioxydants peuvent être répartis dans les deux groupes de base suivants : **les antioxydants naturels et les antioxydants synthétiques (Santrucek et Krepelka, 1988)**.

Pour prévenir les dommages oxydatifs, les plantes possèdent un vaste système de défense antioxydant composé d'enzymes et de métabolites tels que des métabolites secondaires (les polyphénols, les flavonoïdes...) et qui participent à la détoxification des ROS sous différents stress environnementaux (**Du et al., 2018 ; Nadarajah, 2020**).

Il a été suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité anti radicalaire (**Yang et al., 2008**). Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités anti oxydantes du fait de la présence de nombreux groupements fonctionnels hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres (**Roudsari et al., 2009**).

Il existe une relation entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres. Les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes sont capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO•), alkoxydes (RO•) et hydroxyle par transfert d'hydrogène (**Morand et Milenkovic, 2014**).

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres tant décrite dans diverses pathologies. Dans le but de pallier le système de défense endogène, les recherches s'orientent dans la découverte de molécules antioxydantes.

4.2 Les méthodes de mesuré l'activité antioxydante :

Sur la base des réactions chimiques impliquées, les principaux tests de capacité antioxydante peuvent être grossièrement divisés en deux catégories : les tests basés sur la réaction de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) et les tests basés sur la réaction de transfert d'électrons simples (ET). Les tests basés sur le transfert d'électron unique impliquent une réaction d'oxydoréduction avec l'oxydant (**Huang et al., 2005**).

Pour mieux évaluer les capacités antioxydantes des extraits de produits naturels, en particulier ceux qui sont fréquemment consommés par les gens, différents tests d'évaluation ont été mis au point (**Xu et al., 2017**). Parmi lesquels :

4.2.1 Test du piégeage du radical libre (DPPH)

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'un des rares radicaux azotés organiques stables, est utilisé pour analyser l'activité antioxydante (**Zaghdoudi et al., 2016**). Le DPPH possède une couleur violette profonde et un maximum d'absorption UV-Vis à 515 nm (**Prior, et al., 2005**). Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Osman, 2011 ; Floegel et al., 2011**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote(**figure9**) (**Popovici et al., 2009**).

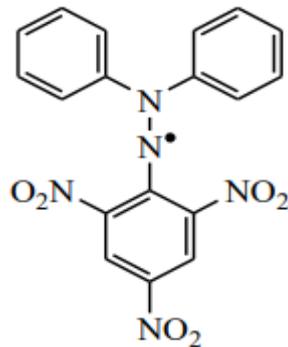


Figure 9 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (Osman, 2011).

Les composés testés (antioxydants) réduisent le radical DPPH de couleur violet intense (à température ambiante) en DPPH-H. Son passage à la forme non radicalaire après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de la coloration violette (Hadj Salem, 2009). Le pouvoir réducteur peut être évalué en mesurant la diminution de son absorbance. Au final, les résultats sont indiqués par la CI50 (Antolovich et al., 2002).



Avec : AH : un antioxydant

La méthode a pour avantages d'être relativement simple et peu coûteuse (prior et al., 2005). Cependant, elle a pour inconvénients que des antioxydants peuvent rester inertes face au DPPH relativement stable. De plus, certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés, et beaucoup d'antioxydants peuvent réagir plus lentement avec le DPPH (Huang et al., 2005).

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupes SH-, NH- et OH-. Le test s'effectue à température ambiante, cela évitera toute dégradation thermique des molécules thermolabiles (Salah et al., 1995).

4.2.2 Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP)

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des produits testés à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) (pellegrini et al., 2003).

Toutefois, la principale limite de cette méthode réside dans le temps de réaction. En effet, le potentiel de plusieurs molécules ne peut être mesuré par FRAP, comme certains phénols qui

réagissent plus lentement et demandent un temps de réaction plus long pour leur détection (30 minutes) (le même inconvénient que pour la méthode ABTS) (Huang et al., 2005). De plus, elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe sulfhydryle SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène (Prior et al., 2005).

4.2.3 Test de la capacité antioxydante totale (CAT)

La méthode est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) en présence d'un agent antioxydant qui favorise la formation de phosphomolybdène vert. Elle est spécifiquement efficace à une température comprise entre 25-37 C°, parce que quelques antioxydants à température plus faible ne sont pas détectés (Hang et Ou, 2002 ; Zheng et al., 2003). Cette méthode est plus utilisée en raison de sa simplicité, pour mesurer la capacité antioxydante d'antioxydants hydrophiles et lipophiles également.

Matériel et Méthode

1. Matériel végétal :

Récolte et préparation des extraits :

La matière végétale utilisée dans cette étude est la tige de *Crocus Sativus*, une plante locale récoltée dans la région d'Ain Fezza, djebel Zaafran, wilaya de Tlemcen en janvier 2022.

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche physiologie physiopathologie et biochimie de la nutrition au niveau de l'université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen pour faire les différentes méthodes d'extraction de la tige de *crocus sativus*.

Les tiges sont divisées en deux parties :

Une partie des tiges ont été séchées à une température ambiante 27°C, puis moulues en poudre fine par un moulin de laboratoire et l'autre partie ont été prises frais, puis moulues en poudre fines.



figure10 : Tiges de Safran sèches et fraîches.



Figure11: Tiges de Safran fraîches et sèches broyées

2. Méthodes :

2.1. Extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide est l'une des travaux les plus anciennes, 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.

2.1. Types d'extraction :

Au cours de notre étude, l'extraction des constituants des tiges de *crocus sativus* fraîches et sèches ont été effectuée dans deux solvants différents (eau distillé et mélange 30ml eau et 70ml méthanol) selon trois méthodes : macération, décoction, infusion.

2.1.1. Macération :

Principe :

C'est une méthode conventionnelle qui consiste à mettre la matière végétale dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou l'huile végétale (macération huileuse), à température ambiante

ou élevée pendant plusieurs heures, ou bien plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle est utilisée pour l'extraction de Plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin, car leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une gélatinisation dans l'eau bouillante. Egalement préférable pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude. Elle concerne les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition.

Mode opératoire :

Dans un bécher versez 5g de tige fraîche de safran dans 100ml d'eau distillé, le mélange est laissé à température ambiante sans agitation pendant 6h.

Nous avons refait le même mode opératoire, en utilisant eau-méthanol (30-70) comme solvant pendant 24h.

Une fois le temps spécifié écoulé pour les deux types de solvants, on a filtré et récupéré le filtrat.

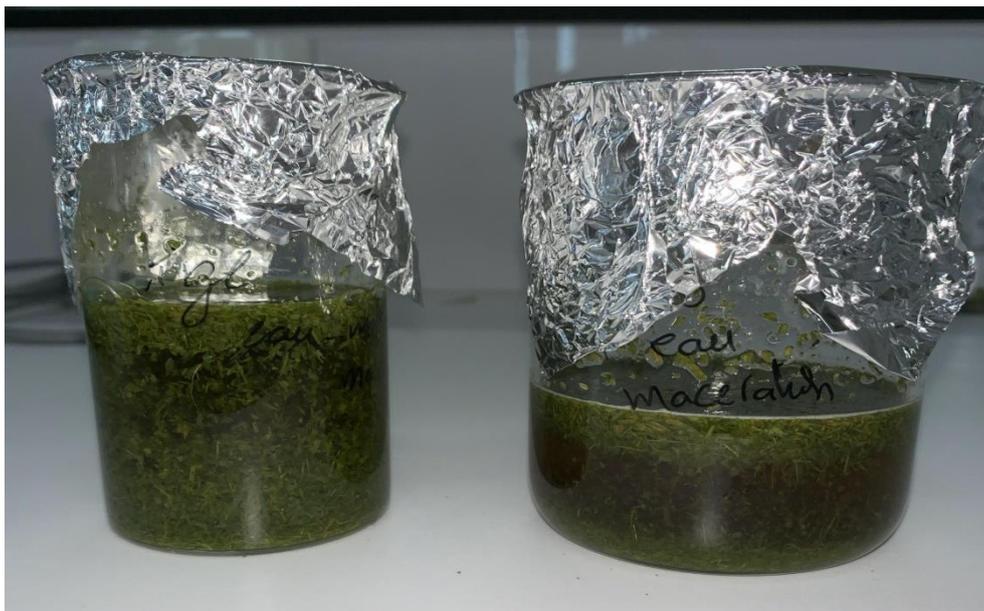


Figure12 : l'extraction par macération.

2.2.2. Infusion :

Principe :

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinaux. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes : feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles. (Kraft, 2004)

Mode opératoire :

Versez 100 ml de l'eau distillée bouillante sur 5g de tige fraîche, agitez le mélange jusqu'à refroidissement et filtrez ce mélange sur du papier filtre.

Nous avons refait le même mode opératoire en utilisant 70ml méthanol et 30ml eau distillée comme solvant.



Figure13 : l'extraction par infusion.

2.2.3. Décoction :**Principe :**

Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches et/ou sèches dans de l'eau pendant 10 à 30min, pour bien extraire ces principes médicinaux et principes actifs non thermolabiles, cette technique est essentiellement utilisée pour l'extraction de matière végétale dur : les racines, bois, écorces, ou des plantes avec des constituants peu solubles. Elle est cependant très rapide et indispensable.

Mode opératoire :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, placé sur une plaque chauffante agitatrice Mélangez 5g de tige fraîche avec 100ml de l'eau distillée, agitez et chauffez jusqu'à ébullition pendant 1 heure.

Laissez le mélange quelque minute jusqu'à refroidissement et filtrez sur du papier filtre.

Refaire le meme mode opératoire en utilisant 70ml méthanol et 30ml eau distillée comme solvant.

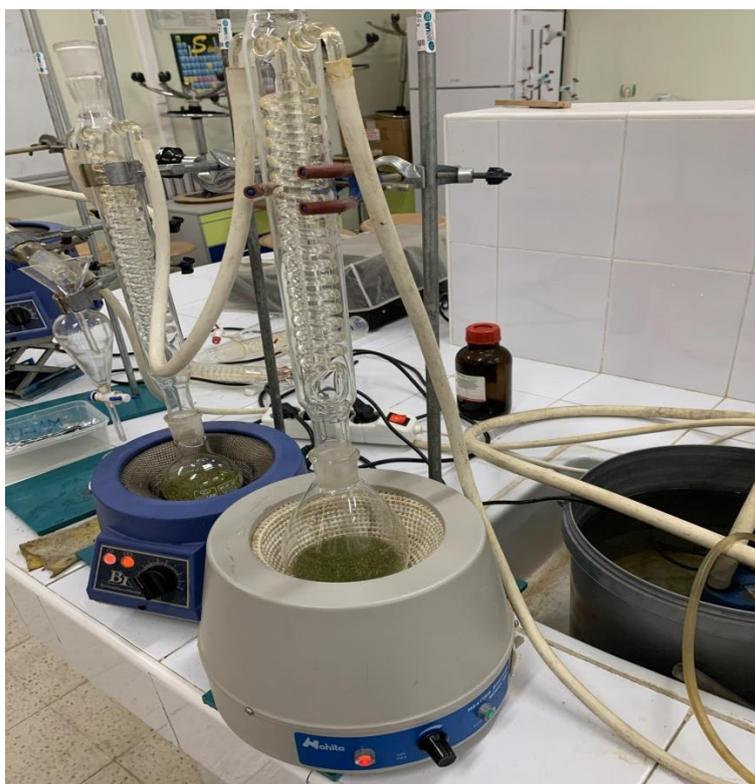


Figure14 : L'extraction par décoction.

Les mêmes modes opératoires sont utilisés pour la tige sèche avec les mêmes solvants.

Les filtrats obtenus pour chaque extraction ont été soumis à une évaporation à l'aide d'une étuve à 37°C, pour faire les dosages suivants.



Figure15 : Extraits de tiges de safrans après évaporation.

3. Calcul du rendement des extraits :

Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage, et correspond au rendement moyen spécifique d'une substance est calculé par la formule suivante : (Falleh, 2008)

$$R(\%) = (M1 / M0) * 100$$

R(%) : rendement en pourcentage.

M1 : masse en gramme du résidu sec obtenu après évaporation du solvant d'extraction.

M2 : masse en gramme de la matière végétale initiale.

On calcule le poids de l'extrait sec par la différence entre le poids du boîte de pétri vide et le poids du boîte de pétri après évaporation.

4. Dosage des molécules bioactifs des extraits :

Les extraits obtenus ont été récupérés dans des tubes à hémolyse en ajoutant de l'eau distillée et en déterminant les concentrations.



figure16 : Les extraits obtenus.

► Après récupération des extraits, nous les avons dilués avec de l'eau distillée en fonction de leur concentration pour réaliser les dosages.

4.1. dosage des polyphénols totaux :

Principe :

Le dosage des polyphénols totaux a un principe qui repose sur les pouvoirs réducteurs des complexes ioniques polymériques formés à partir d'acides phosphomolybdiques ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) "réactif de Folin-Ciocalteu" par des composés phénoliques. Cela se traduit par la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par addition de carbonate de sodium ($NaCO_3$). La dose de phénols totaux est effectuée en comparant l'absorbance observée avec celle obtenue par un étalon acide gallique de concentration connue. (Dif, 2005)

Mode opératoire :

Les polyphénols sont dosés par spectrophotométrie comme suit :

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Singleton, 1965) en y apportant quelques modifications. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 μ l de chaque extrait a été ajouté, avec un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois, et 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium à 7,5 %. L'absorbance est lue à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations.

4.2. dosage des flavonoïdes :

Principe :

Le dosage des flavonoïdes est effectué par la méthode spectrophotométrie au trichlorure d'aluminium et à la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe rose qui est absorbé dans le visible à 510 nm. (Marinova et al., 2005).

Mode opératoire :

Nous avons mis 500 μ L de l'extrait dilué avec 1500 μ L d'eau distillée, suivi de 150 μ L d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 15% et l'incuber pendant 5 min à température ambiante, après 5 min d'incubation nous avons ajouté 150 μ L de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 10% au mélange.

Le tout est laissé pendant 6 min à une température ambiante, à la fin nous avons ajouté 500 μ L d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%.

La courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05/ 0,1/ 0,2/0,3/0,4/ 0, 5/ 0,6/ 0,7 mg/ml). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine en gramme de matière végétale sèche.

5. capacité antioxydante totale(CAT) : Elle est réalisée selon la méthode décrite par (Prieto et al., 1999).

► Nous avons effectué ce dosage afin de déterminer la capacité antioxydante de nos extraits

Principe :

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait végétal. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo(V) qui est de couleur verte.

Mode opératoire :

Versez 300 μ L de l'extrait dilué dans un tube, ajouter 3ml de solution de réactif composé d'acide sulfurique (0.6 M), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM).

Les tubes ont été fermés et incubés à 95°C pendant 90 min, après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV-VIS à 695nm contre le blanc.

La courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif à différentes concentrations.

Résultats et Interprétation

1. Rendement d'extraction des composés phénolique de la tige de safran :

Le calcul des rendements est réalisé pour trois méthodes d'extraction de la tige étudiée (crocus sativus L) concernant la tige fraîche dans l'eau distillée, la tige fraîche dans le solvant méthanol, ainsi que la tige sèche dans le solvant eau distillée et dans le solvant méthanol.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau3 : rendement en extrait sec des différents modes d'extraction et différents solvants.

	Tige fraîche		Tige sèche	
	Rendement %		Rendement %	
	Eau distillée	30ml eau distillée +70 ml méthanol	Eau distillée	30ml eau distillée +70ml méthanol
Macération	44	42	8	24
Infusion	48.2	46	34	36
Décoction	22	24	8	10

Nos résultats montrent que la tige du safran fraîche donne des rendements d'extraction plus importants que ceux de la tige sèche. De plus, les rendements sont plus élevés avec l'eau distillée comparée à l'eau-méthanol pour la tige fraîche, et plus élevée avec l'eau-méthanol comparée à l'eau distillée pour la tige sèche.

En effet, les extractions des tiges du safran par infusion donnent des rendements plus ou moins importants que ceux de la macération et la décoction pour les deux types de tige (fraîche et sèche).

Le rendement d'extraction de l'infusion de la tige fraîche avec l'eau distillée est supérieur à ceux obtenus avec eau-méthanol. Par contre, le rendement d'extraction de l'infusion de la tige sèche avec eau-méthanol est supérieur à ceux obtenus avec l'eau distillée.

2. Dosage des molécules bioactives :

2.1. Teneur en polyphénols totaux :

Les extraits obtenus (aqueux/70ml méthanol et 30ml eau distillée) ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre, pour leurs teneurs des polyphénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique (μg EAG) par milligramme de matière sèche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage.

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 ($y = 0,45485x$) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9909$. (Figure 13).

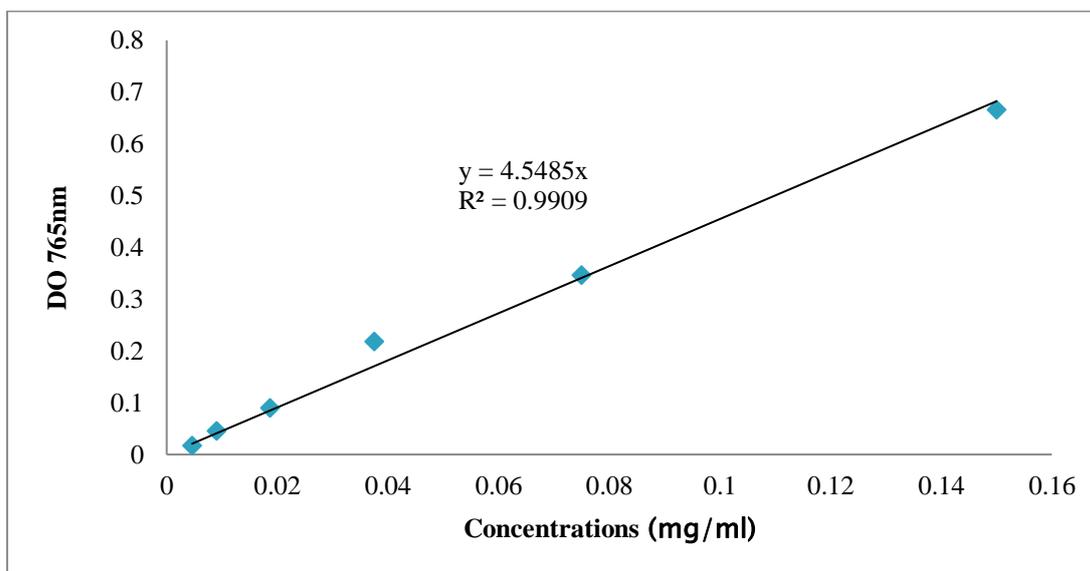


Figure17 : courbe étalon d'acide gallique.

D'après nos résultats nous avons constaté que tous les extraits préparés contiennent des composés phénoliques, mais à des concentrations variables.

Les extraits préparés par macération à partir de la tige fraîche de *c.sativus* présente des concentrations les plus élevées en phénols totaux. Un taux de $60.53\mu\text{g}$ EAG/mg à partir de l'eau distillée qui est supérieur à un taux de $59.47\mu\text{g}$ EAG/mg à partir de mélange E+M, tandis que les extraits préparés par décoction des tiges fraîches de *crocus sativus* présente la plus faible concentration des polyphénols totaux, un taux de $46.47\mu\text{g}$ EAG/mg à partir de l'eau distillée qui est supérieur à $36.68\mu\text{g}$ EAG/mg à partir de mélange E+M. contrairement aux

extraits préparés par infusion qui présente une teneur(54,32 μg EAG/mg) à partir de mélange E+M, et une teneur moins faible(52,57 μg EAG/mg) à partir de l'eau distillée.(figure..).

La figure19 montre que l'extraits des tiges sèche de crocus sativus.L par infusion à partir de l'eau distillée renferme un taux plus élevé en polyphénols (24.49 μg EAG/mg) par apport l'extrait à partir de mélange E+M (10.88 μg EAG/mg).

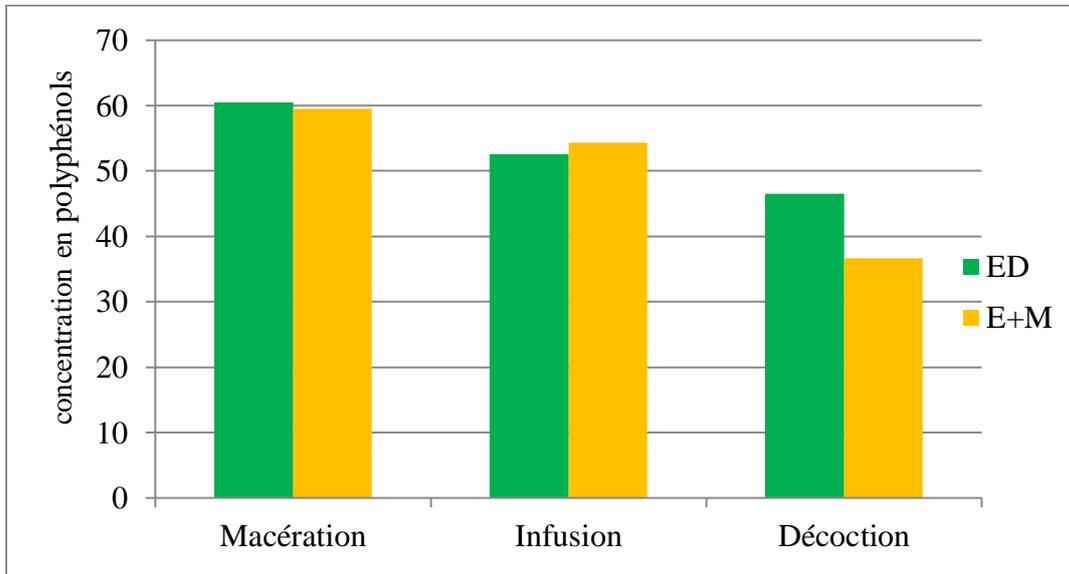


Figure18 : teneur en polyphénols totaux des extraits des tiges fraîches de safran.

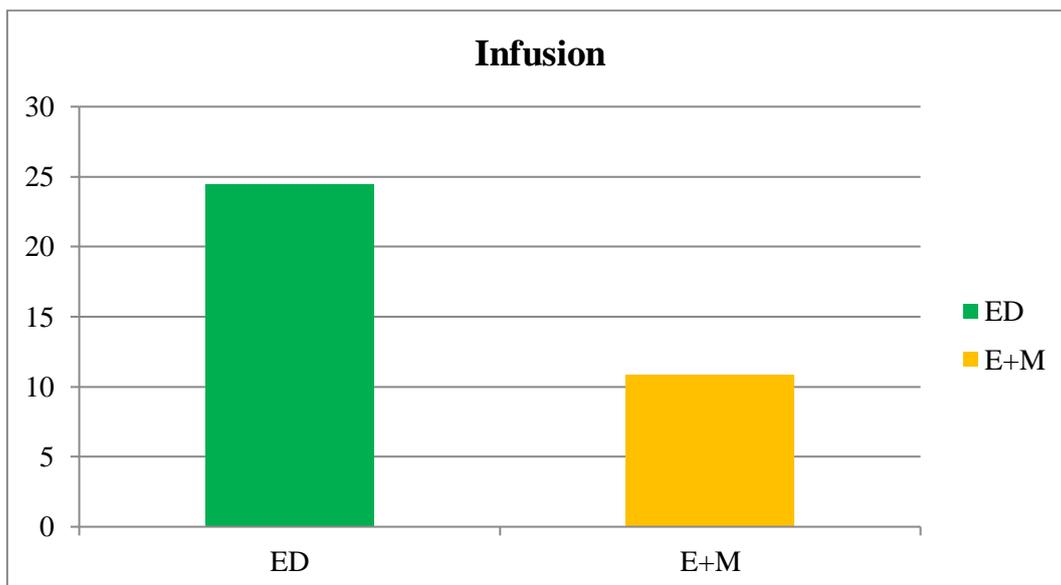


Figure19 : teneur en polyphénols de l'extrait des tiges sèches de safran.

2.2. Teneur en flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode spectrophotométrique au chlorure d'aluminium (AlCl₃). Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes totaux sont exprimés en µg équivalent de catéchine par mg de matière sèche (µg EC/mg MS). Ils sont basés sur la formule de la régression de (de $y=1,1248x$) avec un coefficient de détermination ($R^2=0,9984$), de la courbe $A=f([Catéchine])$ (figure 20).

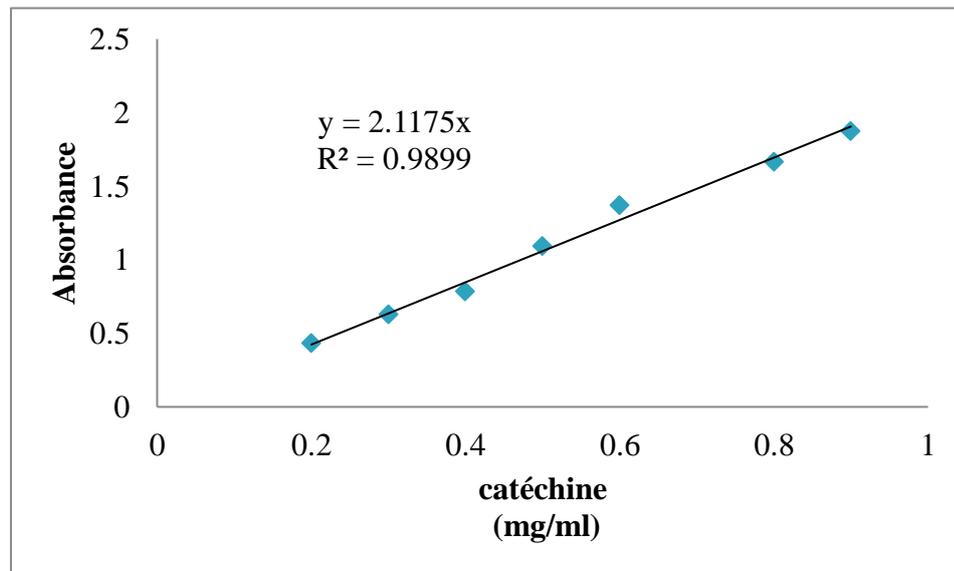


Figure20 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Les quatre extraits préparés: macération et décoction à partir de l'eau distillée et de mélange Eau+Méthanol des tiges fraîches de crocus sativus ont montrés la présence des teneurs plus importante en flavonoïdes avec des concentrations de l'ordre (76,32µg EC/mg MS) à partir de l'eau distillée et 88.26µg EC/mg MS à partir de E+M, 77,64µg EC/mg MS à partir de l'eau distillée et 42.37µg EC/mg MS à partie de E+M) respectivement, dont nous avons remarqués que la teneur enregistrée dans l'extrait E+M de la macération est la plus importante, sauf les extraits préparés par infusion présente des teneurs plus faibles(27.86µg EC/mg MS à partir de l'eau distillée et 33.81µg EC/mg MS à partir de E+M).(figure 21).

La figure 22montre que l'extrait des tiges sèches de crocus sativus.L par infusion à partir de l'eau distillée renferme un taux plus élevé et plus important en flavonoïdes (76.88µg EC/mg MS) par apport l'extrait à partir de mélange E+M (37.93µg EC/mg MS).

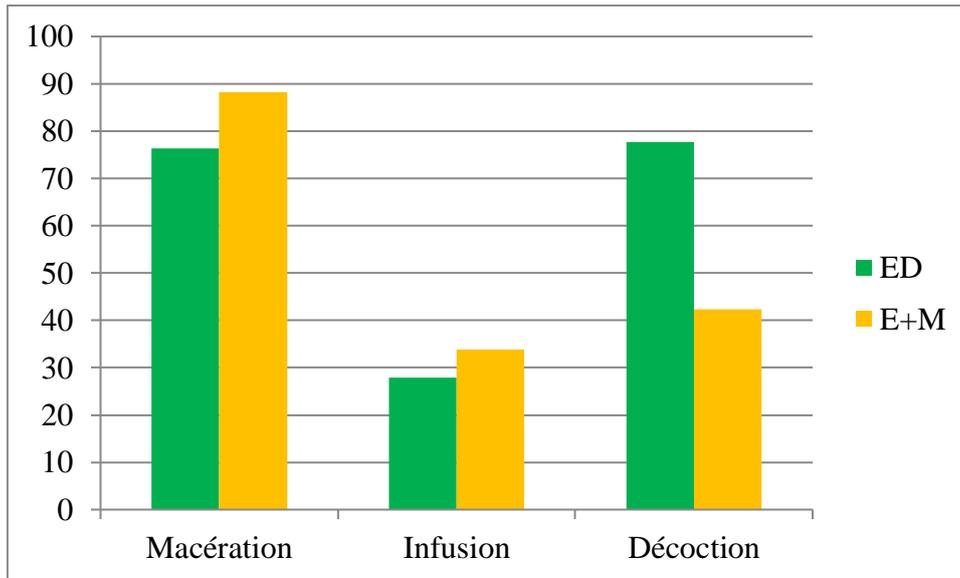


Figure21 : Teneur en flavonoïdes des extraits de tiges fraîches de safran.

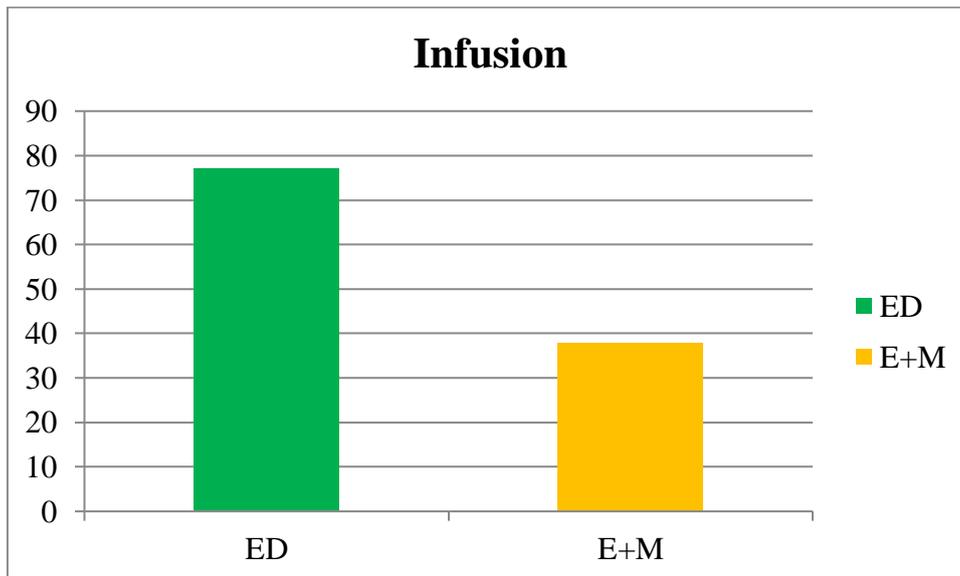


Figure22 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait des tiges sèches de safran.

3. Capacité anti oxydante totale :

La capacité antioxydante totale est déterminée par la méthode de phosphomolybdène. La teneur est estimée grâce à l'équation de la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique ($y = 2,8554x$; $R^2 = 0,9956$) (figure 23). Ensuite, la capacité antioxydante totale a été rapportée en milligramme d'équivalents d'acide ascorbique par g de la matière végétale de départ et/ou par g d'extrait sec.

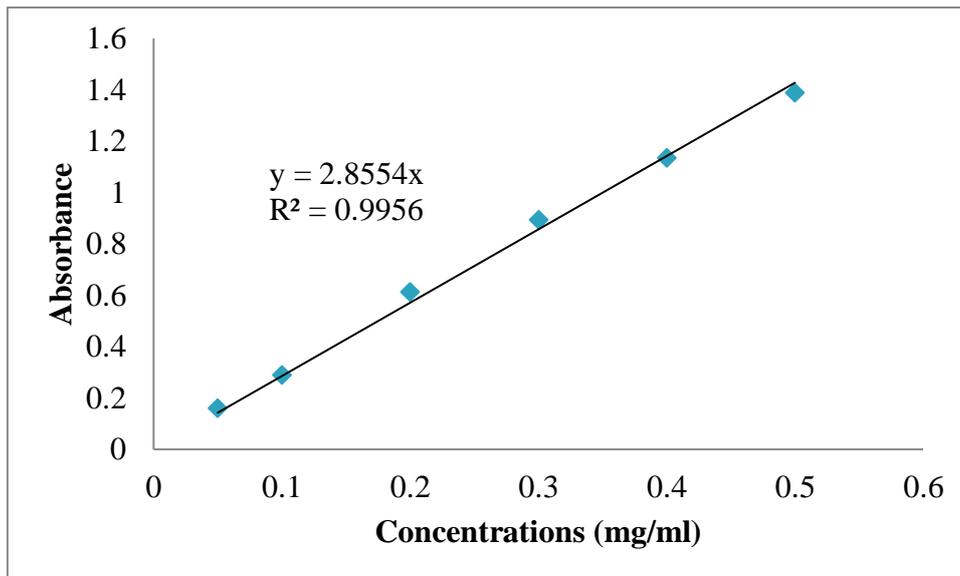


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'évaluation de la capacité antioxydante totale.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits obtenus de la tige fraîche et sèche de *Crocus sativus* ont une capacité anti oxydante totale, mais à des différentes valeurs.

La technique d'extraction par macération de la tige fraîche a manifesté une capacité plus importante par rapport à celle obtenue par infusion, suivi de celle obtenue par infusion à partir de la tige sèche. Par ailleurs la plus faible capacité enregistrée est celle obtenue par décoction à partir de tige fraîche.

D'après les figures 24 et 25 on a remarqué que les extraits du mélange (eau et méthanol) obtenus par macération et infusion à partir de tige fraîche donnent des valeurs plus importantes par rapport à l'extrait aqueux. Contrairement aux extraits obtenus par décoction à partir de la tige fraîche et infusion de la tige sèche qui montre que l'extrait aqueux donne des valeurs plus importantes à celle de mélange eau et méthanol.

La technique d'extraction par macération de la tige fraîche montre que l'extrait du mélange (30ml d'eau et 70ml méthanol) a présenté la capacité la plus importante par rapport aux autres extraits (18,41mg/g), suivi de l'extrait du mélange (eau et méthanol) obtenu par infusion (16,6mg/g) de la tige fraîche, puis l'extrait aqueux obtenu par macération avec une valeur de 10,93mg/g de la tige fraîche, suivie de l'extrait aqueux obtenu par infusion avec une valeur de 9,06 mg/g de la tige sèche. Et puis, l'extrait aqueux par infusion de la tige fraîche avec une valeur de 6,56mg/g, suivit par l'extrait du mélange eau et méthanol par infusion de la tige sèche avec une valeur de 6,36mg/g.

La technique d'extraction par décoction de la tige fraîche qui présente la plus faible capacité antioxydante montre que l'extrait aqueux donne une valeur plus importante (6,34mg/g) par rapport à celle de l'extrait de mélange eau et méthanol (6,18mg/g).

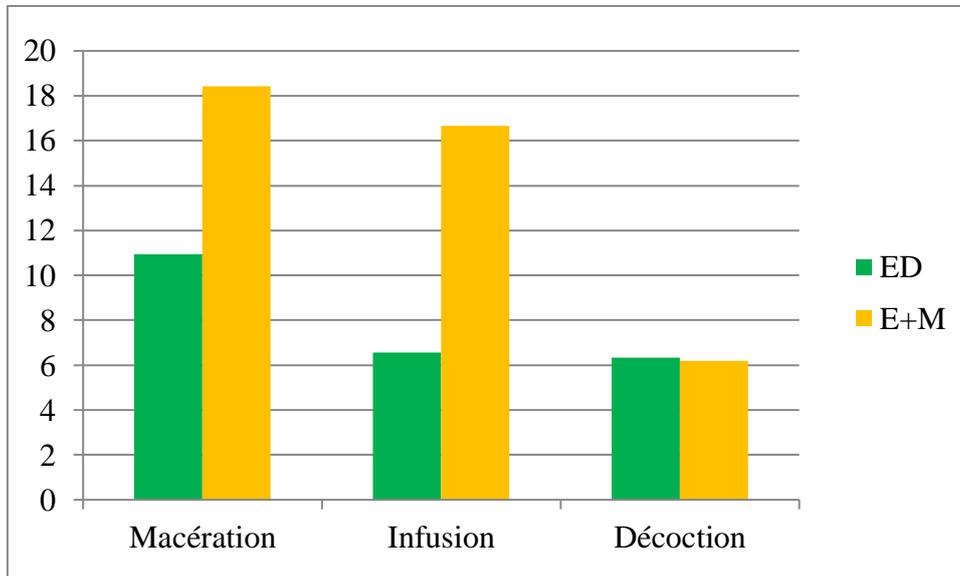


Figure24 : La capacité antioxydante totale de la tige fraîche de crocus sativus.

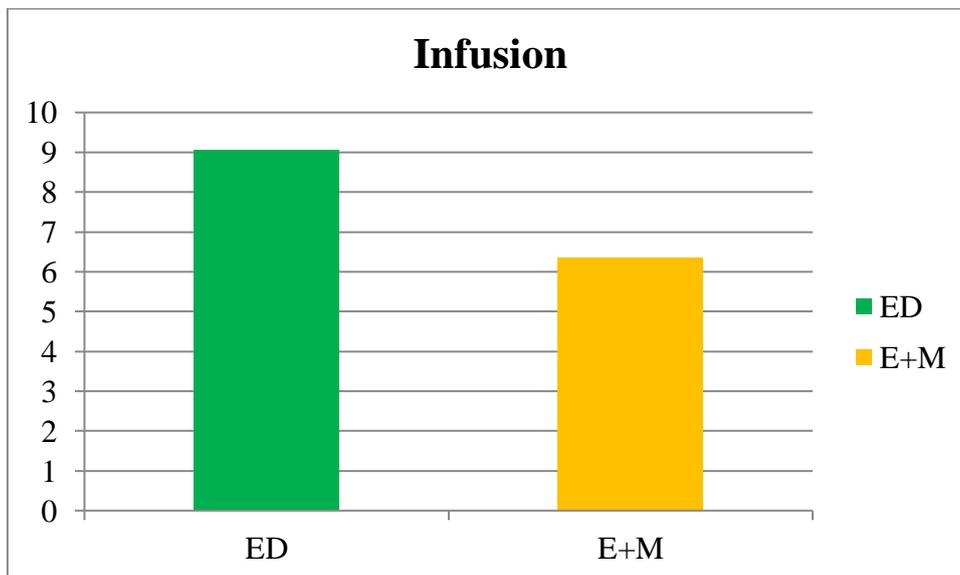


Figure25 : La capacité antioxydante totale de la tige sèche de crocus sativus

Discussion

Ces dernières années, on s'est intéressé aux antioxydants naturels, liés avec leurs propriétés thérapeutiques, qui a augmenté considérablement (**Sanchez; Huang & Prior, 2005**). Notre étude entre dans le cadre de la recherche de composés naturels à activité biologique.

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**). Par conséquent, nous sommes intéressés à évaluer les constituants actifs des extraits de tiges de *Crocus Sativus L* dans le but de la valorisation des matières résiduelles du safran, et connaître la meilleure méthode d'extraction de ces molécules.

En premier lieu, il est capital de noter que les extraits des tiges de safran qui ont servi pour tous les protocoles de notre étude ne sont pas adultérés, ils proviennent de la même safranière dans la plaine d'Ain Fezza. Vu que le séchage est une étape très délicate, toutes les mesures ont été prises pour assurer une bonne déshydratation afin d'empêcher le développement des moisissures ce qui va se répercuter sur sa qualité et par conséquent sur ses propriétés biologiques.

Nous avons dans un premier temps préparé trois méthodes d'extractions dans deux solvants différents, à savoir l'eau distillée et mélange de 30ml d'eau distillée et 70ml de méthanol. Une méthode à froid qui est la macération et deux autres méthodes à chaud qui sont l'infusion et la décoction. Nous avons réalisé ensuite des dosages quantitatifs des six extraits obtenus par des réactions chimiques pour la détermination des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Suivi par une détermination de la capacité antioxydante dans le but de savoir si le système de défense interne sera vaincu.

Nos résultats montrent que le rendement d'extraction de la tige de safran fraîche est plus élevé que la tige sèche, et le rendement le plus élevé a été obtenu par extraction par infusion de la tige fraîche à 48.2 % en utilisant l'eau distillée, et de la tige sèche à 36% en utilisant le mélange Eau-Méthanol. Nous pouvons dire que cette méthode est la meilleure technique qui permet d'extraire le plus de métabolites par rapport aux autres extraits, suivi par la macération et en dernier les décoctions. De plus, l'utilisation du solvant Eau-Méthanol permet une meilleure extraction que l'eau distillée pour la tige sèche seulement (36% contre 34%).

Les résultats de rendement obtenus à partir de la tige de safran sont incompatibles avec les rendements de pétales de safran obtenus par (**Benbrahim et kernabi, 2020**) qu'ils ont trouvé

que le rendement de la décoction est plus élevé par rapport la macération suivie par l'infusion en dernier.

Ceci nous a amenés à mesurer les polyphénols totaux et les flavonoïdes par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement. Les concentrations en polyphénols et flavonoïdes sont différentes selon le type d'extraction et le solvant. En comparant entre les six extraits, nous avons remarqué que l'extrait aqueux de la tige fraîche par macération à froid est le plus riche extrait en polyphénols, soit 60,53 μ g EAG/mg et l'extrait de mélange eau-méthanol de la tige fraîche par macération à froid est le plus riche extrait en flavonoïdes soit 88,26 μ g EC/mg.

(Hosseini et al., 2018) ont travaillé sur les pétales de safran suivant les mêmes méthodes d'extraction, la valeur la plus élevée de polyphénols totaux est celle obtenue par macération, ces résultats sont en accord avec nos résultats et montrent une diminution des concentrations en composés phénolique au niveau de pétales de safran comparés à nos résultats obtenus au niveau de tige de safran. Cependant, la richesse des tiges en ces composés nous incite à une meilleure exploitation de cette richesse.

De même, les concentrations en flavonoïdes au niveau des tiges restent toujours en accord à ceux obtenus au niveau des pétales d'après les études de **(Benmostefa et Guellil, 2017)** et dit que la meilleure technique d'extraction est la macération à froid suivi par la décoction et l'infusion à chaud. La teneur en flavonoïdes au niveau de la tige de safran reste toujours supérieure par rapport à la teneur de flavonoïdes au niveau des pétales.

La richesse des extraits de la tige de safran en polyphénols et en flavonoïdes nous a poussés à rechercher la capacité antioxydante totale in vitro. D'après les résultats, nos extraits ont une capacité antioxydante assez importante, en particulier l'extrait du mélange eau-méthanol obtenu par macération de tige fraîche du safran qui a présenté la capacité la plus élevée avec une valeur de 18,41 mg /ml par rapport aux autres extraits, ce qui peut ouvrir un créneau d'exploitation dans le domaine pharmacologique et cosmétique.

Il apparait clairement que la tige de safran ne doit pas être jetée, mais plutôt utilisée pour l'extraction des molécules bioactives qui peuvent être utilisées comme antioxydants dans le domaine agro-alimentaire, cosmétiques ou en parapharmacie.

Conclusion générale

Le safran est une plante formée de diverses parties anatomiques. Son traitement et sa récolte engendrent des grandes quantités de déchets qui sont généralement rejetées dans l'environnement causant des problèmes écologiques aux pays producteurs de safran. Parmi les résidus résultants, nous nous sommes intéressés à la tige du safran.

D'énormes quantités de tiges de safran, qui n'ont que peu ou pas de valeur commerciale, sont générées lors du traitement de la fleur de safran (stigmaté). Ces déchets agricoles contiennent cependant une grande variété de composants bioactifs dont l'exploitation peut augmenter l'utilisation globale et la désirabilité de cette culture.

C'est pour cela que notre étude est concentrée sur les tiges de safran, dans l'objectif de connaître la meilleure méthode traditionnelle pour l'extraction efficace des composés phénoliques contenus dans la tige de safran.

Dans ce travail, nous avons choisi deux solvants pour extraire les molécules bioactives de la tige de safran, L'eau distillée et un mélange de 30 ml d'eau distillée et 70ml de méthanol, parce que le méthanol est le meilleur solvant qui donne des rendements élevés en polyphénols. Puis nous avons testé leurs activités biologiques in vitro.

Sur la base de nos résultats, on peut dire que la tige de safran est très riche en différents composés métaboliques et présente une bonne activité antioxydante. Elle peut constituer une source importante de composés naturels très intéressants et à usage biologique et thérapeutique importante. De plus, les constituants phytochimiques dont les polyphénols contenus dans la tige de safran sont influencés par la méthode d'extraction, les méthodes les plus efficaces dans ce genre d'extraction sont les méthodes à froid.

Notre travail permet donc de valoriser les tiges de safran et de conclure que les tiges ne sont pas des déchets et ne doivent pas être jetées, ils pourraient être exploités comme une source d'antioxydants et de composés phénoliques afin d'augmenter le rendement de l'organisme. En effet, elle contient des molécules ayant des activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Ces molécules peuvent être extraites et utilisées dans différents domaines.

Ça sera judicieux que notre résultat ouvre de larges perspectives pour d'autres études afin de :

- Évaluer leur activité anti-inflammatoire in vivo en étudiant la toxicité.
- Déterminer les autres composants toxiques constitués dans la tige de safran.

- Faire leur extraction par d'autres méthodes plus développées.
- Évaluation des autres activités antioxydante, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antimicrobienne...etc.
- Pouvoir les utiliser dans le domaine médical comme source de prévention et de traitement

Références bibliographique

A

Abdullaev F I (2001). “Saffron (*Crocus sativus* L.) and its possible role in the prevention of cancer.” *Phytochemistry and Pharmacology II*, 8: 70-82.

Abdullaev F I, Frenkel G D (1992a). “Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis.” *BioFactors (Oxf.)*, 3 (3): 201-204.

Abe K, Saito H (2000). “Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation.” *Phytother. Res.*, 14: 149-152.

Achat S (2013). Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et avec des ions métalliques. (Thèse de doctorat en science). Université A. MiraBejaia. 211p.

Afnas'eva I B, Ostrakhovitch E A, Mikhal'chik EV, Ibragimova G A, Korkina L G (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals *Biochemical Pharmacology*. 61(6): 677-684.

Akowauh G A, Zhari I, Norgyati I, Sadikun A, Khamsah S M (2004). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Foodchemistry*, 87: 559-566.

Algrech C (2001). “Le safran du Quercy.” *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27; 9-16; 18-26.

Antolovich M, Prenzler P D, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127(1), 183–198.

<https://doi.org/10.1039/b009171p>

B

Bate-Smith E C (1968). “Phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. II. Monocotyledons.” *J. Linn. Soc. Lond., Bot.*, 60 (383): 325-356.

Bathaie S, Zahra, Reyhane Hoshyar, Majid Sadeghizadeh (2013) Crocin Triggers the Apoptosis Through Increasing the Bax/Bcl-2 Ratio and Caspase Activation in Human Gastric Adenocarcinoma, AGS, Cells DNA AND CELL BIOLOGY Volume 32, Number 2, 2013 ^a Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 50–57 DOI: 10.1089/dna.2012.1866 .

Bessada S M (2018). coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics* , 5, 5.

Bonnin A L (2016). Autour du café (Thèse pour le diplôme de docteur en pharmacie, université agers. 16. Boulevard Daviers-49045 ANGER), 85.

Bouden H, Kadri A (2019). Contrôle de qualité du café et du safran. (Mémoire de master, université Blida 1, Blida). 1-12.

Bruneton J (2009). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} édition. Lavoisier Technique & Documentation. Médicales internationales, Paris, p261, 308, 571.

C

Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>.

Chvátalová K., Slaninova I. et al. (2008). Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*. 106(2):650-660.

Croteau Rodney and Toni M. Kutchan and Norman G. Lewis (2000) Natural Products (Secondary Metabolites) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. 2000, American Society of Plant Physiologists.

D

Du, B., Kreuzwieser, J., Winkler, J. B., Ghirardo, A., Schnitzler, J. P., Ache, P., Alfarraj, S., Hedrich, R., White, P., & Rennenberg, H. (2018). Physiological responses of date palm (*Phoenix dactylifera*) seedlings to acute ozone exposure at high temperature. *Environmental pollution (Barking, Essex :1987)*, 242(PtA), 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.059>

E

Eirini, C., Nikolaos, P., kolaos, K., et Georgia, V. 2015. Saffron

Escandar G.M., Sala L.F. (1991).Complexing behavior of rutin and quercetin. *Canadian Journal of Chemistry*. 69(12): 1994-2001.

G

Giorgi A, Bertoni D, Manzo A & Panseri S. (2015).L'oro Rosso delle Alpi. Biblion Edizioni. Manuel technique-scientifique de production de papier peint.

G. Katzer (2001),“Saffron (*Crocus sativus* L.)” . Mzarbi, I., Addin, M., et Berrichi, M. 2019. Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*). *Laboratory of Biology of Plants and Microorganisms, Faculty of Sciences*, B. P. 717, Oujda 60000, Morocco ; *Cosmetics*, Vol. 12 n° 63, p. 1-2-3-4-6-7.

Gresta F, Avola G, Lombardo GM, Siracusa L & Ruberto G. (2009). Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by conditions. *Université de Italy* 119 : 320–32.

Guellil (2017). ASDA: Analyseur Syntaxique du Dialecte Algérien dans un but d'analyse sémantique. arXivpreprint arXiv:1707.08998.

Guellil K., Azouaou F., Abbas M., & Fatiha, S. (2017).Arabizi transliteration of Algerian Arabic dialect into Modern Standard Arabic. Paper presented at the Social MT 2017/First workshop on Social Media and User Generated Content Machine Translation.

H

Hadj Salem, J. (2009). Extraction, Identification, caractérisations des activités biologiques de flavonoïde de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. (INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE)

HALIL Khadouma Nassima et GUEBLI Feyrouz (2021) Etude technico-culturelle de safran *Crocus sativus* L. dans la région de Hamadia, Tiaret.

Hayakawa F., Kimura T., Maeda T., Fujita M., Sohmiya H., Fujii M., Ando T. (1997).

DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1336(2):

H. McGee (2004), *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen* (<http://books.google.com/books?ie=UTF-8&hl=en&id=iX05JaZXRz0C>), Scribner, p. 422, ISBN 0-684-80001-2 .H. McGee, op. cit., p. 423

Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2003). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841–1856

Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841–1856.

<https://doi.org/10.1021/jf030723c>

I

ISO/TS (2003). “Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai.” Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2.

K

KARAMAC MAGDALENA AND PEGG RONALD B. (2009) Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, Poland, and Department of Food Science & Technology, The University of Georgia, 100 Cedar Street, Athens, Georgia 30602-7610 .

Katzer G. (2001). Saffron (*Crocus sativus* L.). ([http:// www. uni-graz. at/ ~katzer/ engl/ Croc_sat. html](http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Croc_sat.html)), Gernot Katzer's Spice Pages.

Korkina L.G., Afanas'ev I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151–163.

Kumar and Matthew A. Killingsworth and Thomas Gilovich (2014) Cornell University; 2 University of California, Berkeley; and 3 University of California, San Francisco.

L

Liakopoulou-Kyriakides M. et Kyriakidis D. A. (2002). “*Crocus sativus*-biologically active constituents.” *Studies in Natural Products Chemistry*, 26 (Bioactive Natural Products, (Part G)): 293-312.

López, María José Bagur, Cándida Lorenzo, M.E. Martínez-Navarro, M. Rosario Salinas and Gonzalo L. Alonso Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. Flower Natalia Moratalla-2019.

M

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).

MANACHa CLAUDINE and JENNIFER L. DONOVANb (2004) Pharmacokinetics and Metabolism of Dietary Flavonoids in Humans a Unité des Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA, 63122 Saint-Gene's Champanelle, France; b Laboratory of Drug Disposition and Pharmacogenetics, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA Accepted by Professor B. Halliwell (Received 13 May 2004) .

Martin, S., Andriantsitohaina, R.(2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304–315.

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

Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). (Thèse Docteur de l'université d'Orléans). Université D'ORLÉANS. 286p.

Moran J.F., Klucas R.V., Grayer R.J., Abian J., Becana M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 22: 861–870.

Morand, C., Milenkovic, D. (2014). Polyphénols et santé vasculaire : mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*, 42, 47-62

N

Naczek et M. Shahidi, F., (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC press.

Nathalie and Guingand Yannick and Bourgeois Caroline and Durand Sandrine and Fromageot Claude and Combe Corinne and Ferret Pierre-Jacques * Yves-Rocher Research and Development, Worldwide Safety Department, 101 quai du Président Roosevelt, 92444 Issy les Moulineaux, France Received 4 March 2006; accepted 29 August 2006 .

O

Orfanou O & Tsimidou M. (1996). Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV-Vis. *Food chemistry*, Vol. 51, No. 3: 463-469.

Osman A M (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) with (+) -catechin : evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH· and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(3), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.123>

P

Palomares C (2015). Le safran, précieuse épice ou précieux médicament ? (Doctoral dissertation, Université de Lorraine) Université de Lorraine., Sciences pharmaceutiques. hal-01732922, France.

Pascual-Reguera P, Ortega-Barrales A, Molina-Díaz T L F. Capith-Vallveyb a Department of Physical and Analytical Chemistry Faculty of Experimental Sciences, University of Ja&, 23071 Jatk, Spain bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain Received 4 March 1997; received in revised form 27 May 1997; accepted 2 June 1997.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J.Nutr*, 133, 2812-2819.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4, 25-39.

Prior R L, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

R

Rahimi M (2015). Chemical and Medicinal Properties of Saffron. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 4 (3): 69-70-72-73-78-81.

Ribeiro Carla E, Bradley M, Lamm and Tracey C, Vlahovic and Gary R, Bauer and Howard J, Hillstrom, PhD Peg-in-Hole, End-to-End, V Arthrodesis A Comparison of Digital Stabilization in Fresh Cadaveric Specimens .

Roudsari M, Chang P, Pegg R, Robert T (2009). Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*, 114, 717-726

R Sánchez-Vioque, M F Rodríguez-Conde, J. V. Reina- Ureña, M. Escolano-Tercero, D.Herraiz-Peñalver, O. Santana-Méridas, Ind. Crop Prod. 2012, 39, 149.

S

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell G P, Rice-Evans CA (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346.

Salomi M J, Nair S C, Panikkar K R (1991). “Inhibitory effects of Nigella sativa and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice.” *Nutr. Cancer*, 16 (1): 67-72.

Sampathu S R, Shivashankar S, Lewis Y S (1984). “Saffron (*Crocus sativus* Linn.) cultivation, processing, chemistry and standardization.” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (2): 123-157.

Sandhar, Mohanjit Kaur, Prashant Tiwari, Manoj Salhan, Pardeep Sharma, Sunil Prasher, Bimlesh Kumar (2011). Lovely School of Pharmaceutical Sciences, Lovely Professional University, Jalandhar-Delhi G.T. Road (NH-1), Phagwara. Punjab (INDIA) 144402 .

Santrucek M, Krepelka J (1988). Antioxidants-potential chemotherapeutic agents. *Drugs Future*, 13(11), 973.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287–306.

SKOULA, CHEDLY ABIDI, EUGENE KOKKALOU (1996). Mediterranean Agronomic Institute of Chania, PO Box 85, 73100 Chania, Greece; tDepartment of Pharmacognosy and Pharmacology, School of Pharmacy, Aristotle University of Thessaloniki, 54006 Thessaloniki, Greece .

Smolskaite L, Talou T, Fabre N, Venskutonis PR. Valorization of saffron industry by-products: Bioactive compounds from leaves. In *Innovations for Food Science and Production, Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2011*, Jelgava, Latvia, 5–6 May 2011; Straumite, E., Ed.; Faculty of Food Technology: Riga, Latvia, 2011; pp. 67–72.

Stalikas C D (2007). Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J sep sci*; 30: 3268-3295.

Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, 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.

Sungur Ş., Uzar A. (2008). Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe (III). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 69(1): 225-229.

T

Teixeira B, Marque A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos, O, Neng N R , Nogueira J M F , Saraiva J A, Nunes M L (2012). Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 7(36) : p. 81-87.

Teusher E, Anton R, Lobstein A. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles.* Lavoisier Ed., Illkirch. 2005, pp.429-435 in Claire

T Hill (2004). *The Contemporary Encyclopedia of Herbs and Spices: Seasonings for the Global Kitchen*, Wiley, p. 272, ISBN 0-471-21423-X .

Thompson James C, Mottola Horacio A (1984) * Department of Chemistry, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma 74078.

V

Valizadeh R (2000). “Utilization of saffron leaves as an animal feedstuff.” *Agricultural sciences and technology*, 14 (1): 3-9.

W

Williams C A, Harborne J B et Goldblatt P (1986). “Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae.” *Phytochem.*, 25 (9): 2135-2154.

X

Xu D P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang J J, Li H B (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants : Extraction, Assessment and Resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.
<https://doi.org/10.3390/ijms18010096>

Y

Yang J, Guo J. Yuan J (2008). Propriétés antioxydantes in vitro de la rutine, *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1060- 1066.

Z

Zaghdoudi K, Framboisier X, Frochot C, Vanderesse, R, Barth D, Kalthoum Cherif J, Blanchard F, Guiavarc'h Y (2016). Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Food chemistry*, 208, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.104>

ZHENG ZHENG CHAO MA, YOUSHENG SHU, , YONG CHEN, HANG YAO, KENNETH W. GREENQUIST, FLETCHER A. WHITE, AND ROBERT H. LAMOTTE (2003) Department of Anesthesiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510 Submitted 19 July 2002; accepted in final form 2 November 2002