

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID –TLEMEN-

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

*Département de Biologie*

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

**Master en Science Alimentaire**

Option : Biologie de la nutrition

**Thème**

**Etude *in vitro* des activités biologiques  
des extraits hydro éthanoliques  
des pétales de safran**

**Présenté par :**

**FANDI Ilhem**

***Présenté le 20 Juin 2024 devant le jury composé de :***

<b>Présidente :</b> Mme LOUKIDI B.	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examinatrice :</b> Mme GUERRICHE A.	MCA	Université de Tlemcen
<b>Promotrice :</b> Mme MOKHTARI N.	Professeur	Université de Tlemcen

**Année universitaire : 2023-2024**

## *Remerciements*

En premier lieu je remercie Dieu, le tout puissant pour ses faveurs et ses grâces, de m'avoir donné le courage et la patience pour mener ce travail durant ces derniers mois.

De plus, mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon encadreur, **Mme MOKHTARI N.** Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté de m'encadrer et de diriger ce présent travail, pour ses conseils et surtout pour m'avoir consacré son temps tout au long de cette période.

Je remercie **Mme MERZOUK H.** Professeur et Directrice du laboratoire **Ppa Bio Nut** pour son accueil au sein de son laboratoire, sans oublier l'ensemble de l'équipe, en particulier la doctorante **Chouiti N.** pour son aide précieuse et ses conseils avisés.

J'exprime mes sincères remerciements à **Mme LOUKIDI B.** Professeur à l'université de Tlemcen, qui a accepté de présider et de juger ce travail de Master.

Aussi je remercie **Mme GUERRICHE A.** MCA à l'université de Tlemcen, de l'intérêt porté à ce travail et l'aide précieuse qu'elle nous a prodiguée et aussi d'avoir accepté de faire partie du jury de ce travail. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Bien sûr, je tiens à remercier vivement tous les enseignants du département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Enfin, mes remerciements vont aussi à mes très chers parents qui m'ont apporté aide et courage pour terminer ce modeste travail.

*Cela semble toujours impossible.  
Jusqu'à ce qu'on le fasse.*

*Nelson Mandela*

## *Dédicace :*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...*

*Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce modeste travail .*

- A ceux qui ont attendu avec patience le fruit de leur éducation, **mes parents**.

Permettez-moi de vous exprimer mon grand amour, mon attachement et ma plus haute considération. Je suis très fière d'être votre fille et de pouvoir enfin réaliser, ce que vous avez tant espéré et attendu de moi.

Vous n'avez jamais cessé de déployer tous vos efforts afin de subvenir à nos besoins, nous encourager et nous aider à choisir le chemin de la Réussite

Votre patience, votre bonne volonté, vos conseils précieux ainsi Que votre confiance en moi ont été pour beaucoup dans ma réussite. Que Dieu vous protège et vous garde.

- A celui qui crois en moi depuis le début, **mon mari**.

Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, merci d'avoir eu confiance en moi, merci de m'avoir supporter dans ses quelques mois de stress, merci d'avoir été patient avec moi, merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour... Je prie dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur et prospérité.

- A mes chers trésors, **Rym, Mehdi et Anes**, mon bonheur et ma source d'inspiration.
- A la seule et unique sœur que j'ai, **Amina** pour ses encouragements et son aide précieuse.
- A mes frères, **Nassim, Riad**, et **Nadir** et belles sœurs
- A mes petits **neveux** et **nièces**.
- A ma **belle-famille** de m'avoir soutenu et encouragé.
- A ma très chère amie et sœur **Faliha** qui m'a toujours soutenu dans les moments difficiles.
- A mon encadreur **Mme Mokhtari N.** qui m'a été d'une très grande aide par sa sagesse et son grand savoir-faire.
- Enfin, merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

FANDI Ilhem ép. SELADJI

## ملخص

يعتبر الزعفران من أعلى التوابل في العالم ويتميز بخصائص طبية مثيرة للاهتمام. تنتج صناعة الزعفران كميات كبيرة من المنتجات الثانوية، بما في ذلك بتلات الزعفران التي تحتوي على مركبات حيوية فعالة ورخيصة ووفيرة، مما يجعلها بديلاً جذاباً لاستخراج المكونات الحيوية الفعالة. تحتوي بتلات الزعفران على مجموعة متنوعة من المركبات الحيوية الفعالة مثل البوليفينولات، الفلافونويدات، والأنثوسيانينات.

تركز دراستنا على الدراسة المخبرية لتأثيرات مستخلص بتلات الزعفران الإيثانولي على الكريات الدموية الحمراء والالتهابات والسمية الخلوية بتراكيز مختلفة 50، 75 و150 ميكروغرام/مل، مع استخدام حمض الجاليك كمرجع. أظهرت النتائج أن التركيز البالغ 50 ميكروغرام/مل هو الأكثر فعالية، حيث تتعرض الخلايا لنسبة منخفضة من السمية مع الحفاظ على تأثيره الواقي على الأغشية الخلوية وتأثير مضاد للالتهابات.

تفتح هذه الخصائص الحيوية الفعالة آفاقاً جديدة لتطوير علاجات طبيعية، كما يساهم استخدام بتلات الزعفران في تحسين استغلال النبات بأكمله، ويدعم البحث عن حلول طبية بديلة ومستدامة.

## الكلمات المفتاحية:

الزعفران، الكروسين، البيكروكروسين، السافرنال، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط السام للخلايا، بتلة الزعفران.

## Abstract

Saffron is one of the world's most expensive spices, with interesting medicinal properties.

The saffron industry produces large by-products, including petals with potential bioactive compounds, which are cheap and abundant, an attractive alternative for the extraction of bioactive components. Saffron petals contain a variety of bioactive compounds (polyphenols, flavonoids, and anthocyanins).

Our work focuses on the in-vitro study of the anti-hemolytic, anti-inflammatory and cytotoxic effects of the ethanolic extract of saffron petals at doses of 50, 75 and 150  $\mu\text{g/ml}$ , with gallic acid as the reference.

The results obtained show that the 50  $\mu\text{g/ml}$  concentration is the most interesting, as it presents a low percentage of cytotoxicity while retaining a protective effect on membranes and an anti-inflammatory effect.

These bioactive properties open up new prospects for the development of natural therapeutic treatments. The valorization of saffron petals optimizes the use of the whole plant, and contributes to the search for alternative and sustainable medical solutions.

**Keywords:** *Crocus sativus. L.*, saffron, crocin, picrocrocin, safranal, anti-inflammatory activity, cytotoxic activity, petal saffron.

## Résumé

Le safran est l'une des épices les plus chères au monde et possède des propriétés médicinales intéressantes.

L'industrie du safran produit de gros sous-produits, y compris des pétales avec des composés bioactifs potentiels, qui sont bon marché et abondants, une alternative attrayante pour l'extraction de composants bioactifs. Les pétales de safran contiennent une variété de composés bioactifs (polyphénols, flavonoïdes, et des anthocyanines).

Notre travail porte sur l'étude *in-vitro* des effets anti-hémolytiques, anti-inflammatoires et cytotoxiques de l'extrait hydro éthanolique des pétales de safran aux doses de 50, 75 et 150 µg/ml, avec pour référence l'acide gallique.

Les résultats obtenus montrent que la concentration de 50 µg/ml est la plus intéressante, car elle présente un faible pourcentage de cytotoxicité tout en conservant un effet protecteur sur les membranes et un effet anti-inflammatoire

Ces propriétés bioactives ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de traitements thérapeutiques naturels. La valorisation des pétales de safran optimise l'utilisation de la plante entière, et contribue à la recherche de solutions médicales alternatives et durables.

**Mots clés :** *Crocus sativus. L.*, safran, crocine, picrocrocine, safranal, activité anti-inflammatoire, activité cytotoxique, pétale de safran.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	12
<b>CHAPITRE 1</b> _____ <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
<b>I. Présentation de la plante étudiée (<i>Crocus sativus. L</i>).....</b>	<b>15</b>
<b>I.1. Généralité sur le safran .....</b>	<b>15</b>
<b>I.1.1. Définition.....</b>	<b>15</b>
<b>I.1.2. Nomenclature .....</b>	<b>15</b>
<b>I.2. Classification scientifique : .....</b>	<b>16</b>
<b>I.3. Description botanique .....</b>	<b>16</b>
<b>I.4. La culture du safran .....</b>	<b>19</b>
<b>I.5. Récolte et rendement du safran : .....</b>	<b>19</b>
<b>II. Etude phytochimique du safran.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1. Principaux constituants chimiques du safran .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1. Composés chimiques des stigmates:.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1.1. Crocine.....</b>	<b>22</b>
<b>II.1.1.2. Picrocrocine : .....</b>	<b>22</b>
<b>II.1.1.3. Safranel.....</b>	<b>23</b>
<b>II.1.2. Les composés chimiques des pétales de safran.....</b>	<b>25</b>
<b>II.1.2.1. Flavonoïdes : .....</b>	<b>25</b>
<b>II.1.2.2. Anthocyanines :.....</b>	<b>25</b>
<b>II.1.2.3. Caroténoïdes : .....</b>	<b>25</b>
<b>II.1.2.4. Composés volatils: .....</b>	<b>25</b>
<b>II.1.2.5. Acides phénoliques : .....</b>	<b>25</b>
<b>II.2. Comparaison des constituants chimiques des stigmates et des pétales de safran :.....</b>	<b>26</b>
<b>III. Propriétés pharmacologiques et médicales du safran .....</b>	<b>27</b>
<b>III.1. Propriétés Antidépessives.....</b>	<b>27</b>
<b>III.2. Propriétés Antioxydantes.....</b>	<b>27</b>

III.3.	Propriétés Anti-inflammatoire .....	28
III.4.	Effets Neuroprotecteurs .....	28
III.5.	Propriétés Anticancéreuses.....	28
III.6.	Propriétés Cardioprotectrices .....	28
III.7.	Amélioration de la Fonction Cognitive.....	28
III.8.	Propriétés Anti convulsivantes .....	28
<b>CHAPITRE 2    MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>30</b>
I.	Préparation des extraits.....	31
I.1.	Préparation des pétales de safran .....	31
I.2.	Extraction des composés phénoliques des pétales de safran.....	31
I.2.1.	Préparation de la solution éthanolique.....	31
II.	Détermination de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et cytotoxicité des extraits de pétales de safran .....	32
II.1.	Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh).....	32
II.2.	Test de cytotoxicité des extraits.....	33
II.3.	Evaluation de l'activité anti-hémolytique, <i>in vitro</i> , des extraits éthanoliques par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges .....	34
II.4.	Activité Anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de pétales de safran .....	34
<b>CHAPITRE 3    RESULTATS ET INTERPRETATION .....</b>		<b>36</b>
I.	Rendements d'extraction des extraits éthanoliques de pétales de safran.....	37
II.	Test de cytotoxicité des extraits éthanoliques de pétales de safran .....	37
III.	Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits des pétales de safran. ....	40
IV.	Activité anti-inflammatoire des extraits de pétales de safran.....	40
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>45</b>
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>51</b>
<b>REFERENCES .....</b>		<b>54</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>60</b>



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 Morphologie de la plante <i>Crocus sativus</i></b> .....	18
<b>Figure 2 les organes de la fleur</b> .....	18
<b>Figure 3 Culture du safran en Algérie</b> .....	20
<b>Figure 4 L'émondage du stigmate de safran</b> .....	20
<b>Figure 5 Structure chimique de la crocine</b> .....	24
<b>Figure 6 Structure chimique de la Picrocrocine</b> .....	24
<b>Figure 7 Structure chimique du safranel</b> .....	24
<b>Figure 8 Quelques effets pharmacologiques du safran et de ses constituants</b> .....	29
<b>Figure 9 Photographie de la poudre des pétales de safran</b> .....	31
<b>Figure 10 Photographie de la solution après séchage</b> .....	32
<b>Figure 11 Photographie de la suspension des GRh à 10%</b> .....	33
<b>Figure 12 Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique</b> .....	38
<b>Figure 13 Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait éthanolique</b> .....	38
<b>Figure 14 Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits éthanoliques des pétales de safran</b> .....	39
<b>Figure 15 Activité anti-hémolytique de l'acide gallique</b> .....	42
<b>Figure 16 Activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des pétales</b> .....	42
<b>Figure 17 Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique et les extraits éthanoliques des pétales de safran</b> .....	43
<b>Figure 18 Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac</b> .....	43
<b>Figure 19 Inhibition de la dénaturation protéique par les extraits éthanoliques des pétales de safran</b> .....	44
<b>Figure 20 Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits éthanoliques des pétales de safran</b> .....	44

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1. Classification scientifique du safran.....</b>	<b>16</b>
<b>Tableau 2. Constituants Chimiques des Stigmates et des Pétales de safran.....</b>	<b>26</b>
<b>Tableau 3. Rendement de la macération des pétales de safran dans le solvant éthanol .....</b>	<b>37</b>

## **LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXES**

<b>Tableau A 1 Test de cytotoxicité (pourcentage d'hémolyse) de l'acide gallique et de l'extrait éthanolique des pétales de safran.....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau A 2 Test anti-hémolytique (Pourcentage de stabilité membranaire) de l'extrait éthanolique des pétales de safran.....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau A 3 Test anti-inflammatoire (Pourcentage de l'inhibition de la dénaturation des protéines) de l'extrait éthanolique des pétales de safran.....</b>	<b>62</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

# INTRODUCTION

Depuis longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle important dans les cultures et les traditions différentes des nations musulmanes.

Safran, le nom vernaculaire pour *Crocus sativus* (CS), est une plante vivace, appartenant aux iridacées. Il est cultivé dans divers pays tels que l'Iran, Grèce, Espagne, Chine et Turquie (**Bostan et al., 2017**)

Le (Cs) représente 90 % de la production mondiale de safran. Ses fleurs, également connues sous le nom de safran, sont des épices et des plantes médicinales précieuses avec des propriétés bénéfiques pour la santé pour réduire la tension artérielle et soulager les symptômes de la dépression, ainsi que des propriétés antioxydantes, anti radicalaires, chélatrices de métaux, anticancéreuses et antifongiques (**Serrano-Diaz et al., 2013**)

L'industrie du safran génère d'importants sous-produits, notamment de grandes quantités de pétales contenant des composés bioactifs potentiels. Environ 98,5 % de la fleur de safran est finalement jetée comme déchet, puisque seulement 15g d'épice peuvent être produits à partir de 1 kg de fleurs au cours du processus de production. Cela conduit à un grand nombre de sous-produits. De nombreux composants phytochimiques, notamment les flavonoïdes, les anthocyanes, les caroténoïdes, les acides phénoliques, les monoterpénoïdes, les alcaloïdes, les glycosides et les saponines, sont présents dans les sous-produits du safran. Ces pétales sont bon marché et abondantes, ce qui en fait une alternative intéressante aux stigmates coûteux pour l'extraction de composants bioactifs, en particulier lors de l'extraction de ces derniers (**Jabbari et al., 2024**).

Dans cette optique, notre travail de Master a pour objectif de déterminer *in vitro* la cytotoxicité des extraits éthanoliques des pétales de safran, et leurs activités biologiques à savoir leur activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire. Le but de cette étude est de valoriser les pétales de safran et de les exploiter dans plusieurs domaines comme la nutrition, la cosmétique et la pharmacologie.

# Chapitre I

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



## I. Présentation de la plante étudiée (*Crocus sativus*. L)

### I.1. Généralité sur le safran

#### I.1.1. Définition

Le safran est une épice utilisée depuis plus de 3 000 ans. *Crocus sativus* L., (CS), plante dont est extrait le safran à partir des stigmates séchées des fleurs, elle a parcouru les siècles et essaimé dans les différentes régions du globe (**Palomares, 2015**). Il est principalement distribué en Méditerranée, en Europe et en Asie occidentale. Le safran d'Iran représente près de 90 % de la production mondiale (**Mir et al., 2022**).

Il ne s'agit pas d'une plante sauvage car elle doit tout à la main de l'homme qui a su la cultiver, la choyer, et l'importer tout autour du bassin méditerranéen (**Palomares, 2015**)

Le safran, est également désigné par l'appellation « or rouge », appellation hautement justifiée puisqu'elle est d'une grande valeur commerciale issue de stigmates de la fleur du safran d'après les producteurs à travers le monde, il faut 75000 fleurs ou encore 225000 stigmates triés pour produire 0,5 Kg de safran, d'où son prix prohibitif, 10 fois plus élevé que celui de la vanille et 50 fois plus élevé que la cardamome. C'est l'épice la plus chère au monde (**CRSTRA, 2012**).

Le nom "safran" est dérivé du latin safranum, lui-même inspiré de l'arabe "zaafarân" dont la racine exprime une notion essentielle, la couleur jaune. Le nom de genre "*Crocus*" vient du grec *Krokos*, qui veut dire "filament", par allusion aux stigmates de la plante. Le terme "*sativus*", quant à lui, signifie "cultivé", car le *Crocus sativus*, par sa reproduction végétative, ne peut se multiplier sans la main de l'homme (**Dupont, 2001**).

La consommation de safran augmente quotidiennement, en raison de ses propriétés thérapeutiques. Par conséquent, cette demande croissante de safran a poussé les agriculteurs à cultiver le safran dans différents pays du monde. De nombreuses études ont été conclues en soulignant le rôle du safran dans l'atténuation de diverses maladies.

#### I.1.2. Nomenclature

- Nom scientifique : *Crocus sativus* L.
- Noms communs : safran, fleur de *Crocus sativus*
- Anglais : Safran *crocus*
- Français : safran, safran cultivé, safran de Gâtinais
- Arabe : Azzaàfarane AzzaàfaraneAlhorr, Azzaàfarane Chaàra (**Rahmouni et Reghis, 2016**).

## I.2. Classification scientifique :

Tableau 1. Classification scientifique du safran (Source : Palomares C., 2015)

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophyte
Sous-embranchement	Angiospermes (Magnoliophyta)
Classe	Monocotylédones (Liliopsida)
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Iridaceae
Sous-famille	Crocoïdeae
Genre	Crocus
Espèce	<i>Crocus sativus</i> L.

Selon la classification botanique de Cronquist de 1981, *Crocus sativus* L. appartient à :

La plante safran appartient à la famille des Iridacées qui comprend 1 800 espèces dont les iris, les glaïeuls, les crocus. Ces Plantes ont pour caractéristiques communes un ovaire infère et un androcée comportant trois Étamines disposées en un seul verticille. Notons qu'il existe deux groupes de crocus ; le premier à floraison automnale comme *Crocus sativus* L. et le second à floraison printanière tels que *Crocus vernus* L.

Parmi les 85 espèces appartenant au genre *crocus*, le safran est l'espèce la plus fascinante (Dupont, 2007).

## I.3. Description botanique

Cette plante herbacée vivace (**Figure 1 A**) atteint 10 à 25 cm de hauteur en se développant à partir de ses bulbes. Le bulbe, de forme sub-ovoïde, est de taille et de formes variables. Il a une structure massive et est recouvert de nombreuses spathes concentriques. Chaque bulbe mère produit à partir des bourgeons apicaux un à trois gros bulbes filles et plusieurs petits bulbes à partir des bourgeons latéraux.



Le safran possède deux types de racines : des racines fibreuses et fines à la base du bulbe mère, et des racines contractiles formées à la base des bourgeons latéraux (**Figure 1 B**). Les feuilles varient de cinq à 11 par bourgeon (**Figure 1 C**). Ils sont très étroits et mesurent entre 1,5 et 2,5mm de couleur vert foncé. Ils mesurent 20 à 60 cm de longueur avec une bande blanchâtre à l'intérieur et une côte à l'extérieur.

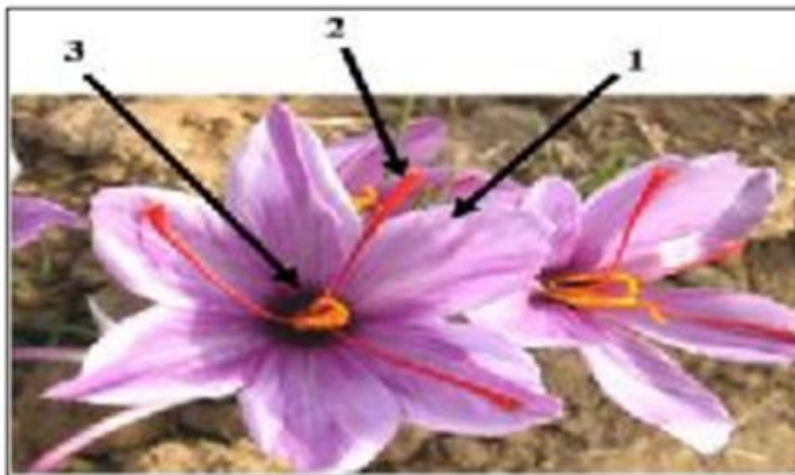
Les fleurs du safran commencent à apparaître au début de l'automne, vers la fin septembre de couleur violette composée de six tépales, trois internes, tandis que les trois autres sont externes, qui se rejoignent au niveau du long tube qui naît de la partie supérieure de l'ovaire (**Figure 1 C**). A leur apparition, les fleurs sont protégées par des bractées membraneuses blanchâtres. Le pistil est composé d'un ovaire infère d'où naît un style fin, long de 9 à 10 cm. Le style se termine par un stigmate unique composé de trois filaments de couleur rouge intense dont la longueur dépasse celle des pétales (**Figure 2**), qui sont la partie de la plante intéressante pour l'homme du point de vue de la culture (**Mzabri et al., 2019**).

Selon certains rapports, cette espèce est un triploïde stérile et ne produit donc pas de graines fertiles. Le (Cs) est très probablement issu de *Crocus cartwrightianus* Herbert (diploïde), présent en Grèce orientale, qui se distingue du safran que nous connaissons par des stigmates moins développés mais néanmoins comestibles. La mutation à l'origine de cet hybride remonterait à une époque très ancienne, entre 1 500 et 500 ans avant notre ère, et les cormus actuels ne seraient donc, d'après des recherches ADN récentes, que des clones d'un premier ancêtre hybride commun, au capital génétique similaire. C'est la sélection par des agriculteurs grecs de spécimens de *Crocus cartwrightianus* avec des stigmates particulièrement longs qui seraient à l'origine de l'apparition du premier (Cs) en Crète. Il n'est pas exclu que d'autres espèces de *Crocus* tels que *Crocus thomasii* et *Crocus pallasii* aient participé aux hybridations qui ont donné (Cs). Ce dernier ne fructifie jamais (son pollen est stérile) excepté s'il est pollinisé par *Crocus cartwrightianus* ou une autre espèce apparentée telle que *Crocus thomasii*. Sa multiplication ne se fait donc que par l'intermédiaire de la partition des bulbes (**Crozet et al., 2012**).

La germination peut prendre de 1 à 6 mois à 18 °C. Il faut 3 ans pour que les plantes puissent fleurir à partir de graines (**Srivastava et al., 2010**).



**Figure 1 Morphologie de la plante *Crocus sativus* : ( A ) plante de safran ; ( B ) types de racines du safran ; ( C ) feuilles de safran ; ( D ) fleur de safran (Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*) - Scientific Figure on ResearchGate)**



**Figure 2 les organes de la fleur**

**1- Pétale    2- Stigmate    3- Etamine**

#### **I.4. La culture du safran**

La culture du safran est une activité agricole délicate et laborieuse, nécessitant des conditions spécifiques pour produire cette épice précieuse (**Figure 3**).

Le safran préfère les climats arides et semi-arides avec des étés chauds et secs et des hivers froids. La température optimale pour la croissance du *Crocus sativus* varie entre 15°C et 20°C. Des températures trop élevées ou trop basses peuvent affecter la floraison et la qualité du safran (**Negbi, 1999**).

Le safran prospère dans des sols bien drainés, riches en matière organique et légèrement alcalins (pH entre 6 et 8). Les sols argilo-sableux ou limoneux sont idéaux. Un bon drainage est crucial car l'excès d'humidité peut entraîner la pourriture des bulbes (**Fernandez, 2004**).

Le safran est cultivé à partir de bulbes ou cormes, généralement plantés en été ou au début de l'automne. Les cormes de haute qualité, exempts de maladies, sont essentiels pour une bonne récolte. Ils doivent être plantés à une profondeur de 10-15 cm et espacés de 10-15 cm les uns des autres (**McGimpsey et al., 1997**).

#### **I.5. Récolte et rendement du safran :**

Ce sont les stigmates orange vif de la fleur qui constituent le safran. En début de floraison, en septembre ou octobre, les fleurs sont coupées puis les stigmates sont prélevés (**Figure 4**) et mis à sécher dans un local aéré. Ils sont ensuite conservés dans un bocal hermétique (**Polese et Devaux, 2001**).

Le rendement moyen d'un hectare de safran dépend des conditions du milieu et de l'âge de la safranière et peut atteindre plus de 10 kg/ha. La durée de stockage du safran est longue si les conditions de conservation sont optimales. La qualité du safran peut être maintenue durant plus de 3 ans. Comme c'est une épice hygroscopique, elle doit être conservée dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et de l'air. L'utilisation des conteneurs en verre colorés ou opaques, fermés hermétiquement et placés dans un endroit sec constitue une bonne méthode de préservation de la qualité du safran (**Chahine, 2014**).



**Figure 3** Culture du safran en Algérie (<https://elwatan-dz.com/culture-du-safran-en-algerie-lor-rouge-pour-redynamiser-les-zones-rurales>)



**Figure 4** L'émondage du stigmate de safran ([https://fr.123rf.com/stock-photo/indian\\_saffron.html](https://fr.123rf.com/stock-photo/indian_saffron.html))

## II. Etude phytochimique du safran

### II.1. Principaux constituants chimiques du safran

Compte tenu de son large éventail d'utilisations médicales, le safran a fait l'objet de recherches phytochimiques et biochimiques approfondies et plusieurs composants bioactifs ont été isolés (Srivastava *et al.*, 2010).

#### II.1.1. Composés chimiques des stigmates:

Les stigmates sont les plus anciennes parties utilisées du safran dans un but médicinal. La formule générale de composition des stigmates de safran est la suivante :

- eau (14 à 16 %).
- glucides (12 à 15 %).
- matières azotées (13 %).
- non azotées (41 à 44 %).
- fibres (4 à 5 %).
- huiles essentielles (0,6 à 0,9 %).
- cendres (4 à 6 %).
- Plus de 150 composés aromatiques (volatils) et non volatils sont présents dans le safran, dont les caroténoïdes, qui lui donnent son pouvoir colorant. À ce jour, seuls 40 à 50 composants ont pu être identifiés.

Schématiquement, on peut dire que les stigmates de safran sont composés de :

- caroténoïdes dont principalement la crocine ;
- anthocyanes ;
- huile essentielle (< 1 %), dont le composant majoritaire est le safranal (aldéhyde terpénique);
- flavonoïdes (quercétine et kaempférol) ;
- polysaccharides ;
- protéines, acides aminés ;
- minéraux (Mn, Cu, K, Na, Fe et N) ;

- vitamine B1 (thiamine) : 0,7–4 µg/g, vitamine B2 (riboflavine) : 56–138 µg/g ;
- résine.(Crozet et al., 2012).

Les composants caractéristiques du safran sont la crocine-(responsable de la couleur), picrocrocine- (responsable du goût amer), et safranal- (responsable de l'odeur et de l'arôme).

### II.1.1.1. Crocine

L' $\alpha$ -crocine est la molécule responsable de la couleur jaune-orange d'or du safran. C'est un caroténoïde à l'origine de l'arôme du safran. C'est un pigment présent à hauteur de 10 % dans la masse du safran frais. L' $\alpha$ -crocine est un colorant idéal pour tous les aliments basés sur l'eau comme les plats à base de riz (Palomares, 2015).

#### Les propriétés chimiques de la crocine :

- La crocine est un caroténoïde glycosylé. Il s'agit en fait d'un diéster digentiobiosidique de la crocétine (acide crocétique).
- Sa formule chimique est  $C_{44}H_{64}O_{24}$  (Figure 5), et elle a une masse molaire de 976.96 g/mol.
- La crocine existe sous plusieurs isomères, les principaux étant la crocine-1 (trans-crocine-4) et d'autres isomères cis (Bouvier et al., 2005).
- La crocine est hydrosoluble, ce qui la distingue de nombreux autres caroténoïdes qui sont généralement liposolubles. Cette solubilité dans l'eau facilite son utilisation dans des applications alimentaires et médicinales.
- La crocine est relativement stable à la chaleur, mais elle peut se dégrader sous l'effet de la lumière et du pH extrême. Elle se décompose en crocétine et en sucres sous certaines conditions de traitement (Sanchez et al., 2008).

### II.1.1.2. Picrocrocine :

La picrocrocine est un composé qui a le goût amer du safran. Cette molécule possède des propriétés insecticides et pesticides et se retrouve dans 4% du safran séché. La picrocrocine est une version tronquée de la zéaxanthine caroténoïde. La zéaxanthine est également l'un des caroténoïdes naturels présents dans la rétine de l'œil humain (Palomares, 2015).

#### Les propriétés chimiques de la picrocrocine :

- La picrocrocine est un glucoside monoterpénique, chimiquement connue sous le nom de 4-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2,6,6-triméthyl-1-cyclohexène-1-carboxaldéhyde.
- Sa formule chimique est  $C_{16}H_{26}O_7$  (**Figure 6**), et elle possède une masse molaire de 330.37 g/mol (**Escribano et al., 1996**).
- La picrocrocine est dérivée du caroténoïde zeaxanthine. Pendant le processus de séchage du safran, la picrocrocine se dégrade en safranal et D-glucose. Le safranal est responsable de l'arôme caractéristique du safran.
- Cette dégradation est catalysée par la chaleur et les enzymes présentes dans les stigmates de *Crocus sativus* (**Carmona et al., 2006; Straubinger et Winterhalter, 2000**).
- La picrocrocine est soluble dans l'eau et les solvants organiques polaires, ce qui permet son extraction lors de la préparation culinaire et médicinale du safran (**Abdullaev, 1993**).

### II.1.1.3. Safranal

Le safranal est l'un des principaux composés volatils du safran, responsable de son arôme caractéristique. C'est un composé terpénoïde qui se forme à partir de la dégradation de la picrocrocine lors du séchage du safran

#### Propriétés chimiques du safranal :

- Le safranal est un monoterpénoïde. Sa formule chimique est  $C_{10}H_{14}O$  (**Figure 7**), et sa masse molaire est de 150.22 g/mol.
- La structure du safranal est celle d'un aldéhyde terpénoïde, spécifiquement le 2,6,6-triméthyl-1,3-cyclohexadiène-1-carboxaldéhyde (**Carmona et al., 2006; Straubinger et Winterhalter, 2000**).
- Le safranal est formé par la dégradation thermique de la picrocrocine, un processus qui se produit principalement lors du séchage des stigmates de *Crocus sativus*. La picrocrocine se décompose en safranal et en glucose.
- Cette dégradation est favorisée par la chaleur et se produit plus efficacement à des températures élevées utilisées pendant le séchage du safran (**Sanchez et al., 2008**).
- Le safranal est soluble dans les solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol et les huiles essentielles. Il est légèrement soluble dans l'eau.
- Il est relativement stable à température ambiante mais peut se dégrader sous l'effet de la lumière et de l'air, ce qui peut entraîner une perte d'arôme au fil du temps (**Asgarpanah et Kazemivash, 2013**).

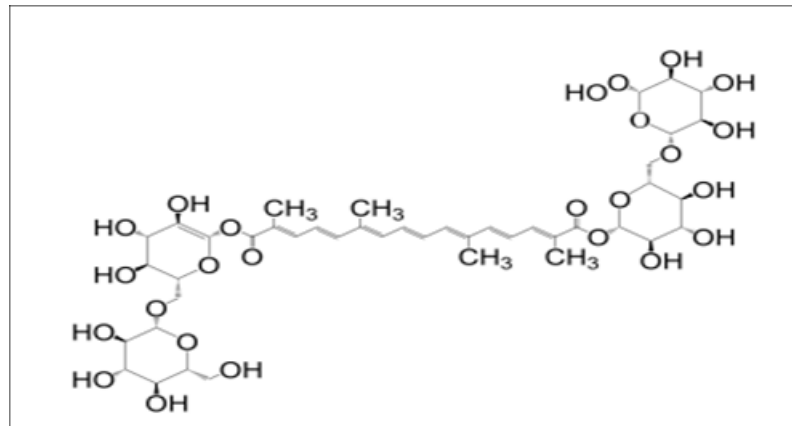


Figure 5 Structure chimique de la crocine (Badie Bostan et al.,2017)

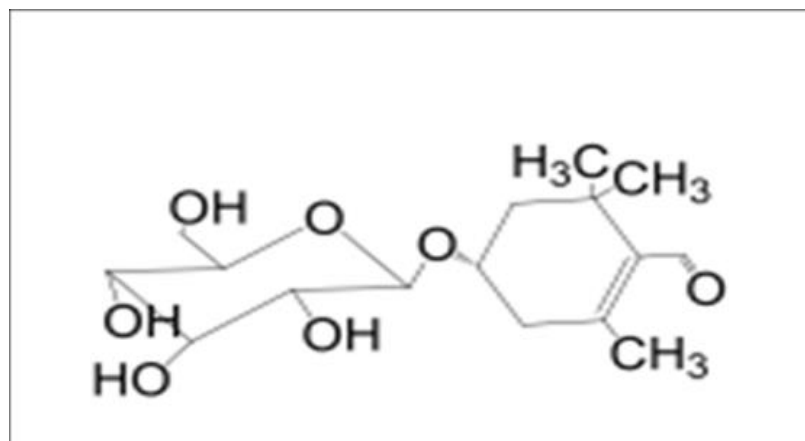


Figure 6 Structure chimique de la Picrocrocine (Palomares, 2015).

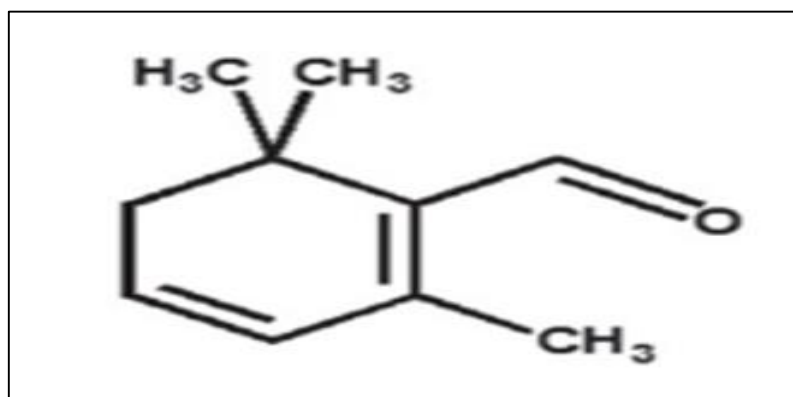


Figure 7 Structure chimique du safranal (Badie Bostan et al., 2017)



## **II.1.2. Les composés chimiques des pétales de safran**

Les pétales de safran, bien que moins étudiées que les stigmates, contiennent plusieurs composés chimiques intéressants mais avec une composition chimique différente. Les principaux constituants chimiques présents dans les pétales sont :

### **II.1.2.1. Flavonoïdes :**

Les pétales de safran sont riches en flavonoïdes, qui sont des composés phénoliques connus pour leurs propriétés antioxydantes. Les principaux flavonoïdes identifiés incluent la quercétine, le kaempférol et leurs dérivés glycosylés (**Karimi et al., 2010**)

### **II.1.2.2. Anthocyanines :**

Les anthocyanines sont responsables de la coloration violette des pétales. Les principaux anthocyanines présents dans les pétales incluent la delphinidine, la cyanidine et leurs dérivés (**Abdullaev et Frenkel, 1999**).

### **II.1.2.3. Caroténoïdes :**

Bien que les stigmates soient la principale source de caroténoïdes comme la crocine, les pétales contiennent également des caroténoïdes, bien que en quantités moindres. Ces composés contribuent également aux propriétés antioxydantes des pétales (**Lozano et al., 1999**).

### **II.1.2.4. Composés volatils:**

Les pétales contiennent également des huiles essentielles et des composés volatils, bien que moins concentrés que dans les stigmates. Les principaux composés volatils identifiés sont similaires à ceux trouvés dans les stigmates, tels que le safranal (**Maggi et al., 2011**).

### **II.1.2.5. Acides phénoliques :**

Les pétales contiennent divers acides phénoliques tel que l'acide sinapique, qui contribue également aux propriétés antioxydantes (**Li et al., 2023**).

## II.2. Comparaison des constituants chimiques des stigmates et des pétales de safran :

Les stigmates et les pétales de safran présentent des compositions chimiques distinctes qui leur confèrent des propriétés et des usages différents. Les stigmates sont riches en caroténoïdes comme la crocine et la picrocrocine, ainsi qu'en composés volatils comme le safranal, qui sont responsables de la couleur, du goût et de l'arôme du safran. Les pétales, quant à eux, sont principalement riches en flavonoïdes et anthocyanines, ce qui leur confère des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Tableau 2).

**Tableau 2. Constituants Chimiques des Stigmates et des Pétales de safran**

Constituants	Stigmates	Pétales
<b>Caroténoïdes</b>	<p><b>Crocine</b> : Principal caroténoïde, responsable de la couleur rouge.</p> <p><b>Crocétine</b> : Contribue à la couleur.</p> <p><b>Picrocrocine</b> : Précurseur du safranal, responsable du goût amer (Escribano et al., 1996).</p>	Présents en quantités moindres (Lozano., 1999).
<b>Composés volatils</b>	<b>Safranal</b> : Principal composé responsable de l'arôme caractéristique du safran (Rios et al., 1996).	Présents en quantités beaucoup plus faibles ; peuvent contenir des traces de safranal (Maggi et al., 2011).
<b>Flavonoïdes</b>	Présents en petites quantités, contribuent aux propriétés antioxydantes (Abdullaev et Frenkel, 1999).	<p><b>Quercétine</b> : Flavonoïde avec de puissantes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires</p> <p><b>Kaempférol</b> : Autre flavonoïde bénéfique pour la santé (Karimi et al., 2010).</p>

<b>Anthocyanines</b>	Non significatifs dans les stigmates.	<b>Delphinidine et Cyanidine :</b> Responsables de la coloration violette des pétales ( <b>Abdullaev et Frenkel, 1999</b> ).
<b>Acides phénoliques</b>	Présents en petites quantités, contribuent aux propriétés antioxydantes : Acide caféique, acide gallique ( <b>Li et al., 2023</b> )	Contribuent aux propriétés antioxydantes : Acide sinapique ( <b>Li et al., 2023</b> )

### III. Propriétés pharmacologiques et médicales du safran

Le safran présente une large gamme de propriétés pharmacologiques et médicales (**Figure 8**), notamment des effets antidépresseurs, antioxydants, anti-inflammatoires, neuroprotecteurs, anticancéreux, cardioprotecteurs, d'amélioration cognitive et anticonvulsivants. Ces propriétés en font un candidat prometteur pour diverses applications thérapeutiques. Bien que de nombreuses études précliniques et cliniques aient montré des résultats prometteurs, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer et étendre ces découvertes.

#### III.1. Propriétés Antidépresseurs

Le safran a montré des effets antidépresseurs significatifs, comparable à des antidépresseurs classiques. Plusieurs études cliniques récentes ont confirmé ces effets (**Tóth et al., 2019**).

#### III.2. Propriétés Antioxydantes

Les caroténoïdes présents dans le safran, notamment la crocine et le safranal, possèdent de puissantes propriétés antioxydantes, protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs (**Hosseinzadeh et Rezaee, 2013**).

### **III.3. Propriétés Anti-inflammatoires**

Le safran et ses composés bioactifs, comme la crocine, ont des effets anti-inflammatoires. Ils réduisent la production de médiateurs inflammatoires et inhibent les voies de signalisation inflammatoires (**Bostan et Hosseinzadeh, 2017**).

### **III.4. Effets Neuroprotecteurs**

Le safran montre des effets neuroprotecteurs dans des modèles animaux de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, en inhibant l'agrégation des protéines bêta-amyloïdes et en réduisant le stress oxydatif neuronal (**Georgiadou et al., 2012**).

### **III.5. Propriétés Anticancéreuses**

Le safran possède des propriétés anticancéreuses en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses et en inhibant leur prolifération. Des études récentes ont montré l'efficacité des constituants du safran contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (**Milajerdi et al., 2016**).

### **III.6. Propriétés Cardioprotectrices**

Le safran a des effets cardioprotecteurs, notamment en réduisant les niveaux de cholestérol et de triglycérides et en protégeant le cœur contre les dommages oxydatifs (**Hosseinzadeh et al., 2016**).

### **III.7. Amélioration de la Fonction Cognitive**

Le safran peut améliorer la fonction cognitive et la mémoire, en particulier chez les personnes atteintes de troubles cognitifs légers (**Akhondzadeh et al., 2010**).

### **III.8. Propriétés Anti convulsivantes**

Le safran a démontré des propriétés anti convulsivantes dans divers modèles animaux, suggérant un potentiel pour le traitement de l'épilepsie et d'autres troubles convulsifs (**Modagheh et al., 2008**).

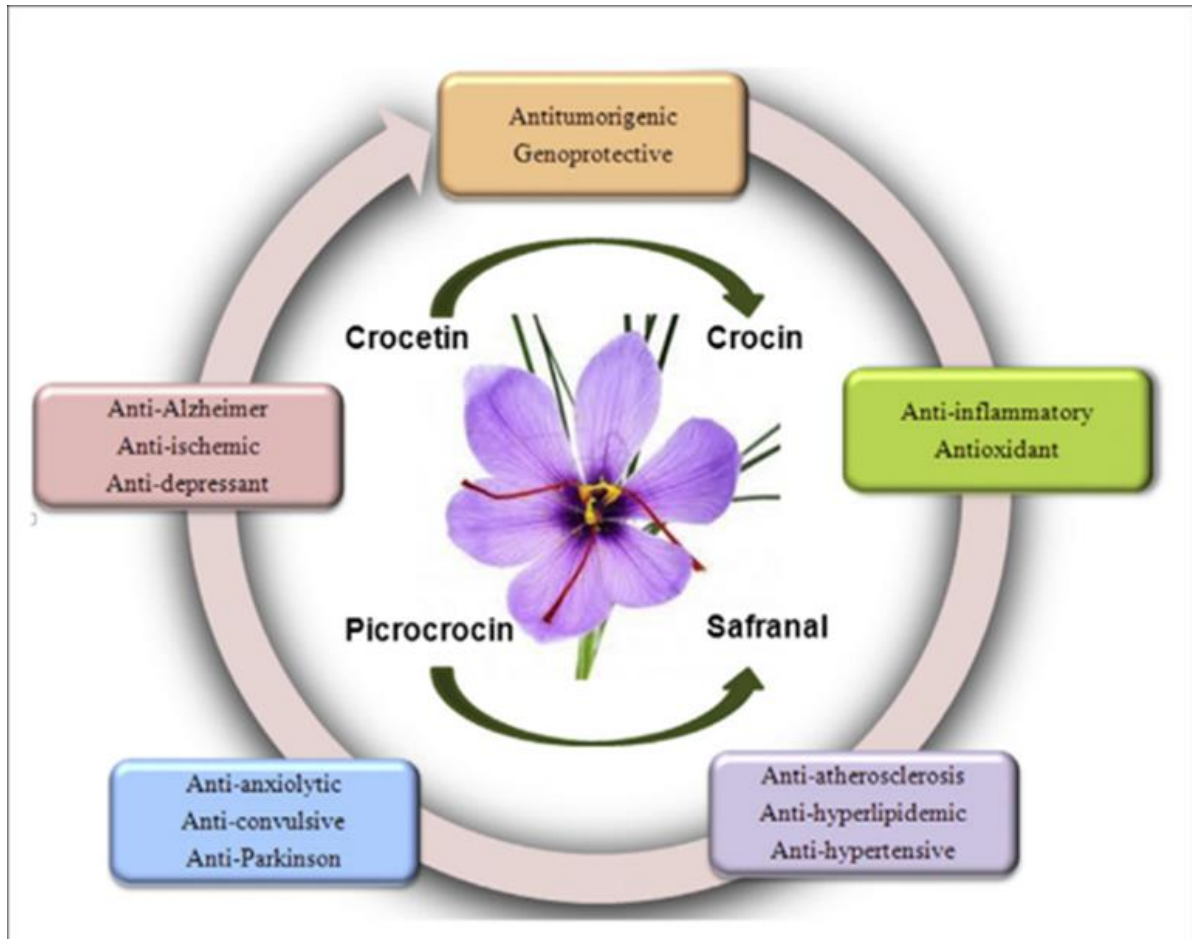


Figure 8 Quelques effets pharmacologiques du safran et de ses constituants (Badie Bostan et al., 2017).

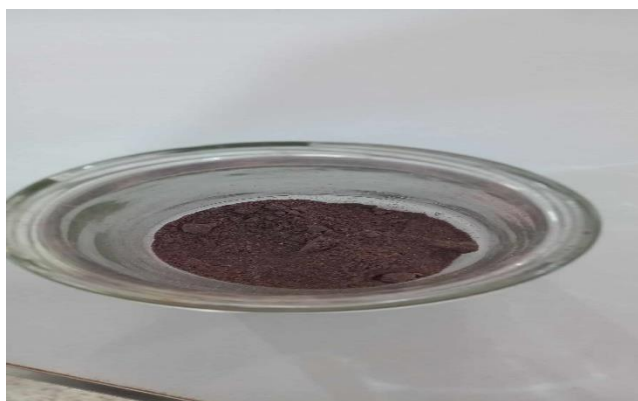
# CHAPITRE II

## MATERIELS ET METHODES

## I. Préparation des extraits

### I.1. Préparation des pétales de safran

Les pétales de safran ont été récoltés de la région d'Ain Fezza Willaya de Tlemcen. Ils ont été séchés à l'ombre et à température ambiante. Une fois totalement secs, les pétales sont moulus en poudre fine (**figure 9**).



**Figure 9** Photographie de la poudre des pétales de safran

### I.2. Extraction des composés phénoliques des pétales de safran

Les polyphénols sont extraits par macération selon un protocole standardisé (**Mahmoudi et al., 2013**).

#### I.2.1. Préparation de la solution hydro éthanolique

Le solvant utilisé est l'éthanol. Pour cela 50g de pétales de safran séchés et moulus sont mises dans un deuxième bécher, puis 400ml de la solution hydro éthanolique sont ajoutées au bécher, cette dernière est préparée avec 320ml d'éthanol et 80ml d'eau distillée soit un rapport de (4V/V ; éthanol/eau).

La préparation est conservée au réfrigérateur pendant 72heures à 4°C pour une macération froide. Ensuite, elle est filtrée avec du papier filtre standard.

Les filtrats sont par la suite récupérés dans des tubes à essai puis centrifugés 10 mn à 4000rpm, le surnageant est ensuite récupéré et transvasé dans une boîte en verre. Cette dernière est mise dans l'étuve à la température de 30°C pendant 24h jusqu'à séchage complet (**figure 10**).



**Figure 10 Photographie de la solution après séchage**

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante (Fellah et al., 2008 in Mahmoudi et al., 2013) :

$$R(\%) = \left( \frac{M_{ext}}{M_{ech}} \right) * 100$$

Où

$M_{ext}$  : la masse des extraits après évaporation du solvant en g

$M_{ech}$  : la masse sèche de l'échantillon végétal en g

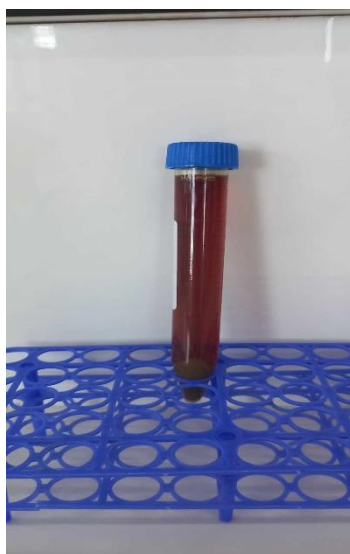
Les extraits secs obtenus sont pesés et récupérés par 3 ml d'eau physiologique, puis conservés à 5°C jusqu'à leur utilisation.

## **II. Détermination de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et cytotoxicité des extraits de pétales de safran**

### **II.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)**

Des échantillons de sang frais de donateurs volontaires (environ 8 ml) sont récupérés dans des tubes héparinés, au niveau du laboratoire puis centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de globules rouges est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume est mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh), avec une solution iso saline et utilisé immédiatement (Figure 11).





**Figure 11 Photographie de la suspension des GRh à 10%**

## II.2. Test de cytotoxicité des extraits

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des pétales de safran, un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser.

**Principe** : Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran, à différentes concentrations (50-75-150 µg/ml), dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GRh.

**Mode opératoire** : Le protocole suivi est celui de **Bulmus et al.,2003**) où un volume de 1,6ml de l'extrait éthanolique de pétales de safran, et l'acide gallique, molécule de référence de composés phénoliques, est mélangé avec un volume de 0,4 ml de la suspension de GRh (10%). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'hémoglobine libérée est mesuré à 560 nm. En parallèle, deux contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100 % d'hémolyse).

**Expression des résultats** : Le pourcentage d'hémolyse est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At/Ac) \times 100$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle positif ;

At = Absorbance du test.

### II.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, des extraits hydro éthanoliques par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges

**Principe** : Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits des pétales de safran à empêcher l'hémolyse des GRh, induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par d'autres auteurs (**Sadique et al., 1989; Oyedapo et al., 2010**).

**Mode opératoire** : Le milieu réactionnel contenant 0,5 ml de l'extrait de (C s), de l'acide gallique à différentes concentrations (50-75-150µg/ml), mélangé avec 1,5ml du tampon phosphate (0,9% NaCl, pH=7,4) et 2ml d'une solution hypo-saline (0,36 % NaCl), est incubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite 0,5 ml de la suspension de GRh (10%) sont ajoutés à chaque concentration et une deuxième incubation est réalisée à 56°C pendant 1h.

Au final, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2500rpm pendant 5min. Les absorbances du surnageant sont mesurées à 560 nm. En parallèle, un contrôle est réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 ml du tampon phosphate.

Expression des résultats : Le pourcentage de stabilité membranaire est estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

Où : Ac=Absorbance du contrôle.      At=Absorbance du test

### II.4. Activité Anti-inflammatoire des extraits hydro éthanoliques de pétales de safran

**Principe** : La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Williams et al., 2008**). De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines (**Bouhlali et al., 2016**). L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de (Cs) est donc effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Chandra et al., 2012**).

**Mode opératoire** : La méthode consiste à préparer quatre solutions :

1. La solution d'essai (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA, 5 %) et 0,05 ml d'extrait avec une concentration de 250 pg/ml ou de 250 ng/ml ou de 250 µg/ml (test solution).

2. La solution test contrôle (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé (test contrôle).
3. La solution contrôle produit (0,5 ml) composée de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extraits avec une concentration de 250 pg/ml ou de 250 ng/ml ou de 250 µg/ml (control).
4. La solution standard test (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5% et 0,05 ml de la solution de standard Diclofénac sodium avec une concentration de 250 pg/ml ou de 250 ng/ml ou de 250 µg/ml (étalon).

Toutes les solutions ont été ajustées à pH 6,3 par une solution d'HCL (1N). Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 20 min, ensuite la température est augmentée pour garder les échantillons à 57°C pendant 3 min. Après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution tampon phosphate saline (pH=6,3) est ajoutée aux solutions ci-dessus. L'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre UV-visible à 416 nm.

**Expression des résultats :** Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(DO \text{ test solution} - DO \text{ control} / DO \text{ test control})] \times 100.$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec l'anti-inflammatoire de référence, le Diclofenac sodium.

# CHAPITRE III

## RESULTATS ET INTERPRETATION

## I. Rendements d'extraction des extraits éthanoliques de pétales de safran

Le rendement représentant le poids de l'extrait par rapport au poids du matériel végétal est réalisé avec la macération de pétales de safran dans le solvant éthanol. Le résultat est récapitulé dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3. Rendement de la macération des pétales de safran dans le solvant éthanol**

Macération	Safran hydro éthanol
Rendement (%)	9,42

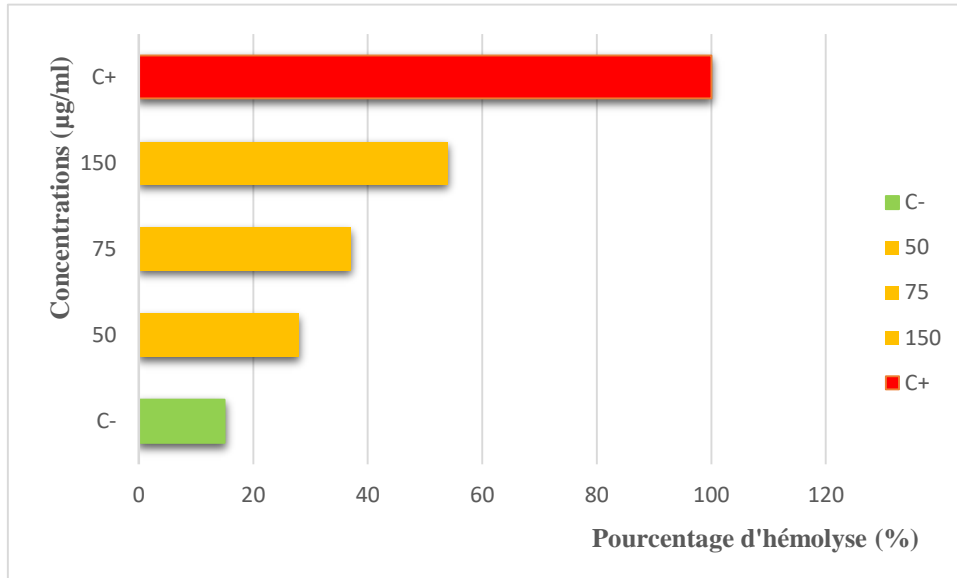
## II. Test de cytotoxicité des extraits hydro éthanoliques de pétales de safran

Le test *in vitro* de cytotoxicité représenté par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges est effectué en utilisant des globules rouges (GR) d'un donneur sain en bonne santé. Différentes concentrations de l'acide gallique (polyphénol de référence) et des extraits hydro éthanoliques de pétales de safran sont testés. Le pourcentage d'hémolyse est évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, en comparaison au contrôle négatif (C-, solution de GR dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 15%) et au contrôle positif (C+, solution de GR dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse). Les résultats obtenus sont représentés dans les **Figures 12, 13, 14** et le **Tableau A1** en annexes.

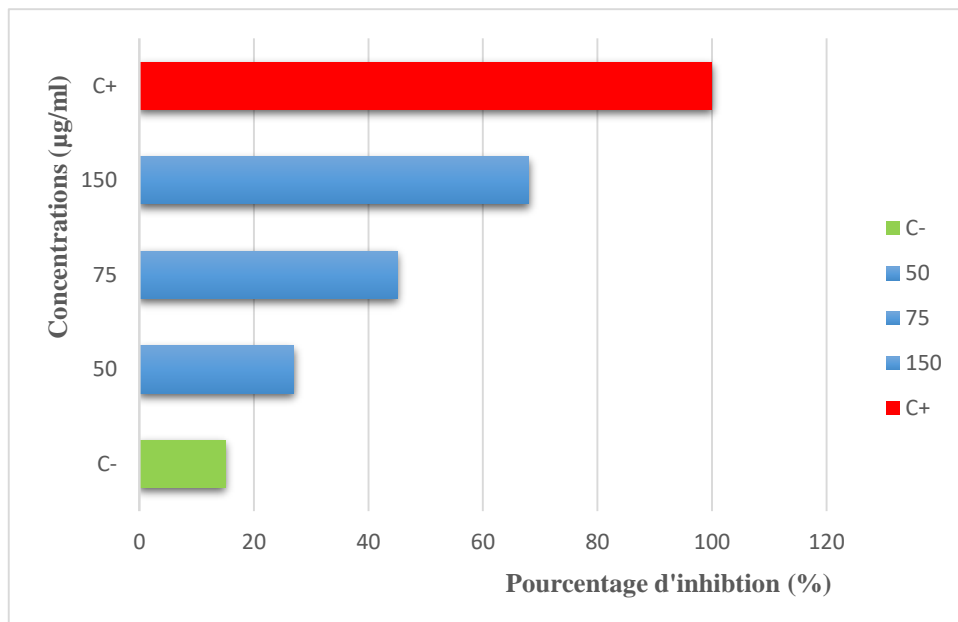
Nos résultats montrent que l'acide gallique représente un faible effet hémolytique de 28,48% à la concentration de 50 µg/ml en comparaison avec le contrôle négatif (C-, 15 %). Cet effet hémolytique augmente de 30,40% à la concentration de 75 µg/ml et de 90,06% à la concentration 150 µg/ml (**Figure 12**).

Les extraits hydroéthanoliques des pétales de safran provoquent un taux d'hémolyse des GR de 27,28% à la concentration de 50 µg/ml, cette activité hémolytique augmente de 67,04% à la concentration de 75 µg/ml et de 150,8% à la concentration de 150 µg/ml (**Figure 13**).

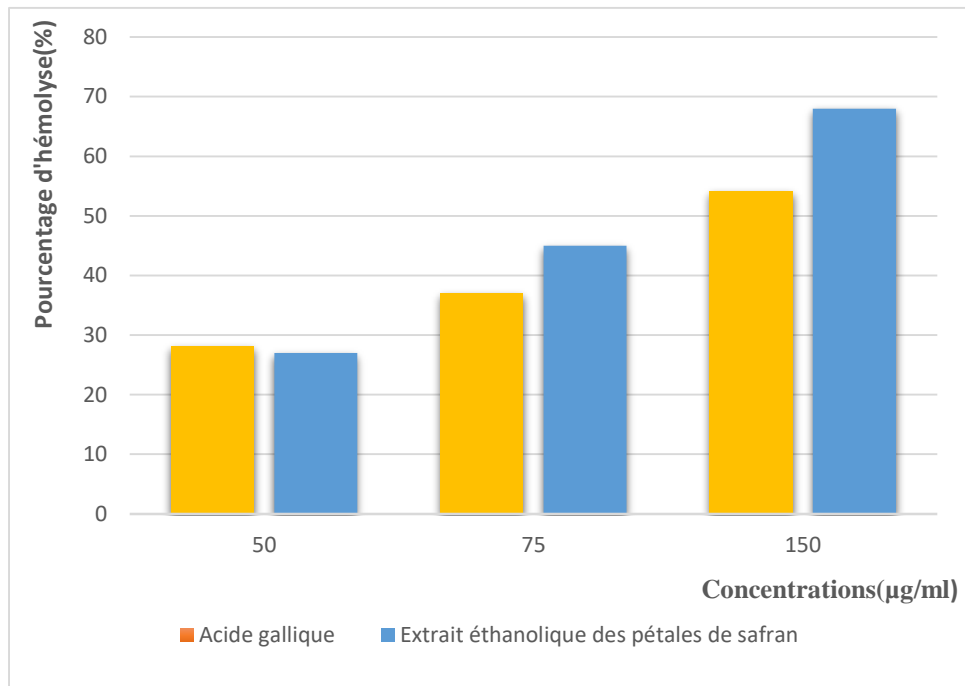
**La figure 14** résume l'effet comparatif du taux de cytotoxicité entre l'acide gallique et les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran. Les résultats indiquent que ces derniers possèdent un pouvoir hémolytique plus élevé (22,69% et 26,39%) par rapport à l'acide gallique aux concentrations respectives de 75 et 150 µg/ml. Cependant cet effet hémolytique des extraits hydro éthanoliques diminue à la concentration de 50 µg/ml, avec un taux estimé à 4,21% presque similaire à celui de l'acide gallique.



**Figure 12** Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique.



**Figure 13** Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait hydro éthanolique



**Figure 14** Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran.

### III. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits des pétales de safran.

Les résultats obtenus sont représentés dans les **Figures 15, 16 et 17** et le **Tableau A2** en annexes. Ils montrent que l'acide gallique à faible concentration de 50 µg/ml présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR, il est estimé à 65,63%. Cet effet protecteur diminue de 43,34% pour la concentration de 75 µg/ml et de 56,66% pour la concentration de 150 µg/ml (**Figure 15**).

Les données obtenues avec l'extrait hydro éthanolique des pétales de safran indiquent qu'il présente un effet protecteur de 43,29% à faible concentration de 50 µg/ml. Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR diminue de 18,15% pour la concentration de 75 µg/ml et de 34,97% pour la concentration de 150 µg/ml (**Figure 16**).

**La figure 17** récapitule l'effet comparatif du taux de la stabilité membranaire entre l'acide gallique et les extraits éthanoliques des pétales de safran. Les résultats montrent que l'acide gallique a un plus grand pouvoir anti-hémolytique (de + 34,03%) par rapport aux extraits de pétales de safran à la concentration de 50 µg/ml, cependant cette différence est atténuée aux concentrations de 75 et 150 µg/ml où le pouvoir anti-hémolytique présente un taux quasi similaire entre l'acide gallique et les extraits de pétales de safran (respectivement de 4,70 et 1,01%)

### IV. Activité anti-inflammatoire des extraits de pétales de safran

La méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire des extraits. La protéine utilisée pour ces tests est le sérum albumine bovine (SBA). Les résultats de l'inhibition de la dénaturation de la SBA sont donnés dans les **Figures 18, 19, 20** et le **Tableau A3** en annexe.

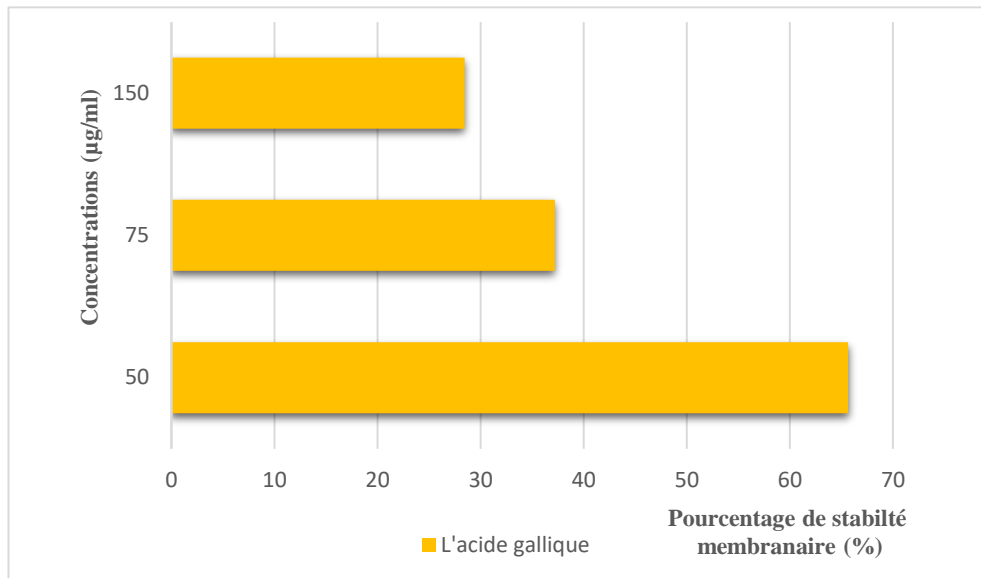
Nos résultats montrent que le Diclofénac assure une bonne inhibition de la dénaturation protéique, qui représente un taux de 96,15% à la concentration de 50 µg/ml, ce pouvoir diminue de 10% à la concentration de 75 µg/ml puis augmente légèrement avec un taux de 1,99% à la concentration de 150 µg/ml marquant ainsi son effet anti inflammatoire (**Figure 18**).

Les données obtenues avec les extraits éthanoliques des pétales de safran indiquent qu'ils présentent un effet anti inflammatoire atteignant un taux de 86,65 % à faible concentration de

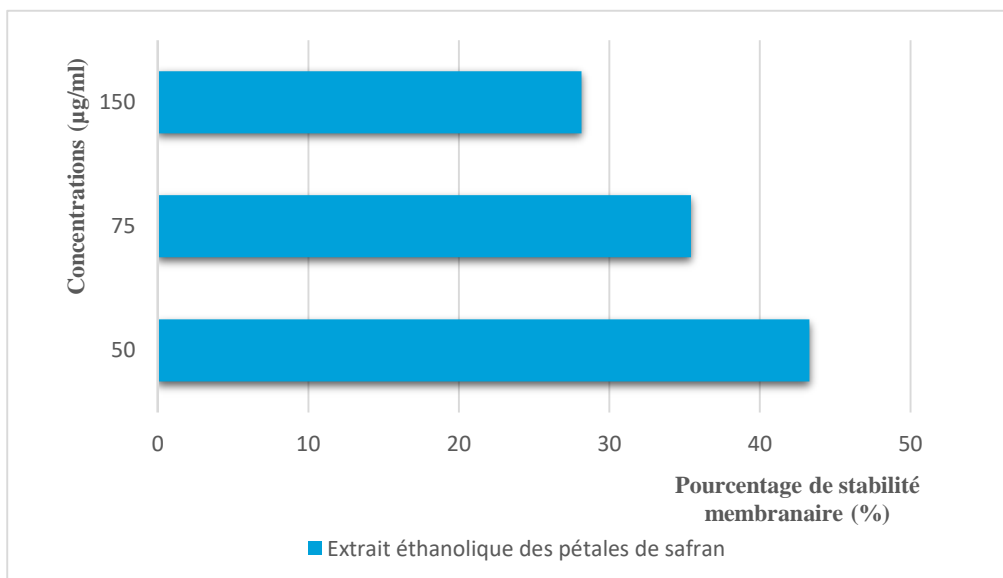


50µg/ml, cette activité inhibitrice de la dénaturation protéique diminue de 6,37% et de 11,22% aux concentrations respectives de 75 et 150 µg/ml (**Figure 19**).

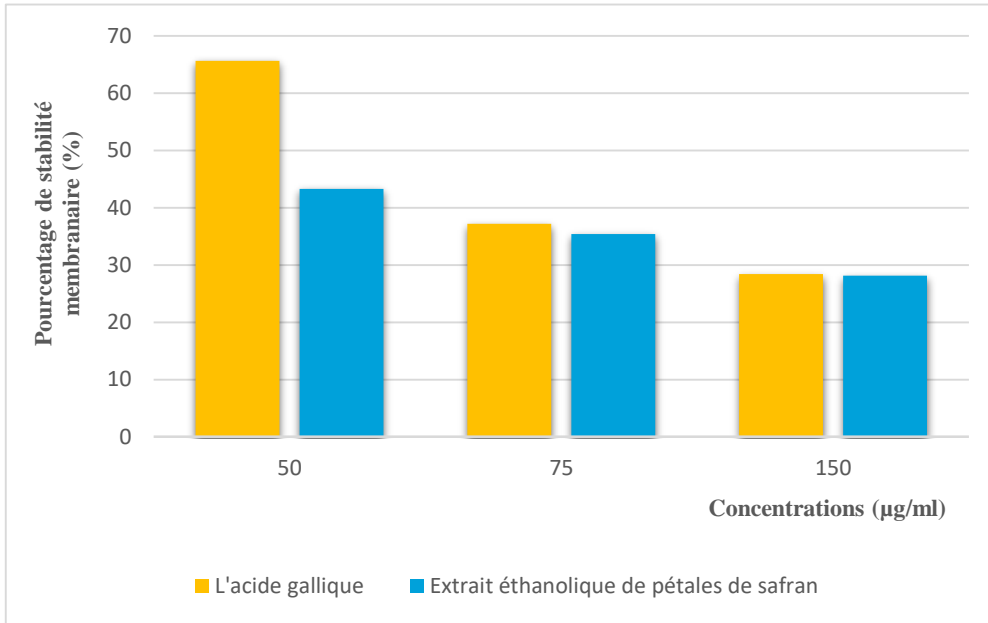
Les résultats résumés dans **la figure 20** montrent l'effet comparatif du pouvoir anti- inflammatoire des extraits hydro éthanoliques de pétales de safran et du Diclofenac. Aux concentrations de 50 et 75 µg/ml, les taux sont presque similaires, soit 9,88% et 6,24% respectivement. Cependant, à la concentration de 150 µg/ml, le Diclofénac montre une augmentation de 21,56% de son taux d'inhibition de l'inflammation par rapport aux extraits de pétales de safran.



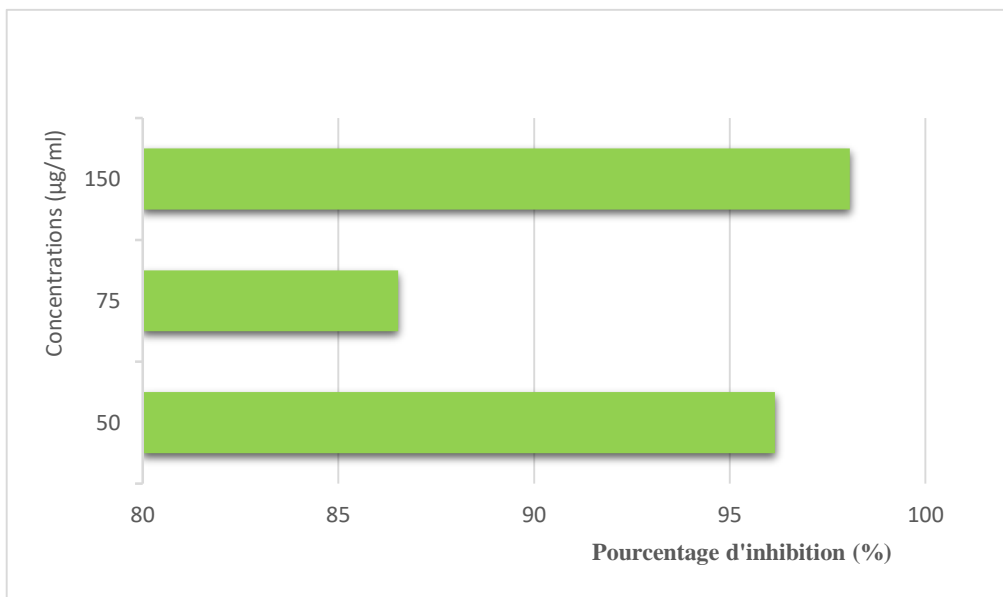
**Figure 15** Activité anti-hémolytique de l'acide gallique.



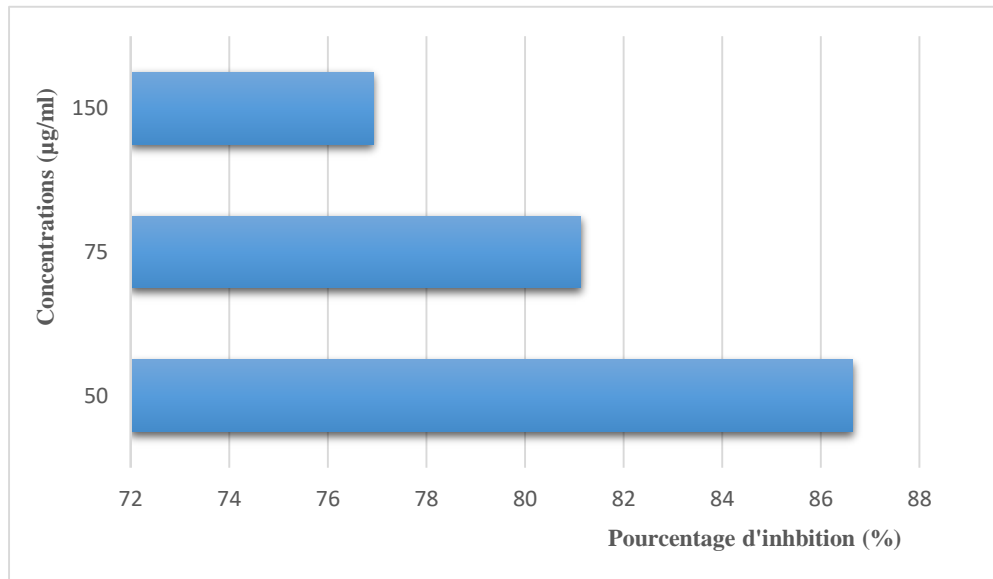
**Figure 16** Activité anti-hémolytique des extraits hydro éthanoliques des pétales



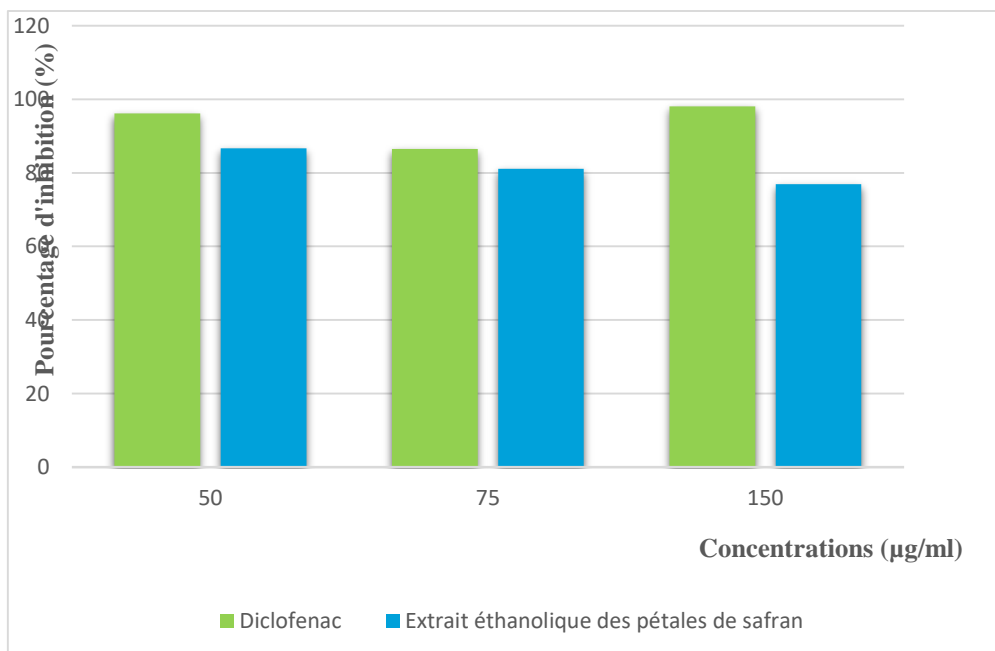
**Figure 17** Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique et les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran.



**Figure 18** Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac



**Figure 19 Inhibition de la dénaturation protéique par les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran.**



**Figure 20 Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran**

# DISCUSSION

Le (Cs) représente 90 % de la production mondiale de safran. Son stigmate, la principale partie médicinale, a un rendement extrêmement faible et un prix élevé, d'où la rareté des ressources, tandis que ses pétales, le sous-produit, sont généralement jetés ou utilisés comme engrais ou aliments, ce qui entraîne un gaspillage énorme, car il a été prouvé que les pétales contiennent divers composants chimiques couvrant les terpénoïdes, les flavonoïdes et les glycosides, qui présentent des activités pharmacologiques d'analgésie, d'anti-inflammatoire, de protection cardiovasculaire, de protection du foie et d'antidépresseur (**Li et al., 2023**).

Notre travail de Master sur les activités biologiques des extraits éthanoliques de pétales de safran contribue à la valorisation des déchets de cette plante.

Comparés à la littérature, nos résultats présentent des différences considérables dans le rendement d'extraction entre les stigmates et les pétales (**Tableau 3**); ils concordent avec ceux rapportés par **Khorasgani (2016)** et **Mousavi (2017)** qui ont trouvé que les extraits hydro éthanoliques de pétales de safran présentaient des rendements de 8% à 15% en poids sec, en utilisant des méthodes similaires d'extraction par macération à l'éthanol avec une concentration de ce dernier qui varie entre 70% et 80 % et une durée d'extraction entre 24 et 48 heures. Alors que les résultats obtenus avec les extraits éthanoliques des stigmates ont montré des rendements plus élevés (entre 20 et 28%) (**Babaei et al, 2014 ; Hosseini et al, 2013**). Cette différence dépend de nombreux facteurs, y compris la concentration de l'éthanol, la température, la durée et la méthode d'extraction ainsi que la qualité des matières premières. Les stigmates offrent généralement un rendement plus élevé en raison de leur concentration en composés bioactifs (**Babaei et al, 2014; Hosseini et al, 2013**).

L'étude de la cytotoxicité des extraits de plantes, *in vitro*, a été largement utilisée sur des globules rouges (GR) comme modèle (**Novaes et al., 2007**). Cela est dû au fait qu'ils sont faciles à isoler du sang en plus d'avoir une similitude membranaire avec d'autres cellules (**Robertis, 1995**). De plus, les GR sont très sensibles aux substances chimiques et toute toxicité se manifeste par une cytolyse et hémolyse, ceci entraîne la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant, qui est détectable visuellement par l'apparition d'une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma (**Lee et Feldman, 1997**).

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

Aux concentrations élevées, les flavonoïdes présents dans les plantes peuvent entraîner des effets néfastes sur les GR impliquant ainsi l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure

membranaire et l'augmentation de sa conductimétrie. Ces actions mènent à l'hémolyse des érythrocytes en raison des effets pro-oxydants exercés par les flavonoïdes (**Galati et al., 2002**).

Aussi, les érythrocytes sont considérés comme une cible majeure pour les radicaux libres en raison de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines actives, qui sont des promoteurs puissants d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahinzadeh et al., 2009**). Par exemple, l'acide gallique est utilisé dans notre travail comme un polyphénol de référence en raison de ces plusieurs effets bénéfiques sur les globules rouges, principalement grâce à ses propriétés antioxydantes (**Jones et Sies, 2020**), anti-inflammatoires (**Verma et al., 2013**) et stabilisantes des membranes cellulaires (**Maheshwari et Ramya, 2020**).

A faible concentration, l'acide gallique n'est pas toxique. A forte concentration, il est capable de réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , ou le  $Cu^{2+}$  en  $Cu^{+}$ , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Kessler et al., 2002**).

Dans notre travail, l'acide gallique à 150  $\mu g/ml$  présente une toxicité de 54,13 % d'hémolyse. Nos résultats montrent que les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran provoquent un taux d'hémolyse plus important que celui provoqué par l'acide gallique qui est de l'ordre de 26,42% et ne doivent donc pas être utilisés à cette concentration. On constate que l'effet cytotoxique est concentration dépendant, ceci peut être dû à la présence de nombreux constituants dans les extraits.

Dans d'autres études, Il a été démontré que le safran et ses constituants inhibent sélectivement la prolifération des cellules cancéreuses dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, tandis que ces composés n'ont pas d'effet toxique sur les cellules normales aux doses thérapeutiques (**Badie Bostan et al., 2017**)

En comparant l'effet toxicologique des pétales aux stigmates, **Mohadjeri et al. (2007)** ont démontré que la toxicité des pétales était inférieure à celle des stigmates. Comparé à l'extrait hydro éthanolique, l'extrait aqueux peut avoir une toxicité plus faible (**Li et al., 2023**).

L'étude de l'activité *in vitro* anti-hémolytique des extraits hydro éthanoliques des pétales de safran est réalisée en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des GR. L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des extraits utilisés et en les comparant à une molécule de référence, à savoir l'acide gallique étant un polyphénol à activité anti-hémolytique. En effet, nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentration (50 $\mu g/ml$ ) induit un effet anti-hémolytique, protecteur et

stabilisateur des membranes des GR, important. Cependant, cet effet protecteur diminue à forte concentration (150 µg/ml).

Dans notre travail, l'extrait hydro éthanolique a été plus ou moins efficace pour inhiber l'hémolyse des GR à la concentration de 50 µg/ml, mais cette stabilité membranaire a diminué avec l'augmentation de la concentration. De plus, cet extrait montre une activité anti-hémolytique identique à celle de l'acide gallique aux concentrations respectives de 75 et 150 µg/ml. Une étude a montré que les extraits hydro éthanoliques des pétales de safran inhibent la lyse des érythrocytes induite par des conditions hypotoniques, suggérant une stabilisation de la membrane cellulaire. Cette stabilisation est essentielle pour limiter les réponses inflammatoires en empêchant la libération des constituants lysosomaux des neutrophiles activés (**Chen et al., 2022**). Plusieurs études ont rapporté l'efficacité des extraits de plantes médicinales sur la stabilisation de la membrane du globule rouge (**Gadamsetty et al., 2013; Oyedapo et al., 2010; Sadique et al., 1989**).

Le traitement de l'inflammation repose actuellement sur l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens (AINS). Bien que ces molécules soient efficaces, elles peuvent entraîner des effets indésirables qui limitent leur utilisation à long terme. Le Diclofénac sodique, un dérivé de l'acide phénylacétique, est l'un des AINS les plus couramment utilisés en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques puissantes. Il agit principalement en inhibant l'enzyme COX-2, ce qui réduit la production d'acide arachidonique libre et, par conséquent, les médiateurs inflammatoires (**Goodman et Gilman, 2001**).

Des études ont démontré que le Diclofénac interagit avec les composants membranaires, notamment les bicouches de phospholipides. Il se localise principalement dans les groupes polaires des phospholipides, près de la région phosphate. Le Diclofénac peut former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau ou les groupes polaires des phospholipides, modifiant ainsi l'affinité de la membrane pour l'eau. En outre, sa charge négative altère les propriétés électrostatiques des phospholipides dans la région polaire, ce qui influence la structure de la bicouche lipidique (**Moreno et al., 2009**).

Des études ont montré que de nombreux flavonoïdes et polyphénols jouent un rôle crucial dans l'activité anti-inflammatoire de diverses plantes. Ces composés exercent leurs effets par plusieurs mécanismes, notamment l'inhibition des enzymes pro-inflammatoires, la réduction du stress oxydatif et la modulation des voies de signalisation inflammatoires. (**Luo et al., 2002 ; Okoli et Akah, 2004**).

L'activation incontrôlée ou prolongée de l'inflammation *in vivo* peut conduire à des altérations dangereuses, comme la dénaturation de protéines. Ces dernières subissent une perte de leur structure



qui aboutit à l'exposition d'autoantigènes (Clos, 2012), conduisant à de nombreuses maladies (arthrites, rhumatoïdes,...) (Lanneau, 2010).

Le phénomène de dénaturation protéique est un phénomène où la protéine perd sa structure tridimensionnelle, à cause de son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique (Lanneau, 2010), induisant l'exposition de certains sites qui vont devenir des auto-antigènes (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994). Les agents possédant des propriétés protectives contre la dénaturation protéique, seraient de bons candidats pour le développement de nouvelles molécules anti-inflammatoires (Chandra et al., 2012).

Selon nos résultats, on constate que l'effet anti-dénaturant des extraits hydro éthanoliques est inversement proportionnel à la concentration. D'autres études faites par Hosseinzadeh et al (2002) ont montré une activité anti-inflammatoire aiguë et/ou chronique des extraits éthanoliques des stigmates et des pétales de safran lors de tests induits chimiquement sur des rats. Des études ont montré que de nombreux flavonoïdes et polyphénols jouent un rôle crucial dans l'activité anti-inflammatoire de diverses plantes. Ces composés exercent leurs effets par plusieurs mécanismes, notamment l'inhibition des enzymes pro-inflammatoires, la réduction du stress oxydatif et la modulation des voies de signalisation inflammatoires (Gomes et al., 2008)

Selon les résultats obtenus avec l'extrait hydro éthanolique des pétales de safran et en combinant les paramètres étudiés pour la même concentration, nous concluons ce qui suit :

- Pour la concentration de 50 µg/ml, l'effet cytotoxique est quasi similaire pour les pétales de safran comparant à l'acide gallique. Pour la protection membranaire, l'extrait hydro éthanolique présente une stabilité membranaire inférieure à l'acide gallique, en ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, une faible diminution est notée.
- Pour la concentration de 75 µg/ml, il y a une augmentation du taux d'hémolyse de 67,04%, en revanche, le pourcentage de stabilité membranaire est quasi-similaire entre l'extrait hydro éthanolique des pétales de safran et l'acide gallique, il en est de même pour le pouvoir anti-inflammatoire.
- Pour la concentration de 150 µg/ml, la cytotoxicité est élevée de 150,80% pour l'extrait hydro éthanolique, le pourcentage de stabilité membranaire est quasi-similaire par rapport à l'acide gallique et l'activité anti-inflammatoire est diminuée de 11,22%.

La concentration de 50 µg/ml est particulièrement intéressante, car elle présente un faible pourcentage de cytotoxicité tout en conservant un effet protecteur sur les membranes et un effet anti-

inflammatoire comparable à ceux de la molécule de référence. Cela pourrait être attribué à la présence de nombreux flavonoïdes et polyphénols dans l'extrait.

# CONCLUSION

Les pétales de safran sont les principaux sous-produits de la transformation du safran qui représentent une quantité importante de déchets. En revanche ils contiennent plusieurs composés tels que des agents minéraux, des anthocyanes, des flavonoïdes, des glycosides, des alcaloïdes et du kaempférol. Comme les pétales de safran sont moins chers et produits en grande quantité que le stigmate du safran, ils peuvent donc être considérés comme une source appropriée à différentes fins.

Dans ce travail de Master, nous avons utilisé l'éthanol comme solvant pour extraire les polyphénols des pétales de safran, puis nous avons testé leurs activités biologiques *in vitro*. L'extraction éthanolique des produits phénoliques des pétales de safran a donné un rendement de 9,42%.

Nos résultats ont montré une faible cytotoxicité de l'extrait hydro éthanolique des pétales de safran, vis-à-vis des globules rouges, à la concentration de 50µg/ml qui est quasi-similaire à la molécule de référence (acide gallique). Cependant, cet effet cytotoxique augmente jusqu'à atteindre un taux de 150,80 µg/ml à la concentration de 150 µg/ml.

Les résultats de ce présent travail ont indiqué un effet anti-hémolytique considérable des extraits hydro éthanoliques des pétales de safran aux concentrations de 75 et 150 µg/ml comparativement à la molécule de composés phénoliques testée, à savoir l'acide gallique. Ainsi, ils procurent une stabilité membranaire aux globules rouges qui ont des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment la membrane du lysosome.

Le traitement de l'inflammation repose actuellement sur l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens. Bien que ces médicaments soient efficaces, ils entraînent souvent des effets indésirables à long terme. Dans ce contexte, l'exploration des principes bioactifs issus de plantes constitue une alternative prometteuse pour développer de nouvelles molécules efficaces et dépourvues d'effets secondaires.

L'extrait hydro éthanolique des pétales de safran a aussi révélé une activité anti-inflammatoire efficace avec un pourcentage maximal de 86,65% à faible concentration.

Notre étude a montré que les pétales de safran ne sont donc pas des déchets et ne devraient pas être jetés. En réalité, ils renferment des molécules possédant des activités anti-inflammatoires et anti-hémolytiques. Ces composés peuvent être extraits et utilisés dans divers domaines.

A cet effet, nos résultats ouvrent de larges perspectives pour d'autres études afin de :

- Déterminer et purifier les molécules bioactives responsables de l'activité
- Évaluer leur activité anti-inflammatoire *in vivo* et étudier la toxicité.

- Déterminer leur mécanisme et leur mode d'action.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdullaev, F. I., & Frenkel, G. D. (1999).** Saffron in biological and medical research. *Experimental Biology and Medicine*, 224(1), 20-26.
- Akhondzadeh, S., Shafiee Sabet, M., Harirchian, M. H., Togha, M., Cheraghmakani, H., Razeghi, S., ... & Zare, F. (2010).** Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 35(5), 581-588. doi:10.1111/j.1365-2710.2009.01133.x
- Asgarpanah, J., & Kazemivash, N. (2013).** Phytochemistry and pharmacologic properties of *Crocus sativus*. *L. Current Pharmaceutical Design*, 19(5), 739-748.
- Babaei, S., Talebpour, Z., & Amjadi, M. (2014).** High-performance liquid chromatography analysis of crocins in saffron stigmas and its application to quality control. *Journal of Chromatography A*, 1347, 1-9.
- Badie Bostan, H., Mehri, S., & Hosseinzadeh, H. (2017).** Toxicology effects of saffron and its constituents : A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(2), 110-121.
- Bostan, H. B., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2017).** Toxicology, pharmacology and therapeutic effects of *Crocus sativus* L. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 31(6), 891-934. doi:10.1002/ptr.5815.
- Bouhlali EDT, Sellam K, Bammou M, Alem C, Filali-zehzouti Y (2016).** *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 (05): 156-162.
- Bouvier, F., Isner, J. C., Dogbo, O., & Camara, B. (2005).** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in Plant Science*, 10(4), 187-194.
- Bulmus V, Woodward M, Lin L, Murthy N, Stayton P, Hoffman A (2003).** A new pHresponsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*. 93(2): 105-120.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M. R., & Alonso, G. L. (2006).** A new approach to saffron aroma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6), 503-512.
- Chahine, N. (2014).** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la Chemistry 103(2007) 1032-1043.
- Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S (2012).** Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 178-180.
- Chen, X., Yang, T., Zhang, C., & Ma, Z. (2022).** RNA-seq based transcriptome analysis of ethanol extract of saffron protective effect against corticosterone-induced PC12 cell injury. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 29.

- Costa-Lotufo LV, Khan MTH, Ather A, Wilke DV, Jimenez PC, Pessoa C, Moraes MO (2005).** Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(1): 21-30.
- Crozet, A., De Sus-Rousset, H., & De Durfort, S.-J. (2012).** *Crocus sativus* L. (Iridaceae), le safran (I). *Phytothérapie*, 10(2), 121-125
- Chahine, N. (2014).** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la Chemistry 103(2007) 1032-1043.
- Dupont G.** Abrégé de botanique systématique moléculaire. 14e édition. Masson Ed. 2007.
- Ebrahimzadeh MA, Ehsanifar S, Eslami B (2009).** Sambucuse bulusel burensis fruits: A good source for antioxidants. *Pharmacognosy Magazine*. 5(19): 213.
- Escribano, J., Alonso, G. L., Coca-Prados, M., & Fernández, J. A. (1996).** Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 100(1-2), 23-30.
- Falleh H (2008) in Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus*L). *Revue Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. (9) : 35-40
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002).** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177 (1): 91-104.
- Georgiadou, G., Tarantilis, P. A., Pitsikas, N. (2012).** Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of Parkinson's disease. *Phytomedicine*, 19(10), 930-936. doi:10.1016/j.phymed.2012.05.013.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008).** *Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids* [Text]. Bentham Science Publishers.
- Goodman G (2001).** The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. McGraw Hill Company, Newyork. P: 690-695.
- Hosseini, S. Z., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2013).** A comprehensive review on the biological and pharmacological activities of crocetin. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 65-80.
- 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.
- Imenshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2016).** Joghataei, M. T., Sadeghnia, H. R., Kazemi, S., & Kamali, M. (2018). Safranal as a promising natural neuroprotective agent against neurodegenerative disorders: a review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(5), 501-512. doi:10.22038/ijbms.2018.30468.7346



- Jabbari, N., Goli, M., & Shahi, S. (2024).** Optimization of Bioactive Compound Extraction from Saffron Petals Using Ultrasound-Assisted Acidified Ethanol Solvent : Adding Value to Food Waste. *Foods*, 13(4), Article 4
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. E. (2010).** Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma and petal for their pharmacological properties. *Molecules*, 15(9), 6244-6256.
- Kessler RC, Andrews G, Colpe LJ, Hiripi E, Mroczek DK, Normand SL, Zaslavsky AM (2002).** Short screening scales to monitor population prevalence and trends in non-specific psychological distress. *Psychological Medicine*. 32(06) : 959-976.
- Khorasgani, Z. N., Bahrami, A., & Fathi, M. (2016).** Optimization of bioactive compounds extraction from saffron petals using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 86, 130-137.
- Lanneau D (2010).** Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. *Sciences agricoles. Université de Bourgogne.* p2-10. Larsson SC, Wolk A (2008). Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 132: 1740-1745.
- Lee M, Feldman M (1997).** The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut*. 41(4): 425-426.
- Li, X., Xie, J., Fan, H., Tan, J., Zhang, D., Bao, Y., Geng, F., Pei, J., & Ma, H. (2023).** Stigmatisation et pétales de *Crocus sativus*.L. : Revue et comparaison de la phytochimie et de la pharmacologie. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(8), 104918.
- Lozano, P., Castellar, M. R., Simancas, M. J., & Iborra, J. L. (1999).** Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography A*, 830(2), 477-483. doi:10.1016/S0021-9673(98)009110
- Maggi, L., Carmona, M., Kelly, S. D., Marigheto, N., Alonso, G. L., & Parker, N. (2011).** Geographical origin differentiation of saffron spice (*Crocus sativus* L. stigma)—preliminary investigation using chemical and multi-element (H, C, N) stable isotope analysis. *Food Chemistry*, 128(3), 543-548. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.076
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus*L). *Revue «Nature & Technologie». B-Sciences Agronomiques et Biologiques.* (9) : 35-40.
- McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., Wallace, A. R., & Russell, G. B. (1997).** Seasonal variation in yield, composition, and quality of saffron in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25(2), 159-169.
- Milajerdi, A., Parohan, M., Larijani, B., & Esmailzadeh, A. (2016).** The anti-inflammatory potential of saffron (*Crocus sativus* L.) in experimental and clinical studies: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 8(12), 971. doi:10.3390/nu8120791

- Modaghegh, M. H., Shahani, M., Kermani, T., & Kamalinejad, M. (2008).** Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine*, 15(12), 1032-1037. doi:10.1016/j.phymed.2008.06.003.
- D. Mohajeri, G. Mousavi, M. Mesgari Abbasi,** Toxicité subaiguë de l'extrait éthanolique de stigmate de *Crocus Sativus* L. (safran) chez le rat.
- Moreno MM, Garidel P, Suwalsky M, Howe J, Brandenburg K (2009).** The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physicochemical study with lecithin phospholipids. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. 1788(6): 1296-1303.
- Mousavi, Z., Bathaie, S. Z., & Fadai, F. (2017).** Extraction and analysis of the bioactive compounds of saffron petals. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(18), 327-335
- Mzabri I, Addi M, Berrichi A., 2019.** Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*). *Cosmetics* 6: 63.
- Negbi, M. (1999).** Saffron: *Crocus sativus* L. (*Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*). **CRC Press.**
- Novaes MR, Novaes LCG, Melo AL, Recôva VL (2007).** Évaluation de la toxicité aiguë du champignon *Agaricus sylvaticus*. *Communications en Science de la Santé*. 18(3):1227-1236.
- Okoli CO, Akah PA (2004).** Mechanism of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasiascandens* P. beauv (*Araceae*). *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 79: 473- 481.
- Oyedapo OO, Akinpelu BA, Akinwunmi KF, Adeyinka MO, Sipeolu FO (2010).** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(4): 46-51.
- Palomares C. (2015).** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, Université Mentouri de Constantine. Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants, in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 4(2):89-96. 2008.
- Rahmouni, S., et Rhgis, S. (2016).** Etude phytochimique et évaluations des activités antioxydantes et antibactériennes des espèces : *Lavandula steochas*, *Glycyrrhizza glabra*. L, *Crocus sativus*. L et *Linum usitassimum* L. (Mémoire de master, université frères Mentouri, Constantine). 1- 9.
- Ramya, V., & Maheshwari, U. (2020).** Gallic acid attenuates oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in erythrocytes in vitro. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3), 1206-1210
- Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H. (2013).** Safranal: From an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), 12-26. PMC3701677
- Ríos, J. L., Recio, M. C., & Giner, R. M. (1996).** An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*, 10(3), 189-193.

- Robertis FA, Robertis EMH (1995).** Cell and molecular biology. London, UK Saunders. 239-245.
- Sadique J, Al-Rqobah WA, Bughait MF, El-Gindy AR (1989).** The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60: 525-532.
- Sánchez, A. M., Carmona, M., Zalacain, A., Carot, J. M., & Alonso, G. L. (2008).** Rapid determination of crocetin esters and picrocrocin from saffron spice (*Crocus sativus* L.) using UV-visible spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3167-3175
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020).** Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383. doi:10.1038/s41580-020-0230-3
- Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R., Dharamveer, K., Saraf, S. A. (2010).** Faculty of Pharmacy, Babu Banarasi Das National Institute of Technology and Management, Dr. Akhilesh Das Nagar, Faizabad Road, Lucknow, Uttar Pradesh, India.
- Tóth, B., Hegyi, P., Lantos, T., Szakács, Z., Keremi, B., Varga, G., ... & Balázs, A. (2019).** The efficacy of saffron in the treatment of mild to moderate depression: a meta-analysis. *Planta Medica*, 85(01), 24-31. doi:10.1055/a-0755-8656
- Verma, A., Singh, S., & Mishra, A. (2013).** Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 473-485. doi:10.1016/j.etap.2013.02.011
- Williams L.A.D., Connar A. O., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J.A., Conrad, J., Vogler B., Rosner H, Kraus W. (2008).** The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J*. 57 (4): 327- 331.
- Winterhalter, P., & Straubinger, M. (2000).** Saffron—renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*, 16(1), 39-59.

# ANNEXES

**Tableau A 1 Test de cytotoxicité (pourcentage d'hémolyse) de l'acide gallique et de l'extrait éthanolique des pétales de safran.**

<b>Test de cytotoxicité</b>	<b>Acide gallique</b>	<b>Extrait hydro-éthanolique</b>
<b>150 µg/ml</b>	54.13	68.42
<b>75 µg/ml</b>	37.14	45.57
<b>50 µg/ml</b>	28.48	27.28

**Tableau A 2 Test anti-hémolytique (Pourcentage de stabilité membranaire) de l'extrait éthanolique des pétales de safran.**

<b>Test anti-hémolytique</b>	<b>Acide gallique</b>	<b>Extrait hydro-éthanolique</b>
<b>150 µg/ml</b>	28.44	28.15
<b>75 µg/ml</b>	37.18	35.43
<b>50 µg/ml</b>	65.63	43.29

**Tableau A 3 Test anti-inflammatoire (Pourcentage de l'inhibition de la dénaturation des protéines) de l'extrait éthanolique des pétales de safran.**

<b>Test anti-inflammatoire</b>	<b>Diclofenac</b>	<b>Extrait hydro-éthanolique</b>
<b>150 µg/ml</b>	98.07	76.92
<b>75 µg/ml</b>	86.53	81.13
<b>50 µg/ml</b>	96.15	86.65

## ملخص

يعتبر الزعفران من أعلى التوابل في العالم ويتميز بخصائص طبية مثيرة للاهتمام. تنتج صناعة الزعفران كميات كبيرة من المنتجات الثانوية، بما في ذلك بتلات الزعفران التي تحتوي على مركبات حيوية فعالة ورخيصة ووفيرة، مما يجعلها بديلاً جذاباً لاستخراج المكونات الحيوية الفعالة. تحتوي بتلات الزعفران على مجموعة متنوعة من المركبات الحيوية الفعالة مثل البوليفينولات، الفلافونويدات، والأنثوسيانينات.

تركز دراستنا على الدراسة المخبرية لتأثيرات مستخلص بتلات الزعفران الإيثانولي على الكريات الدموية الحمراء والالتهابات والسمية الخلوية بتركيز مختلفة 50، 75 و150 ميكروغرام/مل، مع استخدام حمض الجاليك كمرجع. أظهرت النتائج أن التركيز البالغ 50 ميكروغرام/مل هو الأكثر فعالية، حيث تتعرض الخلايا لنسبة منخفضة من السمية مع الحفاظ على تأثيره الواقي على الأغشية الخلوية وتأثير مضاد للالتهابات.

تفتح هذه الخصائص الحيوية الفعالة آفاقاً جديدة لتطوير علاجات طبيعية، كما يساهم استخدام بتلات الزعفران في تحسين استغلال النبات بأكمله، ويدعم البحث عن حلول طبية بديلة ومستدامة

## الكلمات المفتاحية:

الزعفران، الكروسين، البيكروكروسين، السافرنال، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط السام للخلايا، بتلة الزعفران

## Abstract

Saffron is one of the world's most expensive spices, with interesting medicinal properties.

The saffron industry produces large by-products, including petals with potential bioactive compounds, which are cheap and abundant, an attractive alternative for the extraction of bioactive components. Saffron petals contain a variety of bioactive compounds (polyphenols, flavonoids, and anthocyanins).

Our work focuses on the in-vitro study of the anti-hemolytic, anti-inflammatory and cytotoxic effects of the ethanolic extract of saffron petals at doses of 50, 75 and 150  $\mu\text{g/ml}$ , with gallic acid as the reference.

The results obtained show that the 50  $\mu\text{g/ml}$  concentration is the most interesting, as it presents a low percentage of cytotoxicity while retaining a protective effect on membranes and an anti-inflammatory effect.

These bioactive properties open up new prospects for the development of natural therapeutic treatments. The valorization of saffron petals optimizes the use of the whole plant, and contributes to the search for alternative and sustainable medical solutions.

**Keywords:** *Crocus sativus*. L, saffron, crocin, picrocrocin, safranal, anti-inflammatory activity, cytotoxic activity, petal of saffron.



## Résumé

Le safran est l'une des épices les plus chères au monde et possède des propriétés médicinales intéressantes.

L'industrie du safran produit de gros sous-produits, y compris des pétales avec des composés bioactifs potentiels, qui sont bon marché et abondants, une alternative attrayante pour l'extraction de composants bioactifs. Les pétales de safran contiennent une variété de composés bioactifs (polyphénols, flavonoïdes, et des anthocyanines).

Notre travail porte sur l'étude *in-vitro* des effets anti-hémolytiques, anti-inflammatoires et cytotoxiques de l'extrait éthanolique des pétales de safran aux doses de 50, 75 et 150 µg/ml, avec pour référence l'acide gallique.

Les résultats obtenus montrent que la concentration de 50 µg/ml est la plus intéressante, car elle présente un faible pourcentage de cytotoxicité tout en conservant un effet protecteur sur les membranes et un effet anti-inflammatoire

Ces propriétés bioactives ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de traitements thérapeutiques naturels. La valorisation des pétales de safran optimise l'utilisation de la plante entière, et contribue à la recherche de solutions médicales alternatives et durables.

**Mots clés :** *Crocus sativus. L.*, safran, crocine, picrocrocine, safranal, activité anti-inflammatoire, activité cytotoxique, pétale de safran.