



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2021

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par:

KADI Lydia & ADJAL Loubna

Thème

Activités antibactérienne et antioxydante du safran.

Soutenu le: 13 /07/2021

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
BENAZZOUZ Kheira	MAA	Univ. de Bouira	Présidente
SAIT-DIB Sabrina	MCB	Univ. de Bouira	Promotrice
DJOUAHRA-FAHEM Djamilia	MAA	Univ. de Bouira	Examinatrice
BOUDEHANE Rima		Univ. de Bouira	Invitée

Année Universitaire : 2020/2021



Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord notre Dieu Allah, tout puissant de nous avoir donné la bonne santé, la force et le courage et surtout la patience d'accomplir pendant toutes ces années d'étude et de scarification ce modeste travail.

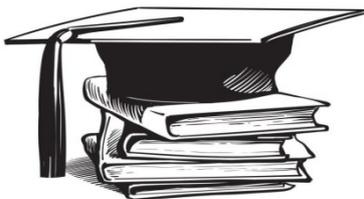
*Nous tenons à remercier notre chère promotrice **Madame SAIT DIB Sabrina** que dieu la protège. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude. Nous vous remercions pour nous avoir donné la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants, d'être rigoureuse et enthousiaste. Et à notre Co-promotrice **Madame Boudahanne Ryma**, de nous avoir bien encadrés ce travail, nous les remercions chaleureusement pour leur gentillesse, aide et patience, ainsi que pour leurs précieux conseils, leurs judicieuses Orientations, leur encouragement et leur disponibilité jusqu'à la fin de ce travail.*

*Nous tenons à remercier également les membres du jury, Madame **BENAZZOUZ Kheira** qui a honoré de sa présence notre soutenance et Madame **DJOUAHRA-FAHEM Djamilia** qui a consacré tout son temps pour examiner et évaluer notre manuscrit.*

Un grand merci à nos enseignants, qu'ont accompagnés tout le long de notre formation durant notre cursus universitaire. En particulier :

*Ces remerciements vont également le département et administration de la faculté **SNV-ST** de l'université de Bouira **Akli Mouhand Oulhadj** pour tous les efforts fournis pour assurer aux étudiants une formation actualisée.*

En fin nous remercions tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.



Merci beaucoup



Dédicace

*Je dédie ce mémoire à Ma mère **Malika bouilil**, ma vie de bonheur, son amour, son soutien, ses sacrifices, ses conseils et son encouragement pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père **Ali**, qu'il trouvera ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A ma cher sœur **Ikrām**, mes cher frères **Lyes, Yanis**, Que Dieu le plus puissant vous garde et exhausse tous vos vœux. Restons unis et soyons à la hauteur de nos parents. Que Dieu vous bénit.*

*A mon binôme et amie **Loubna** avec qui j'ai partagé tous les moments de stress de fatigue, mais aussi de fous rires.*

*A ma promotrice **Mme SAIT DIB Sabrina**, la bouffée d'oxygène qui me ressource toujours dans les moments pénibles, Je prie Dieu le tout puissant pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.*

*A mon ami **Abdelhaq** que je remercie vivement pour son soutien moral.*

Je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude a mes chers collègues de la promotion microbiologie appliquée 2020/2021.



Lydia



Dédicace

Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage de finir ce travail, qui est le fruit de mes années de quête et de savoir.

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents

Aux deux être les plus chers au monde, sources de mes joies et secret de ma force que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments,

A ma chère mère, que Dieu ait pitié d'elle et la fasse vivre dans son paradis, dans ma vie tu resteras toujours le plus beau thème dans mon jardin d'amour.

A mon père, que dieu le protège, mon profond amour et respect pour ses grands sacrifices.

*A mes chères frères et sœurs, et surtout à ma sœur **Souad** ma 2^{ème} mère, pour sa patience, son encouragement continu, et ses aides tout au long de mon parcours,*

*Mes sincères gratitude s'adresse aussi à ma promotrice, ma enseignante **Mme SAIT-DIB.S** pour ses conseils, son assistance, ses efforts dès le début jusqu'à la réalisation de cette mémoire, que dieu la protège et lui accorde la santé et la joie dans sa vie.*

*A ma binôme **Lydia**, qui a été toujours près de moi dans la joie comme la tristesse, que dieu la protège et nous accorde une longue vie d'amitié.*

*A mes meilleurs amies, **Imane, Houda, Lydia, Chaima et Imane C**, que dieu leur accorde le succès, la santé et le bonheur dans leur vie.*

*A toutes la famille **ADJAL** et **TOUATI***

*A toutes mes collègues de promotion **Master II Microbiologie appliquée 2020/2021**, et toutes mes enseignants (es) de mon parcours universitaire.*

A toute personne qui me connaît.



Loubna

Table de matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
<i>Chapitre I : Plantes médicinales</i>	
I. Plantes médicinales.....	3
I.1. La phytothérapie.....	3
I.2. Qu'est-ce qu'une plante médicinale?.....	4
I.3. Le pouvoir d'une plante médicinale.....	4
I.3.1. Définition des principes actifs.....	5
I.3.2. Les différents groupes des principes actifs.....	5
<i>Chapitre II : Monographie de la plante étudiée « Crocus sativus L. »</i>	
II. Monographie de la plante étudiée « <i>Crocus sativus L.</i> ».....	9
II.1. Présentation des Iridacées.....	9
II.2. <i>Crocus sativus</i>	10
II.2.1. Histoire.....	11
II.2.2. Etymologie et noms vernaculaires.....	11
II.2.3. Culture et écologie.....	12
II.2.4. Répartition géographique et production du <i>Crocus sativus</i>	13
II.2.5. Description botanique.....	14
II.2.6. Classification.....	15
II.2.7. Composition chimique.....	16
II.2.8. Vertus thérapeutiques.....	17
Partie pratique	
<i>Chapitre III : Matériels et méthodes</i>	
III. Matériels et méthode.....	19
III.1. Matériel.....	19

III.1.1 Récolte et préparation.....	19
III.2. Méthodes.....	20
III.2.1. Préparation de l'extrait.....	20
III.2.2. Tests phytochimiques.....	20
III.2.2.1. Mise en évidence des principaux constituants chimique.....	20
III.2.2.2. Dosages des polyphénols totaux.....	22
III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	22
III.2.2.4. Dosage des caroténoïdes.....	23
III.2.3. Activité antimicrobienne.....	24
III.2.3.1. Bactéries.....	24
III.2.3.2. Standardisation des souches.....	24
III.2.3.3. Evaluation de l'effet antimicrobien par technique d'aromatogramme.....	24
III.2.4. Activité antioxydante.....	26
III.2.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire (piégeage du radical libre DPPH).....	26
III.2.4.2. Test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline sulfonique (ABTS).....	26
III.2.5. Etude statistique.....	27
<i>Chapitre IV : Résultats et discussion</i>	
IV. Résultats et discussion.....	28
IV.1. Etude phytochimique.....	28
IV.1.1. Rendement d'extraction.....	28
IV.1.2. Tests phytochimiques.....	28
IV.2. Dosage des composés phénoliques.....	30
IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	31
IV.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	32
IV.2.3. Dosage des caroténoïdes.....	33
IV.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	34
IV.4.1. Antibiogrammes.....	34
IV.4.1.1. Activité antibactérienne des extraits à l'égard des bactéries à Gram positif.....	36
IV.4.1.2. Activité antibactérienne à l'égard des bactéries à Gram négatif.....	38
IV.4.1.3. Activité antimicrobienne de l'acide gallique.....	39
IV.4.1.4. Discussion générale de l'activité antimicrobienne.....	39

IV.5.Activités antioxydante.....	41
IV.5.1.Activité scavenger du radical DPPH.....	41
IV.5.2.Activité scavenger du radical ABTS.....	43
Conclusion et perspectif.....	44
Références bibliographiques	
Annexes	
résumé	

Table des figures

N° de Figure	Titre	Page
01	Cycle de développement annuel de <i>Crocus sativus</i>	12
02	Pays producteurs du safran	13
03	(A) Corne, (B) Fleur et (C) Stigmate de <i>Crocus sativus</i>	15
04	Crocus d'automne (<i>Crocus sativus</i>) en fleur. Les trois stigmates oranges de chaque fleur sont collectés et séchés pour en faire une épice au safran	16
05	Principaux constituants chimiques de <i>Crocus sativus</i>	17
06	Photographie des stigmates de safran	19
07	Schéma explicatif de la technique des disques (aromatogramme)	25
08	Structure de la forme réduite d'ABTS et la forme du radical cationique ABTS +	26
09	Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits du <i>Crocus sativus</i>	31
10	Teneur en flavonoïdes dans l'extrait obtenu à partir des stigmates de <i>Crocus sativus</i> par infusion et macération	32
11	Teneur en caroténoïdes de l'extrait préparé à partir des stigmates de <i>Crocus sativus</i> L par les deux méthodes (infusion et macération)	33
12	Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé/macération) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
13	Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé/macération) vis-à-vis d' <i>Enterococcus faecalis</i>	37
14	Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé/macération) vis-à-vis d' <i>E coli</i>	38
15	Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé/macération) vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i>	38
16	Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante du radical DPPH	42
17	Pourcentage d'inhibition de l'activité scavenger du radical ABTS	43

Table des tableaux

N° de tableaux	Titre	Page
I	Tableau représentatif des différentes souches microbiennes testées	24
II	Aspect, le rendement en extrait sec et le solvant de solubilité des différentes modes d'extraction de stigmates de <i>Crocus sativus. L.</i>	28
III	Résultats des tests phytochimiques réalisées sur la partie aérienne de <i>Crocus sativus. L</i> selon différentes modes de préparation	29
IV	Activité antibactérienne des différents extraits de <i>Crocus sativus</i> étudiés, le standard l'acide gallique et les antibiotiques	35

Liste des abréviations

α : Alpha

Abs : Absorbance

AH : antioxydante

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

ATCC : American type culture collection

CH₂SO₄ : Acide sulfurique

C.sativus : *Crocus sativus*

DPPH : Diphényle-Picrylhydrazyl

EAG : équivalent acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EQ : Equivalent Quercétine

FeCl₃ : Le chlorure de fer

Gram⁺ : Gram positive

Ha : Hectare

HCl : L'acide chlorhydrique

H₃PW₁₂O₄₀ : acide phosphotungstique

H₃PMO₁₂O₄₀ : acide phosphomolybdique

JC : Jésus-Christ

M_eOH : Méthanol

Mo₈O₂₃ : molybdène

MS : Matière sèche

R : résistante

SM : solution mère

UV-VIS : Ultraviolet-Visible

W₈O₂₃ : tungstène

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des centaines d'année, les êtres humains utilisent diverses plantes et herbes présentes dans leur environnement, pour traiter, soulager diverses pathologies et maladies. Ces plantes sont riches en métabolites dits : secondaires, elles peuvent donc synthétiser de nombreux composés à partir de principales sources de médicaments, elles constituent donc une énorme bibliothèque de composés avec une vaste diversité chimique et d'activités biologiques. Ainsi, l'évaluation de ces activités reste donc une tâche très intéressante et de nombreuses études peuvent être intéressantes (**Jaccot & Campillo, 2003**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique ainsi les médecins, chimistes et des biologistes cherchent à mieux comprendre l'héritage des espèces spontanées en médecine traditionnelle. Leurs utilisation, leurs indications et leur principe actifs dans diverses pathologies et maladies qui sont étudiés depuis une vingt ans (**Djebaili, 1984; Bouattoura, 1988; Maizak et al., 1993**).

Elles ont été utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la médecine, la nutrition, les boissons, les teintures et les cosmétiques. Les effets antiseptiques de plusieurs plantes aromatiques (épices, condiments) indiquent la présence d'antioxydants et d'ingrédients antibactériennes (**Hirasa & Takemasa, 1998**).

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à trouver puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et les plantes à cuire en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse donc un autre moyen pour lutter contre les maladies à par les antibiotiques (**Rauter et al., 1989**).

Parmi les plantes connus depuis des millénaires à des fins thérapeutiques, nous trouvons la famille des Iridacées, qui renferme plusieurs espèces dont le safran ou *Crocus sativus*.L. connu sous le nom de safran, appartenant à la famille des Iridacées, c'est une plante vivace largement cultivé dans différentes parties du monde, en particulier en Iran (**Esmaeili et al., 2011**).

Le safran est une plante très répandue en tant qu'épice et condiment mais aussi utilisée dans beaucoup de remèdes traditionnels dans le monde entier. Il fait l'objet de nombreuses études botaniques, chimiques et toxicologiques, afin de prouver son efficacité scientifique sur le plan médical ainsi que son innocuité. L'utilisation du safran se développe fortement actuellement.

Dans le cadre de notre travail, nous nous intéressons à l'étude l'activité antibactérienne et antioxydante de la plante *Crocus sativus*, récoltée de la région M'chedallah Willaya de Bouira.

Notre travail se repartie en deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons des généralités sur les plantes médicinales, la plante et les activités biologiques.
- La deuxième partie est la partie expérimentale qui est consacrée au méthodes d'extraction des composés phénoliques à partir du stigmates du safran, leur dosage et leur effet antibactériens vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* et effet antioxydant.

Enfin, une conclusion qui résumera tous les résultats obtenus et quelques perspectives.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I

Plantes médicinales

I. Plantes médicinales

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives et préventives (**Iserin, 2001**).

À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondés, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**).

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Iserin, 2001**).

I.1. La phytothérapie

La phytothérapie existe depuis que le monde est monde. Les hommes ont toujours utilisé les plantes pour s'alimenter, dans un premier temps, et pour se soigner empiriquement, ensuite (**Moatti, 1990**).

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Iserin, 2001**).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. C'est pourquoi, par exemple, on utilise à nouveau l'absinthe chinoise et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments (**Iserin, 2001**).

Le terme de phytothérapie provient du grec « phyton » : plante et « therapeia » : traitement. Elle se définit donc comme l'utilisation des plantes, de parties de plantes ou de

préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe pour soigner les maladies (**Moatti, 1990**).

C'est une science à la fois ancestrale et moderne c'est-à-dire : elle exploite des savoirs transmis oralement de génération en génération à certaines catégories d'individus initiés : les tradipraticiens de santé et les herboristes (**Chabrier, 2010**).

I.2. Qu'est-ce qu'une plante médicinale ?

Environ 35000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales dans le monde, constituant la biodiversité la plus largement utilisée par l'homme. Malgré l'influence croissante du système de santé moderne, les plantes médicinales continuent de répondre à des besoins importants (**Elqaj et al., 2007**). Ils ont un large champ d'action et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines organes de corps et sont reconnues pour pouvoir traiter divers problèmes (**Iserin, 2001**).

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Kanter et al., 2006**). Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisée à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogue utiles (**Sofowora, 2010**).

Autrement dit, une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine ou animale. Elle est utilisée de différentes manières (décoction, macération, infusion, etc.) et une ou plusieurs de ses parties peuvent être utilisées (racine, rhizome, feuilles, fleurs, etc.) (**Baran, 2000**).

I.3. Le pouvoir d'une plante médicinale

Depuis le XVIII^e siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs (**Iserin, 2001**).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

I.3.1. Définition des principes actifs

Les principes actifs font partie des métabolites secondaires. Ce sont des substances chimiques actives issues de plantes fraîches ou desséchées, se trouvant souvent dans les racines, les écorces, les sommités fleuries, les feuilles, les fleurs, les fruits, ou encore les graines (Benghanou, 2012).

Le principe actif est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme ou l'animal, contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale (Pelt, 1980).

Les différents groupes des principes actifs sont les polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponines, alcaloïdes et les huiles essentielles. Leur recherche est d'une importance capitale car elle permet la mise au point de médicaments essentiels.

I.3.2. Les différents groupes des principes actifs

Les effets de certaines plantes sont bien connus. La camomille allemande, par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs. L'aloès était déjà connu du temps de Cléopâtre, où il servait à adoucir la peau (Iserin, 2001).

Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Iserin, 2001).

A) Les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, généralement de haut poids moléculaire ayant des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques, forment une grande classe de produits chimiques qu'on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles mais également dans toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, racines, etc.) (Hennebelle *et al.*, 2004; Sarni *et al.*, 2006).

Ce sont des composés photochimiques, organique non azoté et poly-hydroxylés comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils se subdivisent en sous classes principales, à savoir : les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins (Sarni *et al.*, 2006).

Les polyphénols jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance, mais aussi utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**).

B) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune, orange ou rouge. Ils contiennent 15 atomes de carbone rangés dans la configuration C6-C3-C6 ; soit deux noyaux aromatiques A et B reliés entre eux par un hétérocycle oxygéné (C) (**Erlund, 2004; Balasundram et al., 2006**).

Les flavonoïdes sont généralement des antibactériennes, mais possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (**Wichtl et al., 2009**). Elles peuvent être utilisées de multiples façons dans l'industrie cosmétique et alimentaire (jus de citron) et dans l'industrie pharmaceutique (les fleurs de trèfle rouge traitent le rhume et la grippe en réduisant les sécrétions nasales) (**Bruneton, 1999**).

C) Tanins

Les tanins, une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, sont des composés phénoliques complexes obtenus à partir de la condensation des phénols simples (**Makkar, 2003**). Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines etc.) et des liaisons entre les fibres de collagènes, d'où leur viennent la plupart de leurs propriétés (**Paolini et Dorchies, 2003**). Il en existe deux types :

- *Les tanins condensés* : polymères avec des unités flavonoïdes reliées par de fortes liaisons de carbone, non hydrolysable mais pouvant être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (**Hopink et al., 2003**).
- *Les tanins hydrolysables* : polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique (**Hopink et al., 2003**).

Tanin est un terme dérivé de l'ancienne pratique qui utilisait d'extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux. Il sert à protéger les végétaux contre les parasites, à réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure mais aussi ayant un effet antioxydant, anti-inflammatoire, antivirales et antiseptiques (**Iserin, 2001**).

D) Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, alcalines et de structure complexe (noyau hétérocyclique), qui existent dans des nombreuses familles des plantes **(Wichtl, 2009)**.

Les alcaloïdes constituent la plupart des ingrédients actifs des plantes médicinales. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain **(Harbone et Herbert, 1999)**.

La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool, ont un goût amer, et certains sont très toxiques **(Harbone et Herbert, 1999)**.

E) Les huiles essentielles

Les huiles essentielles ou encore « essences aromatiques végétales » sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique, se trouvent dans les organes sécréteurs. Elles se définissent comme étant des extraits volatils, odorants et de consistance huileuse, tirés de certaines plantes par la distillation à la vapeur, le pressage ou l'incision des plantes qui les composent. Elles apparaissent dans un grand nombre de plantes en tant que sous-produits du métabolisme secondaire **(Bruneton, 1999; Lardry et Haberkorn, 2007)**.

Ces essences jouent un rôle dans la protection des plantes contre un excès de lumière, dans l'attrance des insectes pollinisateurs et dans le traitement des maladies inflammatoires (allergies, l'eczéma etc.) et l'élimination des gaz intestinaux (les fleurs fraîches ou séchées de la camomille) **(Boree, 2012)**.

En outre, l'usage médicinal des huiles essentielles dépend de leurs odeur et de leur saveur ; leur effet irritant sur la peau et les muqueuses ; leur propriétés désinfectantes et leur action bactéricides **(Boree, 2012)**.

F) Saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines (mot dérivé du latin « sapo ») doivent leur nom au fait que, comme le savon, ses composés moussent une fois agités avec de l'eau (**Bottger et Melzig, 2011**).

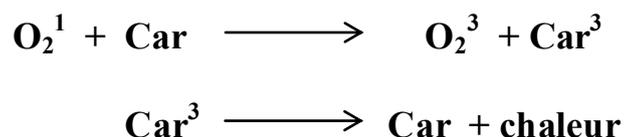
Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone), et de plantes qui en contiennent (**Iserin, 2001**).

Ils sont dotés d'activité hormonale moindre, possèdent des propriétés hémolytiques et facilitent l'absorption des aliments mais parfois sont toxique à l'égard des animaux à sang froid (**Iserin, 2001**).

G) Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles naturels, synthétisés par les plantes, contribuent à la coloration jaune, orange et rouge des végétaux (plantes, champignons, algues) (**Stahl et Sies, 2004**). Ils dérivent d'une structure basale à 40 carbones qui inclue un système de doubles liaisons conjuguées. Les caroténoïdes font parti de la famille des tétraterpenoïdes et ils sont divisés en deux groupes: les composés non oxygénés "les carotènes " tels que le bêta carotène et les composés oxygénés "les xanthophylles" tels que la lutéine (**Tanumihardjo, 2013**).

Les caroténoïdes jouent un rôle antioxydant très important. Le système de doubles liaisons conjuguées au niveau de leurs longues chaînes qui servent à l'absorption lumineuse ; il confère à ces molécules leur couleur attractive permettant ainsi leur qualification et quantification. Le pouvoir antioxydant des caroténoïdes est basé sur leur propriété atténuante de l'oxygène singulet et ils le transforment en O₂ moléculaire triplet et leur capacité à piéger les radicaux peroxydes (**Sergio et al., 1999**).



Chapitre II

*Monographie de la plante
étudiée « Crocus sativus »*

II. Monographie de la plante étudiée « *Crocus sativus* L. »

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à celle des civilisations. En effet, l'histoire des peuples à travers les régions du monde atteste que ces plantes ont toujours occupées une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (**Lahmadi et al., 2013**).

Parmi ces plantes, *Crocus sativus* L., autrement dit le safran, qui appartient à la famille des iridacées et qui se caractérise par des stigmates de la fleur qui représente le safran en lui-même, est désigné par l'appellation « or rouge », appellation hautement justifiée par sa grande valeur commerciale due à la cherté de la main d'œuvre (**Lahmadi et al., 2013**).

Cette épice historique, réputée depuis l'antiquité pour son usage culinaire, est bien moins connue du grand public pour son emploi dans les domaines de la médecine et de la cosmétique. Pourtant, les anciens, n'ont cessé de l'utiliser et de la cultiver pour ses nombreuses vertus (**Palomares, 2015**).

Ce chapitre a pour but d'identifier avec précision cette espèce médicinale poussant dans la région, par le biais d'un inventaire suffisamment détaillé (étude botanique, culture et composition chimique), ainsi que les différents usages thérapeutiques et les maladies traitées.

II.1. Présentation des Iridacées

Les iridaceae sont une famille vaste et diversifiée d'environ 80 genres et 2 200 espèces, principalement centrée sur les continents de l'hémisphère sud, l'Australasie, l'Afrique subsaharienne et l'Amérique latine, bien qu'avec une représentation substantielle en Amérique du Nord et en Eurasie (**Britannica, 2020**).

Elle est généralement caractérisée par des feuilles équitantes isobilatérales et des fleurs épigynes à trois étamines (en face des tépales externes, c'est-à-dire dépourvus de verticille intérieur, contrairement à d'autres Liliales, comme les Burmanniaceae, qui manquent de verticille extérieur) (**Britannica, 2020**).

Outre les orchidées, les iridacées représentent l'une des plus grandes familles du superordre Liliiflorae, qui se caractérise largement par la présence de tépales pétaloïdes, souvent de couleur vive (**Rudall, 1994**).

Les plantes de la famille des Iridacées sont principalement des herbes vivaces , bien qu'il existe également quelques arbustes et herbes à feuilles persistantes. La plupart ont de longues feuilles étroites, généralement à nervation parallèle (**Rudall, 1994**).

Les tiges souterraines peuvent appartenir à au moins trois types structurels :rhizomes ,ampoules et cormes . Chez de nombreuses espèces d'iris, la tige est horizontale, robuste et annelée de cicatrices foliaires. C'est un rhizome qui pousse souvent partiellement exposé mais est fermement enraciné dans le sol. Les espèces d'iris originaires du sud-ouest d'Europe produisent généralement des bulbes. Ce type de tige est court et conique et de nombreuses bases de feuilles naissent, l'une à l'intérieur de l'autre. Ces culots sans soudure constituent l'essentiel de l'ampoule et servent à propager la plante (**Rudall, 1994**).

La reproduction par graines est également très importante dans la famille des iris et est essentielle dans le développement de nouveaux hybrides . Chez *Crocus*, une seule fleur peut se développer à partir de chaque corne, mais dans de nombreux autres genres, comme chez *Iris* et *Gladiolus*, une inflorescence (grappe de fleurs), parfois ramifiée, naît de la tige souterraine (**Rudall, 1994**).

Les fleurs possèdent généralement trois sépales , trois pétales et trois larges stigmates réceptifs au pollen branches , sous lesquelles sont cachées les anthères productrices de pollen. Ces parties florales sont situées au-dessus d'ovaire (ovaire inférieur), qui se compose de trois carpelles unifiés en un seul pistil. Les ovules dans la partie ovarienne deviennent des graines et l'ovaire mûrit en fruit (**Rudall, 1994**).

Les membres des Iridaceae produisent des capsules sèches, un fruit qui s'ouvre pour libérer les graines (**Rudall, 1994**).

II.2. *Crocus sativus*

Le safran est l'épice la plus chère au monde et est utilisé depuis l'antiquité pour son arôme et sa capacité à donner aux plats et aux textiles une teinte jaune doré. Au cours des dernières décennies, les propriétés médicinales de la plante sont également devenues intéressantes (**Nemati et al., 2019**).

II.2.1. Histoire

Le safran, considéré comme un cadeau des dieux qui peut guérir les maladies et les blessures, est l'une des épices les plus anciennes, son histoire remontant à la plus haute antiquité (Algrech, 2001). Des auteurs antiques, comme Homère, Salomon, Pline ou Virgile, mentionnent cette fleur dans leur récit, qui était alors considérée comme divine (Mzabri *et al.*, 2019).

La première représentation date de 1600 à 1700 avant JC et a été trouvée sur une fresque du palais de Minos en Crète, représentant des personnages cueillant du safran (Mzabri *et al.*, 2019).

Concernant l'origine et la domestication du safran : Vavilov indique que son origine est le Moyen-Orient, tandis que d'autres auteurs suggèrent l'Asie centrale ou les îles du sud-ouest de la Grèce (Mzabri *et al.*, 2019).

Negbi prouve également que *Crocus sativus* a très probablement été sélectionné et domestiqué en Crète à l'âge du bronze. De cette zone primaire, il se serait propagé à l'Inde, à la Chine et aux pays du Moyen-Orient et c'est à partir de ces derniers pays que les Arabes ont répandu le safran dans tout le bassin méditerranéen, comme au Maroc, où il était très probablement introduit au IX^e siècle (Mzabri *et al.*, 2019).

En 2015, la plantation de safran au Maroc a été réalisée sur une superficie d'environ 1600 ha avec un rendement moyen de 3,5 t, faisant du Maroc le quatrième producteur mondial de safran (Mzabri *et al.*, 2019).

II.2.2. Etymologie et noms vernaculaires

Le nom « safran » est dérivé du latin « safranum », qui est inspiré de l'arabe « zaafarân » dont ces racines expriment un concept de base, la couleur jaune. Le mot « crocus » vient du grec « krokos », qui veut dire « filament », par rapport aux stigmates de la plante. Au même temps, le terme « sativus » signifie « cultivé », car *Crocus sativus*, ne peuvent pas se reproduire sans les mains humaines en raison de leur reproduction végétative (Dupont, 2001).

Les espèces du genre *Crocus* possèdent plusieurs nominations. Elles sont connues sous le nom: « zafaran » en arabe, « koricos » en grec alors que les romains utilisaient le

terme « crocum ». En Inde, cette épice dorée est connue sous le nom de « kum kum » et «kesar » en sanskrit et « koung » en langue cachemirienne (Srivastava *et al.*, 2010).

II.2.3. Culture et écologie

Le safran s'octroie une culture à contre saison car la végétation se produit en hiver et la dormance commence dès le début de l'été (Douglas et Perry, 2003).

Comme la pérennisation du safran est obtenue grâce à la multiplication végétative du bulbe souterrain, tous les safrans dans le monde ont le même patrimoine génétique et sont issus d'un seul bulbe (Douglas et Perry, 2003).

Le *Crocus* est une plante stérile n'existant pas à l'état sauvage. Par conséquent, sa culture est complètement dépendante de l'homme et cela depuis des centaines d'années. (Douglas et Perry, 2003).

La culture exigeante du safran fait de cette plante une ressource à haute valeur ajoutée permettant la création d'emplois et l'amélioration du revenu familial, notamment, en zones rurales. Également, sa pratique peut contribuer à la mise en valeur de terre en régions arides et semi arides et son développement s'inscrit dans la stratégie du développement durable (Lahmadi *et al.*, 2013).

Voici ci-dessous une figure qui représente le cycle de développement annuel de *Crocus sativus* :

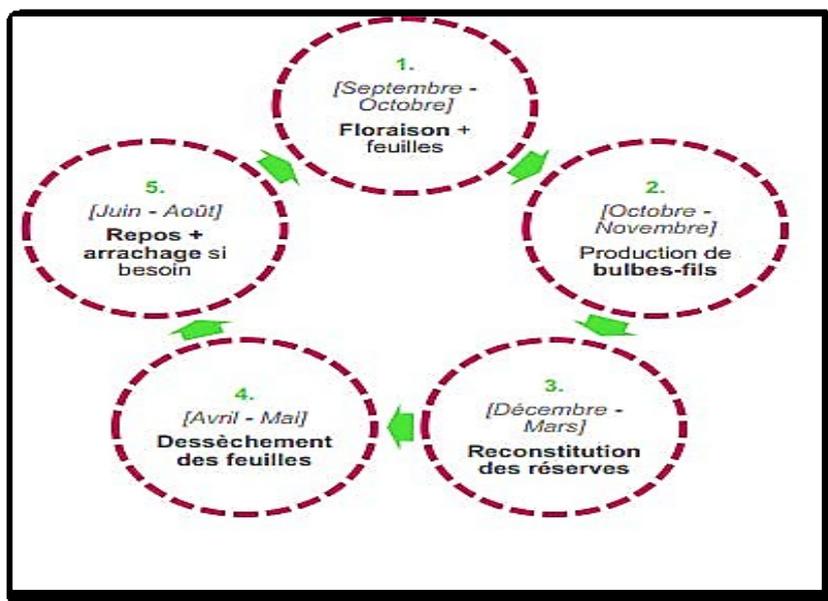


Figure 01: Cycle de développement annuel de *Crocus sativus* (Lazérat,2009).

II.2.5. Description botanique

Le safran appartient à la famille des iridacées. Cette plante herbacée vivace (Figure 03) atteint 10 à 25 cm de hauteur en se développant à partir de ses bulbes (Mzabri *et al.*, 2019).

Le bulbe, de forme sub-ovoïde, est de taille et de formes variables. Il a une structure massive et est couvert par 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 (Mzabri *et al.*, 2019).

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 (Mzabri *et al.*, 2019).

Les feuilles varient de cinq à 11 par bourgeon. Ils sont très étroits et mesurent entre 1,5 et 2,5 mm de largeur de couleur vert foncé. Ils mesurent de 20 à 60 cm de long avec une bande blanchâtre à l'intérieur et une nervure à l'extérieur (Mzabri *et al.*, 2019).

Les fleurs de *Crocus sativus* commencent à apparaître au début de l'automne, vers la fin septembre de couleur pourpre composées de six tépales, trois sont 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). À 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 de 9 à 10 cm de long. Le style se termine par un seul stigmate composé de trois filaments de couleur rouge intense dont la longueur dépasse celle des tépales, qui sont la partie de la plante intéressante pour l'homme du point de vue de la culture (Mzabri *et al.*, 2019).

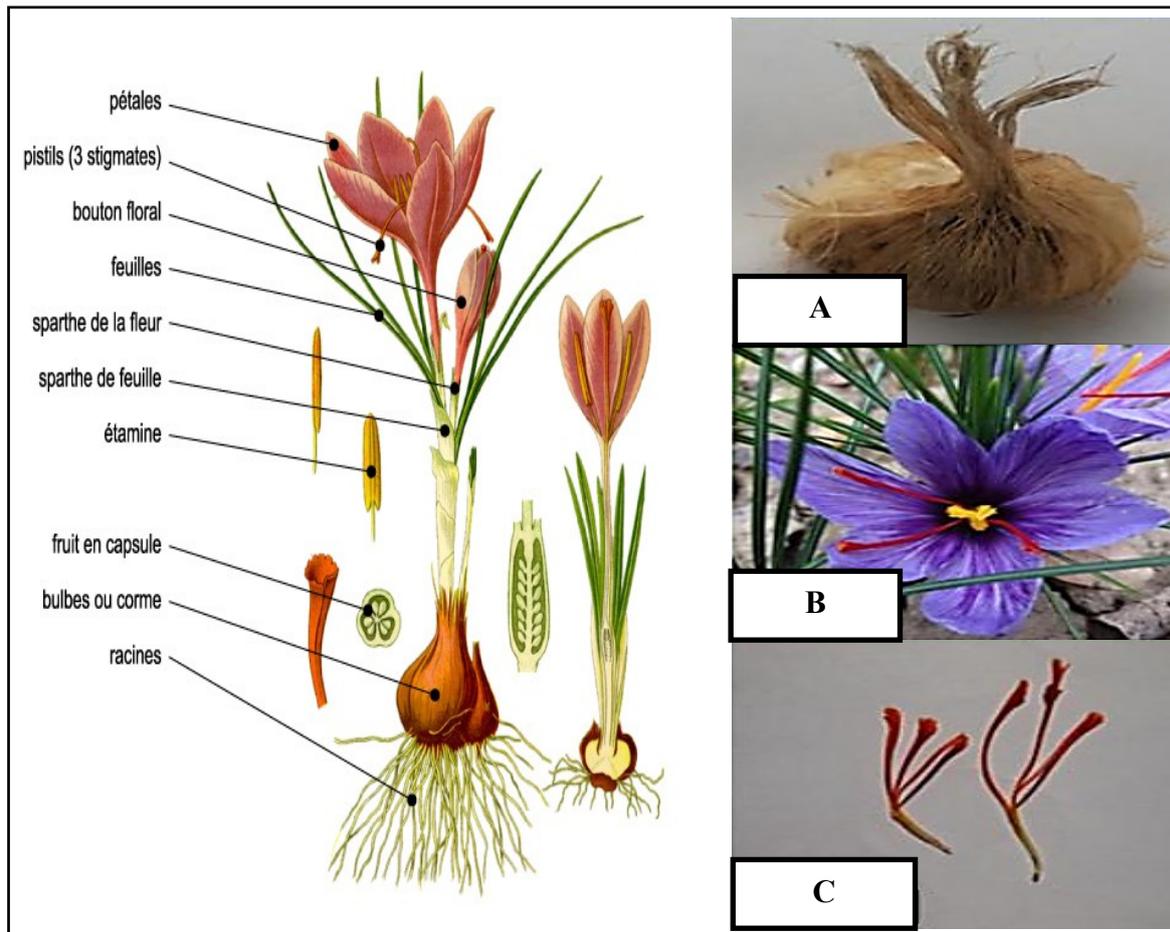


Figure 03 : (A) Corme, (B) Fleur et (C) Stigmate de *Crocus sativus* (Jan *et al.*, 2014).

II.2.6. Classification

Parmi les 85 espèces signalées du genre *Crocus*, *C. sativus* (figure 04) est la seule espèce qui attire l'attention particulière en raison de son potentiel médicinal, de ses propriétés colorantes et de son utilisation d'épices (Dar *et al.*, 2017).

La position systématique de *Crocus sativus* L. est la suivante (Dar *et al.*, 2017) :

- ❖ Règne : Plantae
- ❖ Division : Spermatophyta
- ❖ Sous-division : Angiospermae
- ❖ Classe : Monocotyledonae
- ❖ Sous-classe : Liliidae
- ❖ Ordre : Liliales
- ❖ Famille : Iridaceae
- ❖ Genre : *Crocus*
- ❖ Espèce : *C. sativus*



Figure 04 : Crocus d'automne (*Crocus sativus*) en fleur. Les trois stigmates orange de chaque fleur sont collectés et séchés pour en faire une épice au safran (**Britannica, 2020**).

II.2.7. Composition chimique

Outre les principaux métabolites tels que les glucides, les minéraux, les graisses et les vitamines, le *Crocus sativus* L. contient quatre principaux composés bioactifs, à savoir la crocine (esters monoglycosyliques de polytène), la crocétine (un précurseur d'acide dicarboxylique caroténoïde naturel de la crocine), la picrocrocine (précurseur glycoside monoterpénique du safranal et produit de la dégradation de la zeaxanthine) et le safranal (Figure 05), tous contribuant respectivement à la couleur, au goût et à l'arôme (**Jan et al., 2014**).

La présence de composés biologiquement actifs tels que la crocétine, la picrocrocine et le safranal fait de cette épice un candidat prometteur pour être un aliment fonctionnel (**Dar et al., 2017**).

Les études menées sur la composition phytochimique du safran ont rapporté divers composés volatils (>150), non volatils (caroténoïdes, lycopène et α et carotènes) et aromatiques (**Dar et al., 2017**).

Trois composants clés du safran ont été signalés comme les crocines, la picrocrocine et le safranal (exprimés principalement dans le stigmate), suivis de la présence de vitamines (riboflavine et thiamine) sous forme de traces (**Dar et al., 2017**).

La couleur rouge du stigmate est due à la crocine (longue chaîne de tétraterpènes hautement insaturés et conjugués)(Dar *et al.*, 2017).

Chez *C. sativus* et ses autres espèces, cinq sortes différentes de crocines (crocine-1 à crocine-5) ont été documentées (Dar *et al.*, 2017).

L'adour et l'amertume du safran sont dues à la picrocrocine, et est utilisé comme agent aromatisant (Dar *et al.*, 2017).

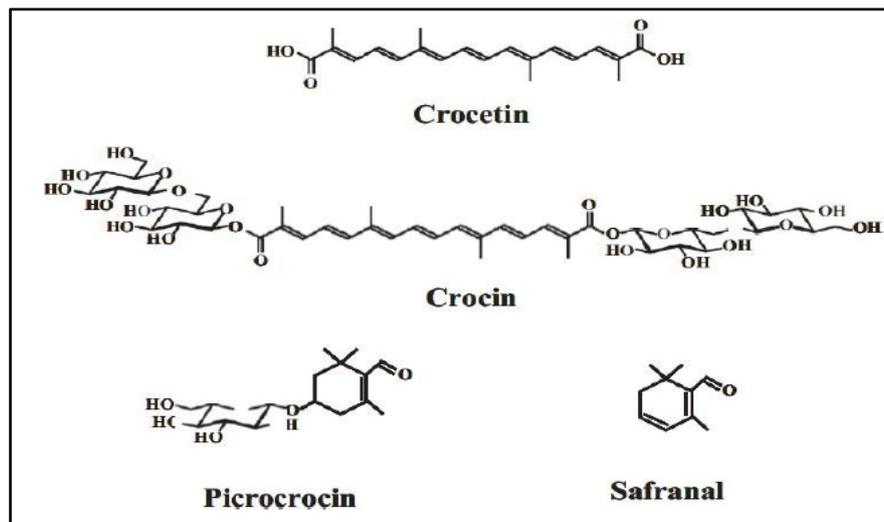


Figure 05 :Principaux constituants chimiques de *Crocus sativus* (Jan *et al.*, 2014).

II.2.8. Vertus thérapeutiques

Outre son importance médicinale, le safran est utilisé comme épice (considéré comme le roi de tous les temps du monde des épices), comme colorant, comme parfum, dans l'industrie alimentaire (Dar *et al.*, 2017).

A) Cosmétologie et utilisations en parfumerie du safran

Outre les propriétés antioxydantes, le safran présente de multiples intérêts pour des applications cosmétiques. Plus récemment, il a suscité un regain d'intérêt pour son utilisation en cosmétique (Mzabri *et al.*, 2019).

Depuis l'Antiquité, le safran est utilisé à des fins cosmétiques, absorbé en infusion ou encore en application cutanée, mélangé à de la matière grasse ou macéré dans du lait d'ânesse, pour ses propriétés éternelles de jeunesse (Mzabri *et al.*, 2019).

Cléopâtre l'utilisait dans ses produits de beauté. En médecine traditionnelle iranienne, le safran peut améliorer le teint et peut être utilisé pour traiter l'érysipèle. En médecine grecque traditionnelle, il peut rafraîchir la peau du visage et est utilisé pour soulager le foie de la domination de la bile et pour traiter l'acné, les maladies de la peau et les plaies. De plus, le corps peut paraître plus jeune et plus lumineux (Mzabri *et al.*, 2019).

Dans une autre catégorie, les femmes hindoues utilisaient le safran pour fabriquer le bindi, le point jaune sur le front. C'est en quelque sorte un troisième œil symbolisant la bonne fortune et la conscience (Mzabri *et al.*, 2019).

De nos jours, les tépales de safran ont été étudiés dans plusieurs études comme étant riches en crocine et en kaempférol, représentant ainsi une source importante de composés bioactifs pour des formulations cosmétiques potentielles (Mzabri *et al.*, 2019).

B) Potentiel médicinale du safran

Selon les rapports, depuis les temps préhistoriques, le potentiel médicinale de *C. sativus* est bien documenté (Dar *et al.*, 2017).

Dans le scénario actuel, l'extrait d'eau de safran (caroténoïde) s'est avéré avoir un potentiel médicinale pour traiter le cancer, les complications cérébro-vasculaires et cardiovasculaires ; il est également signalé qu'il a diverses autres activités dans différentes parties du monde, par exemple (Dar *et al.*, 2017) :

- ❖ Au Moyen-Orient, il serait utilisé comme antispasmodique, aphrodisiaque, carminatif, activateur de la cognition, emménagogue et thymoleptique (Dar *et al.*, 2017) ;
- ❖ Dans le système de médecine traditionnelle chinoise, le safran était utilisé pour traiter l'aménorrhée, les accouchements à haut risque, la ménorragie et la lochiostase post-partum (Dar *et al.*, 2017);
- ❖ Dans le système indien de médicaments, il était utilisé pour traiter la maladie de la bronchite, de la fièvre, des maux de tête, des maux de gorge et des vomissements (Dar *et al.*, 2017).

Diverses activités pharmacologiques sont également signalées dans le safran, à savoir : activité anti-hypertensive, activité anti-convulsivante, activité antitussive, action anti-inflammatoire et activité antioxydante (Dar *et al.*, 2017).

Partie pratique

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel

La partie expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de la microbiologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre à l'université Akli Mohand Oulhadj Bouira.

Ce travail comporte trois parties :

- Préparation de l'extrait à partir des stigmates de safran *Crocus sativus* par la méthode d'infusion et macération;
- Analyse phytochimiques et dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes, tannins, saponines et caroténoïdes au niveau de cet extrait des stigmates de *Crocus sativus* L.;
- Evaluation de l'activité antiradicalaire par le teste de DPPH et ABTS;
- Teste l'activité antibactérienne de l'extrait par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide.

III.1.1 Récolte et préparation

Le matériel végétal est utilisé au cours de notre étude est la partie aérienne de *Crocus sativus*.L, une plante locale de la région de Mehdallah, Wilaya de Bouira.

Le matériel végétal constitué de la partie aérienne de la plante récoltée pendant le mois de novembre 2020. Après séchage de la partie aérienne à une température ambiante, Elle est conservée et stockée dans des bocaux en verre fermé hermétique à l'abri de la lumière solaire et de l'humidité (afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique) pendant un a deux mois.



Figure 06: photographie des stigmates de safran.

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation des extraits

Des différentes méthodes d'extractions peuvent être adaptées à l'extraction des composés naturels. Parmi celles-ci nous avons choisi:

❖ L'infusion hydroalcoolique

C'est une technique simple et facile à mettre en œuvre. Une quantité de 2,5g des stigmates du safran sèche, a été mise en contact avec 50 ml du méthanol/ eau à 35/15 (v/v) bouillant, cette préparation a été agitée et laissée à refroidir à l'abri de la lumière pendant 15 minute. Après filtration par un papier filtre wattman, on récupère le filtrat.

❖ Macération

Dans un Erlenmeyer, mettre 2,5g du matériel végétal séché (stigmates du safran sèche) et non broyé avec 50 ml de mélange méthanol-eau a 35/15 (v/v) sous agitation à l'obscurité, à une température ambiante pendant 24h. Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

Le solvant d'extraction a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 ° C. L'extrait sec obtenu est pesé pour estimer le rendement d'extraction obtenu puis quantifié par la formule ci- dessous. Les extraits obtenus sont conservés dans dessiccateur à l'abri de l'humidité et de la lumière.

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0) / E] * 100$$

P₀: poids du cristalliseur vide (g).

P₁: poids du cristalliseur contenant l'extrait après l'évaporation (g).

E: poids de la plante (g).

III.2.2. Tests phytochimiques

III.2.2.1. Mise en évidence des principaux constituants chimiques

Le but de mettre en évidence la présence ou l'absence des principaux métabolites secondaires. Les tests sont réalisés sur les extraits obtenus par infusion et macération.

a) Recherche des polyphénols

Pour la recherche et la caractérisation des composés appartenant au groupe des polyphénols nous utilisons la réaction au chlorure ferrique. 0,5 ml de solution de FeCl₃ (p / v) ajouté dans 2 ml de solution d'essai, formation d'une couleur intense indique la présence de phénols.

b) Recherche des flavonoïdes

Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes sont mis en évidence grâce à la réaction shinoda.

Dans un tube à essai contenant 0,5 ml de l'extrait, 10 gouttes d'acide chlorhydrique dilué suivies d'un petit morceau de magnésium ont été ajoutées. La formation de couleur rouge, orange ou violet a indiqué la présence de flavonoïdes.

c) Recherche des tannins

Pour la recherche de la présence des tanins, on utilise:

Test de chlorure ferrique: 1,5 g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de MeOH 80 %. Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes. L'ajout de FeCl_3 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Rizk et al., 1982**).

d) Recherche des terpénoïdes

A 2.5 ml de chaque extrait a été ajouté 1ml de chloroforme suivi d'une homogénéisation nous avons ajouté 1ml H_2SO_4 concentré (**Pooja et Vidyasagar, 2016**).

e) Caractérisation des saponines par l'indice de mousse

Nous avons versé dans des tubes à essai, 10ml de l'extrait total aqueux. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 seconds. Après un repos de 15 min en position verticale on mesure la hauteur de la mousse persistante en cm. Une hauteur persistante supérieur a 1 cm indique la présence abondante de saponosides (**bekro et al., 2007**).

f) Recherche des alcaloïdes

La mise en évidence des alcaloïdes est basée sur leur capacité à former des précipités ou des complexes insolubles avec des métaux lourds contenus dans les « réactifs généraux des alcaloïdes » (Wagner, Mayer, Bouchardat, Dragendorff, etc.).

✚ Test de Wagner

un volume de 2 mL de chaque extrait a été mélangé avec 0.5 mL de réactif de Wagner. La formation d'un précipité brun rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes (**Kokate et al., 2001**).

III.2.2.2. Dosages des polyphénols totaux

Le composé phénolique réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui se réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

Cette réaction développe une coloration bleue qui est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux et qui peut être dosée par spectrophotométrie UV-VIS dont l'absorption maximale est de 765 nm (**Ribéreau-Gayon, 1968; Cicco *et al.*, 2009**).

La teneur en composés phénoliques totaux, des extraits préparés ci-dessus, est déterminée par une méthode spectrophotométrique décrite par **Owens et Johns (1999)**.

Dans des tubes à essai, un volume de 1000 μ l de réactif de Folin Ciocalteu (1N) est additionné à chaque tube contenant préalablement 10 μ l d'extrait (mg/ml) de plante et 90 μ l de mélange (méthanol/eau distillée). Après 10 min d'incubation, 800 μ l de la solution de carbonate de sodium est ajoutée à chaque tube. Une fois agité, les tubes sont incubés pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Des mesures d'absorbance sont enregistrées à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre par rapport à un blanc préparé sans extrait. Les concentrations en composés phénoliques de l'extrait sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe II)

III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes

Le réactif utilisé est la solution incolore de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Le principe de cette technique est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un complexe jeune qui absorbe à 415 nm (**Marinova *et al.*, 2005**).

Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxydes OH libre en position 5, qui peuvent donner en présence du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) un complexe très stable de couleur jaune. Ce dernier peut être dosé par un spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde 415 nm (**Ribéreau-Gayon, 1968; Bahorun *et al.*, 1996; Djeridane *et al.*, 2006**).

La détermination du taux de flavonoïdes contenus dans les extraits est réalisée par la méthode décrite par (**Djeridane *et al.*, 2006**). Pour 2 ml d'une solution d'extrait (3mg/ml) des stigmates, un volume équivalent du trichlorure d'aluminium à 2% préparé dans du méthanol, est ajouté. Le mélange est vigoureusement homogénéisé et laissé reposer pendant 15 minutes à l'obscurité, la lecture est effectuée à 415 nm par rapport un blanc préparé sans l'extrait. Les

concentrations en flavonoïdes sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (Annexe II). Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par g de matière sèche (mg EQ/g MS).

III.2.2.4. Dosage des caroténoïdes

La valeur d'absorbance de caroténoïdes des extraits a été déterminée par spectrophotomètre UV-vis à 480 nm après dilution. Le rendement total en caroténoïdes (ug/g matière sèche) a été calculé selon la formule suivante (**Gu et al., 2008**):

$$\text{Rendement en carotenoides } (\mu\text{g/g}) = \frac{100 \times A \times D \times V}{0,16 \times w}$$

A: absorbance

D: dilution

V: Volume de solvant d'extraction

w: poids de la plante séchée

III.2.3. Activité antimicrobienne

III.2.3.1. Bactéries

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait des stigmates de *Crocus sativus*, a été réalisée vis-à-vis de 4 souches bactériennes. Il s'agit de deux bactéries à Gram négatif et deux bactéries à Gram positif (tableau I), qui sont entretenues par des repiquages sur un milieu solide qui s'agit d'une gélose nutritive et incubé à 24 h.

Tableau I : Tableau représentatif des différentes souches microbiennes testées.

Souches bactériennes	Reference
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

ATCC: American Type Culture Collection.

III.2.3.2. Standardisation des souches

L'activité de tout agent antimicrobien dépend de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée. La taille de l'inoculum bactérien est un élément primordial contribuant de façon essentielle à la qualité des résultats de l'antibiogramme, d'où la nécessité de standardiser l'inoculum bactérien. Ce dernier est préparé, dans de l'eau physiologique, à partir d'une culture jeune et pure de 18 h. Cette suspension bactérienne est soumise à un balayage 625 nm afin de déterminer l'absorbance de chaque souche dont l'intervalle est entre $A=0.08$ à 0.13 .

III.2.3.3. Evaluation de l'effet antimicrobien par technique d'aromatogramme

L'activité antimicrobienne de l'extrait de *Crocus sativus* est évaluée en utilisant la méthode de diffusion des disques sur milieu solide " méthode de l'aromatogramme".

Le protocole suivi dans la présente étude, pour réaliser cet aromatoigramme, est rapporté par plusieurs auteurs **Chevalier et al., 2003; Kablan et al., 2008; Abou Elkhair et al., 2010** ou les disques d'antibiotiques vierges sont remplacés par des disques imprégnés avec les différents concertations d'extrait. A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, des colonies isolées sont prélevées (2 à 4 colonies) puis mises dans 9 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, l'absorbance de la suspension est ajustée à une

absorbance entre 0,08-0.13 à 625 nm à l'aide de spectrophotomètre. Des boîtes de Petri coulées avec le milieu gélosé Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur, sontensemencées dans des conditions aseptiques, par écouvillonnage, à partir de suspensions de souches tests. Ensuite des disques de papier stériles sont déposés dans des boîtes de Petriensemencées puis imprégnés avec un volume de 20 µl des différents concentration d'extrait de safran à différents concentrations (**Karabay-Yavasoglu et al., 2007; Abou Elkhair et al, 2010**). Les boîtes de Pétri sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant deux heures pour une pré-diffusion. Après l'incubation à 37°C/24 heures pour les souches bactériennes, des zones d'inhibition tout autour des disques sont mesurées en millimètres (**Bansemir et al., 2006**).

Les solvants d'extraction (méthanol absolu) sont utilisés comme témoins négatifs vis-à-vis de toutes les souches cibles. Un standard de polyphénol (acide gallique) est testé *vis-à-vis* de toutes les souches cibles.

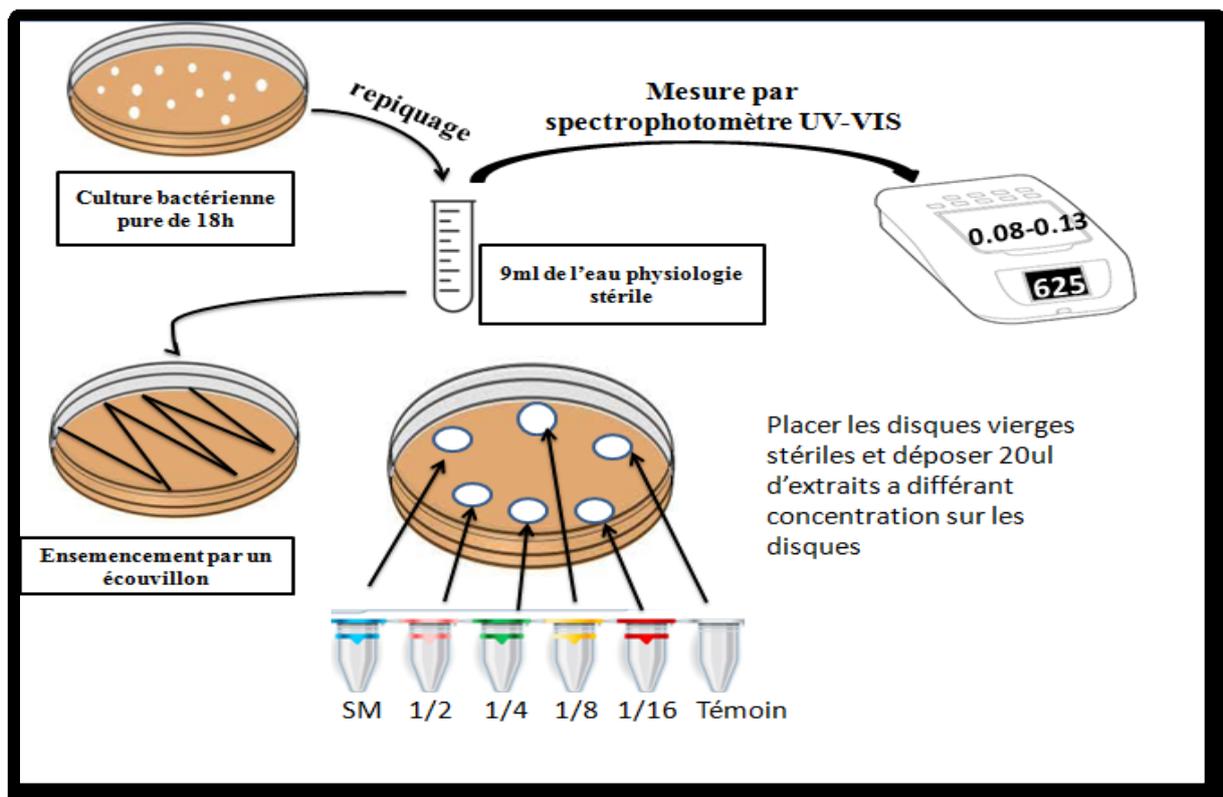


Figure 07 : Schéma explicatif de la technique des disques (aromatogramme).

Des zones d'inhibition autour des disques sont mesurées en millimètres après incubation à 37°C/24 heures pour les souches bactériennes (**Bansemir et al., 2006**).

La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition: $\emptyset < 8 \text{ mm}$: souche non sensible (aucune activité); $9 < \emptyset < 14$

mm: souche sensible (activité intermédiaire); $15 < \varnothing < 19\text{mm}$: souche très sensible (forte activité) et $\varnothing > 20\text{ mm}$: souche extrêmement sensible (très forte activité) (Pereira *et al.*, 2006).

III.2.4. Activité antioxydante

III.2.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire (piégeage du radical libre DPPH)

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire de l'extrait de safran, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl) qui est un radical relativement stable, dans ce test, les antioxydants réduisent le diphénylpicrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl hydrazine, dont la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

Le DPPH absorbe à une longueur d'onde de 515 nm à 520 nm dans le visible. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Chaouche *et al.*, 2013. Un volume de 50 μl de différentes concentrations (0 à 0,4 mg/ml) de chaque extrait est ajouté à 1950 μl de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. Les tubes sont incubés à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante.

L'absorbance est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 μl de chaque concentration de l'extrait et 1950 μl du méthanol (Sanchez Moreno *et al.*, 1998).

III.2.4.2. Test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline sulfonique (ABTS)

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser un radical cationique ABTS de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS incolore. Par piégeage d'un proton par l'antioxydant suivant la méthode de Katalinic *et al.*, (2006).

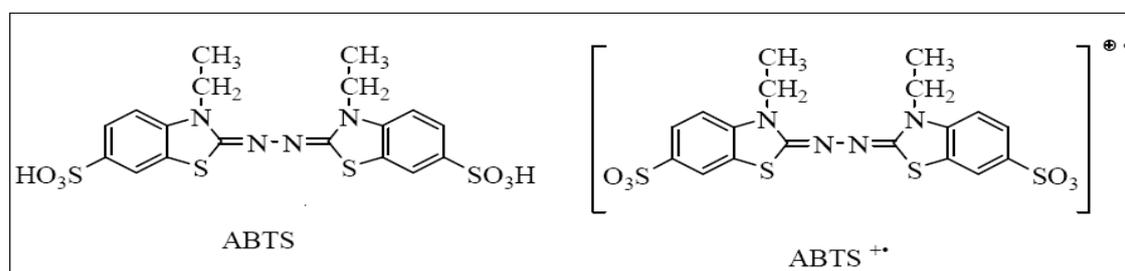


Figure 08 : Structure de la forme réduite d'ABTS et la forme du radical cationique ABTS^{•+} (Marc *et al.*, 2004).

Un volume de 50 µl des d'extrait (12,5 mg/ml) des différents extraits est ajouté à un volume de 1950 µl d'une solution ABTS préparé dans l'éthanol. Ce mélange est agité et laissé au repos. La décoloration, par rapport à un contrôle, est mesurée au spectrophotomètre à 737 nm après incubation à température ambiante, à l'obscurité, pendant 7 minutes.

$$\% \text{ Inhibition} = [(\text{Abs } 737 \text{ contrôle} - \text{Abs } 737 \text{ échantillon}) / \text{Abs } 737 \text{ contrôle}] \times 100$$

-Abs₇₃₇ contrôle: correspond à l'absorbance du blanc après 7 min d'incubation ;

-A₇₃₇ échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon après 7 min d'incubation.

III.2.5. Etude statistique

Toutes les déterminations ont été effectuées en triple essais. La moyenne et l'écart type pour chaque test ont été calculés par Microsoft Excel. Les différents résultats obtenus pour les trois extraits ont été comparés par une analyse de variance (ANOVA). Des différences significatives ($p < 0,05$) entre les moyennes sont déterminées par le test LSD (Low Significant Difference). Le logiciel utilisé est STATISTICA5.5.

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

IV.1. Etude phytochimique

IV.1.1. Rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec, l'aspect ainsi que les solvants de solubilisation des différentes modes d'extractions ont été mentionnées dans le tableau II.

Tableau II: Aspect, le rendement en extrait sec et le solvant de solubilité des différentes modes d'extraction de stigmates de *Crocus sativus L.*

	Stigmates de <i>Crocus sativus L.</i>		
Modes d'extraction	Aspect	Solvant de solubilisation	Rendement en extrait sec (%)
Infusion	Pâte	Méthanol/Eau distillée	10
Macération	Pâte	Méthanol/ Eau distillée	30

Wang *et al.* (2008) rapportent dans leur étude sur des herbes chinoises que le rendement d'extraction dépend du processus utilisé, car les constituants des cellules se libèrent par rupture des parois cellulaires vers le solvant organique, un phénomène qui s'intensifié par l'usage d'un solvant polaire (Li *et al.*, 2012). La taille des particules végétales joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. Il est généralement admis que sous une forme broyée, la matière végétale présentera une plus grande surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer sa solubilité (Bonnaillie *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent au niveau des stigmates que : l'extrait préparé par infusion et macération a un aspect de pâte avec un rendement d'ordre 10% et 30%, respectivement.

IV.1.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les différentes modes de préparations de l'extrait de stigmates de *Crocus sativus L.* (infusion et macération), nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires présents dans notre plante étudiée

par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques). Les résultats sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Résultats des tests phytochimiques réalisées sur la partie aérienne de *Crocus sativus L* selon différentes modes de préparation.

Métabolites secondaires (mg EAG/g MS)	Réactions	Milieux de préparation	
		Infusion	Macération
Polyphénols totaux	FeCl ₃	+++	+++
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	+++	+++
Alcaloïdes	Wagner	++	++
Saponines	Eau distillée	++	++
Terpénoïdes	Chloroforme/ H ₂ SO ₄	+++	+++
Tanins	FeCl ₃ à 1%/ méthanol	++	++

+ : Présence ; - : Absence

Les tests phytochimiques réalisés sur les différentes préparations (macération, infusion) à partir des stigmates de *Crocus sativus. L* ont révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires.

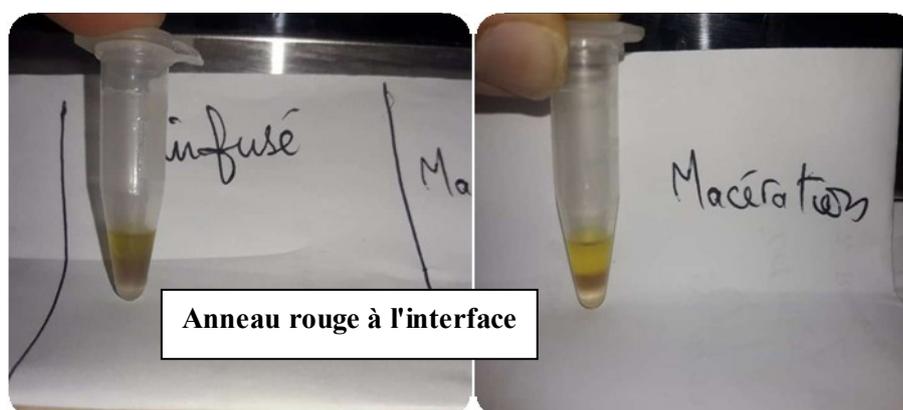
Ces tests ont montré la richesse des stigmates de *Crocus sativus L* en polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins, saponines et terpénoïdes.

- ✓ La présence des polyphénols totaux est confirmée par la formation d'une couleur intense indique la présence de phénols.
- ✓ La mise en évidence des flavonoïdes dans deux milieux hydroalcoolique (macération, infusion) est confirmée par la formation de couleur rouge, orange ou violet a indiqué la présence de flavonoïdes.
- ✓ La couleur bleu noir indique la présence des tanins galliques tandis que la couleur brun verdâtre confirme la présence des tanins cathéchiques.
- ✓ La mise en évidence des Alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité brun rougeâtre.

- ✓ La présence abondante des saponosides est indiquée par une hauteur persistante supérieure à 1 cm (indice de la mousse).



- ✓ La mise en évidence des Terpénoïdes est confirmée par la formation d'une couleur brune-rouge à l'interface.



IV.2. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont l'objet de nombreuses études à cause de leur action bénéfique sur la santé (**Richard *et al.*, 2001**). Après l'ajout des réactifs de Folin-Ciocalteu et du carbonate de sodium, une couleur bleue est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration phénolique de l'extrait.

Après l'addition de la solution de chlorure d'aluminium, une couleur jaune est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Cette coloration est due à la formation de complexes entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. La molécule flavonoïde agit comme donneur d'électrons et le métal $AlCl_3$ comme accepteur d'électrons en formant deux liaisons avec deux atomes d'oxygène de la première molécule (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols totaux est analysée quantitativement par la méthode spectrophotométrique en utilisant la méthode de folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique (mg EAG) par gramme de la matière végétale sèche, en utilisant les équations de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (Annexe II).

Les résultats obtenus montrent que la teneur en composés phénoliques de *Crocus sativus* varie d'un extrait à un autre.

Les résultats de dosage des polyphénols totaux ont révélées que l'extrait préparé par macération à partir des stigmates de *Crocus sativus*, présente la concentration la plus élevée (7.63 mgEAG/g). Cependant, l'extrait préparé par infusion présente une teneur faible (3.80 mgEAG/g) par rapport à celle préparé par macération (figure 09).

L'analyse statistique montre une différence significative ($p < 0.05$) entre les teneurs en composés phénoliques des différents extraits.

Ces différences de teneurs peuvent être provoqué par la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu, c'est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

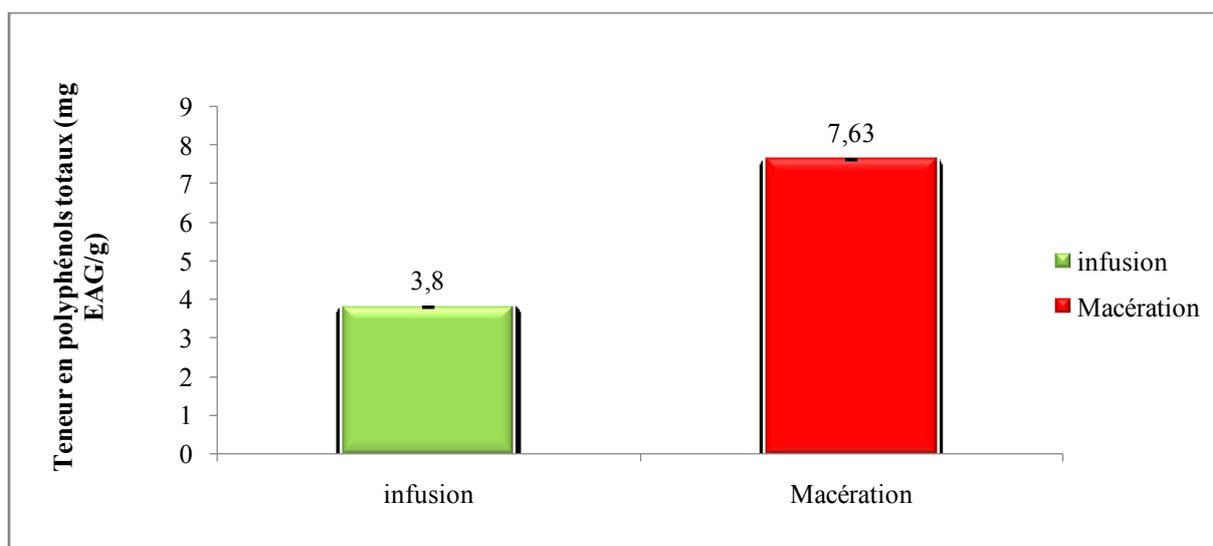


Figure 09 : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits du *Crocus sativus*.

Jadouali et al. (2018)) ont analysé des extraits du safran (*Crocus sativus*) et ont enregistré une teneur de 65.34 mg EAG/g en polyphénol totaux qui n'est pas en parfait accord avec nos résultats.

Les valeurs observées dans cette étude est proche de celles rapportées par **Karimi et al. (2010)** qui ont noté une teneur de 6.5 mg EAG/g pour la macération et 5,7 mg EAG/g pour l'infusion pour des extraits du stigmates du safran, par contre il est inférieur à celui trouvé par **Asgarpanah et al. (2013)**, les teneurs varient de 4,09mg à 17,34mg EAG/g MS.

IV.2.2. Dosage des 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 milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS). En utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (Annexe II).

Les teneurs en flavonoïdes de la partie aérienne de *Crocus sativus. L* sont présentées dans la figure suivante :

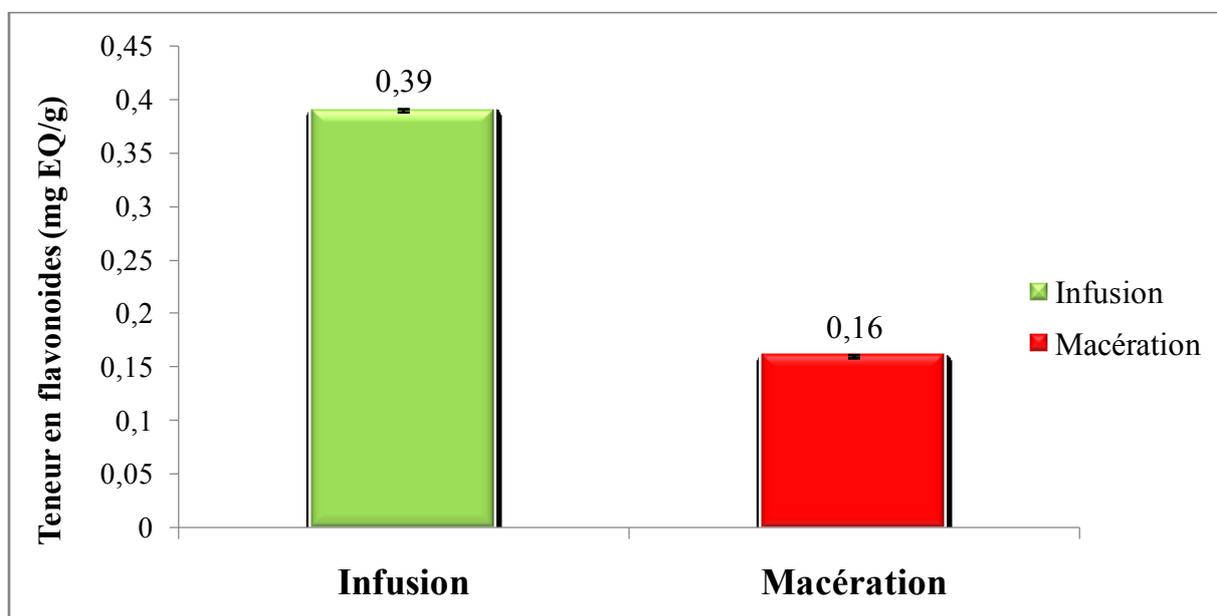


Figure 10 : Teneur en flavonoïdes dans l'extrait obtenu à partir des stigmates de *Crocus sativus* par infusion et macération.

D'après les résultats obtenus, les flavonoïdes sont présents dans les deux extraits, l'étude statistique a révélé des différences significatives ($p < 0.05$) entre les différents extraits. La teneur la plus élevée est notée pour l'extrait de l'infusion (0.39 mg EQ/g) alors que l'extrait obtenu par macération présente la teneur la plus faible (0.16 mg EQ/g)

Les valeurs observées dans cette étude sont inférieures à celles rapportées par **Karimi et al. (2010)** qui ont noté une teneur de 5.8 mg EQ/g pour la macération et 3,8 mg EQ/g pour l'infusion pour des extraits du stigmates du safran.

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées à la méthode d'extraction (solvant d'extraction et température), leur structure chimique, la taille des particules formant l'échantillon, le temps et les conditions de stockage ainsi que la présence d'interférents (**Lee et al., 2003; Li et al., 2006; Ebrahimi et al., 2008**).

IV.3. Dosage des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes a été réalisé par la méthode spectrophotométrique UV-visible à 480 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme ($\mu\text{g/g}$) pour les différents extraits étudiés et sont représentés dans la figure suivante:

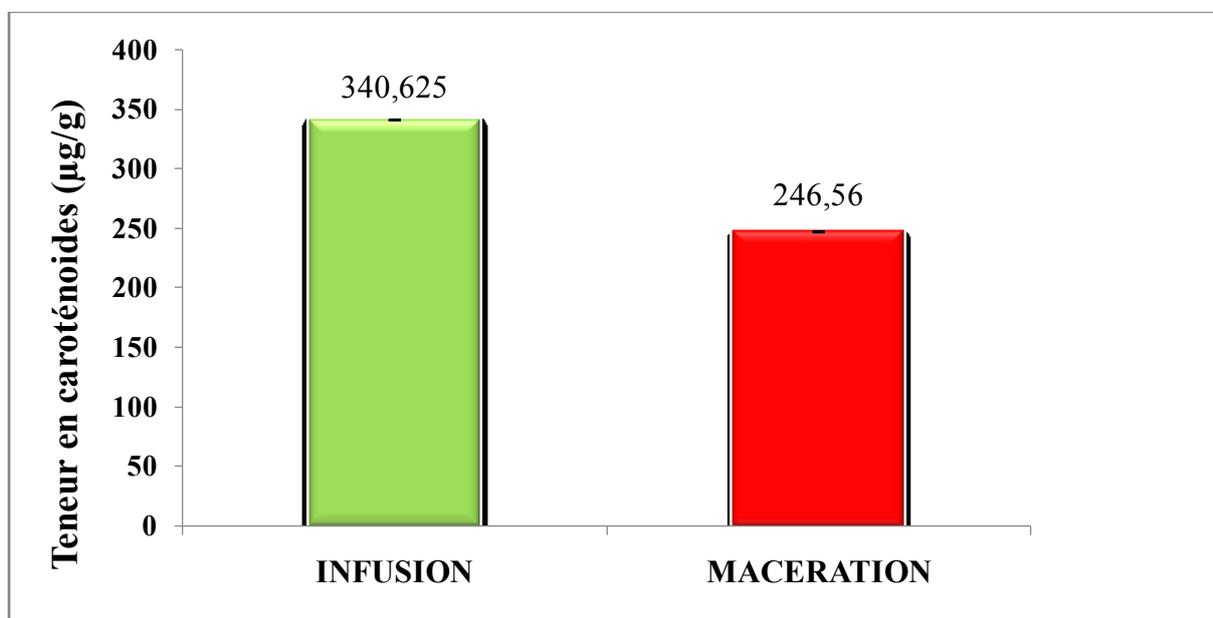


Figure 11 : Teneur en caroténoïdes de l'extrait préparé à partir des stigmates de *Crocus sativus L* par les deux méthodes (infusion et macération).

Selon nos résultats, la teneur des extraits obtenus par infusion (**340.625 µg/g**) est plus riche en caroténoïdes que celle réalisée par macération (**246.56 µg/g**).

D'après la documentation consultée, aucune étude n'a été menée sur la détermination de la teneur en caroténoïdes de cette plante.

IV.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Ces dernières années, plusieurs bactéries ont développé des résistances envers des antibiotiques utilisés pour le traitement des différentes infections chez l'Homme (**Zampini et al., 2005**). Chaque année plusieurs antibiotiques sont retirés des pharmacies à cause de leurs effets secondaires et de l'apparitions des maladies qui avant étaient rares et la résistances aux antibiotiques (**Karou et al., 2005**). Ces situations ont motivé les scientifiques à chercher de nouvelles substances antibactériennes à partir de sources multiples telles que les plantes médicinales. Des études basées sur la recherche des agents antibactériens ont montré que les plantes représentent une source potentielle de nouveaux antibactériens (**Arias et al., 2004**).

L'objectif de cette partie est d'évaluer et comparer la capacité des différents extraits de *Crocus sativus L* obtenus par deux méthodes différentes (infusion et macération) à produire des composés bioactifs présentant un intérêt thérapeutique potentiel.

La présence de l'activité antimicrobienne est considérée comme un indicateur de la capacité de *Crocus sativus L*. de synthétiser des métabolites secondaires bioactifs (**Al-Bakri et Afifi, 2007; Abou Elkhair et al., 2010**).

IV.4.1. Aromatogramme

L'activités antibactérienne des différents extraits sont déterminées par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Qui a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de 4 bactéries. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité: Résistant: $D < 8\text{mm}$, intermédiaire : $15\text{ mm} \geq D \geq 8\text{ mm}$ et sensible: $D > 15\text{ mm}$ (**Bansemir et al., 2006**).

L'activité antibactérienne des extraits de *Crocus sativus* étudiées est illustrée dans le tableau IV.

Tableau IV: Activité antibactérienne des différents extraits de *Crocus sativus* étudiée et le standard l'acide gallique et les antibiotiques.

Extraits	Dilution (mg/μl)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
		<i>E.faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Macération</i>	SM	11,00±00,01	12,00±00,02	R	R
	1/2	17,00±00,02	11,00±00,01	R	R
	1/4	16,00±00,01	11,00±00,02	R	R
	1/8	16,00±00,02	12,00±00,01	R	R
	1/16	15,00±00,01	12,00±00,02	R	R
<i>Infusion</i>	SM	R	R	R	R
	1/2	R	R	R	R
	1/4	R	R	R	R
	1/8	R	R	R	R
	1/16	R	R	R	R
<i>Acide gallique</i>	SM	15,00±00,02	14,00±00,01	14,00±00,01	12,00±00,01
	1/2	14,00±00,01	14,00±00,02	11,00±00,01	12,00±00,01
	1/4	14,00±00,01	14,00±00,02	11,00±00,01	12,00±00,01
	1/8	12,00±00,01	13,00±00,01	15,00±00,02	12,00±00,02
	1/16	15,00±00,02	12,00±00,01	15,00±00,02	12,00±00,02
<i>Antibiotiques</i>	<i>Vancomycine</i>	28,00±00,02	12,00±00,02	/	/
	<i>Cefotaxime</i>	/	/	R	10,00±00,02

D'après le tableau qui récapitule le profil de résistance des souches bactériennes étudiées vis-à-vis les antibiotiques utilisés (CTX pour les Gram négatives et VAN pour les

Gram positives). Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après les résultats obtenus et le tableau ci-dessus, on peut dire que les antibiotiques testés ont une activité plus ou moins intense sur les bactéries étudiées à l'exception d'*E. coli* qui est résistante à la CTX (selon le CA-SFM / EUCAST 2021, *E. coli* est considérée comme résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 17mm et c'est le cas).

Si les bactéries sont sensibles aux antibiotiques, elles ne vont pas se développer dans les zones où ils se trouvent ; cela va créer des zones plus ou moins importantes sans croissance bactérienne autour d'eux.

Si elles sont résistantes, on n'aura pas la formation des zones d'inhibitions.

Donc c'est ce qu'explique notre résultat que plusieurs zones d'inhibitions plus ou moins importantes sont apparues autour des disques d'antibiotiques utilisés.

La raison pour laquelle on a utilisé la CTX pour les Gram négatives et la VAN pour les Gram positives est ainsi : La céfotaxime et la vancomycine appartiennent à 2 différentes familles d'antibiotiques mais partagent en commun le même mode d'action. En effet, la différence entre eux s'étend sur leur spectre d'activité : la CTX est une céphalosporine active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif alors que la VAN est un glycopeptide réservé aux bactéries à Gram positif (Denis *et al.*, 2016).

IV.4.1.1. Activité antibactérienne des extraits à l'égard des bactéries à Gram positif

Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

L'étude statistique a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre les extraits obtenus par macération et l'infusion vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

L'extrait obtenu par macération possède le meilleur effet inhibiteur à l'encontre de cette souche avec une zone d'inhibition de 12mm. L'extrait exerce un effet bactériostatique à toutes les concentrations testées. Quant à l'infusion, il n'a pas d'effet inhibiteur à l'égard de *S. aureus* à toutes les concentrations.

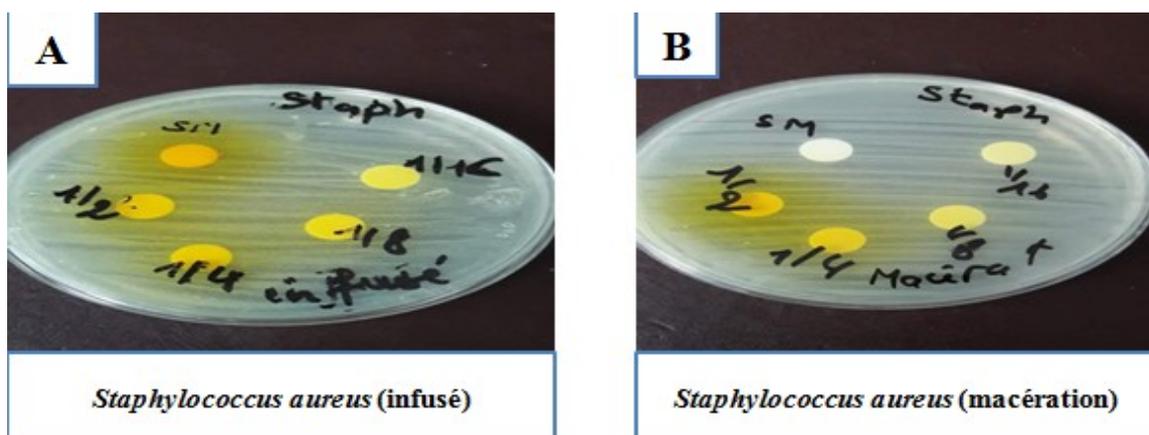


Figure 12: photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé (A) / macération (B)) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

✚ Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis d' *Enterococcus faecalis*

Les deux extraits étudiés de *Crocus sativus* ont inhibé la croissance de *Enterococcus faecalis* avec des zones d'inhibition allant de 11 à 17 mm. La zone d'inhibition la plus large est obtenue pour la macération à une concentration de 6,25 mg/20µl avec une zone d'inhibition de 17 mm. Cet extrait à des concentration de 3,125 mg/20 µl ont donné des zones d'inhibition de 16 mm.

L'infusion s'est montrée la moins active, elle n'a donné aucune zone d'inhibition à toutes concentration. L'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre l'extrait obtenu par macération et celui de l'infusion vis-à-vis cette souche.

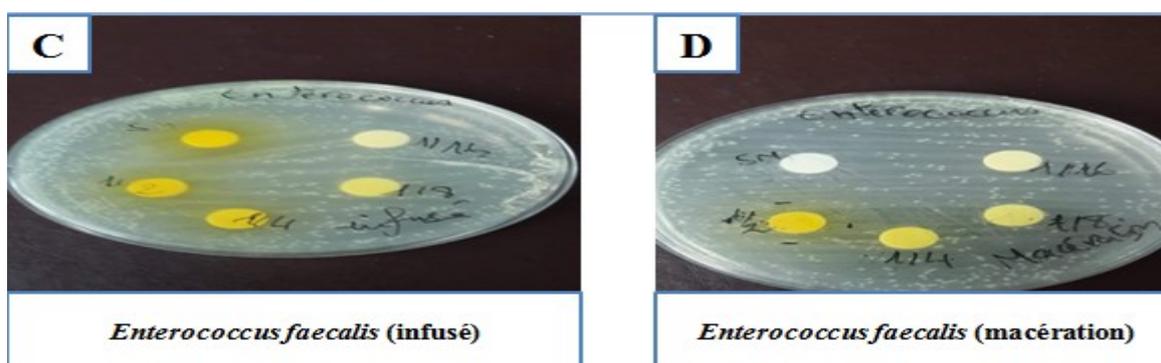


Figure 13 : Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé (C) / macération (D)) vis-à-vis d' *Enterococcus faecalis*.

IV.4.1.2. Activité antibactérienne à l'égard des bactéries à Gram négatif

✚ Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *E. coli*

Aucune différence significative n'est observée entre les extraits d'infusion et macération vis-à-vis de *E. coli*, celle-ci s'est montrée résistante à ces deux extraits qui n'ont développé aucune zone d'inhibition.

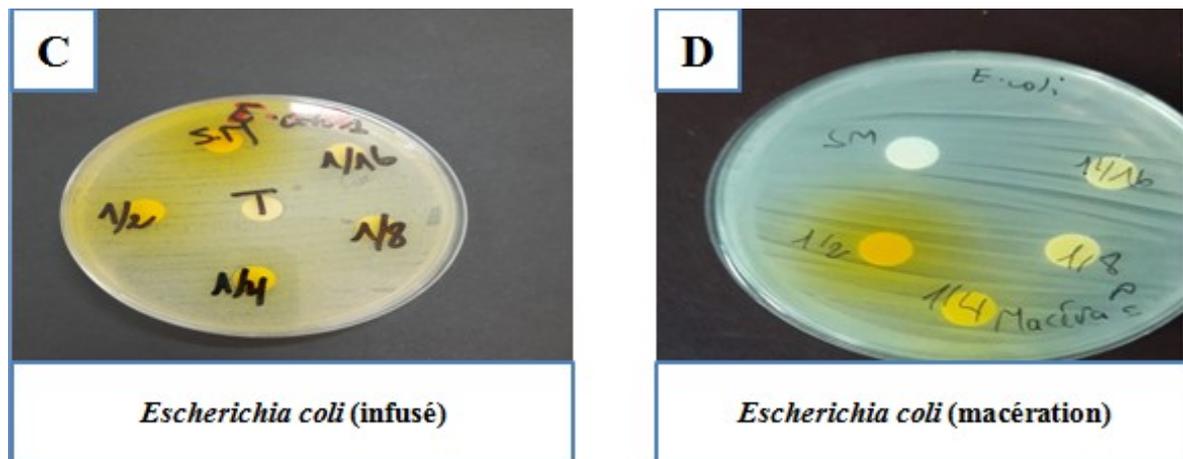


Figure 14: Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé/macération) vis-à-vis d' *E. coli*.

✚ Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis de *P. aeruginosa*

les résultats des deux extraits (infusion et macération) ne présentent aucune activité inhibitrice sur la croissance de cette souche.

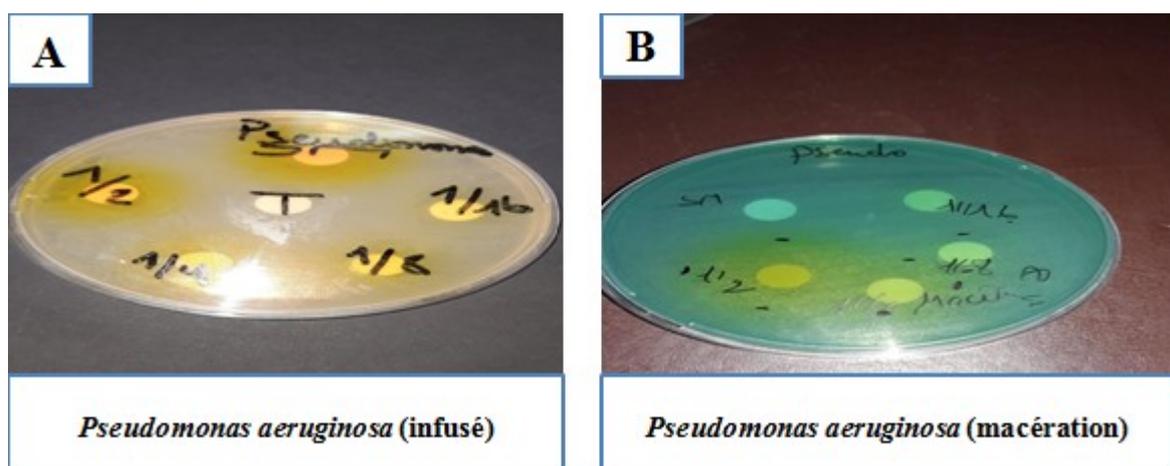


Figure 15: Photographies des résultats d'aromatogramme par deux types d'extraits (infusé (A) /macération (B)) vis-à-vis d' *P. aeruginosa*.

IV.4.1.3. Activité antimicrobienne de l'acide gallique

Les résultats illustrés dans le tableau indiquent que le standard polyphénol (acide gallique) utilisé est actif vis-à-vis des souches testées.

A toutes les concentrations, l'acide gallique exerce un effet inhibiteur, avec un diamètre d'inhibition de 11 à 15 mm, contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, tandis que les souches *P. aeruginosa* et *E. coli*, se sont révélées résistantes aux deux extraits avec une différence significative ($p > 0,05$). L'acide gallique s'est montré le plus actif vis-à-vis de *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de 15 mm.

Les résultats obtenus avec l'acide gallique à une concentrations de 12,5 mg/20µl sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*. ont montré des zones d'inhibition de 11 à 15 mm, ce qui confirme les résultats obtenus par **Rodriguez-Vaquero et al. (2007)**. Contrairement à nos résultats, **Rauha et al. (2000)** n'ont pas observé d'effets inhibiteurs des acides gallique et caféique à l'égard d'*E. coli*, *S. aureus*. Cela pourrait être dû à leur faible concentration testée (0,5 mg/500 µl).

Par contre à des mêmes concentrations, l'extrait obtenu par macération possède une activité inhibitrice meilleure sur *Enterococcus faecalis* qu'avec le polyphénol pur acide gallique.

IV.4.1.4. Discussion générale de l'activité antimicrobienne

La méthode de diffusion sur gélose a révélé que l'effet antimicrobien des différents extraits de la plante médicinale de *Crocus sativus.L* diffère d'une souche à une autre. Les bactéries à Gram négatif se sont avérées les plus résistantes alors que les bactéries à Gram positif sont les plus sensibles. Ces résultats sont en accord avec plusieurs publications concernant les extraits de plantes médicinales ou les bactéries à Gram négatif dévoilent une forte résistance aux extraits de plantes que les bactéries à Gram positif (**Perry et al., 2004; Murray et al., 2009 ; Athamina et al., 2010**).

Cette différence peut être due aux différences morphologiques entre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. Outre la couche peptidoglycane; la paroi des bactéries à Gram négatif présente trois structures polymériques externes ou liées au peptidoglycane: des lipoprotéines, une membrane externe et lipopolysaccharides qui sont attachés à la membrane externe. Ces éléments rendent la paroi cellulaire imperméable au

passage des solutés liposolubles. Quant aux porines situées au niveau de la membrane externe, elles permettent le passage uniquement de petites molécules hydrophiles (600 dalton) (**Perry et al., 2004; Athamina et al., 2010**). De plus, selon **Shan et al.(2007)**, la membrane des bactéries à Gram négatives se trouve associée à des enzymes dans l'espace périplasmique qui sont capables de détruire les molécules intruses (à travers les porines). Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux agents antibactériens car elles possèdent uniquement le peptidoglycane qui ne constitue pas une véritable barrière sélective à ces composés (**Arias et al., 2004**).

L'activité antibactérienne observée avec les différents extraits peut être liée à la composition chimique des parties étudiées. L'étude phytochimique de deux extraits obtenus par deux méthodes d'extraction, a mis en évidence la présence de diverses classes de polyphénols telles que les tanins, flavonoïdes.

Selon **Chen et al.(2010)**, les polyphénols et les flavonoïdes présentent des activités antimicrobiens sur des pathogènes. **Havsteen, (2002)** a noté que la plupart des souches bactériennes couramment rencontrées chez l'Homme sont tuées par les flavonoïdes. L'effet bactéricide des flavonoïdes peut bien être le résultat d'une perturbation métabolique

IV.5. Activités antioxydantes

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Popovici et al., 2009). Il n'existe pas de test de référence *in vitro* pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, pour cela, la combinaison de plusieurs tests est un indicateur de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Amic et al., 2003). Pour nos extraits nous avons employé deux méthodes : le piégeage du radical DPPH, le piégeage du radical ABTS.

IV.5.1. Activité scavenger du radical DPPH

Le pouvoir antiradicalaire est très utilisé pour évaluer rapidement l'activité antioxydante dans les aliments et dans les systèmes biologiques complexes (Gulçin et al., 2005). La méthode adoptée dans le présent travail est celle utilisant le pouvoir antiradicalaire DPPH. Elle est largement utilisée pour estimer la capacité des substances à agir en tant que piègeurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène et d'évaluer ainsi leur activité antioxydante (Milardovic et al., 2006; Laib, 2011).

L'activité scavenger du radical DPPH \cdot est déterminée avec la diminution de l'absorbance à 517 nm suite à la réduction du radical en présence d'un antioxydant(AH) ou d'une espèce radicalaire (R \cdot) (Maisuthiakul et al., 2007) selon les réactions suivantes :



La diminution de l'absorbance se traduit par une décoloration de la solution éthanolique de DPPH du violet au jaune (Gulçin et al., 2003).

Selon les résultats obtenus, tous les échantillons testés ont présenté un pouvoir antiradicalaire supérieur à 50% à une concentration de 12,5 mg/ml. L'infusion a présenté le pouvoir scavenger du radical DPPH le plus élevé montre ainsi de très forte activité antioxydante (78 %) suivi de la macération (71%). Ces résultats indiquent des différences

significatives ($p < 0,05$) concernant la capacité des extraits de piéger le radical DPPH (Annexe 2).

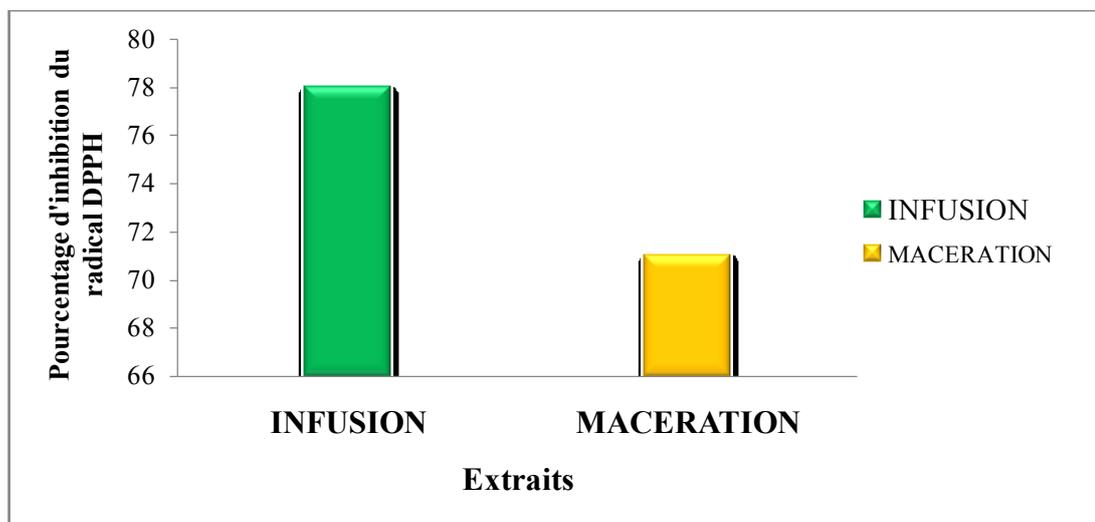


Figure 16: Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante du radical DPPH.

Ces résultats prouvent qu'un nombre important d'antioxydants a été extrait à partir de *Crocus sativus. L* par les deux méthodes utilisées. La polarité et les types de composés extraits seraient à l'origine de ces variations entre les différents extraits.

Les résultats obtenus dans notre étude sont supérieures à ceux obtenus par **Karimi et al. (2010)** dont ils ont trouvés un pourcentage d'inhibition de 68,2 %.

Le niveau de corrélation entre les composés phénoliques des plantes et l'activité antioxydante vis-à-vis du DPPH est un paramètre très important du moment qu'il peut renforcer l'hypothèse que ces antioxydants végétaux contribuent dans cette activité. Pour cela, nous avons constaté une corrélation négative entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antiradicalaire contre le DPPH avec un coefficient de $r = -1$. Des études antérieures ont rapporté les mêmes résultats entre la teneur en polyphénols et l'activité du piégeage radical de DPPH des feuilles de patates douces. Ces résultats indiquent que d'autres composés non identifiés peuvent contribuer à l'activité antioxydante globale des extraits de la plante de *Crocus sativus. L*.

Le pouvoir antiradicalaire contre le DPPH des différents extraits étudiés enregistre des coefficients de corrélations importantes positifs ($P < 0,05$) avec les teneurs en flavonoïdes ($r = 1$) et les caroténoïdes ($r = 1$).

IV.5.2. Activité scavenger du radical ABTS

Le test ABTS est un excellent paramètre pour déterminer l'activité antioxydante des composés donneur d'hydrogène (**Marc *et al.*, 2004**). Les résultats du pouvoir antiradicalaire des extraits, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical ABTS+ (figure), indiquent que tous les extraits possèdent la capacité de piéger le radical ABTS+ et leur capacité diffère significativement ($P < 0,05$) entre les deux procédés d'extractions (Annexe 2).

D'après les résultats obtenus, tous les échantillons testés ont présenté un pouvoir antiradicalaire supérieur à 50% à une concentration de 12,5 mg/ml. A la même concentration, les résultats montrent que l'extrait obtenu par l'infusion est le plus actif, il enregistre un pourcentage d'inhibition de 72 % montre ainsi de très forte activité antioxydante suivi de la macération (64.73 %).

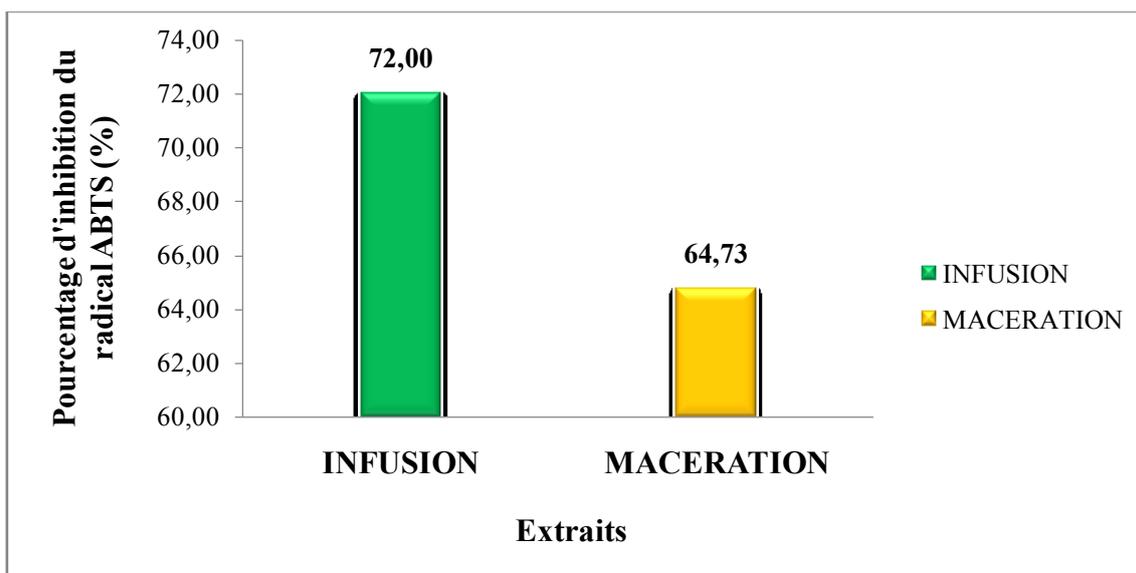


Figure 17: Pourcentage d'inhibition de l'activité scavenger du radical ABTS.

Des corrélations ($P < 0,05$) positives sont enregistrées entre les différents antioxydants présents dans les extraits analysés. Les coefficients sont de $r=1$ pour les flavonoïdes, $r=1$ pour les caroténoïdes, cela signifie que les flavonoïdes et les caroténoïdes contribuent dans l'activité antiradicalaire de plus précisément dans la réduction des radicaux cationiques.

En comparaison avec les résultats obtenus par **Marref, (2018)**, leur résultats sont supérieure à ceux trouvés de notre étude.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Les ressources naturelles du règne végétal restent la source fiable et capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. La recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation comme alternative des molécules de synthèse.

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis de souches bactériennes Gram positives et Gram négatives, ainsi qu'à l'évaluation du pouvoir antioxydant d'extraits, et la détermination la teneur en antioxydants (polyphénols totaux, flavonoïdes et caroténoïdes) et enfin révélation la présence des métabolites secondaires (recherche des composés phénoliques, des saponines, des alcaloïdes ainsi que des Terpénoïdes) des extraits bruts hydroalcooliques de la partie aérienne de *Crocus sativus* (stigmates) récoltée dans la région Mechedalah, Wilaya de Bouira.

A la lumière de ces résultats obtenus, on peut conclure que:

Le dosage phytochimique ont montré que l'extrait obtenu par macération présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (7.63 mg EAG/g MS) et cette valeur a diminué en l'infusion (). Par contre pour le dosage des flavonoïdes, c'est l'infusion qui présente la teneur la plus élevée (0.39 mg EQ/g MS).

D'autre part les résultats de dosage des caroténoïdes montrent que la teneur en caroténoïdes qui est de 340.625 µg/g MS, revient à l'infusion suivie de la macération (246.56 µg/g).

L'analyse qualitative a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires où nous avons constaté la présence des saponines, des terpénoïdes, des tanins et des alcaloïdes.

Au regard des résultats obtenus, les extraits étudiés exhibent des propriétés antioxydantes très intéressantes, en effet, la capacité antioxydante la plus élevée de piéger les radicaux DPPH et ABTS a été observée dans les extraits réalisés par infusion (78%, 72% respectivement).

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits de *Crocus sativus* vis-à-vis des deux antibiotiques testés (CTX et VAN) a montré des zones de sensibilité autour des disques imprégnées à l'exception d'*E. coli* qui est résistante à la CTX.

En comparant la sensibilité des souches cibles, nous remarquons des différences significatives dans la susceptibilité entre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Cela est en accord avec quelques études réalisées dans cette optique.

Aucune différence significative n'est observée entre les extraits d'infusion et macération vis-à-vis les souches à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*), celles-ci se sont montrées résistantes à ces deux extraits qui n'ont développé aucune zone d'inhibition. Tandis que une activité antimicrobienne importante est notée pour l'extrait obtenue par macération qui est active à l'égard des souches à Gram positifs (*S. aureus* et *E. faecalis*). Quant à l'infusion, il n'a pas d'effet inhibiteur vis-à-vis ces souches.

Cette étude a permis de mieux connaître la phytochimie de *Crocus sativus* et de caractériser ces deux extraits obtenus. cette plante est un réservoir potentiel de métabolites, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en alimentation et en médecine traditionnelles comme traitements à plusieurs pathologies.

C'est pour cela il est intéressant d'approfondir cette étude par :

- Détermination de l'extraction avec d'autres solvants, et d'utiliser d'autres modes d'extraction ;
- Isoler et identifier les principes actifs responsables des activités antibactériennes ;
- Evaluation des différentes activités biologiques *in vivo* ;
- Réaliser des tests de cytotoxicité pour, éventuellement, éviter les doses toxiques en thérapeutique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- **Abou Elkheir, E., Fadde, H. and Abou Mohsen, U. (2010).** Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants from Gaza Strip Palestine. *Journal of Al Azhar University-Gaza*, **12**: 45-54.
- **Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G. and Prasada Rao, U.J.S., (2007).** Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, **105**:982-988.
- **Al-Bakri, A. G., & Affi, F. U. (2007).** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, **68**(1): 19-25.
- **Algrech C. (2001).** “Le safran du Quercy.” *Revue Quercy recherche*, **97 et 98 (1-2-4)**: 2027;9-16;18-26.
- **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, **76**(1): 55-61.
- **Amokrane, C., Atroun, S. (2020).** Etude de la bioactivité du safran (*Crocus sativus*. L): Etat de l’art sur les applications alimentaires, thérapeutiques et cosmétiques. 40.
- **Arias, M.E., Gomez J.D., Cudmani N.M., Vattuone M.A and Isla M.I. (2004).** Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex HOOK et Arn. *Life Sciences*, **75**:191-202.
- **Arvy M., Gallouin F. (2003).** Epices, aromates et condiments. Belin Ed., pp.216-219.
- **Asgarpanah, J., Darabi-Mahboub, E., Mahboubi, A., Mehrab, R., & Hakemivala, M. (2013).** In-Vitro evaluation of *Crocus sativus* L. petals and stamens as natural antibacterial agents against food-borne bacterial strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **9**(4): 69-82.
- **Athamina S., Chalghem I., Kassah-laouar A., Laroui S. et Kherbi S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminumcyminum*. *Libanaise Science Journal*, **11**(1) :69-81.

B

- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, T., Gazin, T.C. Pinkas, M., Luycky, M. and Gazin, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arznein Forsh/Drug Res*, 1-6.

- **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, **99**(1):191-203.
- **Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., & Lindequist, U. (2006).** Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, **252** (1): 79-84.
- **Baran, J.-M. (2000).** Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde. Thèse de doctorat en médecine. Université de Nancy, France.
- **Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et *Zarucchi* (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, **4**(2): 217-225.
- **Benghanou M, (2012).** La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical Chettia :(Alger), 56p.
- **Bouattoura, N. (1988).** Les ressources phylogénétiques. Importance-Préservation-Utilisation, Programme en cours. Annales de l'INA, *El Harrach-Alger*, **12**(1): pp. 43-69.
- **Bounailie, C., Salacs, M., Vassiliova, E. et Saykova, I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachishypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, **7**:35-45.
- **Boree. (2012),** REALISATION : In texte édition, traduction de l'espagnol : Nicolas Blot jean –Bernard Gouillier ISBN : 978-8129-0590-2).
- **Bottger, S., Melzig, M. F. (2011).** Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, **4**:59-68.
- **Britannica. (2020).** Les rédacteurs de l'Encyclopédie. "Iridacées". *Encyclopédie Britannica*.
- **Bruneton. J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed Lavoisier, Paris.

C

- **Chabrier J-Y (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Université Henri Poincaré, Nancy 1, Faculté de pharmacie, 22 p.

- **Chahine, N. (2014).** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique (Doctoral dissertation, Reims).
- **Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food chemistry*, **141**(1): 253-258.
- **Chen, S., Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X. (2010).** Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of ethnopharmacology*, **130** (1): 116-121.
- **Chevalier, J., Choisy, C., Crémieux, A., Dardord, J-C., Davin-Régli, A., Dubreuil, L., Finance, C., Linxe, C., Quentin-Noury, C., Quero, A-M et Reynaud, A. (2003).** Agents antimicrobiens, antiviraux-antibiotiques. In "Microbiologie générale et santé", Ed: Eska, ISBN: 2-7472-0420-0, pp: 278-321.
- **Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M. and Lattanzio, V. (2009).** A reproducible, rapid and inexpensive Folin Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91**:107-110.

D

- **Dar, R. A., Shahnawaz, M., Malik, S. B., Sangale, M. K., Ade, A. B., & Qazi, P. H. (2017).** Cultivation, distribution, taxonomy, chemical composition and medical importance of *Crocus sativus*. *J Phytopharmacol*, **6**(6) : 356-8.
- **Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C. (2016).** Bactériologie médicale: techniques usuelles, 3rd Edition. France: Elsevier Masson. 600p.
- **Deo, D.B. (2003).** "Growing Safran—The World's Most Expensive Spice", Crop & Food Research (New Zealand Institute for Crop & Food Research).
- **Djebaili., & S Djellouli, Y. (1984).** Synthèse sur les relations flore-climat en zone aride Cas de la Wilaya de Saïda. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, **131**(2-4): 249-264.
- **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**: 654-660.
- **Douglas, M., Perry, N. (2003).** Growing Saffron-The Words Most Expensive Spice. Crop and Food Research. Publication No. 20.

- **Dupont, G. (2007).** Abrégé de botanique systématique moléculaire. 14e édition. *Masson Ed.* 2007,p-108.

E

- **Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A. et Yousefzadi, M. (2008).** Essentiel oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. **110**: 927-931.
- **Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D. (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques"*. Maroc.
- **Erlund, I. (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, **24**(10): 851-874.
- **Esmaili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., & Safarian, S. (2011).** Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy magazine*, **7**(25): 74.

G

- **Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**(4): 1220-1234.
- **Gu Z., Chen D, Han Y., Chen Z., Gu F.(2008).** Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*, *LWT*, **41**: 1082–1088.
- **Gülçin, İ., Oktay, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003).** Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, **36**(2) : 263-271.

H

- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, **96**(2-3) : 67-202.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **2**(1): 3-6.
- **Herbert, B., Harborne, J. B., & Moss, G. P. (1998).** *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2^{eme} edi. 976p.

- **Hirasa, K., & Takemasa, M. (1998).** *Spice science and technology*. CRC Press.
- **Hopink, W .G. (2003).** physiologie végétale .2ème Édition Américaine, de Boeck et hanciers A, 514p.

I

- **Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha, E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M.,Ringuet, J., Bloth, J. et Botrel A. (2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation,soins.(Ed) Larousse Bordas. p10-12.

J

- **Jaccot, B., & Campillo, B. (2003).** Nutrition humaine. Ed.
- **Jadouali, S. M., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., & Mamouni, R. (2018).** Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus L* petals and leaves. *J. Mater. Environ. Sci*, **9**(1) : 113-118.
- **Jan, S., Wani, A. A., Kamili, A. N., & Kashtwari, M. (2014).** Distribution, chemical composition and medicinal importance of saffron (*Crocus sativus L.*). *African Journal of Plant Science*, **8**(12): 537-545.

K

- **Kablan, B. J., Adiko, M., & Abrogoua, D. P. (2008).** Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, **6** (5): 282-288.
- **Kanter M., Coskun O., Uysal H. (2006).** The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arch. Toxicol.*, **80** (4): 217-224.
- **Karabay-Yavasoglu, N. U., Sukatar, A., Ozdemir, G., & Horzum, Z. (2007).** Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **21**(2): 153-156.
- **Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. (2010).** Evaluation of *Crocus sativus L.* stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, **15**(9): 6244-6256.

- **Karou D., Dicko M.H., Simpore J. and Traore A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, **4**(8): 823-828
- **Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, **94**(4) : 550-557.
- **Kokate, C. K., Purohit, A. P., & Gokhale, S. B. (2001).** Carbohydrate and derived Products, drugs containing glycosides, drugs containing tannins, lipids and protein alkaloids. *Text book of Pharmacognosy*, **7**: 133-166.

L

- **Lachaud, C. M. (2012).** La Bible du Safranier. Tout Savoir sur le Crocus sativus et sur le Safran. ILV.258pages. ISBN978-2-7466-4412-0
- **Lahmadi, S., Guesmia, H., Zeguerrou, R., Maaoui, M., & Belhamra, M. (2013).** La culture du safran (*Crocus sativus* L.) en régions arides et semi arides cas du Sud Est Algerien. 18-27.
- **Laib, I., & Barkat, M. (2011).** Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de Lavandula officinalis.
- **Lardry, J.-M. et Haberkorn, V. (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinésithérapie, *La Revue*, **7 (61)** : 14-17. Disponible sur : doi: 10.1016 / s1779-0123 (07) 70308-x.
- **Lazérat V. (2009).** Secrets de safranière. Lucien Souny Ed. Saint-Paul., 125 p.
- **Lee, K. W., Kim, Y. J., Joo, L. H., & Lee, C. Y. (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 7292–7295.
- **Li B.B., Smith B., Hossain Md. M.(2006).** Extraction of phenolics from Citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, **48** : 189-196.
- **Li, H., Deng, Z., Wuc, T., Liu, D., Loewen, S. and Tsao, R. (2012).** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, **130**:928-936.

M

- **Makkar, H. P. S. (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, **49**(3): 241-256.
- **Maisuthiakul, P., S. Pasuk., p. Rtthiruangdej. (2007).** Relation between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plant. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 229-240
- **Maizak K., Brac O. La perriere et Hammi CHE V. (1993).** Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2^e colloque européen d'émnopharmacoce. Heidelberg. pp 169-181.
- **Marc, F., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C. et Baccaunaud, M. 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/Science*, **20**:458-463.
- **Marref, S. (2018).** Contribution à l'étude des activités biologiques de l'extrait méthanolique de la plante *Gladiolus segetum in vivo* et *in vitro*. Thèse de Doctorat troisième cycle, université Mustafa Ben Boulaid, BATNA 2.
- **Marinova, Z., Vukojevic, V., Surcheva, S., Yakovleva, T., Cebers, G., Pasikova, N., & Bakalkin, G. (2005).** Translocation of dynorphin neuropeptides across the plasma membrane: a putative mechanism of signal transmission. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(28): 26360-26370.
- **Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, **68**(2): 175-180.
- **Moatti, R. (1990).** La phytothérapie. *Revue des Deux Mondes*: 80-89 .
- **Mzabri, I., Addi, M., & Berrichi, A. (2019).** Traditional and modern uses of saffron (*Crocus sativus*). *Cosmetics*, **6**(4) : 63.
- **Murray, P.R, Rosnathal, K.S, Pfaller, M.A (2009).** Medical Microbiology, sixthed Mosby Elseiver, *Philadelphia*, 960 p.

N

- **Nacz, M. and Shahidi, F.(2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054** : 95-111.
- **Nemati, Z., Harpke, D., Gemicioglu, A., Kerndorff, H., & Blattner, F. R. (2019).** Saffron (*Crocus sativus*) is an autotriploid that evolved in Attica (Greece) from wild *Crocus cartwrightianus*. *Molecular phylogenetics and evolution*, **136**:14-20.

- **Nemlin J, Brunel JF (1995).** Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3ème année). Université Nationale de Côte d'Ivoire : Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie, Laboratoire de Phytologie, p.47.

O

- **Owen, P.L. and Johns, T., (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**:149-160.

P

- **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.
- **Paolini. V., PH. Dorchies. (2003).** Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri.*
- **Pereira, J. A., Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L. & Bento, A. (2006).** Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**:8425-31.
- **Pelt J.-M. (1980).** Les drogues. Leur histoire, leurs effets, Ed. Doin.
- **Perry, J. J., Staley, J., Lory, S. (2004).** Microbiologie. Ed. *Dunod*, Paris. 891p.
- **pooja, S., & Vidyasagar, G. M. (2016).** Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *Journal of Medicinal Plants Studies*, **4**(5): 39-43.
- **Popovici, J., Comte, G., Bagnarol, É., Alloisio, N., Fournier, P., Bellvert, F., ... & Fernandez, M. P. (2010).** Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(8): 2451-2460.

R

- **Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., ... & Vuorela, P. (2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, **56**(1): 3-12.
- **Rauter A.P., Branco I., Tostao Z., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B. (1989).** Flavonoids from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. **28**(8): 2173-2175.

- **Ribéreau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. *Dunod*. Paris, P: 173-201.
- **Richard, T., Vergé, S., Vercaution J., Monti, J.P. 2001.** Etude de l'interaction tanin-proteine par RMN et modélisation moléculaire. Deuxième journée scientifique de l'UFR des sciences pharmaceutiques. *Bulletin de la Société de Pharmacie .Bordeaux*, **140**:127-166.
- **Richaud. (2014).** Marion. Mini guide illustré des Plantes médicinales. Marabout. Paris : 192p.
- **Rizk, A. M., AM, R., AL nagdy, S. A., & EL missiry, M. M. (1982).** Constituents of plant growing in qatar.
- **Rudall, P. (1994).** Anatomie et systématique des Iridacées. *Journal botanique de la Linnean Society*, **114** (1) :1-21.

S

- **Sánchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, **8**(3): 121-137.
- **Sarni-Manchado P, Veronique C, (2006).** Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier.
- **Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007).** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, **117**(1) : 112-119.
- **Sofowora A (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition KARTHALA. P.22.
- **Srivastava, R., Ahmed, H., & Dixit, R. K. (2010).** Crocus sativus L.: a comprehensive review. *Pharmacognosy reviews*, **4**(8): 200.

V

- **Vaquero, M. R., Alberto, M. R., & De Nadra, M. M. (2007).** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food control*, **18**(2) : 93-101.
- **Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005).** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(22): 8492-8497.

W

- **Wang, Y., Xu, Z., Bach, S.J. and McAllister, T.A. 2008.** Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on *in vitro* ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, **145**: 375-395.
- **Wichtl M. Anton R. (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Éd Lavoisier, Paris: 38, 41p.
- **Willard, P. (2001).** Secrets of Saffron: The Vagabond Life of the World's Most Seductive Spice, Beacon Press,p. 3,ISBN0-8070-5008-3.

Z

- **Zampini, I.C., Vattuone, M., Isla, M. (2005).** Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 450-456.

Annexes

Annexes I

Composition des milieux de culture

✚ Gélose Mueller Hinton

Extrait de viande : 2 g, hydrolysate de caséine : 17,5 g, amidon : 1,5 g, agar : 10 g,
eau distillée : 1 litre. pH=7,4.

✚ Bouillon nutritif

Extrait de viande : 5g, Peptone tryptique 10g, NaCl 5g, eau distillée : 1 litre. pH=7,2.

✚ Milieu PCA (Plate Count Agar).

Peptone : 5g, extrait de levure : 2,5g, glucose : 1g, agar : 15g, eau distillée : 1 litre. pH= 7.

Annexes II

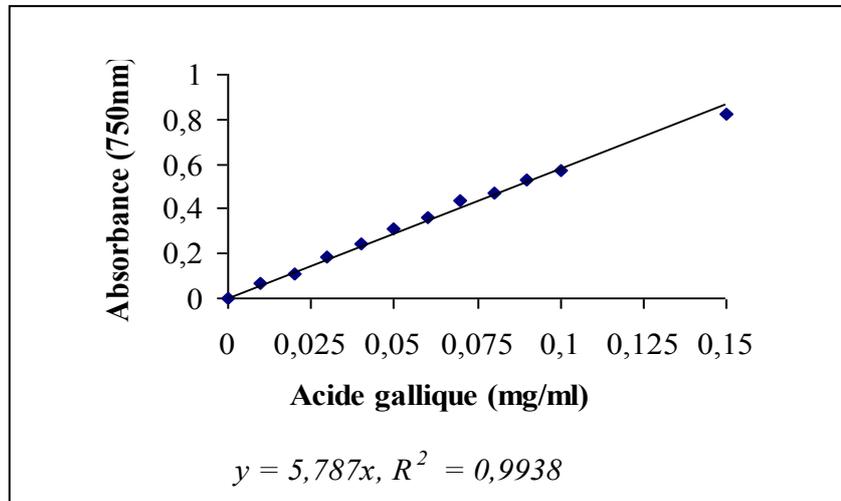


Figure 01 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

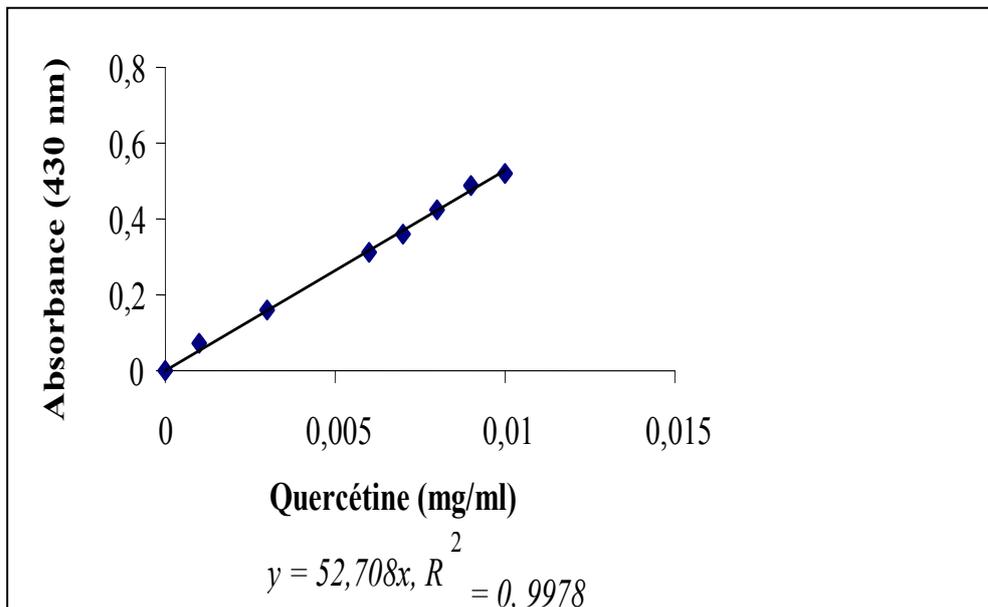


Figure 02: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Résumé

Crocus sativus.L connu sous le nom de safran qui est très utilisé comme épice mais aussi comme plante dans la médecine traditionnelle. Le but de notre travail est l'étude de l'activité antioxydante des extraits des stigmates de safran récoltée dans la région de Mehdallah, wilaya de Bouira et testé l'activité antimicrobienne par la technique aromatoigramme.

Le dosage de polyphénols totaux dans les deux extraits montre que l'extrait des stigmates obtenu par macération (7.63 mg EAG/g MS) plus riche par rapport aux celle de l'infusé (3.80 mg EAG/g MS) par contre l'extrait obtenu par l'infusé plus riche en flavonoïde (0.39 mg EQ/g MS) vis-à-vis macération (0.16 mg EQ/g MS). L'effet des extraits sur la réduction du DPPH• et ABTS a révélé une forte activité dans l'extrait obtenu par infusé des stigmates par rapport à l'extrait obtenu par macération. L'activité antibactérienne, testée vis-à-vis quatre espèces bactériennes de référence, a montré que l'extrait obtenu par macération présente une activité plus importante vis-à-vis *S.aureus* et *E. faecalis* avec des diamètres d'inhibition de 15 mm à 17mm.

Les résultats obtenus justifient l'utilisation traditionnelle de cette plante et la mise au point d'un nouveau phyto-médicament contre diverses pathologies à base du *Crocus sativus*.

Mots clés : *Crocus sativus.L*, macération, infusion, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

Crocus sativus.L known as saffron which is widely used as a spice but also as a plant in traditional medicine. The aim of our work is study and the antioxidant activity of the extracts of saffron stigmas harvested in the region of Mehdallah, wilaya of Bouira and tested the antimicrobial activity by the technique of aromatoigram.

The determination of total polyphenols in the two extracts shows that the extract of stigmas obtained by maceration (7.63 mg EAG/g DM) is richer compared to that of the infusion (3.80 mg EAG/g DM), while the extract obtained by infusion is richer in flavonoid (0.39 mg EQ/g DM) compared to maceration (0.16 mg EQ/g DM). The effect of the extracts on the reduction of DPPH• and ATBS revealed a strong activity in the extract obtained by infusion of the stigmas compared to the extract obtained by maceration. The antibacterial activity, tested against four bacterial species of reference, showed that the extract obtained by by maceration presents a more important activity against *S.aureus* and *E. faecalis* with diameters of inhibition from 15 mm to 17 mm.

The results obtained provide a justification for the traditional use of this plant and the development of a new phytodrug against various diseases based on *Crocus sativus*.

Keywords: *Crocus sativus.L*, maceration, infusion, antimicrobial activity, Antioxidant activity.

ملخص

Crocus sativus. L المعروف باسم الزعفران، تابع لعائلة Iridacées، والذي يستخدم على نطاق واسع كتوابل ولكن أيضاً كنبات في الطب التقليدي. الهدف من عملنا هو دراسة للطاقة المضادة للأكسدة المستخلص من ميسمات الزعفران التي تم جمعها في منطقة مشدالة بولاية البويرة، و اختبار نشاط مضادات الميكروبات بتقنية aromatogram. يكشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود البوليفينول، الفلافونويد، العفص، السابونين، الكاروتينات والتربينويدات في نوعي المستخلص الناتج عن النقع والتسريب.

يوضح تحديد البوليفينول الإجمالي في المستخلصين أن مستخلص الميسمات التي تم الحصول عليها عن طريق النقع (7.63 مجم EAG / جم DM) أكثر ثراءً مقارنةً بالتسريب (3.80 مجم EAG / جم DM) وبالمقابل المستخلص الذي تم الحصول عليه بواسطة التسريب أكثر ثراءً بالفلافونويد (0.39 مجم EQ / g MS) مقابل النقع (0.16 مجم EQ / g MS). أظهر تأثير المستخلصات على الحد من DPPH• و ABTS نشاطاً قوياً في المستخلص الناتج عن الميسمات مقارنةً بالمستخلص الناتج عن النقع.

أظهر النشاط المضاد للبكتيريا، الذي تم اختباره مقابل أربعة أنواع بكتيرية مرجعية، أن المستخلص الذي تم الحصول عن طريق النقع نشاطاً أكبر ضد *S. aureus* و *E. faecalis* بأقطار تثبيط من 15 ملم إلى 17 ملم.

النتائج التي تم الحصول عليها توفر تبريراً للاستخدام التقليدي لهذه النبتة وتطوير دواء نباتي جديد ضد مختلف الأمراض على أساس *Crocus sativus*.

الكلمات المفتاحية: نبات الزعفران، التسريب، النقع، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة