

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, ET SCIENCES DE

LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Département de Biologie

Laboratoire de physiologie physiopathologie et biochimie de la nutrition

MÉMOIRE EN VUE DE L'OPTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN

BIOLOGIE

Spécialité : physiologie cellulaire et physiopathologie

Thème :

Evaluation de l'activité in vitro des extraits poly-
phénoliques du safran sur la fonction des
lymphocytes

Présenté par : Kaddour Fadia

Azzout Sanaa

Soutenu le 28 juin 2020, devant le Jury :

Présidente : Mme MERZOUK. H Professeur, Université de Tlemcen.

Examinatrice : Mme LOUKIDI.B Maître de Conférences, Université Tlemcen.

Promotrice : Mme MEDJDOUB.A Maître de Conférences, Université Tlemcen.

ANNEE UNIVERSITAIRE
2019-2020

Remerciement

Un grand merci à notre encadreur Dr Mme MEDJDOUB.A Maître de Conférences, Université Tlemcen pour avoir dirigé ce travail, pour son sérieux et ses efforts pour nous avoir aidés conseillés orientés.

Nous lui exprimons notre profond respect et nos chaleureux remerciements.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Pr Marzouk H, professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la terre et de l'univers, département de Biologie, Université Abou bekr Belkaid de Tlemcen et Dr. LOUKIDI. B Maître de conférences, Université de Tlemcen de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Nous vous remercions pour leur compréhension. Trouvez ici chère professeurs l'expression de notre profonde gratitude.

Merci à tous nos enseignants et étudiants de notre parcours.

Dédicaces

À l'aide de Dieu tout puissant, Nous avons pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

Fadia :

Aux êtres les plus chers qui ont sacrifiés leurs vies pour mon bonheur, qui ont été toujours à mes côtés, dans la joie comme la tristesse, mes parents que j'aime énormément.

Pour leur soutien durant toute ma vie, que Dieu les protège et les gardes pour moi.

A mes frères, sœur, belle-sœur et beaux-frères que j'aime énormément.

A mes beaux-parents et beaux-frères que j'aime énormément

Aux grands parents

A mes petit neveux et nièces que j'adore

A mes copines pour leur soutien et à mon binôme Azzout Sanaa

À tous mes amis et mes camarades de la promotion de Master 2

*Et enfin à la plus belle chose qui m'est arrivé dans ma vie à mon mari
je ne te remercierai jamais pour votre soutien votre aide et votre
écoute merci du fond du cœur.*

Sanaa

Je dédie

Aux êtres les plus chers qui ont sacrifiés leurs vies pour moi, Mes
parents, que dieu les protège.

Merci de m'avoir appris l'importance des études dans ma vie

A mon mari et ma fille Sarah, que dieu nous garde réunis.

A mes sœurs chéries et mon frère que j'aime énormément

Que dieu favorise notre union et notre entente.

Sommaire

1- Généralité sur le safran :	
1.1. Etymologie et histoire	
1.1.1. Etymologie.....	18
1.1.2. Histoire.....	18
1.2. Caractères botaniques.....	19
1.3. Culture du safran.....	20
1.4. Récolte du safran	21
☐- Cueillette du safran	22
☐ - Emondage des fleurs	22
☐ - Séchage.....	23
1.5. Etude phytochimique de la fleur du <i>Crocus Sativus</i>	24
1.5.1. Principaux composants du safran	24
1.6. Caractères biologiques et thérapeutiques du safran	25
1.7. Autres usages.....	26
2- Les métabolites secondaires	27
2.1. Polyphénols.....	27
2.1.1. Principales classes des polyphénols	27
2.1.2 Acides phénoliques.....	27
2.1.3. Flavonoïdes.....	28
2.1.4. Tannins.....	28
☐-Tannins hydrolysable.....	29
☐-Tannins condensés	29
2.1.5. Coumarines.....	29
2.2. Les alcaloïdes.....	30
2.3. Les terpenoïdes	30
3-Généralité sur les radicaux libres et les antioxydants.....	30

3.1. Radicaux libres	30
3.2. Origines des espèces réactives oxygénées.....	31
3.2.1. Définition du ROS ou ERO.....	31
3.2.2 .Sources	32
3.3. Le stress oxydatif	33
3.4. Peroxydation lipidique	33
3.4.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique.....	33
☐-Amorçage	
☐—Bouturage	
☐—Achèvement	
3.5. Les antioxydants	34
3.5.1. Les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.....	35
II-Matériels et méthodes.....	36
I-Matériel végétal.....	37
I.1.Extraction et préparation	37
II- Méthodes.....	37
II.2.préparation des extraits.....	38
II.2.1.Macération	38
II.2.2. Décoction.....	38
II.2.3.Infusion.....	39
II.2.4.Ultrason.....	39
II.3.Calcul du rendement des extraits.....	40
III-Etude in vitro.....	40
III.1.Isolement des lymphocytes humains.....	40
III.2.préparation des solutions mères des extraits	41
III.3.Test de transformation lymphoblastiques (TTL).....	44
III.3.1.Comptage des lymphocytes.....	44
III.3.2.Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode MTT.....	44

III- Détermination des marqueurs du stress oxydatifs au niveau des lymphocytes	45
III.4.1.Détermination des taux de glutathion des lymphocytes en présence des différents extraits de pétale de safran.....	45
III.4.2.Détermination de l'activité de la catalase des lymphocytes en présence des différents extraits de pétale de safran.....	45
III.4.3.Teneurs en protéines carbonylées des lymphocytes en présence de différents extraits de pétale de safran.....	46
VI-Analyse statistique	46
IV-Résultats et interprétations.....	47
IIV-Discussion.....	61
IIIV-Conclusion	65
IX-Références bibliographiques.....	68
X-Webologie.....	74
XI-Annexe	75

Liste des figures :

Figure 1	La fleur de <i>Crocus Sativus</i> 20
Figure 2	Récolte du safran..... 21
Figure 3	La cueillette du safran..... 22
Figure 4	Emondage de <i>Crocus Sativus</i> 22
Figure 5	Stigmates obtenu après émondage..... 23
Figure 6	Structures moléculaires des quatres métabolites secondaires du safran à activité..... 24
Figure 7	Structure de base des flavonoïdes..... 28
Figure 8	Types de tannins et leurs structures de base..... 29
Figure 9	Squelette de base des coumarins 29
Figure 10	Structure de base des alcaloïdes 30
Figure 11	Radical libre..... 31
Figure 12	les espèces radicalaires et non radicalaires.....32
Figure 13	la peroxydation lipidique..... 34
Figure 14	Les pétales de safran sous forme séchées Et Broyées 37
Figure 15	Schéma d'extraction par macération..... 38
Figure 16	Schéma d'extraction par décoction..... 38
Figure 17	Schéma d'extraction par l'infusion..... 39
Figure 18	Schéma d'extraction par l'ultrason..... 39
Figure 19	L'appareil utilisé pour la sonication 40
Figure 20	Extraits de pétales de safran après évaporation..... 40
Figure 21	Méthode d'isolement et purification des lymphocytes..... 43
Figure 22	Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'ultrason..... 48
Figure 23	Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de macération..... 49
Figure 24	Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'infusion..... 49
Figure 25	Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de décoction..... 50

Figure 26	Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran.....	51
Figure 27	Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de macération de pétale de safran.....	51
Figure 28	Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran.....	52
Figure 29	Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de décoction de pétale de safran.....	52
Figure 30	Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'ultrason.....	53
Figure 31	Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de macération.....	53
Figure 32	Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'infusion.....	54
Figure 33	Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de décoction.....	55
Figure 34	Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'ultrason.....	55
Figure 35	Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de macération	56
Figure 36	Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'infusion	56
Figure 37	Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de décoction.....	57
Figure 38	L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'ultrason.....	58
Figure 39	L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de macération.....	58
Figure 40	L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'infusion.....	59
Figure 41	L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de décoction.....	60

Liste des tableaux

Tableau 1	Caractères biologiques et thérapeutiques du safran ...p25-26	
Tableau 2	les principaux acides phénoliques.....	28
Tableau 3	Classification des terpenoïdes.....	30
Tableau 4	origine des espèces réactives oxygénées.....	32
Tableau 5	Antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.....	35
Tableau 6	Taille et densité des cellules sanguines.....	42

Liste Des Abréviations

ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
AG	<i>Acide gallique</i>
AINS	<i>Anti-inflammatoire non stéroïdien</i>
AIS	<i>Anti-inflammatoire stéroïdien</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
TTL	<i>Test de transformation lymphoblastique</i>
PTS	<i>Pétales de safran</i>
ED	<i>Eau distillée</i>
EP	<i>Eau physiologique</i>
ERO	<i>Espèces réactives de l'oxygène</i>
GPx	<i>Glutathion peroxydase</i>
GRH	<i>Globules rouges humains</i>
Hb	<i>Hémoglobine</i>
PB	<i>Prolifération basale</i>
IP	<i>Indice de prolifération</i>

Résumé

Notre travail porte sur l'évaluation in vitro des extraits poly-phénoliques des pétales de safran sur la prolifération des lymphocytes T.

L'extraction des constituants des pétales de *Crocus sativus* a été effectuée selon quatre méthodes : macération, décoction, Infusion, ultrason. L'isolement des lymphocytes se fait à partir du sang d'un volontaires dans un gradient d'histopaque. les lymphocytes sont stimulés par des agents mitogènes spécifiques, la Concanavaleine A. les lymphocytes T sont mis en contact avec différentes concentrations des 4 extraits [1µM/l-10µM/l-25 µM/l -50 µM/l -100 µM/l] pendant 48 h d'incubation, pour déterminer le taux de prolifération cellulaire et le dosage des paramètres du statut oxydant-antioxydant lymphocytaire (le glutathion érythrocytaire et l'activité de la catalase, les teneurs en protéines carbonylées et les teneurs en malendialdéhydes) .

Nos résultats montrent que les extraits d'ultrason à 25µM/l, macération entre 1µM/l et 100µM/l et infusion à 1µM/l de pétale de safran provoquent une augmentation significative de la prolifération cellulaire comparée à la prolifération basale, par contre la prolifération lymphocytaire est diminuée significativement en présence des autres concentrations de ces extraits. Cependant, l'extrait de décoction de pétale de safran provoque une diminution de la prolifération lymphocytaires d'une manière dose dépendante.

En ce qui concerne les teneurs en malendialdéhydes sont augmentées aux concentrations 10 µM/l d'extrait d'ultrason, à 100 µM/l d'extrait de décoction comparées à la prolifération basale, elles sont diminuées aux autres concentrations cependant l'extrait de macération et infusion provoque une diminution des teneurs en MDA d'une manière dose dépendante.

Ensuite les teneurs en protéines carbonylées sont augmentées aux concentrations 1µM/l, 25µM/l, 50µM/l d'extrait d'ultrason 1µM/l, 50 µM/l d'extrait de macération et d'infusion 1µM/l, 10µM/l d'extrait de décoction.

Cependant, les teneurs lymphocytaires en GSH augmentent aux concentrations 100µM/l d'extrait d'ultrason par contre elles varient pas aux autres concentrations et enfin pour l'activité de la catalase augmente aux concentrations 1µM/l, 100µM/l de l'extrait de macération 1µM/l, 10µM/l, 100 µM/l de l'extrait d'infusion et 10µM/l de l'extrait de décoction et provoque une diminution aux autres concentration.

En conclusion, les extraits de pétale de safran (ultrason, macération, infusion, macération) provoquent des effets immunostimulateurs et ou immuno-inhibiteurs d'une manière dose dépendante avec une augmentation de la défense antioxydante en présence de l'extrait de pétale de safran au ultrason.

Mots clés : Lymphocytes T, MDA, Pétale de safran, décoction, macération, infusion, ultrason, statut oxydo-rédox

Summary

Our work focuses on the in vitro evaluation of polyphenolic extracts from saffron petals on the proliferation of T cells. The constituents of the *Crocus sativus* petals were extracted using four methods: maceration, decoction, infusion, and ultrasound. The isolation of lymphocytes is done from the blood of a volunteer in a histopical gradient. The lymphocytes are stimulated by specific mitogens, the Concanavaline A. the T cells are put in contact with different concentrations of the 4 extracts [M-10-25 M -50 M -100 M] during 48 hours of incubation, incubation to determine the rate of cell proliferation and the dosage of parameters of lymphocytic oxidation-antioxidant status (erythrocytic glutathione and catalase activity, carbonyated protein levels and malendialdehydes levels). Our results show that ultrasound extracts at 25 M/l, maceration between 1M/l and 100 M/l and infusion at 1M/l ...

Then the carbonyated protein levels are increased to concentrations of 1M/l, 25 M/l, 50 M/l of ultrasound extract 1M/l , 50 M/l of maceration extract and infusion 1M/l , 10 M/l of decoction extract. However, the lymphocytic levels of GSH increase to concentrations 100 M/l of ultrasound extract on the other hand they do not vary at other concentrations and finally for the activity of the catalase increases to concentrations 1M/l,100M/l of the maceration extract 1M/l,10 M/l,100 M/l of the infusion extract and 10 M/l of the decoction extract and causes a decrease at the other concentration . In conclusion, saffron petal extracts (ultrasound, maceration, infusion, maceration) cause immunostimulatory and or immuno-inhibitory effects in a dose-dependent manner with an increase in antioxidant defense in the presence of saffron petal extract at ultrasound.

Keywords: T-cells, MDA, saffron petal, decoction, maceration, infusion...

التلخيص

يركز عملنا على التقييم في المختبر من مستخلصات من الزعفران بتلات على انتشار الخلايا التائية. تم استخراج مكونات باستخدام أربع طرق: الماكرة ، ديكوتيون ، التسريب ، الموجات فوق الصوتية. يتم عزل الخلايا *Crocus sativus* بتلات هيتوبكال يتم تحفيز الخلايا الليمفاوية بواسطة ميتوجين محددة، والخلايا *gradient.the* الليمفاوية من دم أحد المتطوعين في [M-10-25 M-50 M-100] يتم وضع الخلايا التائية في اتصال مع تركيزات مختلفة من مقتطفات A. الكانكانافالين خلال 48 ساعة من الحضانة، الحضانة لتحديد معدل انتشار الخلايا وجرعات من المعلمات من حالة الأكسدة للمفاوية [M] مستويات البروتين الكربوني ومستويات *catalase* المضادة للأكسدة (الجلوتاثيون الكرتي والنشاط *malendialdehydes*) بين 1 *maceration* تظهر نتائجنا أن مستخلصات الموجات فوق الصوتية في 25 م/ لتر، و... لتر / M لتر وضخ في 1 M / لتر و 100.

ثم يتم زيادة مستويات البروتين الكربونية إلى تركيزات M/11، M/1، 25 M/1، 50 م/لتر من استخراج الموجات فوق الصوتية M/11، M/1 من استخراج الماكرة و 1M/1 *fusion*، 10 م/لتر من استخراج ديكوتيون. ومع ذلك، مستويات الليمفاوية من GSH زيادة إلى تركيزات 100 م / لتر من مستخلص الموجات فوق الصوتية من ناحية أخرى أنها لا تختلف في تركيزات أخرى وأخيرا لنشاط الزيادات كاتالوظيفة إلى تركيزات 1 م / لتر، 100 م / لتر من استخراج الماكرة M/11، 10 M/1، M/100 لتر من مستخلص التسريب و 10 م / لتر من استخراج ديكوتيون ويسبب انخفاضا في التركيز الآخر. في الختام ، مقتطفات بتلة الزعفران (الموجات فوق الصوتية ، القعقع ، التسريب ، الماكرة) تسبب تأثيرات مثبطة للمناعة أو مثبطة للمناعة بطريقة تعتمد على الجرعة مع زيادة في الدفاع المضاد للأكسدة في وجود مستخلص الزعفران الصغير في الموجات فوق الصوتية.

الكلمات الرئيسية: تي-الخلايا، MDA، بتلة الزعفران، ديكوتيون، الماكينة، التسريب...

Introduction générale

Le safran (*Crocus sativus*) est une plante utilisée depuis plus de 3 000 ans qui a parcouru les siècles et essaimé dans les différentes régions du globe pour se retrouver cultivé en France à partir du Xe siècle et en Algérie durant l'occupation française. Il ne s'agit pas d'une plante sauvage car elle doit tout à la main de l'homme qui a su la cultiver, la choyer, et l'importer tout autour du bassin méditerranéen (**Palomares, 1988**).

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 pharmacie. Les anciens (égyptiens, perses, grecs et romains), n'ont cessé de l'utiliser, de la cultiver pour ses nombreuses vertus pharmaceutiques (**Palomares, 1988**).

L'épice de safran est très appréciée, elle est utilisée dans l'industrie, avec différentes applications, comme médicament ; elle a été utilisée dans le traitement d'environ 90 maladies (**Honan, 2004**) telles que : troubles de vision liés à l'âge, flatulences, dysménorrhée, paralysie, goutte et cancers (**Fernandez-Sanchez et al., 2012**).

La culture du safran commence à prendre de l'ampleur en Algérie durant les cinq dernières années, une véritable lancée est remarquée par des projets familiaux soutenus et des expérimentations documentées et ce à Constantine (BenBadis), Khenchela (M'sara) (**Gadiri N., 2011**), Tiaret (Hamadia), et Biskra (**Lahmadi et al., 2013**).

A Tiaret, on propose la vente des bulbes à 20 DA la pièce. Ailleurs comme à Khenchela on propose son exportation. De nos jours, la commercialisation du Safran est lancée même à travers le net (Oued Kniss, à des prix de 1500 –2500DA/le gramme) mais on ne sait pas s'il s'agit toujours de production locale ou d'importation. Plusieurs blogs et vidéos sont diffusés pour témoigner et visualiser la production en Algérie. Par contre il n'y a rien encore en matière de statistique et collecte de données.

Pour connaître son intérêt dans le domaine économique et thérapeutique, nous avons estimé nécessaire d'explorer les constituants de cette plante cultivée dans notre région de la wilaya de Tlemcen. Nous allons l'examiner de plus près en commençant par nous pencher sur ses origines et son histoire. Nous établirons ensuite l'intérêt botanique de la plante *Crocus sativus* L et de ses différentes parties pour ensuite nous attarder et nous focaliser sur les stigmates et les pétales en particulier qui sont à l'origine même de la drogue végétale utilisée pour cette thérapeutique (**Palomares, 1988**).

La fleur de *Crocus sativus* est délicate et fragile et dégage un parfum "miellé" lors de sa récolte. Une caractérisation des composés volatils présents dans la fleur a été effectuée en vue d'une valorisation aromatique et thérapeutique des déchets floraux (**Bergoin, 2005**). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de recherche sur la composition chimique des fleurs du *Crocus sativus*. L pour établir une valeur des métabolites secondaires de ces derniers.

Cette étude comporte deux parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui est constituée de deux chapitres l'un sur la présentation de la plante étudiée (*Crocus sativus.L*) et l'autre sur les métabolites secondaires.
- La seconde partie concerne la partie expérimentale pour évaluer l'activité in vitro des extraits poly-phénoliques de la fleur du *Crocus sativus L* sur la fonction des lymphocytes T et leurs effets sur le statut oxydo-rédox intracellulaire.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le safran

1.1. Etymologie et Histoire

1.1.1. Etymologie

Le safran est connu sous le nom de *Crocus Sativus Linnaeus*, dérivé du latin Safranum, aussi inspiré de l'arabe « Zaafâran » dont la racine exprime une notion essentielle, la couleur jaune. «Crocus » le nom de genre vient du grec Krokos qui veut dire filament par allusion aux stigmates de la plante, le terme Sativus quant à lui signifie cultivé, car le *Crocus Sativus* par sa reproduction végétative ne peut se multiplier sans la main de l'homme (**Chahine, 2014**)

1.1.2. Histoire

Dans la culture et les coutumes humaines l'histoire du safran date de plus de 3000 ans (**Deo,2003**), il est présent dans de nombreuses cultures , continents et civilisations , avec son gout amer , son parfum de foin et des notes légèrement métalliques , le safran a été utilisé comme assaisonnement, parfum, teinture et médicament. Il serait originaire du Moyen-Orient (**Hill, 2004 ; Grigg 1974**) et probablement d'abord cultivé au Cachemire (**Mcgree, 2004**). Cette précieuse épice a été utilisée par les anciennes civilisations mésopotamiennes comme assaisonnement, teinture pour le linge et lors de rites religieux. La couleur du safran a été considérée tout au long de l'histoire comme un symbole de lumière, de spiritualité et de sagesse (**Aramburuet al.,2006**), les Hébreux et les Egyptiens utilisaient le safran pour aromatiser et colorer les aliments dans les fêtes religieuses , il a été prescrit aussi pour les maux d'estomac par les médecins des Pharaons (**Chahine, 2014**) , il a été également utilisé en cosmétiques en raison de sa forte couleur et de son arôme :Cléopâtre l'utilisait pour des traitements de phytothérapie et pour colorer ses lèvres ,ses ongles et ses cheveux , il a aussi été utilisé par les romains dans des parfums et des nombreuses cérémonies (**Carmona et al., 2006**).

Le safran a été ensuite transmis aux Grecs, aux Romains, aux Indiens, aux Marocains, aux Siciliens et aux Italiens, la culture du safran date des Romains. Les Arabes, aux IXe siècle l'introduisent en Afrique du Nord, puis en Espagne (**Chahine,2004**).

En ce moment le principale pays producteur du safran était l'Iran (150 à 170 t/an) ,puis l'Inde et le Cachemire (3 à 40t/an),suivi par la Grèce (5 à t/an) , le Maroc (2 à 3 t/an) puis l'Espagne (1 t/an) , l'Italie (100 kg/an) et enfin les petites productions françaises et suisses, avec le safran du Gâtinais et du Quercy (6kg/an) ou du Mund (1,5 à 3kg/an). La qualité du safran est évaluée par des normes nationales. Les variétés espagnoles présentent généralement une couleur, un arôme et un parfum plus doux. Les variétés italiennes sont plus puissantes, alors que les variétés les plus intenses sont originaires d'Iran ou d'Indes (**Negbi, 1999**).

1.2. Caractères botaniques

Le safran « *Crocus Sativus L.* » est une petite plante (**Rahmouni Sara et Reghis Sarah, 2015-2016**) herbacée, vivace, qui appartient à la famille Iridaceae, la ligne de Liliaceae et du vaste genre crocus qui comprend plus de 80 espèces des plantes bulbeuses de petites tailles.

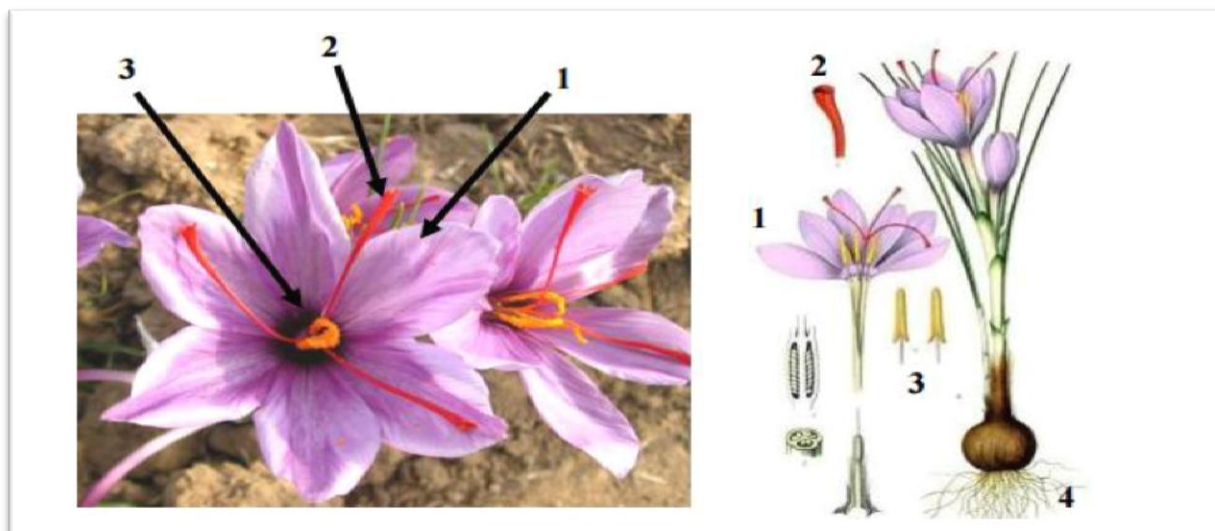
Crocus Sativus est les seules espèces de *Crocus* qui produit le safran (**Pitsikas ,2016 ; Chahine ,2014**).La classification taxonomique de la série *C. sativus* est la suivante : (**Saxena, 2010 ; Srivastava et al., 2010**).

- Royaume : plantae
- Division : spermatophyte
- Sous-division : Angiosperme
- Classe : Monocotylédone
- Sous classe : Liliidae
- Ordre : liliales
- Famille :Iridaceae
- Genre : *Crocus*
- Espèce : *C.sativus*

Crocus sativus est une plante triploïde stérile appartenant à la famille des Iridacées (monocotylédones), herbacée ,pérenne et vivace a floraison automnale inconnue a l'état sauvage (**Moshiri et al., 2006 ; Rubio-Moraga et al.,2009**). C'est une plante qui mesure au plus 25 cm à bulbe (**Polese et Devaux, 2001**). Cette dernière comporte dix feuilles (**Polese et Devaux, 2001**). La tige des fleurs se lève d'une ampoule longue, un tube blanc et mince ; la fleur elle-même étant grande et d'une belle couleur violette. Aussi des feuilles radicales, linéaires, vert foncé ci-dessus, vert pale ci-dessous, enfermés dans une graine membraneuse, restant parfois frais presque tout l'hiver (**Bhargava et al., 2011**).

La fleur est composée de : 6 pétales, 3 étamines jaunes, un pistil qui se divise en 3 longs stigmates de couleur rouge vif brillant et velouté de 3 à 4 cm. Les stigmates ont un aspect brillant à l'ouverture de la fleur, fins à la base et plus larges à l'extrémité, très odorants et constituent le safran du commerce une fois desséchés. Le safran se développe à partir de ses bulbes aussi appelés cormes, sont de petits globules bruns d'environ 4.5 centimètres de diamètre enveloppés dans une natte dense de fibres parallèles. Les cormes, qui ne survivent qu'une saison, doivent être divisés manuellement et cassés, puis replantés. Ils fourniront ainsi jusqu'à dix caïeux, qui produiront de nouvelles plantes (**Winterhalter, et Straubinger, 2000 ; Deo, 2003**). Le safran a un pollen stérile, et la fleur du *crocus sativus* ne produit pas de graines viables, sa multiplication végétative est propagée par les cormes, la plante étant

dépendante de l'homme pour sa reproduction .On compte d'une à trois fleurs par bulbe et de deux à trois bulbes par plante (**Winterhalter et Straubinger, 2000**).



1-pétales, 2-stigmates, 3-étamines, 4-bulbe

Figure 1 : La fleur de *Crocus sativus* (Chahine, 2014)

1.3. Culture du safran

Le safran possède une végétation inverse (**Chahine, 2014**) et un cycle de culture caractérisé par deux stades au cours de l'année (**Alonso Diaz-Marta et al., 2006**) quand tous les autres végétaux s'endorment pour l'hiver que le safran fleurit, les feuilles du *Crocus sativus* sortent de terre en septembre et la plante fleurit en octobre ,puis se dessèche en mai de l'année suivante (**Chahine, 2014**).

Le *crocus sativus* est une plante de jours courts, pouvant supporter des conditions climatiques très sévères adapté aux régions a hiver froid (-10°C) et été chaud (+40°C) et sec (**Chahine, 2014**).

Sa pousse est idéale s'il est exposé directement à la lumière du soleil et s'accommode mal à l'ombre (**Deo, 2003**), il préfère les sols argilo-calcaires friables, lâches, a basse densité , bien arrosés et drainés ainsi qu'une forte teneur en matière organique ,cependant comme n'importe quel crocus de jardin il s'accommode aussi des sols légèrement acides ,supportant sans difficulté jusqu'à pH de 6 (**Lachaud, 2012**).

Après une période de dormance durant l'été, les cornes envoient leurs feuilles étroites et commencent à bourgeonner dès le début de l'automne. Mais c'est seulement au milieu de celui-ci que la plante commence à fleurir. La moisson des fleurs doit être très rapide après leur floraison à l'aube, les fleurs fanent rapidement durant la journée (**Willard, 2001**). En outre le safran fleurit dans une étroite fenêtre d'une à deux semaines (**Willard, 2001**). Il faut Approximativement 150 fleurs pour obtenir 1g de safran sec, pour produire 12g de safran

séché (72 g avant séchage) il faut près de 1kg de fleurs .En moyenne une fleur fraîchement coupée fournit 0.03g de safran frais ou 0.007g de safran sec (Deo, 2003).

La plantation a lieu de juillet au début septembre, les plantations tardives produisant moins de fleurs (Palomares, 1988).les cormes étant enterrés entre sept et quinze centimètres de profondeur (Willard, 2001).la profondeur et l'espacement en corrélation avec le climat, sont deux facteurs critiques ayant un impact sur le rendement des plantes. Ainsi, les cormes plantées les plus profondément fournissent un safran de plus haute qualité, bien qu'ils produisent moins de bourgeons et de cormes fils. Sachant que les producteurs italiens ont déduit qu'une profondeur de quinze centimètres et un espacement de deux à trois centimètres entre les cormes favorisent le rendement en stigmates, tandis que les profondeurs de huit à dix centimètres optimisent la production de fleurs et de cormes (Willard, 2001) .les cormes du *crocus sativus* ne survivent qu'une saison. Leur période d'activité se situe de septembre à mai pour ensuite entrer en dormance durant tout l'été.

Chaque bulbe mère ne fleurit qu'une fois et engendre avant de se dessécher plusieurs petits bulbes ou bulbilles qui produiront de nouvelles plantes. Ils vont puiser leurs ressources, dans le bulbe mère qui finira par mourir. Les nouveaux bulbes seront au nombre de 2 à 10; ils doivent être divisés manuellement, puis replantés. Ils grossissent tout au long de l'automne et ensuite vient la période de dormance (Chahine, 2014).

1.4. Récolte du safran

La floraison des crocus démarre vers la fin de l'été. Le refroidissement des nuits lève la dormance des cormus. Ainsi, toute l'énergie accumulée dans les réserves amylacées du bulbe se libère pour donner naissance à la fleur << A la troisième pluie d'automne après le 15 aout vient le safran >> dit-on en Gatinais (Aucante P. Le safran-chroniques du potager .Actes sud Ed.2000,101 P).

Il faut environ 130 à 200 fleurs pour arriver à 5g de stigmates frais qui une fois séchés donneront 1g de safran (Figure 2).



Figure 2 : Récolte du safran (jardinage.lemonde.fr)

a- Cueillette

Elle aura lieu, selon les années, les lieux et la météo, vers début octobre, elle s'étale sur trois semaines et se fait quotidiennement dès le petit matin, à la rosée puis qu'une fois les fleurs épanouissent. Elles sont rapidement sensibles à l'action de la lumière et de l'air, ce qui peut donner une décoloration des stigmates et une diminution de leur parfum, Les fleurs sont cueillies à leur base à deux mains et seront ensuite déposées dans un panier d'osier ayant une forme originales (les bords du panier sont relevés de façons à protéger les fleurs du vent lorsque ce panier est rempli, il est vidé dans une hotte, une manne (vaste panier rectangulaire) ou sur un drap étendu sur le sol au bord de la safranière (**Favre E.le safran safran –l'anti déprime. Terre d'hommes Ed.2008,177**).



Figure 3 : la cueillette du safran (/ Ursatj.Le safran du Gratinais. Pithiviers.1913,45P)

b-Emondage des fleurs

En langage plus familier : l'épluchage est l'action de séparer les trois stigmates des autres organes de la fleur de crocus .L'objectif est de couper le style ni trop haut ni trop bas afin de garantir une qualité optimale (**Figure 4**).



Figure 4 : Émondage de *crocus sativus* (Plombières, novembre 2013).

L'émondage doit commencer le plutôt possible, au maximum dans les vingt-quatre heures qui suivent la cueillette. Au siècle dernier les hommes s'attelaient la cueillette le matin et les femmes émondaient (**Figure 5**).



Figure 5 : Stigmates obtenus après émondage (Plombières, novembre 2013).

c- Séchage

C'est la partie la plus délicate et la plus critique. Cette étape conditionne la consommation du safran de sa conservation ultérieure, elle détermine les qualités organoleptiques du safran telles que la couleur, la saveur, l'arôme mais également son pouvoir aromatique ainsi que ses propriétés médicinales.

La manière de sécher les stigmates diffèrent d'une région à une autre : poêle à bois, séchoir à pollen, air libre (Maroc), à l'abri ou non du soleil, four électrique, dessiccation, etc. d'où les différentes variations de qualité que l'on peut observer d'un safran à l'autre.

Il y a environ un siècle dans les Gâtinais, les safraniers suspendaient un tamis de crin à environ 45cm au-dessus d'un brasier de charbon de bois ou d'un réchaud chauffant à une température avoisinant les 60°C.

Les stigmates sont déposés dans le tamis et au bout de trente minutes ils sont retournés.

L'opération continue encore une quinzaine de minutes. La dessiccation prend fin lorsqu'au toucher on jugera le safran comme léger, cassant avec des filaments parfaitement raides. Les stigmates ne mesurent plus que 2 cm et au poids, Le safran sec doit prendre les 4/5 du poids frais du départ (**Ursatj.Le safran du Gâtinais.Pithiviers.1913.45P**). Selon la norme internationale ISO 3632-1 de 2011, le taux d'humidité restant doit être au maximum de 12%.

Pendant le séchage, s'opère une véritable réaction chimique qui réorganise les molécules spécifiques de la plante avec libération de molécules d'eau c'est pour cela que la dessiccation est une étape déterminante (**Aucante P. Le safran-chroniques du potager .Actes sud Ed.2000,101P**).

1.5. Etude phytochimique de la fleur du *Crocus Sativus L*

1.5.1. Principaux composants du safran

D'après plusieurs études conduites, le safran contient des principaux composés biologiquement actifs qui sont (**Figure 6**).

-La crocine et la crocétine qui sont deux pigments caroténoïdes responsables de la couleur jaune-orangée de l'épice.

-la picrocrocine, apportant au safran sa saveur et son goût amer.

-le safranal, un composé volatil responsable de l'arôme et de l'odeur si spécifique au safran.

Ainsi, ses principaux constituants contribuent-ils non seulement au profil sensoriel du safran (Couleur, goût, arôme) mais aussi aux propriétés intéressantes de la santé qui seront discutées dans la partie suivante (**Melynk *et al* ; 2010,43(8), PP 1981-1989**).

Les stigmates séchés constituent la drogue végétale. Les analyses chimiques faites sur les stigmates de *Crocus Sativus* ont révélé la présence de plus de cent-cinquante éléments, avec une composition approximative de :

-10% d'eau.

-12% de protéines et d'acide d'aminés.

-5% de graisses.

-5% de minéraux (Mn, Mg, P, Cu, Ca, Zn, Fe...).

-5% de fibres brutes.

-63% incluant l'amidon, les sucres réduits, les pentosanes, les gommages, les pectines et les dextrines.

-Des quantités infimes de vitamine B2(Riboflavine) et de vitamine B1 (Thiamine).

Les proportions de ces constituants peuvent varier en raison des conditions de croissance et du pays d'origine (**Melynk *et al* ; 2010,43(8) ,PP 1981-1989**).

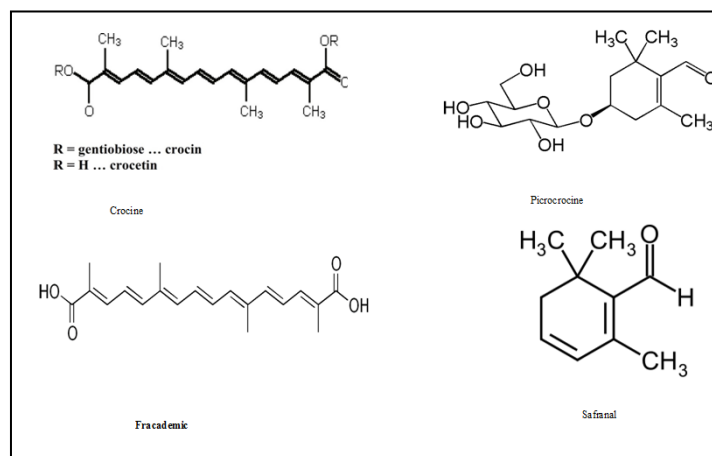


Figure 6 : Structures moléculaires des quatre métabolites secondaires du safran à activité biologique (Researchgate.net).

1.6. Caractères biologiques et thérapeutiques du safran

Plusieurs études ont montrés que le safran à des effets anticancéreux, anti-tumoraux (**Chahine, 2014**) anti-convulsivant (**Chahine,2014**), antitussif (**Bhargava,2011**) et antioxydant... etc (**Chahine, 2014**) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Caractères biologiques et thérapeutiques du safran

<p>Activité anti-cancéreuse et activité anti-tumorale (Chahine,2014).</p>	<p>-La promotion de l'apoptose. -Réduction de la prolifération et la synthèse d'ADN des cellules tumorales. -La diminution de l'inflammation. -La réduction du stress oxydatif. -Augmentation des enzymes anti-oxydantes.</p>
<p>Activité anti-convulsivante (Rhahimi ,2015).</p>	<p>-Safranal et crocine : -Réduisent la durée de la crise chez les souris. -Retarde l'apparition des convulsions toniques.</p>
<p>Activité antitussive (Bhargava,2011).</p>	<p>-L'extrait éthanolique de <i>Crocus sativus</i> a permis de réduire le nombre de toux chez les cobayes lorsqu'ils étaient injectés intrapériton également par une solution d'acides citrique (20%) a été utilisée pour induire la toux.</p>
<p>Activité anti oxydante (Chahine, 2014).</p>	<p>-Effet inhibiteur sur les réactions en chaine des radicaux libres. -Etant riche en vit B2 et provitamine A, il représente un des meilleurs antioxydants naturel pour lutter contre le vieillissement des cellules. -Les caroténoïdes agissent comme une protection active contre les espèces radicalaires. -Il protège les cellules cardiaques en augmentant la défense anti-oxydante dans le cas d'endommagements dus à l'ischémie-reperfusion et dans le cas des maladies cardiovasculaires.</p>
<p>Effets anti -nociceptifs et anti-inflammatoires (Srivastava et al.,2010).</p>	<p>-Due à la présence de flavonoïdes, de tanins, d'anthocyanines, d'alcaloïdes et de saponines.</p>
<p>Pression sanguine (Fatehiet al.,2003).</p>	<p>-Réduction de la pression sanguine grâce aux extraits aqueux et éthanol des pétales de <i>Crocus Sativus</i> de manière dose-dépendante.</p>

Effet sur le flux sanguin oculaire et la fonction rétinienne (Bhargava,2011).	<p>-les analogues de la crocine isolés de <i>Crocus sativus</i> ont été révélés pour augmenter le flux sanguin par vasodilatation à la rétine et à la choroïde.</p> <p>-Facilite la récupération de la fonction rétinienne.</p> <p>-Empêche la rétinopathie ischémique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge qui entraîne une cécité.</p>
Effet sur le comportement d'apprentissage et la potentialisation à long terme (Rahimi,2015).	<p>la crocine et la crocétine :</p> <p>-Ont permis d'améliorer la mémoire et les compétences d'apprentissage dans les troubles de l'apprentissage liés à l'éthanol chez les souris et les rats.</p>
Anti Alzheimer (Rahimi,2015).	<p>-le principal constituant carénoïde. Le trans -crocin-4, le digentibiosylester de la crocétine, à inhiber la fibrillogénèse A-beta formé par l'oxydation des fibrilles de bêta-peptide amyloïdes dans la maladies d'Alzheimer.</p>

1.7. Autres usages

- Teintures et peintures : les textiles, les laines (**Tsatsaroniet al., 1998**).
- Calligraphie : mélanger à l'encre afin d'obtenir l'encre rouge ou jaune (**Lazérat,2009**)
- Histologie : utilisés dans certaines colorations cytologiques de routine, il colore en jaune orangé les fibres de collagène grâce à ses pigments lipophiles (**Teusher et al., 2015**).
- Cosmétologie : garder une peau douce et jeune (**Lazérat, 2009**).
- Parfumerie : composition de certains parfums féminins et masculins (**Palomares,2015**).
- Toxicité : est peu probable vu son prix (**casamayou,2011**).

2. Les métabolites secondaires

On distingue par « métabolites secondaires » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement au processus de base de la cellule vivante contrairement aux métabolites primaires qui sont directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux et enfin la défense contre les prédateurs et les pathogènes.

Ces composés regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes **(Yarnelle, 2007)**.

2.1. Polyphénols

Les Polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal, On les trouve dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, feuilles, fleurs et fruit, mais une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus. Les polyphénols sont des noyaux benzéniques liés au moins à un groupe hydroxyle libre engagé dans une fonction : éther, ester ou hétéroside...etc. **(Bruneton, 1999)**.

2.1.1. Principales classes des polyphénols

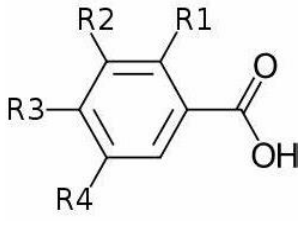
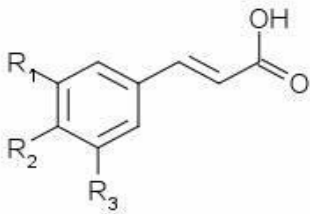
Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ces composés phénoliques se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...etc.) et par les liaisons possibles avec d'autres molécules **(Pincemail et al., 2002)**.

On peut distinguer les différentes classes des Polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base **(Balasundram et al., 2006)**.

2.1.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites végétaux secondaires aromatiques largement répartis dans tout le règne végétal **(Saxena et al., 2012)**. Ils peuvent être divisés en deux groupes principaux, les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques **(Tableau 02)** dérivés des molécules non phénoliques de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique **(Heleno et al., 2015)**. Les acides benzoïques ont sept atomes de carbone (C6-C1) et sont les acides phénoliques les plus simples trouvés dans la nature. Les acides cinnamiques ont neuf atomes de carbone (C6-C3) **(Abdelrazag, 2013)**.

Tableau 2: Les principaux acides phénoliques (Macheix et al, 2005).

Acides hydroxybenzoïques		
	$R_1=R_2=R_3=R_4=H$	Acide benzoïque (non phénolique)
	$R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$	Acide p-hydroxybenzoïque
	$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$	Acide protocatéchique
	$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$	Acide vanilique
	$R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$	Acide gallique
	$R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$	Acide syringique
	$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$	Acide salicylique
	$R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$	Acide gentisique
Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes)		
	$R_1=R_2=R_3=H$	Acide cinnamique (non phénolique)
	$R_1=R_3=H, R_2=OH$	Acide p-coumarique
	$R_1=R_2=OH, R_3=H$	Acide caféique
	$R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$	Acide férulique
	$R_1=R_3=OCH, R_2=OH$	Acide sinapique

2.1.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des feuilles et des fruits (Vania et al., 2014). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (Figure 05), le noyau flavane constitué de 15 atomes de carbones (C₆C₃C₆) assemblés en 3 cycles A, B et C (A et B) sont des noyaux aromatiques et C est un hétérocycle oxygéné central comprend 3 familles : les flavonols, les anthocyanes et les flavanons (Kim et al., 2004).

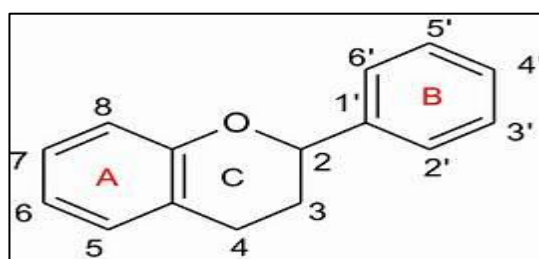


Figure n° 07: Structure de base des flavonoïdes (Vania et al., 2014).

2.1.4. Les tannins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes solubles dans l'eau (20-35 °C). Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides et essentiellement les protéines (Mahmoudi et al., 1982). Selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes :

□-Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique qui contiennent un carbohydrate, généralement du D-glucose, comme noyau central (**Hassanpour et al., 2011**). Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique, ils libèrent alors une partie non phénolique

(souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas des gallotannins) soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (**Macheix et al., 2005**).

□-Tannins condensés

Les tannins condensés : appelés aussi pro-anthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Sour, 2016**).

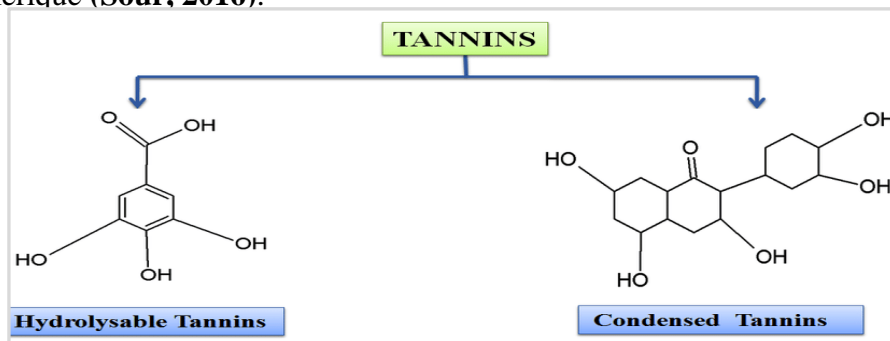


Figure 8 : Types de tannins et leurs structures de base (**Macheix et al, 2005**).

2.1.5. Coumarines

Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. On les rencontre dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés diverses, elles sont capables de prévenir la peroxydation lipidique et de capter les radicaux hydroxyyles, super oxydes et peroxydes. En fonction de leurs structures on peut les classer en coumarines simples avec des substituants sur le cycle de benzène, les furanocoumarines, les pyranocoumarines, ceux substitués en position 3 et ou 4 et le dernier groupe serait celui des dimères (**Ameziane,2016**) (**Figure 09**).

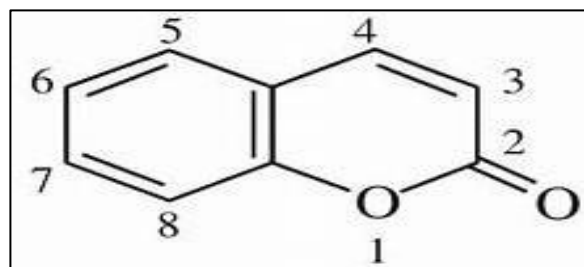


Figure 09 : Squelette de base des coumarines (**Klenkar Molnar, 2015**).

2.2 Les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique complexe azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présente une structure moléculaire hétérocyclique (**Figure 10**), on distingue Les acides aminés dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique et les pseudoscalcoïdes dont l'azote est inclus dans le système hétérocyclique, ce type présente le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas dérivés des *acides aminés* (**Badiaga, 2011**).

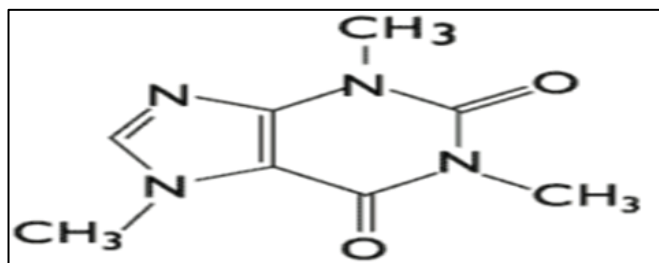


Figure10: structure de base des alcaloïdes (Huang, 2001).

2.3. Terpénoïdes

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelés isoprène. Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est (C₅H_X)_n dont le(x) est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et(n) peut prendre des valeurs 1 à 8 (**Tableau03**) (**Sun et al.,2016**).

Tableau 03 : classification des terpénoïdes

<i>Monoterpène</i>	<i>C10</i>
<i>Sesquitérpène</i>	<i>C15</i>
<i>Ditérpenes</i>	<i>C20</i>
<i>Monoterpène</i>	<i>C25</i>
<i>séstéerpenes</i>	<i>C30</i>
<i>triterpènes</i>	<i>C40</i>
<i>tetraterpenes</i>	<i>(C10)n avec 8 < n</i>
<i>poly terpènes</i>	<i>C10</i>

3-Généralité sur les radicaux libres et les antioxydants

3.1. Radicaux libres

Les radicaux libres ou oxydants sont naturellement fabriqués par notre corps (réaction chimiques) (www.docvadis.fr/patrick-dorffer).

C'est un fragment obtenu par scission d'une molécule, il possède un électron célibataire non apparié, ce dernier lui confère une grande réactivité chimique (molécule non stable) mais très réactives avec des molécules environnantes.

Il tente de céder ou de gagner un électron et transmet à une autre molécule ses propriétés d'où des réactions en chaîne.

Au niveau des mitochondries, l'oxygène est l'origine de la formation des espèces réactives de l'oxygène parmi lesquels se trouvent les radicaux libres qui se forment lors de différents processus biologiques (respiration, stress, inflammation) par exemple lors de la respiration cellulaire, la molécule de dioxygène gagne un électron et forme un superoxyde (www.futura.sciences.com).

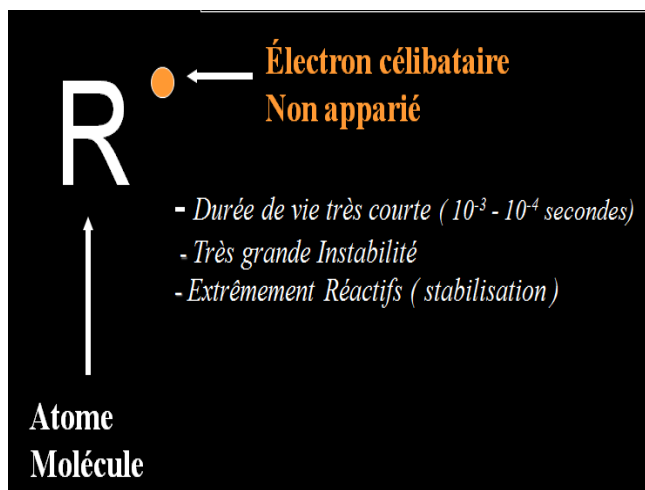


Figure11 : Radical libre (Fr.slideshare.net)

3.2. Origines des espèces réactives oxygénées

3.2.1. Définition du ROS ou ERO : sont une famille d'entités chimiques regroupant les dérivés :

a/Non radicalaire : (ne possèdent pas d'électron célibataire) dont la toxicité est importante

-Anion peroxyde (O_2^{2-}).

-Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

-Peroxyntrie ($ONOO^-$).

b/Radicaux libres oxygénés : (espèces chimiques possédant un électron célibataire-non apparié) qui intéresse notre propos.

-Anion superoxyde (O_2^-).

-Radical hydroxyle (HO^-).

-Monoxyde d'azote (NO). (Novelli, GP., *J physiol pharmacol.*,1997,48,517-527).

Aussi on peut distinguer des radicaux primaires dont leurs rôles physiologique est particulier et des radicaux secondaires issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides) (Favier, A., *Le stress oxydant*) (Gardes *et al*,2003).

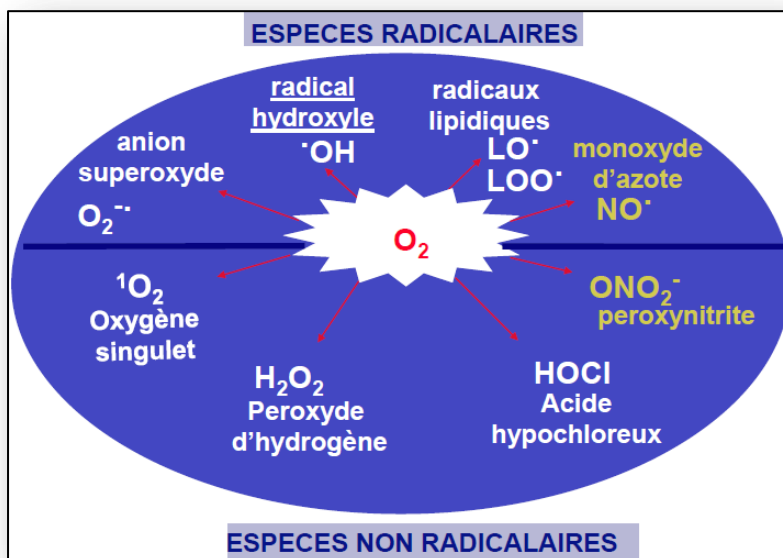


Figure12 : les espèces radicalaires et non radicalaires (Fr.slideshare.net)

3.2.2. Sources

Tableau 4: origine des espèces réactives oxygénées.

Mitochondries «Respiration »	Chloroplastes « Photosynthèses »	Réticulum Endoplasmique « Détoxification via Cyt Pu50 »	Autres
-NADPH-oxydases. -Xanthine oxydase. -Cycloxygénases. -Lipoxygénases. -Oxalate-oxydases. -les amines-oxydases. -les oxydases peroxysomales.	-Photorespiration. -B-oxydation. -La chaine de transport des électrons.	-Phagocytoses. -Inflammation. -Infection. -Déficit immunitaire « cytokines». -Métaux de transition Fe, Cu, Zn. -Exercices physique (sport intensif). -Fatigue (stress,angoisse).	-soleil (forte lumière) -U.V, X. -Radiations ionisantes. -Pollution (trou d'ozones). -Tabac, alcool , Médicaments, alimentation déséquilibré, virus, bactéries.....

(Fr.slideshare.net).

3.3. Le stress oxydatif

Etat de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de l'organisme, cet état est présent lorsqu'une des ces trois conditions suivantes sont présentes :

- Excès des espèces réactives d'O₂, N₂ ou Cl₂.
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes).
- Mécanismes de réparation insuffisant.

Le stress oxydatif n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré (Minotti, Aust ;1987).

3.4. Peroxydation lipidique

Est un procédé métabolique qui entraîne la détérioration oxydante des lipides par des espèces réactives de l'oxygène, elle peut dégrader des lipides dans la membrane cellulaire menant aux dégâts de cellules et éventuellement la mort cellulaire.

3.4.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique

Passe par trois opérations qui forment une réaction en chaîne de radical libre :

- Amorçage.
- Bouturage.
- Achèvement.

□-Amorçage

-Production d'un radical d'acide gras quand les espèces réactives de l'oxygène tel que le radical hydroxyle combine avec un atome d'hydrogène pour former l'eau et un radical d'acide gras.

□-Bouturage

-Le radical instable d'acide gras réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire dans l'opération de bouturage pour former un radical acide peroxy-gras.

-Ce radical instable réagit avec de l'acide gras libre a un peroxyde d'hydrogène ou de répétition de produit et a un radical différent d'acide gras.

□-Achèvement

Un enchainement de réactions de radical libre continue jusqu'à ce qu'une substance non radicale soit constituée par la combinaison de deux radicaux libres dans l'opération d'achèvement.

-Les réactions de radical libre peuvent également être arrêtées par les molécules antioxydantes dans un organisme. Elles peuvent gripper aux radicaux libres et éviter la peroxydation de lipide, souvent sous forme de vitamines de lipide-soluble (**new-medical.net**).

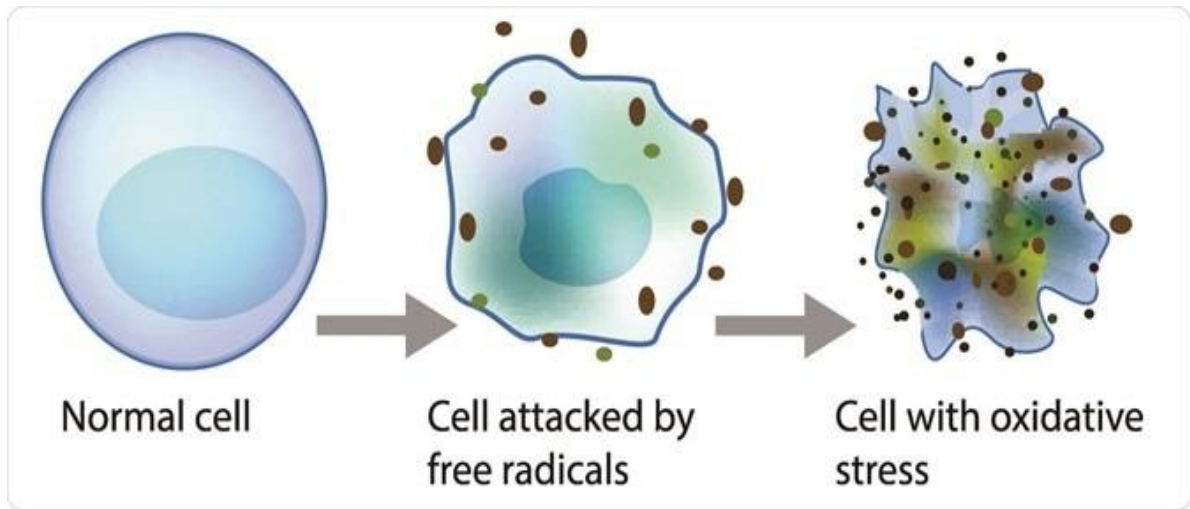


Figure 13: la peroxydation lipidique (new-medical.net)

3.5. Les antioxydants

C'est une substance qui avec une concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retarde de façon significative ou empêche l'oxydation du substrat (**Haliwelle & Gutteridge(1999)**).

Ils permettent : -D'empêcher la formation des ROS.

-D'éliminer des ROS.

- La réparation tissulaire et cellulaire (**new-medical.net**).

3.5.1. Antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques

Tableau 5: les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques: (Fr.slideshare.net)

Enzymatiques	Non enzymatiques	
<p>-Superoxyde dismutases (SOD) : $2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$</p> <p>-Catalase(CAT) : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$</p> <p>-Glutathion peroxydase(GPx) : $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$</p> <p>-Ascorbate peroxydase (APX): $H_2O_2 + 2 \text{ ascorbate} \rightarrow 2H_2O + \text{monodéhydroascorbate}$</p> <p>-Gaiacol peroxydase(GPOX) : $2H_2O_2 + 4 \text{ gaiacol (2méthoxy phénol) Tétragaïacol} + 8H_2O$</p> <p>-La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) : $\text{Monodéhydroascorbate} + 2NAD^+ \rightarrow \text{Ascorbate} + 2NAD$</p> <p>-La déhydroascorbate réductase (DHAR) : $\text{Déhydroascorbate} + GSH \rightarrow \text{Ascorbate} + GSSG$</p>	Exogènes (apportés par les végétaux)	Endogènes « chez l'homme »
	<p>-Vitamine C « Ascorbate ».</p> <p>-Vitamine E « α-tocophérol ».</p> <p>-Minéraux/oligo-éléments (Sélénium, Cuivre, Zinc).</p> <p>-Caroténoïdes (bêta-carotène, lycopène).</p> <p>-Polyphénols (Flavonoïdes, Anthocyanes, Tanins...).</p> <p>-Polyamines/Acides aminés (proline).</p> <p>-Résidus méthionine.</p>	<p>-Protéines de stockage des métaux de transition : transferrine, Ferritine, céruloplasmine, l'albumine, l'haptoglobine, métallothionéines.</p> <p>-Ubiquinone/coenzyme Q10.</p> <p>-Composés à groupement thiol (-SH) « Glutathion ».</p> <p>-Acide urique/Acide lipoïque/Bilirubines.</p>

Matériels et Méthodes

I.MATERIEL VEGETAL

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

I.1.Récolte et préparation

La matière végétale utilisée au cours de notre étude est les pétales de *Crocus sativus L.*, une plante locale qui a été récoltée dans la région d'Ain Fezza, djebel zaafran, Daïra de Tlemcen, Wilaya de Tlemcen en Novembre 2019. Les pétales sont séchés à une température de 30°C dans l'étuve pendant 10 minutes, puis moulues en poudre fine par un moulin de laboratoire. La poudre obtenue a été conservée dans des flacons et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation. (Figure 14)



Figure14 : Les pétales de safran sous forme séchées et broyées.

II. Méthodes

II.1.Extraction solide-liquide

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

II.2.Préparation des extraits

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

II.2.1.Macération

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

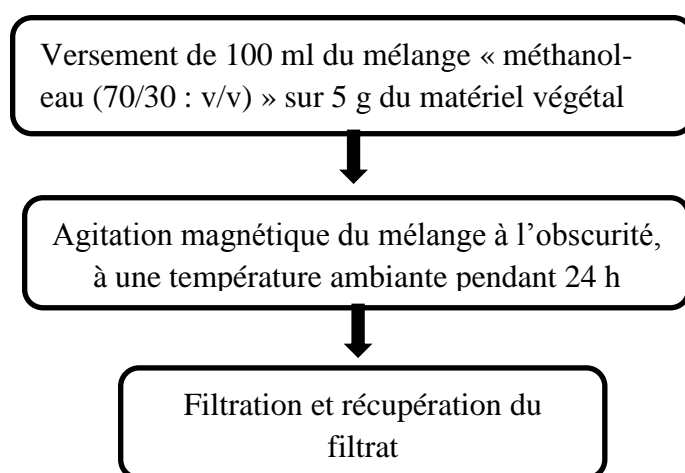


Figure15: Schéma d'extraction par macération

II.2.2.Décoction

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

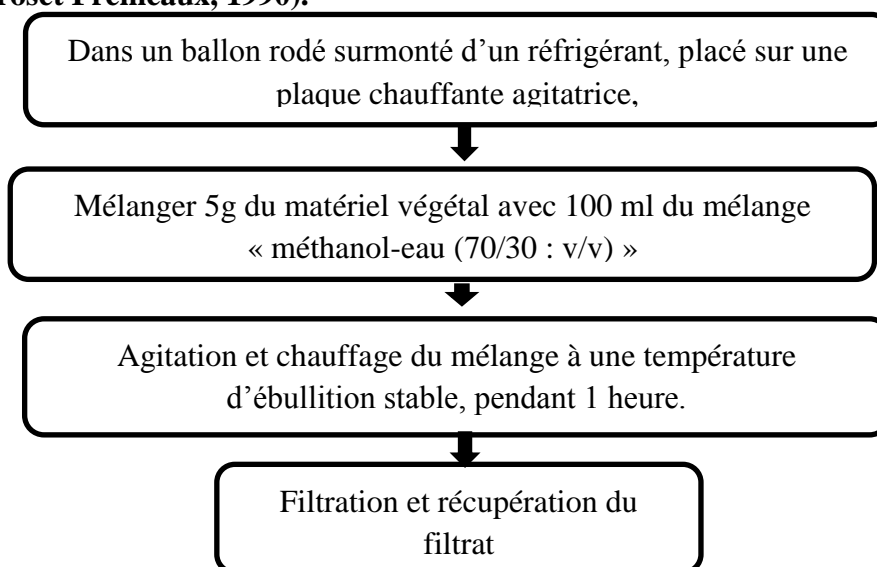


Figure16: Schéma d'extraction par décoction

II.2.3. Infusion

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

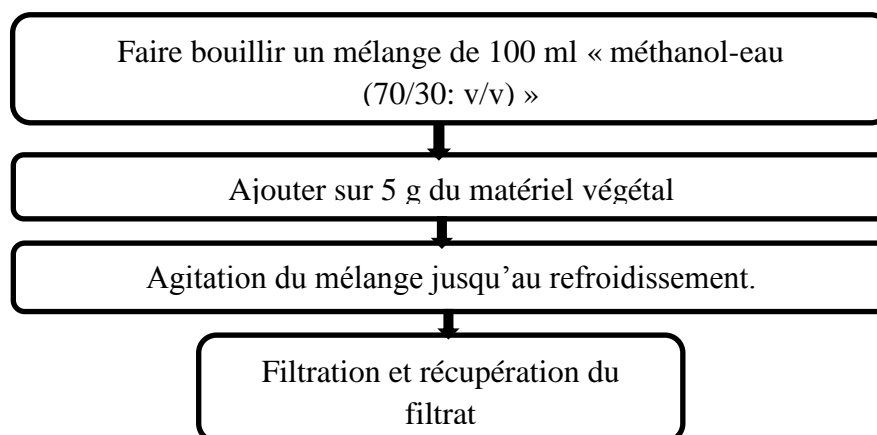


Figure17: Schéma d'extraction par l'infusion.

II.2.4. Ultrason

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

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

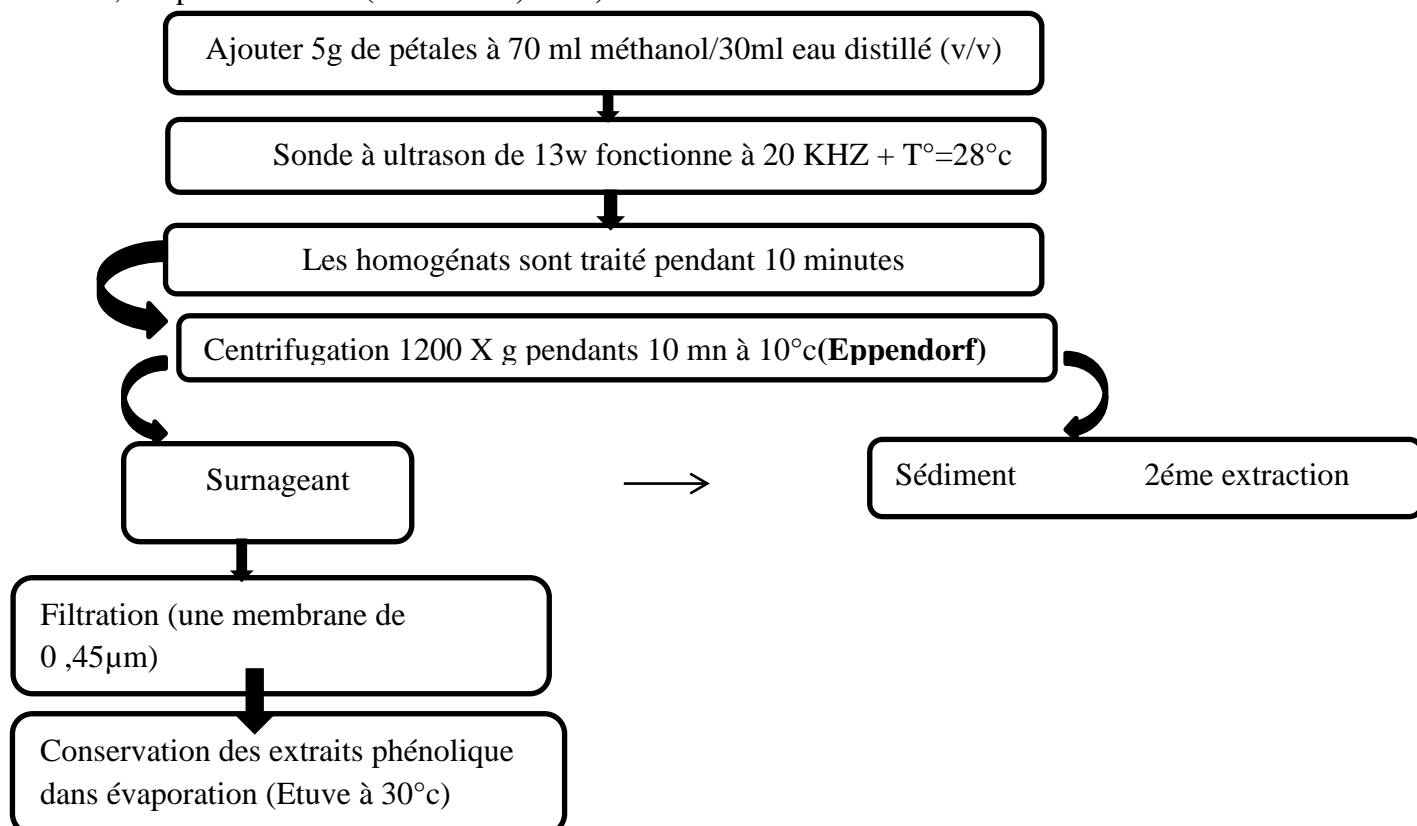


Figure18: Schéma d'extraction par l'ultrason.



Figure19 : L'appareil utilisé pour la sonication

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

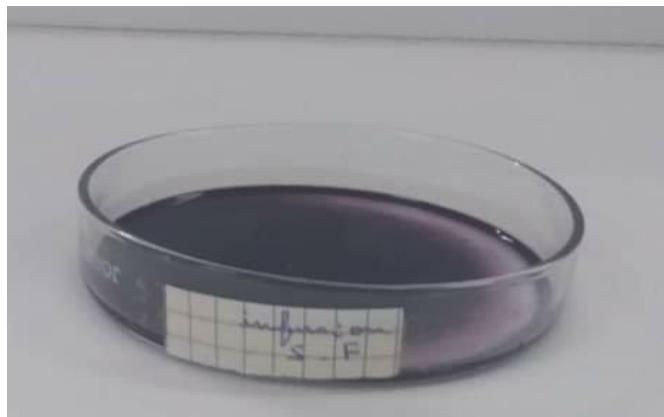


Figure 20: Extraits de pétales de safran après évaporation.

II.3.calcul du rendement des extraits

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

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

- R(%) : rendement en pourcentage.
- M : masse en gramme de l'extrait sec résultant.
- M₀ : masse en gramme du matériel végétal de départ.

III.Etude in vitro

III.1. Isolement des lymphocytes humains

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin d'hommes volontaires, par centrifugation dans un gradient d'Histopaque (Sigma). L'histopaque, dont la densité est de

1,075 permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle d'histopaque (**Tableau 6**) se trouvent à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes..). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée.

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % et 50µl de milieu

RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée «Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10^6 cellules/ml.

III.2. Préparation des solutions mères des extraits

Les extraits du safran sont solubilisés dans un solvant organique le DMSO (diméthyl sulfoxyde) à 1% pour obtenir une solution mère de 10mM. Par la suite, des solutions de concentrations différentes [1µM/1-10µM/1-25µM/1 -50µM/1-100µM/1] sont préparées à partir de la solution mère avec un volume final de 1 ml dans le milieu RPMI 1640. Ces solutions sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins 12 heures avant l'utilisation, pour assurer une bonne solubilisation des extraits du safran.

Tableau 6: Taille et densité des cellules sanguine

	Taille (μM)	Densité	Vitesse de sédimentation
Globules rouges	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.098-1.105)	+
Éosinophiles	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	
Neutrophiles	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
Basophiles	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
Monocytes	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
Lymphocytes	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
Plaquettes	2-3	1.040	-

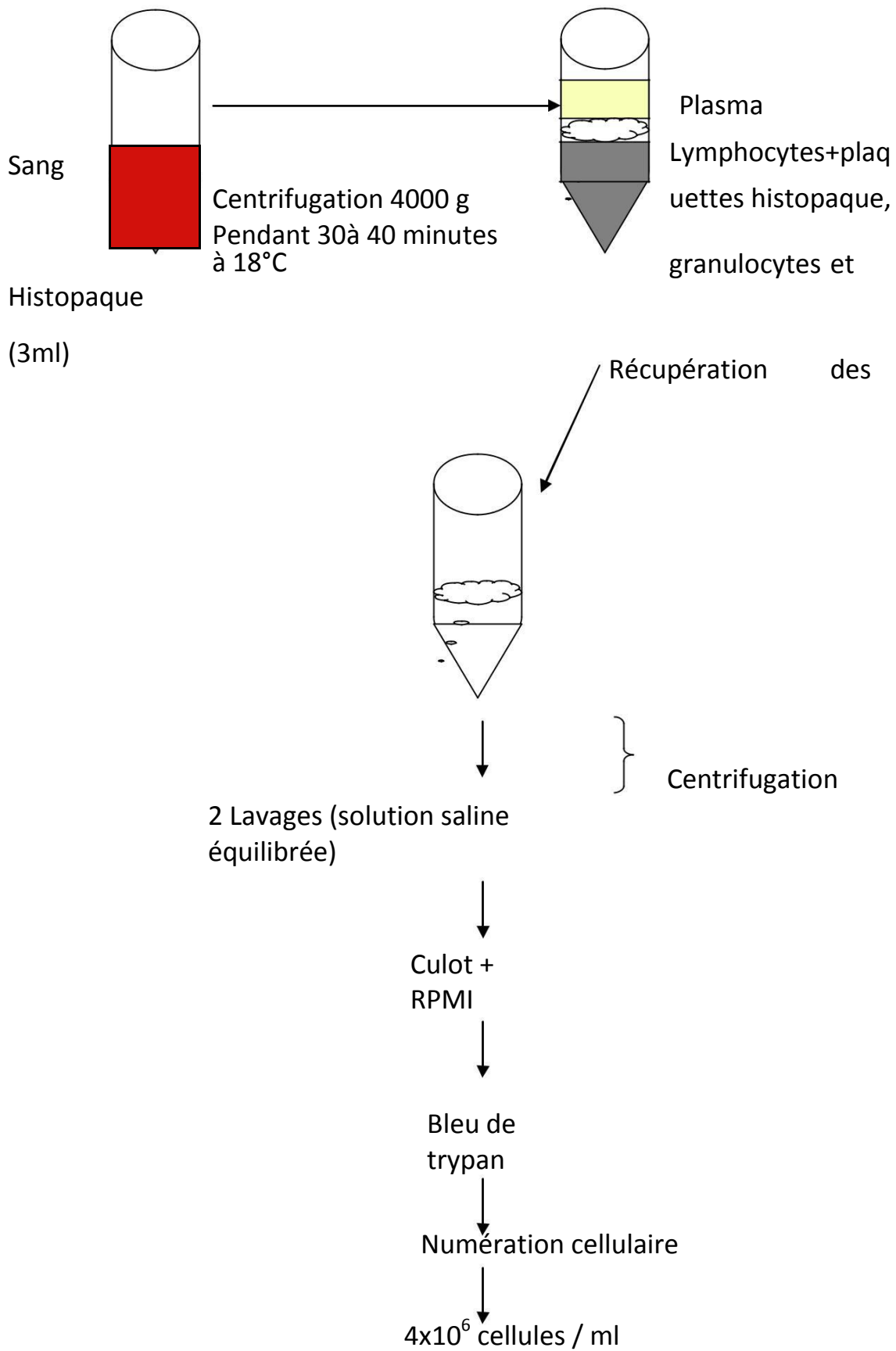


Figure 21: Méthode d'isolement et purification des lymphocytes

III.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Le TTL permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavalline A (Con A, Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 (µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml).

Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets des extraits de pétale de safran sur la prolifération in vitro des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence des quatre extraits de pétale de safran à différentes concentrations finales [0µM/1-1µM/1-10µM/1-25 µM/1 -50 µM/1 -100 µM/1].

Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, 5% de CO₂.

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez) confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] et le dosage des protéines.

III.3.1. Comptage des lymphocytes

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

III.3.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée).

La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN (**Mosmann, 1983**).

La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière.

Après isolement des lymphocytes, une suspension cellulaire de 2×10^6 cellules/ml sert à la préparation de la gamme étalon suite à différentes dilutions.

100µL de suspension cellulaire de la gamme étalon ou des différentes incubations (puits) sont incubés en présence de 10µL de MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5% CO₂ pendant 3 heures. L'addition de 100 µL de HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. La courbe étalon permet d'obtenir directement le nombre de cellules/ml. L'indice de prolifération (IP) est aussi calculé :

IP= (densité optique des cellules stimulées/ densité optique des cellules non stimulées) ×100
(Moussa *et al.*, 2000).

NB : Cellules stimulées: cellules prélevées des puits après les incubations.

Cellules non stimulées: cellules provenant de la suspension cellulaire initiale avant incubation.

III.4. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes

III.4.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes en présence des différents extraits de pétale de safran

Le taux de Glutathion (GSH) est mesuré par méthode colorimétrique suivant le protocole du Kit Bioxytech GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). Les lymphocytes sont suspendus dans l'acide métaphosphorique (5%, P/V). Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, le surnageant est mélangé au tampon phosphate de potassium contenant l'acide diethylene triamine, Penta-acétique et le lubrol (pH 7,8). Le chromogène est par la suite ajouté dans le milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 25°c pendant 10min à l'abri de la lumière.

III.4.2. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes en présence des différents extraits de pétale de safran (CAT, EC 1.11.1.6)

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps. Après incubation, les concentrations du H₂O₂ restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H₂O₂. La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité/ ml ou en Unité/mg de protéine.

III.4.3. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes en présence des différents extraits de pétale de safran (Méthode de Levine et al., 1990)

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées dans le lysat lymphocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine. La réaction aboutit à la formation de la dinitrophényl hydrazone colorée. La concentration des groupements carbonylés est déterminée par lecture à des longueurs d'onde de 350 et 375 nm.

VI. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Stat soft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Student.

Résultats et interprétation

I.1. Effets de l'extrait d'ultrason de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure22)

La prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran est significativement variable puisque l'indice de prolifération (IP) est différent selon les incubations.

On obtient une réduction de la prolifération cellulaire par l'extrait d'ultra cent de pétale de safran aux concentrations de 1 μM /l et 10 μM /l d'une manière dose dépendante.

En présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran à des concentrations entre 25 μM /l et 50 μM /l les proliférations lymphocytaires sont stimulées puisque les IP sont significativement augmentés comparés à la prolifération basale.

Par contre, La prolifération cellulaire est réduite par l'extrait d'ultra cent de pétale de safran aux concentrations de 100 μM /l.

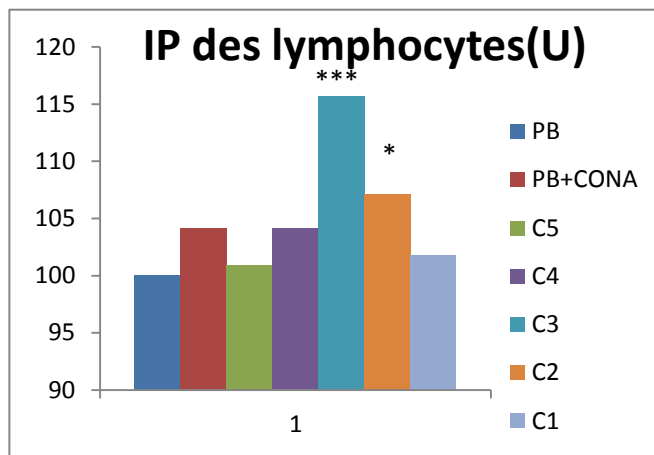


Figure 22 : Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'ultrason

I.2. Effets de l'extrait de macération de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure23)

La prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de macération de pétale de safran est significativement variable puisque l'indice de prolifération (IP) est différent selon les incubations

La prolifération cellulaire est significativement augmentée en présence de l'extrait de macération à la concentration de 1 μM /l comparés à la prolifération basale.

Cependant, la prolifération des lymphocytes T est réduite par l'extrait de macération de pétale de safran aux concentrations 10 μM /l comparés à la prolifération basale.

En présence de cet extrait aux concentrations entre 25-50 μM /l, la prolifération lymphocytaire ne varie pas.

En revanche, à la concentration de 100 μM /l de cet extrait la prolifération est stimulée d'une manière très significative.

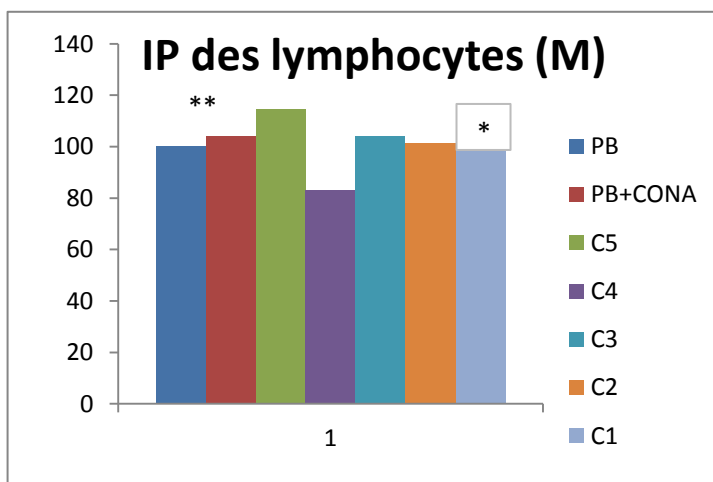


Figure 23 : Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de macération

I.3. Effets de l'extrait d'infusion de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure 24)

La prolifération basale des lymphocytes est significativement variable en présence l'extrait d'infusion de pétale de safran puisque l'indice de prolifération (IP) est différent selon les incubations.

La prolifération cellulaire en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran à la concentration 1 $\mu\text{M/l}$ augmente significativement comparés à la prolifération basale.

La prolifération lymphocytaire diminue significativement à la concentration de l'extrait d'infusion à partir de 10 $\mu\text{M/l}$ comparés à la prolifération basale.

Cependant, à la concentration de 25 $\mu\text{M/l}$ jusqu'au 100 $\mu\text{M/l}$ la prolifération cellulaire augmente significativement et d'une manière dose dépendante.

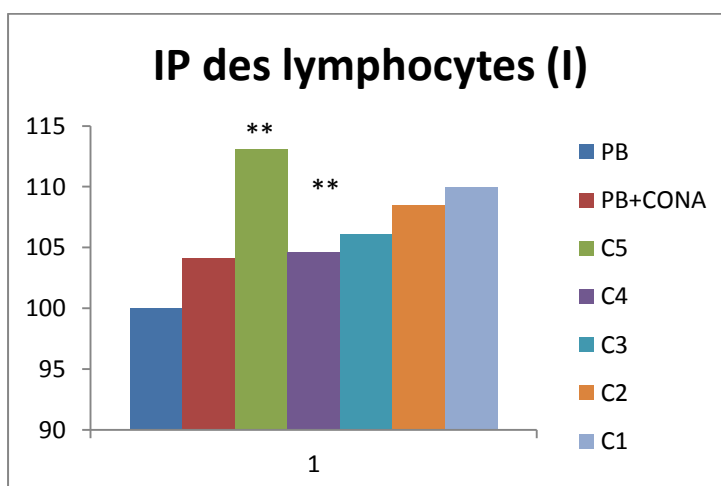


Figure 24 : Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'infusion

I.4. Effets de l'extrait de décoction de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure 25)

La prolifération basale des lymphocytes est significativement variable en présence l'extrait de décoction de pétale de safran puisque l'indice de prolifération (IP) est différent selon les incubations.

On a une réduction de la prolifération cellulaire par l'extrait de décoction de pétale de safran à partir de la concentration de 1 μM /l jusqu'au 100 μM /l comparé à la prolifération basale.

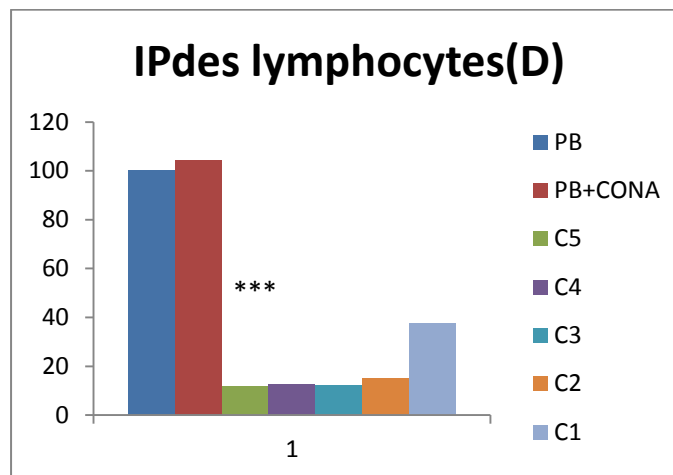


Figure 25 : Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de décoction

II.1. Statut oxydant des lymphocytes humains traités par les extraits de pétale de safran

II.1.1. Effets de l'extrait d'ultrason de pétale de safran sur les teneurs en Malondialdéhydes des lymphocytes (Figure 26)

Les teneurs en malondialdéhydes sont significativement augmentés en présence de 10 μM /l de l'extrait d'ultrason de pétale de safran dans la culture lymphocytaire comparés à la prolifération basale.

Cependant, les teneurs en MDA au niveau lymphocytaires ont diminué significativement en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran entre 25 μM /l et 50 μM /l d'une manière dose dépendante.

Par ailleurs, aucune variation n'a été observée au niveau des teneurs lymphocytaires en MDA en présence de 100 μM /l de l'extrait des ultrasons.

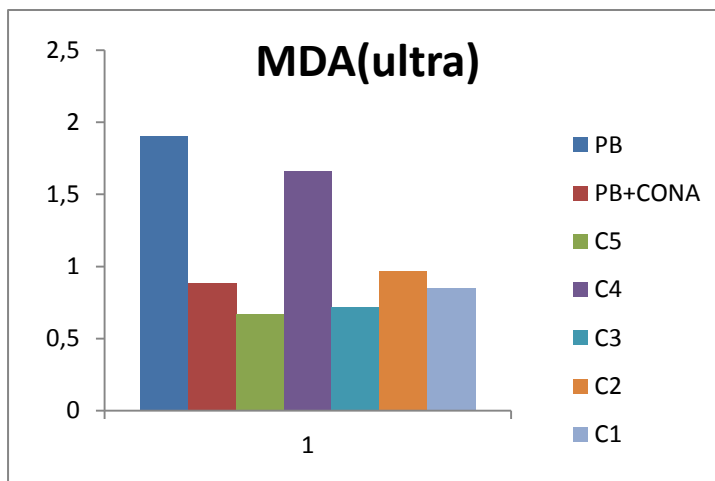


Figure 26: Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran

II.1.2. Effets de l'extrait de macération de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure 27)

L'extrait de macération de pétale de safran ne présente aucune variation des teneurs cellulaires en MDA, quel que soit la concentration utilisée.

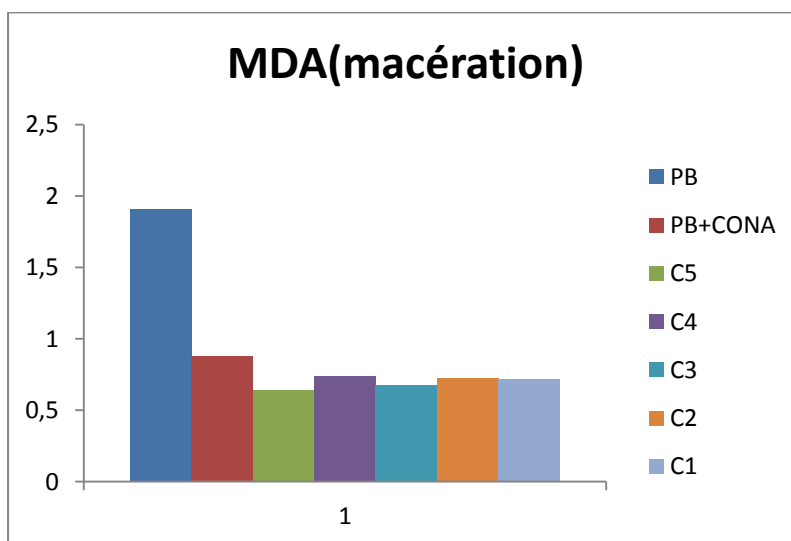


Figure 27 : Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de macération de pétale de safran

II.1.3. Effets de l'extrait d'infusion de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure 28)

L'extrait d'infusion de pétale de safran ne présente aucune variation des teneurs cellulaires en MDA, quel que soit la concentration utilisée.

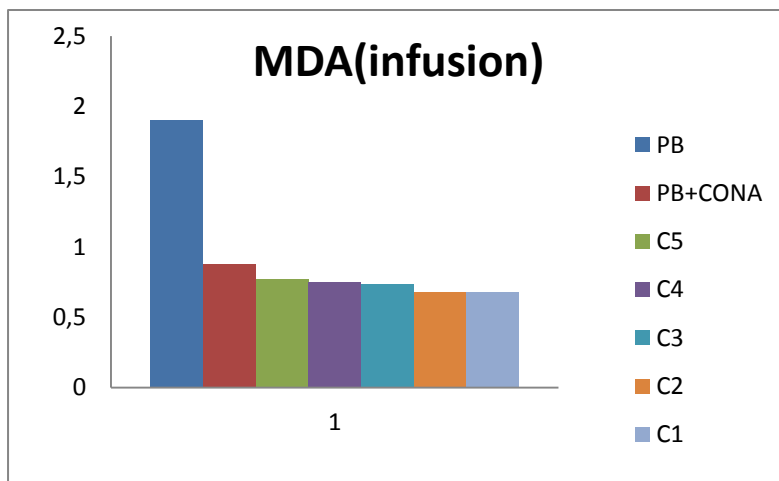


Figure 28 : Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran

II.1.4. Effets de l'extrait de décoction de pétale de safran sur la prolifération des lymphocytes (Figure 29)

Les teneurs en malondialdéhydes sont significativement diminuées au niveau des lymphocytes traités par les concentrations entre (1-50 $\mu\text{M/l}$) de l'extrait de décoction de pétale de safran.

Par contre à la concentration la plus élevée 100 $\mu\text{M/l}$ les teneurs en malondialdéhydes lymphocytaires présente une augmentation significative comparées à la prolifération basale.

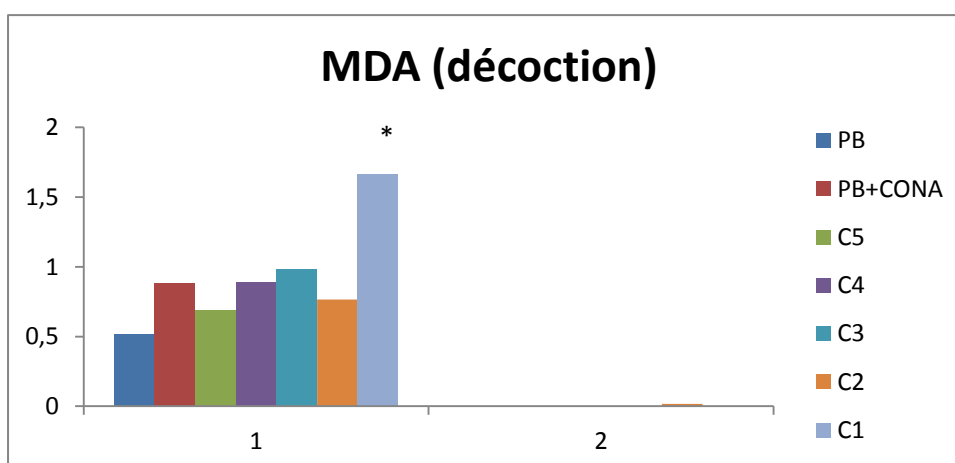


Figure 29 : Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de décoction de pétale de safran.

II.2.1. Effets de l'extrait d'ultrason de pétale de safran sur les teneurs en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes (Figure 30)

Les teneurs lymphocytaires en PCAR sont significativement élevées à 1 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait d'ultrason de pétale de safran. Par contre, les teneurs cellulaires en PCAR ont diminués à 10 $\mu\text{M/l}$ comparées à la prolifération basale.

Nos résultats montrent que l'extrait d'ultrason de pétale de safran entre 25 $\mu\text{M/l}$ et 50 $\mu\text{M/L}$ augmente les teneurs lymphocytaires en PCAR qui ont tendance à diminuer très significativement avec l'extrait d'ultrason de pétale de safran à 100 $\mu\text{M/l}$.

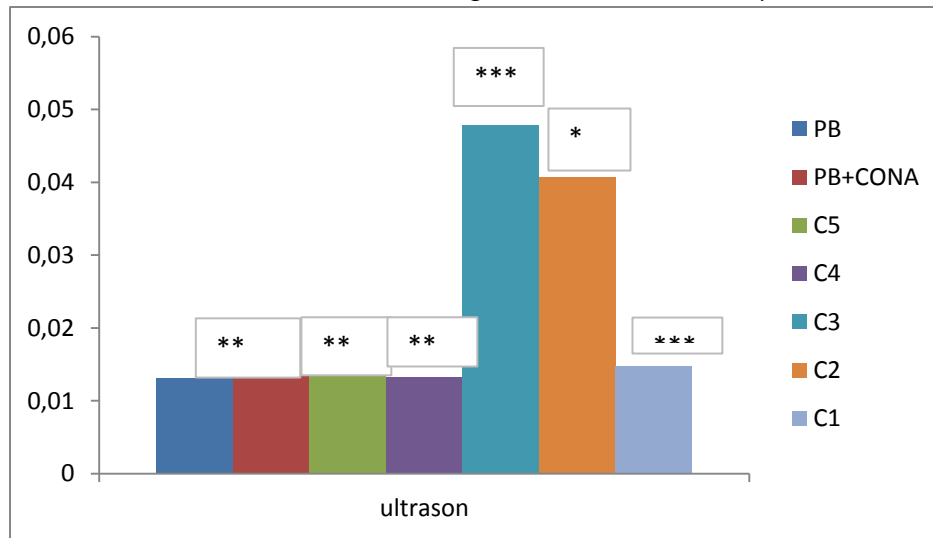


Figure 30 : Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'ultrason

II.2.2.Effets de l'extrait de macération de pétale de safran sur les teneurs en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes (Figure 31)

Les teneurs lymphocytaires en PCAR sont significativement élevées à 1 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait de macération de pétale de safran. Par contre, les teneurs cellulaires en PCAR sont réduites entre (10-25 $\mu\text{M/l}$) comparées à la prolifération basale.

Nos résultats montre que Les teneurs lymphocytaires en PCAR sont significativement élevées à 50 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait de macération de pétale de safran qui ont tendance à diminuer très significativement avec l'extrait de macération de pétale de safran à 100 $\mu\text{M/l}$.

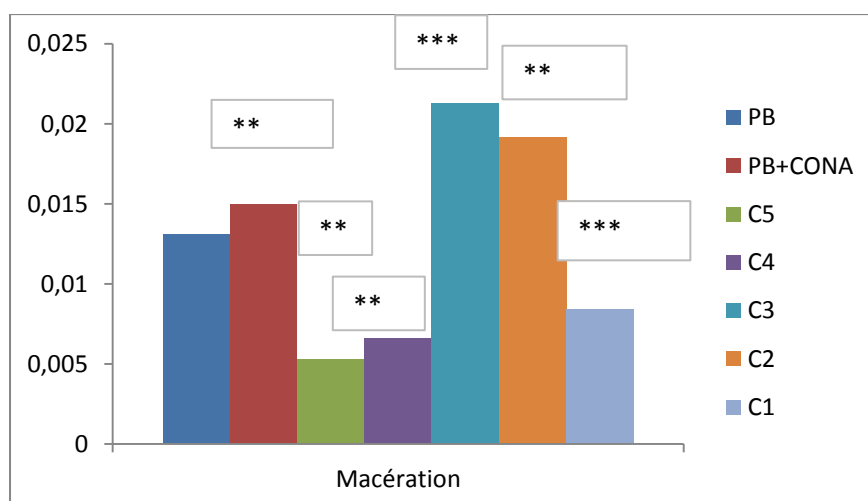


Figure 31 : Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de macération

II.2.3. Effets de l'extrait d'infusion de pétale de safran sur les teneurs en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes (Figure 32)

Nos résultats montrent que l'extrait d'infusion de pétale de safran provoque une augmentation des teneurs cellulaires en PCAR à 1 $\mu\text{M/l}$ et qui diminuent très significativement entre 10 $\mu\text{M/l}$ et 25 $\mu\text{M/l}$.

Nos résultats montrent que les teneurs lymphocytaires en PCAR sont significativement élevées à 50 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait d'infusion de pétale de safran qui ont tendance à diminuer très

significativement avec l'extrait de macération de pétale de safran à 100 $\mu\text{M/l}$.

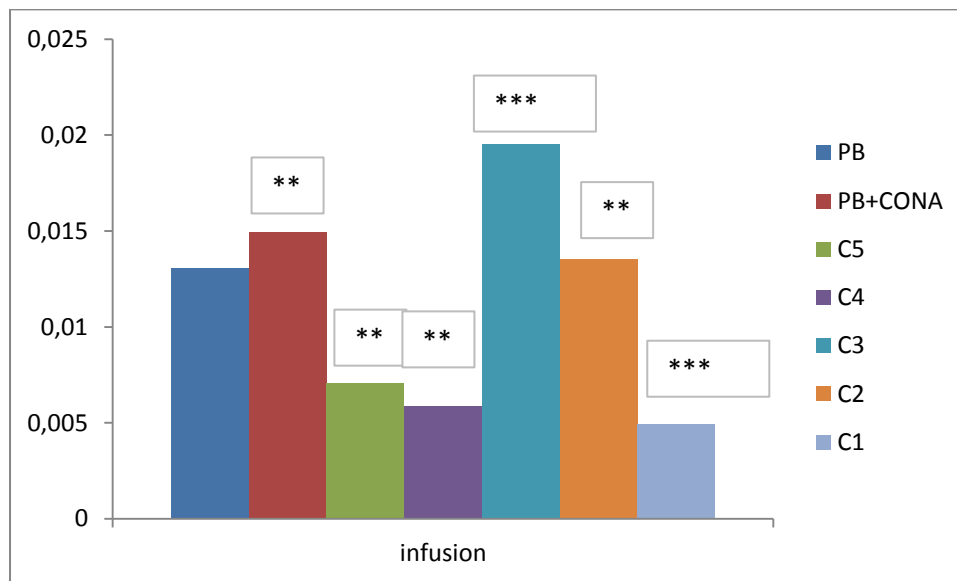


Figure 32: Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'infusion

II.2.4. Effets de l'extrait de décoction de pétale de safran sur les teneurs en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes (Figure 33)

Nos résultats montrent, que les teneurs cellulaires en PCAR sont significativement augmentées en présence de l'extrait de décoction de pétale de safran aux concentrations (1-10 $\mu\text{M/l}$) comparées à la prolifération basale.

Par ailleurs, les teneurs en PCAR sont significativement augmentées entre 25-100 $\mu\text{M/l}$ d'une manière dose dépendante de cet extrait comparés à la prolifération basale.

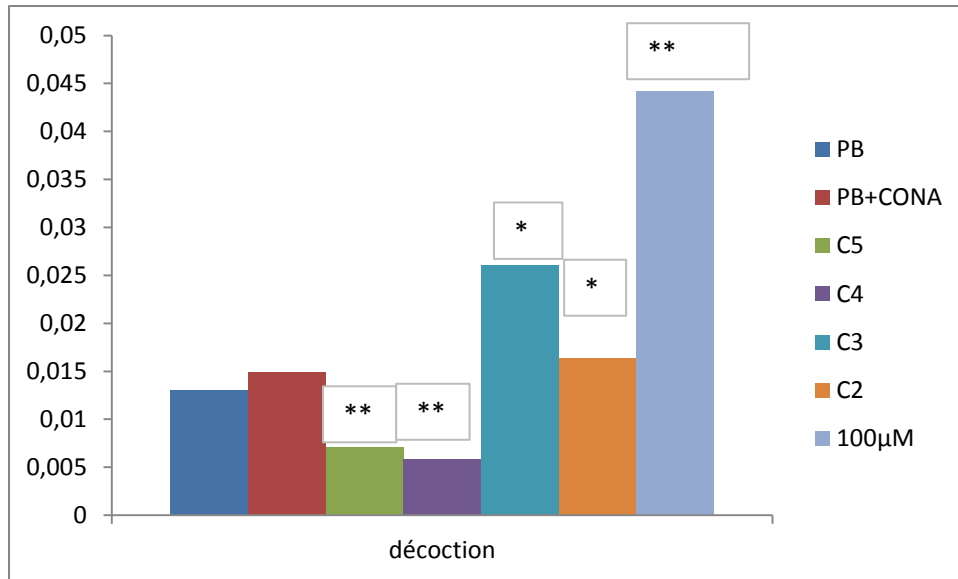


Figure 33 : Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de décoction

III. Statut antioxydant des lymphocytes humains traités par les extraits de pétale de safran

III.1.1.Effets de l'extrait d'ultrason de pétale de safran sur les teneurs en GSH des lymphocytaires (Figure 34)

Les teneurs lymphocytaires en GSH augmentent significativement en présence de l'agent mitogène (Con A) comparées à la prolifération basale.

Les teneurs lymphocytaires en GSH ne varient pas en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran entre 1-50µM/l comparés à la prolifération basale.

Nos résultats montrent qu'en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran à 100µM/l les teneurs érythrocytaires en GSH lymphocytaires augmentent significativement comparées à la prolifération basale.

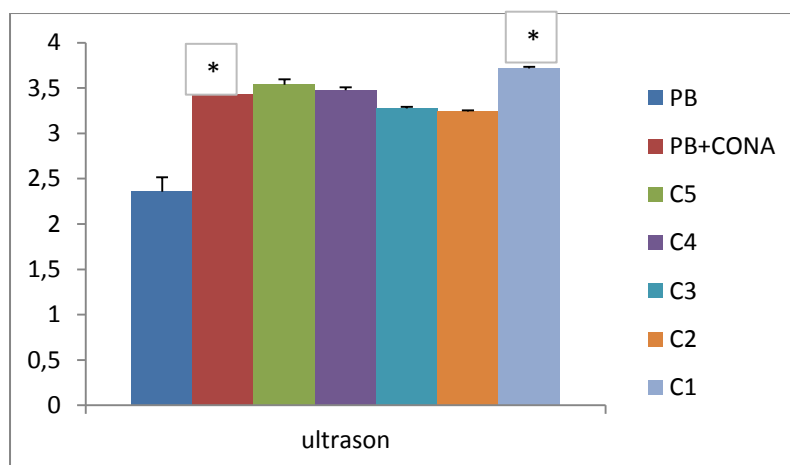


Figure 34 : Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'ultrason

III.1.2.Effets de l'extrait de macération de pétale de safran sur les teneurs en GSH des lymphocytaires (figure 35)

Les teneurs lymphocytaires en présence de différentes concentrations (1-100 $\mu\text{M/l}$) de l'extrait de macération de pétale de safran diminuent significativement comparés aux proliférations basales.

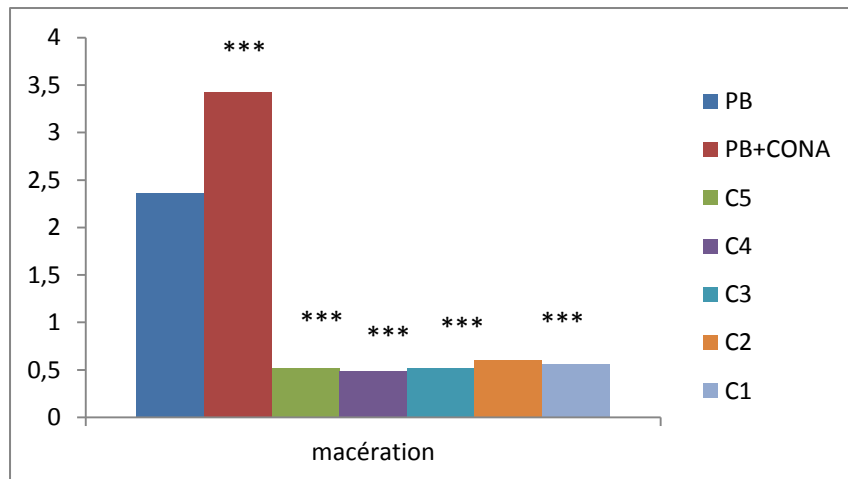


Figure 35: Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de macération

III.1.3.Effets de l'extrait d'infusion de pétale de safran sur les teneurs en GSH des lymphocytaires (Figure 36)

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran aux différentes concentrations (1-100 $\mu\text{M/l}$) diminuent significativement comparés aux proliférations basales.

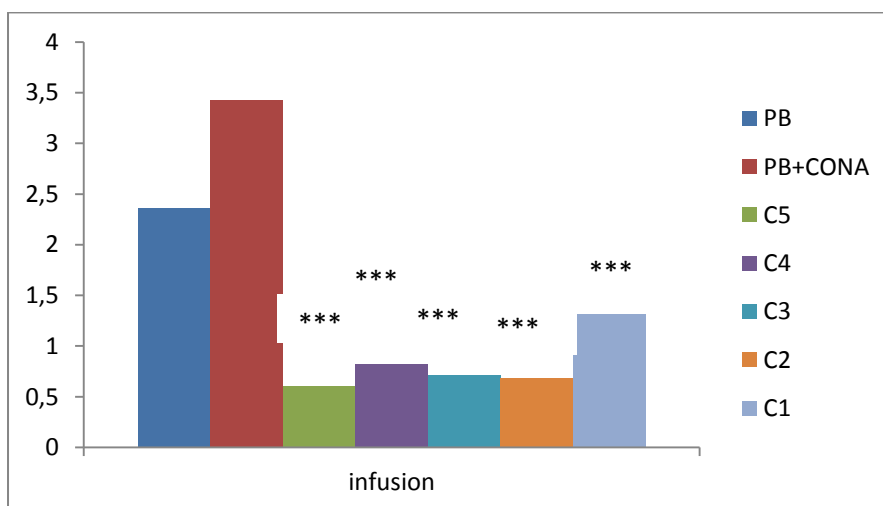


Figure 36 : Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'infusion

III.1.4.Effets de l'extrait de décoction de pétale de safran sur les teneurs en GSH des lymphocytaires (Figure 37).

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait décoction de pétale de safran aux différentes concentrations (1-100µM/l) diminuent significativement comparés aux proliférations basales.

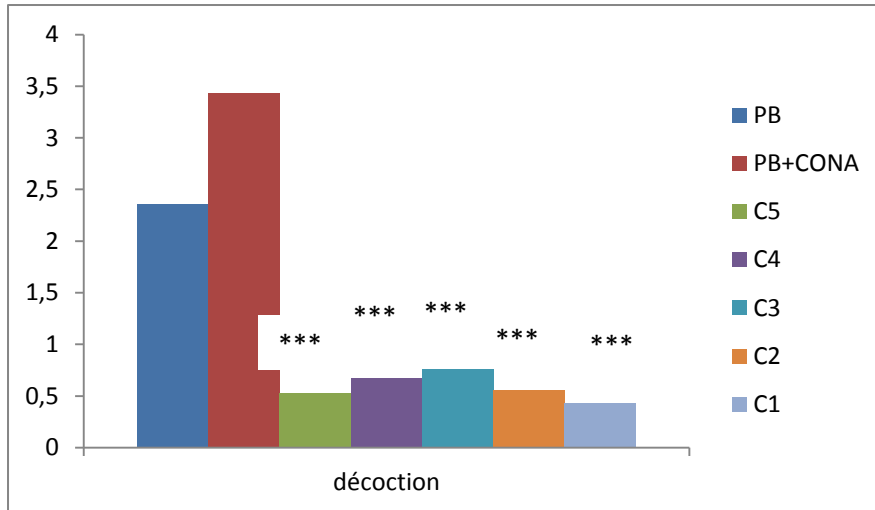


Figure 37 : Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de décoction

III.2.1.Effets de l'extrait d'ultrason de pétale de safran sur l'activité de la catalase des lymphocytes (Figure 38)

L'activité enzymatique de la catalase au niveau des lymphocytes augmente significativement en présence d'agent stimulant (la Con A) comparée à la prolifération basale.

En revanche, nos résultats montrent une diminution de l'activité du catalase à la plus faible concentration de notre extrait (1 µM/l) ultrason par rapport à la prolifération basale. Cette activité ne présente aucune variation entre 10µM/l et 25µM/l de l'extrait d'ultrason.

Cependant, l'activité de la catalase est diminuée significativement à 50µM/l de l'extrait d'ultrason comparée à la PB, par contre à 100 µM/l de notre extrait l'activité de la catalase ne varie pas.

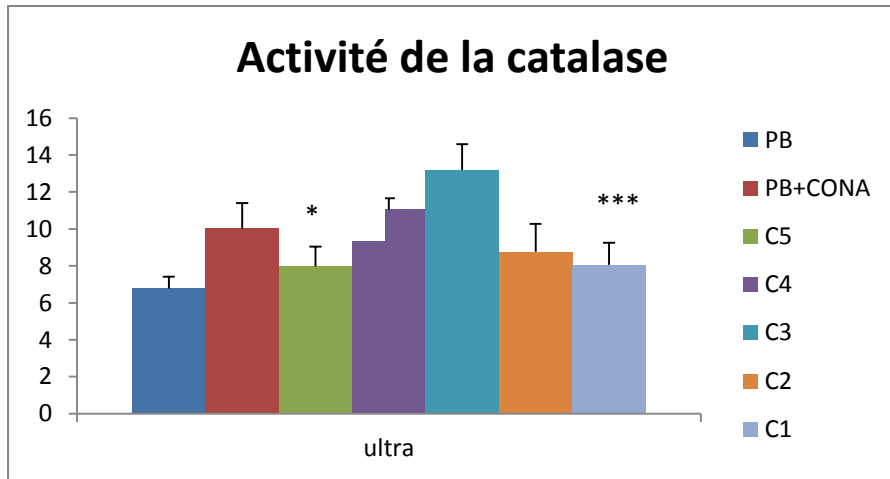


Figure 38 : L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'ultrason

III.2.2.Effets de l'extrait de macération de pétale de safran sur l'activité de la catalase des lymphocytes (Figure 39)

L'activité enzymatique de la catalase au niveau des lymphocytes augmente significativement en présence d'agent stimulant (la ConA) comparée à la prolifération basale.

Nos résultats montrent que l'activité de la catalase au niveau des lymphocytes en présence de l'extrait macération à 1µM/l augmente significativement comparés à la PB et aux lymphocytes avec agent mitogène.

L'activité enzymatique de la catalase au niveau des lymphocytes diminue significativement en présence de l'extrait macération entre 25-100µM/l comparés aux plus faibles concentrations de l'extrait.

L'activité de la catalase en présence de l'extrait macération entre 25-100µM/l reste significativement augmentée comparées à la prolifération basale.

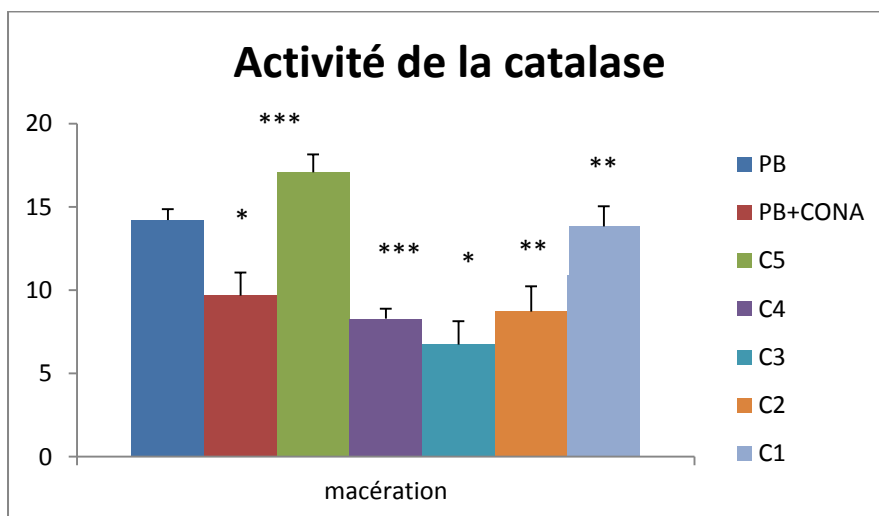


Figure 39: L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de macération

III.2.3.Effets de l'extrait d'infusion de pétale de safran sur CATA des lymphocytes (Figure 40)

L'activité enzymatique de la catalase au niveau des lymphocytes augmente significativement en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran de 1 $\mu\text{M/l}$ à 10 $\mu\text{M/l}$ comparée à la prolifération basale.

La meilleure activité de la catalase était observée à 1 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait d'infusion de pétale de safran.

Cependant, cette activité ne présente aucune variation entre 25 $\mu\text{M/l}$ et 50 $\mu\text{M/l}$ de l'extrait d'infusion de pétale de safran comparés à la prolifération basale.

Par contre l'activité de la catalase lymphocytaire augmente significativement à 100 $\mu\text{M/l}$ comparés à la prolifération

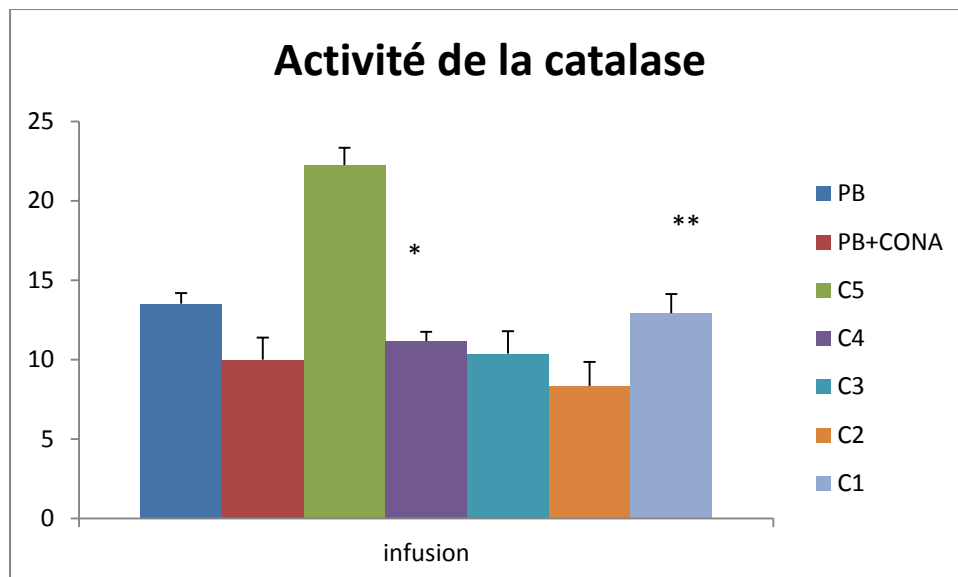


Figure 40 : L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'infusion

III.2.4.Effets de l'extrait de décoction de pétale de safran sur CATA des lymphocytes (Figure 41)

L'activité enzymatique de la catalase au niveau des lymphocytes augmente significativement en présence l'extrait de décoction de pétale de safran à 10 $\mu\text{M/l}$ comparée à la prolifération basale.

Par contre, cette activité ne présente aucune variation en présence des autres concentrations de l'extrait de décoction de pétale de safran prolifération basale.

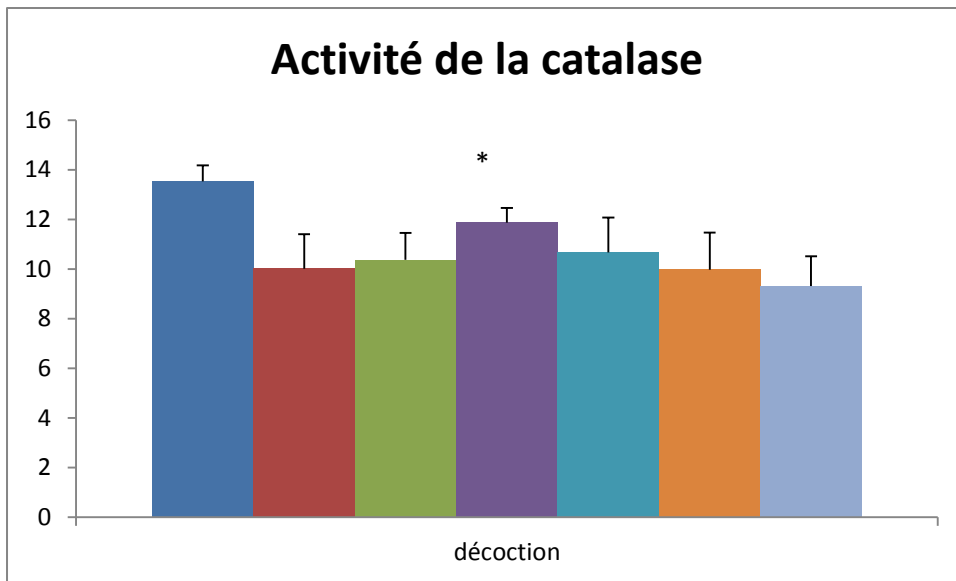


Figure 41 : L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de décoction

Discussion

Depuis l'Antiquité, des vertus thérapeutiques ont été attribuées au safran : antispasmodique, eupeptique, sédatif nerveux et gingival, carminatif, diaphorétique, stomachique, emménagogue et stimulant (**Sampathu et al., 1984**). Trop onéreuse, cette épice a été remplacée par des produits de synthèse. En homéopathie, le safran est toujours prescrit pour soigner les troubles circulatoires, les dysménorrhées ou règles douloureuses chez la femme. Des études récentes ont montrés que le safran aurait un intérêt pharmacologique dans plusieurs domaines : cancérologie, maladie neurodégénérative et rétinopathie (**Abdullaev, 2001**). Le cancer étant la deuxième cause de mortalité dans le monde, l'activité de constituants alimentaires a été évaluée. L'acide ascorbique, l' α -tocophérol, l' α - et β -carotène et la vitamine A ont des activités biologiques reconnues contre cette maladie (Abdullaev et Frenkel, 1992a). De nombreuses études ont démontré que les extraits de safran ont un effet anticarcinogène, (**Salomi et al., 1991**), et antitumoral in vivo et in vitro, (**Abdullaev et Frenkel, 1992b; Tarantilis et al., 1992; Escribano et al., 1996**). Dans les extraits de safran, les caroténoïdes sont les constituants biologiquement actifs. Plusieurs mécanismes ont été proposés (**Abdullaev, 2001**) :

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

La médecine traditionnelle chinoise indique que le safran était utilisé pour soigner des troubles du système nerveux central. Actuellement, des chercheurs japonais, (**Abe et Saito, 2000**), étudient l'effet d'extraits de safran et de ses constituants sur l'apprentissage et la mémoire chez la souris. La crocine est la molécule la plus active. Le safran pourrait être utilisé dans le traitement de maladies neurodégénératives accompagnées de perte de mémoire. Le safran a une activité sur les fonctions sanguines et rétinienne. Les résultats de plusieurs études montrent qu'il pourrait être utilisé afin de soigner les troubles **sanguins (Liakopoulou-Kyriakides et Kyriakidis, 2002)** et oculaires telles que la rétinopathie et la dégénérescence de la macula (**Abdullaev, 2001**). Le safran possède donc de nombreuses activités thérapeutiques. Les chercheurs se basent actuellement sur les vertus attribuées au safran dans l'Antiquité afin de découvrir les molécules actives de cette épice.

Les stigmates ne représentent qu'une très faible partie de la plante et elle reste la partie la plus étudié par les chercheurs. Pourtant, la fleur, la feuille et le bulbe n'ont été que très peu étudiés.

Les extraits aqueux de pétales de crocus possèdent plusieurs activités. Selon Kubo, (**Kubo et Kinst-Hori, 1999**), les composés phénoliques sont les composés biologiquement actifs dans les pétales. Le kaempférol, isolé des pétales de fleurs fraîches permet d'inhiber l'oxydation de la L-3,4-dihydrophénylanine (**L-DOPA**). Son activité provient de sa capacité à chélater le cuivre dans l'enzyme. La tyrosinase catalyse deux réactions de synthèse de la mélanine et est connue comme étant un polyphénol oxydase, ce qui provoque le brunissement des produits alimentaires. Son inhibition aurait une application dans le domaine alimentaire, médical et cosmétique. Li, (**Li Chia-Ying et al., 2004**), a isolé d'autres composés ayant cette même activité dans les pétales : le 4,5-dihydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-énal, le 3-hydroxy-2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohexènylméthanol, le 4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ènone, l'acide protocatéchique et le 7-O-β-D-glucopyranoside kaempférol. Hosseinzadeh, (Hosseinzadeh et Younesi Hani, 2002), a mis en évidence l'activité antinociceptive et anti-inflammatoire des extraits alcoolique et aqueux des pétales chez la souris.

La fleur de crocus étant éphémère, difficile à conserver et présente sur une courte période de l'année, n'a été que très peu caractérisée. L'étude aromatique révèle un intérêt olfactif non négligeable. Seuls les pigments hydrosolubles ont été isolés et certains d'entre eux possèdent une activité biologique. Pourtant, peu d'études ont été menées sur cet organe.

Notre travail de Master porte sur l'effet de quatre extraits de la fleur du safran sur la prolifération des lymphocytes T humains et la modulation du statut oxydant antioxydant.

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants biologiques lorsque la production d'espèces radicalaires pro-oxydantes dépasse la capacité de l'organisme à les éliminer et les détoxifier. Une production excessive de ces espèces radicalaires et/ou une diminution des systèmes de défense anti-radicalaires peuvent avoir des effets délétères (**Biben et al., 2012**).

Nos résultats montrent que les extraits d'ultrason (25µM), macération (1µM et 100µM) et infusion (1µM) de pétale de safran provoque une augmentation significative de la prolifération cellulaire comparé au prolifération basale ces résultats sont en accord avec ceux de (**Reza et al , 2016**) qui ont montré que l'extrait du safranal au concentration de (0.1-0.5-1mM) provoque une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes T. Par contre, la prolifération lymphocytaire diminuée significativement en présence des autres concentrations de ces extraits. Nos résultats corroborent avec ceux de (**Boskabady et al, 2011**) qui ont montré que l'extrait de macération de pétale de safran entre 25 et 50 provoquent une inhibition de la prolifération des cellules sanguines mononucléaires

périphérique et des lymphocytes T avec une inhibition de la sécrétion des cytokines (INF γ et IL10).

Cependant, l'extrait de décoction de pétale de safran provoque une diminution de la prolifération lymphocytaires d'une manière dose dépendante. les travaux de **(Nair et al, 1992)** et de son équipe montrent que la prise du safran encapsulé dans des liposome (0.1-0.2 et 0.4 μ g/ml) par voie orale chez les souris provoque une inhibition de l'activité tumorale du sarcome (S-180), avec une augmentation dans le nombre des lymphocytes comparés aux autres extraits (**safronale 4,8 et 16 μ g/ml**).

Une autre étude menait chez les rats asmathique a montré que l'extrait du safran à la concentration de (100ng/kg) provoque une augmentation du taux des lymphocytes par rapport aux rats asmathiques non traités **(Somayyeh et al, 2013)**.

Les teneurs en protéines carbonylées représentent le marqueur le plus couramment utilisé de l'oxydation des protéines.

Nos résultats montrent que les teneurs lymphocytaires en MDA et en PCAR augmentent significativement en présence de l'extrait d'ultrason (10 μ M/l) de pétale de safran, ces résultats sont en accord avec ceux de **(Alireza,2019)** qui ont donné l'extrait éthanolique de pétale de safran (ethanol/eau 80 :20) aux rats pendant 4 semaines.

Par ailleurs, en présence des extraits d'ultrason, macération, infusion et décoction entre (25-100 μ M/l) les teneurs en MDA et en PCAR diminuent d'une manière dose dépendante.

Concernant les marqueurs de la défense antioxydante, nous avons mesuré le taux de glutathion réduit ; ce marqueur est un réducteur efficace. Il joue un rôle important dans une variété de processus de détoxication. Il neutralise les radicaux hydroxyles, qui sont considérés comme une source importante du stress oxydatif **(PATIL et al., 2008)**.

En ce qui concerne, les teneurs en GSH et l'activité de la catalase au niveau des lymphocytes en contact avec l'extrait d'ultrason de pétale de safran, nos résultats ne montrent aucune variation entre (1-50 μ M/l) avec une augmentation des teneurs en GSH à la plus forte concentration (100 μ M/l) associée à une diminution de l'activité de la catalase. Les lymphocytes à (100 μ M/l) de l'extrait d'ultrason présente un stress oxydatif élevé.

Cependant, Les teneurs lymphocytaires en GSH sont significativement réduites en présence des 3 extraits (Macération, infusion, décoction) en faveur d'un stress oxydatif élevé, ces résultats corroborent avec ceux **(Nair et al, 1992)**.

L'activité de la catalase augmente à la plus faible concentration des 04 extraits (10 μ M/l) et qui a tendance à diminué significativement à partir de 25 μ M/l jusqu'à 100 μ M/l , ce qui peut être expliquer.

Conclusion

Le safran est essentiellement connu pour son stigmate qui possède des propriétés thérapeutiques et colorantes. Néanmoins, les autres parties de la plante et en particulier les fleurs sont couramment ni jetées ni exploitées alors que de nombreuses études montrent leurs richesses en substances bioactives. La culture du safran prend une ampleur considérable en Algérie, d'où notre intérêt à vouloir valoriser les sous-produits de cette plante qui peuvent avoir un intérêt économique important pour notre pays.

Dans ce travail, on s'est intéressé à l'étude des activités biologiques in vitro des extraits de pétales de safran provenant de l'Ouest d'Algérie (Tlemcen) dans le but de contribuer à la valorisation de ces parties considérées comme des déchets de l'agricole .

Avant d'entreprendre cette étude nous avons effectué plusieurs extractions à partir des pétales de *Crocus sativus* en utilisant quatre méthodes : macération, décoction, Infusion et ultrason.

Nos résultats montrent que les extraits d'ultrason à 25µM/l, macération entre 1µM/l et 100µM/l et infusion à 1µM/l de pétale de safran provoquent un effet immuno stimulateur ; et il devient immuno-inhibiteur en présence d'autres concentrations.

Cependant, l'extrait de décoction de pétale de safran provoque une diminution de la prolifération lymphocytaires d'une manière dose dépendante.

En ce qui concerne les teneurs en malandialdéhydes sont augmentées aux concentrations 10 µM/l d'extrait d'ultrason, à 100 µM/l d'extrait de décoction comparées à la prolifération basale, elles sont diminuées aux autres concentrations cependant l'extrait de macération et infusion provoque une diminution des teneurs en MDA d'une manière dose dépendante.

Ensuite les teneurs en protéines carbonylées sont augmentées aux concentrations 1µM/l, 25µM/l, 50µM/l d'extrait d'ultrason 1µM/l , 50 µM/l d'extrait de macération et d'infusion 1µM/l , 10µM/l d'extrait de décoction.

Cependant, les teneurs lymphocytaires en GSH augmentent aux concentrations 100µM/l d'extrait d'ultrason par contre elles varient pas aux autres concentrations et enfin pour l'activité de la catalase augmente aux concentrations 1µM/l, 100µM/l de l'extrait de macération 1µM/l, 10µM/l, 100 µM/l de l'extrait d'infusion et 10µM/l de l'extrait de décoction et provoque une diminution aux autres concentration .

En conclusion, les extraits de pétale de safran (ultrason, macération, infusion, macération) provoquent des effets immunostimulateurs et ou immuno-inhibiteurs d'une manière dose dépendante avec une augmentation de la défense antioxydante en présence de l'extrait de pétale de safran au ultrason.

Dans l'ensemble, notre étude permet de conclure que nos pétales (extrait des ultrasons), ont un effet inhibiteur sur les réactions en chaîne des radicaux libres, les propriétés antioxydantes du safran en confirmant que l'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ses effets bénéfiques mais aussi des complications que peut engendre son utilisation traditionnelle non contrôlée.

En effet, les résultats de ce travail semblent appréciables et encourageants, nous poussant à rechercher la bonne exploitation des fleurs de safran et leur utilisation dans des domaines : médicinale, agroindustriel et cosmétique, au lieu de les jeter comme des déchets.

Nous souhaitons que ce travail ouvre des perspectives pour d'autres études plus approfondies afin de déterminer et purifier les molécules bioactives responsables des activités biologiques contenants dans les fleurs de safran, en montrant leurs mécanismes et leurs mode d'actions.

Références

Bibliographiques

A-

- 1-**Abdelrazag, H. (2013)**. Etude photochimique et activité biologique de la plante *Limonistrum guyonianum* (Doctoral dissertation, Université KasdiMerbah de Ouargla).
- 2-**Alireza R-K, Bibi M R, Elahe T, Abbas T Y, Hossein H (2019)**. Effect of Saffron (*Stigma of Crocus Sativus L.*) Aqueous Extract on Ethanol Toxicity in Rats: A Biochemical, Histopathological and Molecular Study. *J Ethnopharmacol.* 237:286-299.
- 3-**Alonso Daz_Marta G, BetzaT, Dafrera D, LOPEZ Fuster P, Rakitzis K & Al. (2006)**. Livre blanc, Le safran en Europe. Développement de l agriculture:14.9.
- 4-**Ameziane, A. (2006)**. Recherche d effet hémolytique et évaluation de l activitéantioxydante des extraits de la partie aérienne de *Portulacaoleraceae (L.)*. Mémoire de master Biochimie appliquée . Université de Tlemcen
- 5-**Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillón J, Morancho B, Santiago V, López-Rodríguez C (2006)**.Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5.*BiochemPharmacol.* 30;72(11):1597-604.
- 6-**Aucante P.** Le safran_ chronique du potager. A dēs Sud Ed. **2000**, 101P.

B-

- 7-**Badiaga, M. (2011)**. Étude ethnobotanique, photochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.
- 8-**Benavente_garcia o. et Castillo J.(2008)**_Update on use and properties of citrus flavonoids : New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry.* 56(15):6185-6205.
- 9-**BHargava, V.(2011)**. Medicinal uses and pharmacological properties of *crocus sativus* Linn (saffron).*Int J pharma,jpharmaceutical science,* 3(3),22-26.
- 10-**BIRBEN E, SAHINER UM, SACKESEN C, ERZURUM S, KALAYCI O (2012)**. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal.* 5: 9-19.
- 11-**Boskabady MH, Seyedhosseini Tamijani SM, Rafatpanah H, Rezaei A, Alavinejad A (2011)**. The Effect of *Crocus Sativus* Extract on Human Lymphocytes' Cytokines and T Helper 2/T Helper 1 Balance. *Med Food.* 14(12):1538-45.
- 12-**Bruneton, J., (1999)**. **Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales.** 3ème Edition . Tec et Doc (Ed). Paris.

C-

13-**Carmona, M., A. Zalacain and G.L. Alonso.** "The chemical composition of saffron : Color, taste and aroma". (2006): 57-62.

14-**Casamayou A. (2011).** Le safran, l'or rouge des épices. Anagramme Ed, Paris France. Pp39.

15-**Chahine, N. (2014).** Effet protecteur du safran, contre la cardiotoxicité de la doxorubine en condition isochimique.

16-**Cowan m.m. (1999)** - Plant products as antimicrobial agents .Chemical microbiology Review . 12(4): 564-582. **CUSHNIE T.P.T. et LAMB A.J (2005)**- Antimicrobial activity of flavonoids . International Journal of Antimicrobial Agent. 26(5) : 343-256.

17-**Cushine, T.P. ,lanb, A.J (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids.IntAntimicrob Agents 26:343-56.

D-

18-**Deo, D.B.(2003).**"Grocery saffron.The world's most expensive spice ". Crop & Food Research (New Zealand Institute for Crop Food Research)

19-**Devaux S, Polese JM (2001).** Plantes aromatiques et condimentaires. Découverte nature ; Artémis Editions.127pp.

F-

20-**Fatchi et Al, 2003.**

21-**Favier, A,** le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladie et potentiel thérapeutique., **2003**, 108-115.

22-**Favre E .le safran safran-l'anti déprime.** Terre d'Homme Ed-**2008**,177.

23-**Frutos, P., Ervás, G., Giráldez, Dans A, Mantécón. (2004).**Review: Tannins ansRuminantnutrition. Spanish Journal of Agricultural Research, 2(2): 191-202p.

G-

24-**Gadiri N., 2011.** Introduction de la culture du safran (*Crocus Sativus L.*) dans les petites exploitations rurales de M'sara (Khenchela). Atelier sur la recherche -développement rural : Cas du bassin versant de Isser - Sekak(Tlemcen) et des Monts des Aures (M'sara), INRF, Bainem, Alger, 21 Décembre 2011. Communicatio

25-**Griffe, DB (1974).**The agricultural systems of the World. Cambridge: University Press, p-289, ISBN 0 521.9843-2.

26-**Gardès - Albert, M., Abedinzath Z. Jore, D.,** L actualité chimique., **2003**,269-270.

H-

27-**Halwelle &Gutteriadge (1999).**

28-**Hassanpour, S., MaheriSis, N., EsgratKhah, B. (2011).**Plants ans secondary metabolites (Tannins): A Review. International Journal of Forest, Soil ans Erosion (IJFSE), 1(1), 47-53.

29-**Heleno, S. A., Martins, A.,Queiroz , M.J.R., & Ferreira, I.C.(2015).** Bioactivity of phenolic acides: Metabolites versus parent compounds : A review . Food chemistry , 173, 501-513.

30-**Hill, T. (2004).** The contemporay Encyclopedia oh Herbes and spices : Seasonings for the Global KiThen, Wiley, P, 272, ISBN 0-471-214-23-X.

K-

31- **Klendar, J.& Molnar, M. (2015).** Natural anssyntheticcoumarins as potential anticancer agents.Journal of chemical and pharmaceutical Research, 7(7), 1223-1238. Kim et Al.,2004.

L-

32-**Lachaud CM. (2013),** La bible du safranier -Tout savoir sur le corps sativus et sur le safran pp.228.

33-**Lahmadi S., Guesmia H., Zeguerrou R., Maaoui M., Belhamra M., 2013.** La culture du safran (*Crocussativus L.*) en regions arides et semi arides : cas du sud est.Algerien. Journal Algérien des Regions Arides, N° Spécial. 18-27

M-

34-**Macheux , J_ J_ , Fleuriste ,A_ , le Jay _ Allemand, C_ (2005) .** Les composé phenoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaires d'importance économique . PPUR Presses polytechniques .

35-**Mahmoudi . Y_ (1982) .**La thérapeutiques par les plantes communes en Algerie. Blida ,Algerie : Palais de livre .pp . 55_58.

36-**Mcgee , H(2004) .** On food and cooking : the science and lors of Kitchen (HTTP: // books . google.com / books Pie = UTE_88h/=en&id=ix05jazxrzoc) . Sesibner , p.422, IS BNO_684_80001_2.

37-**MelnyKj ., Marccone M ., Wang S** chemical and biological properties of the world's most expensive spice , saffron .Food Research international , **2010**,43(8) 1981_1989.

38-Mémoire spécialité métabolisme secondaire et molécules bioactives , études phytochimique et évaluations des activités anti_oxydantes et anti_bactérienne des especesLavandulesteochasc. Glycyorhizzaglabrat , *Cocus sativus L* et *Linumusitassimum L* _ **2015 _ 2016**

39-**Minotti ,G.andAust SD . (1987) J .BiolChena** 262 ,1098_1104.

40-**Moshini , E ., Basti , A. Noorbala . A. Janishidi ,A Abba-si , S. H.C AKHondzadeh , S. (2006)**. Crocus sativusL . (petal) in the treatment of mild -to-moderate depression : A double _blind , randomized and placebo controlled triql . Photomedicine , 13 (9) ,607_ 611.

N-

41- **Nair S C, Salomi M J, Varghese C D, Panikkar B, Panikkar K R (1992)**. Effect of Saffron on Thymocyte Proliferation, Intracellular Glutathione Levels and Its Antitumor Activity. Biofactors.4(1):51-4.

42-**Nassiri _ aslM .ethosseinzadeh H . , 2009 _Review** of the pharmacological effects of vitisvinifera (grape) and its bioactive compunds . PhytotherapyResearch .

43--**Negbi , M ,(1999)** . Saffron cultivation .in saffron : Gocussativus L . (pp . 1_17) CRC Press

44-**Novelli , GP . , J** .Physiolpharmacol., **1997**, 48,517_527

P-

45-**Patil SB, Kodliwadmth SM (2008)**. Correlation between lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidants in pregnancy induced hypertension. India journal of Clinical Biochemistry. 23(1) : 45-48.

46-**Palomares , C (1888)** . Le safran , précieuse épice ou précieux médicament . Thèse de doctorat . Université de Lorraine Université Mentouri de constantine.

47-**Pincemail, J., Karine, B. , Karine , C., Jean_Olivier , D. (2002)**. Mécanisme physiologique de la defenseAntioxydante .Physiological Action of Antioxydant Defenses. Nutrition clinique et métabolisme .16 (6) : 233_239.

48-**Pitsikas N.(2016)** . Constituents of saffron (Crocussativus L) as potential candidates for the treatment of Anxiety Disorders and schizophrenia .Milecules ,21 (3) ,303.

49-**Plombières , novembre 2013** .

Q-

50-**Quindeau S., Deffieux D., Douat _CarassusC . et Psuysegu L (2011)** Plantpihyphenslechemicalpioperties , biologicalactivities , and synthesis . Angew and te chimie .International Edition .50 (3) :586_621

R-

51-**Rahimi M. (2015)** .chemical and medecinal properties of saffron . Bulletin of environnement ,Pharmacology and life sciences . vol 4 : 69_81

52-**Rubiv_Moraga , A . Castillo-hopez , R, Gomez-Gomez , L, Attazem , D(2009)** Saffron is monomorphie species as revealed by RAPD ISSR and microsatellite analyses . BMC Researchnotes , 2 (2) , 189

S-

53-**Saxena , M., Saxena ,J ., et paradhan . A. (2012)** .Flavonoides and phenolic acids as antioxydants in plants and human health . Int .J .Pharm .Sci .Rev.Res , 16 (2) , 130 , 134 .

54-**Saxena , R. B. (2010)** . Botany ,Tasconomy and cytology of crocus sativus series . AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda) , 31(3), 374.Seur .**2016**

55-**Srivastava etal , 2010**

56-**Sun, V., Wang, S ., Zho, W ., Gwen . H. G ,Homgxun , T ., Lu , J . J. Wang , Y ., chon, X. P. (2016)** .chemical constituents and biological reserch on plants in the genus curcuma . 4 (20) : 9_16 .

57-**Somayyeh V, Mahmoudabady M, Neamati A, Aghababa H (2013)** . Preventive Effects of Hydroalcoholic Extract of Saffron on Hematological Parameters of Experimental Asthmatic Rats. 3(3): 279–287.

R-

58-**Reza F, Mohammad H B, Seyedeh M S T, Houshang R, Seyed A R (2016)**. The Effect of Safranal on Th1/Th2 Cytokine Balance. Iran J Immunol. 13(4):263-273

T-

59-**Teusher et al , 2015**

60-**Tsatsaroni E, Liakopoulou_ kyriakides M and Elepheriadis I. (1998)** comparative stady of deing properties of two yellow natural pigments effect of enzymes and proteins .Dyes pigment 37 , 307_2015

U-

61-**Udenigwe C . C., RamprasathV.R ,Aluko R. E . et Jones P .J. H . 2008** _ Potential of reservatrol in anticancer and anti_inflamatory therapy .Nutrition reviews .66 (8) 445 _ 454.

62-**Urrat , : le saffron du GatinaisPithureis . 1913, 45P**

V-

63-**Vania ,M ., nakajima, G ., abriela , as julianaalves , m. (2014)** . Citrus bioactive phenolic : role in the obesity treatment volume 59(2) .

W-

64-**Willard , P (2001)** . Secret of saffron :the vagabond , Life of the World's Most seductivespice . Beacon Pres .P 3, ISBNO_8070_5008_3

X-

65-**XIA E . Q., Deng G. F., GUO Y. J. et LIHB ., 2011**_ Biological activities of pslyphenols from grapes . International journal of Moleculqr Sciences . 11 (2) : 622 _ 646.

Y-

66-**Yarnell , E . (2007)** .Plant chemistry in veterinary medicine :Medicinal constituents and their mechanisms of action . In :Veterinary herbal medicine , ed . Mosby Elsevier , St louis ,p. 159_182 .

Webologie

1-Jardinage .le monde.fr/dossier-2160-safran-recolte.conservation-utilisation.html

2-rustica.fr/fleurs/recolter-conserver-safran.1889.html

3-fr.slideshare.net

4-new-medical.net

5-www.futura.sciences.com

Annexe

•Lecteur de Microplaque	Plaques ELISA
•Agitateur électromagnétique•tube avec héparine	•Mortier en porcelaine
•Balance de précision	•Agitateur électromagnétique
•Micropipettes.	•Lecteur de Microplaque
Spectrophotomètre	•Eprouvettes
•Eppendorfs.	•Spatules.
•tube avec héparine	•Béchers.
•Réfrigérateur.	•Tubes à essais.
•Erlenmeyers.	•Etuve
•Entonnoirs.	•Incubateur
•Tubes à essais.	

Produits chimiques et organiques :

Bleu de trypan ($C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$)	Treptomycine $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$
DMSO C_2H_6OS	Phosphate de potassium KH_2PO_4
Con A (concanavaleine A)	
Tampon HEPES $C_8H_{18}N_2O_4S$	
Serum de veau fœtal	
L-Glutamine $C_5H_{10}N_2O_3$	
2-mercaptoethanol C_2H_6OS	
Pénicilline $C_{10}H_{13}N_2O_4S - R$	

Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'ultrason

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
IP	100	104.1	100.93	104.1	115.69	107.09	101.78
Ecartype	0.44	0.84	0.75	0.79	0.96	1.34	1.2

Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de macération

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
IP	100	104.1	114.59	82.25	104.5	101.43	110.38
Ecartype	4.43	8.48	1.71	6.21	0.87	1.76	1.61

Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait d'infusion

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
IP	100	104.10	113.79	104.63	106.06	108.47	109.98
	0.44	0.84	1.24	1	0.8	0.8	1.39

Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'extrait de décoction

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
IP	100	104.10	11.51	12.56	12.26	15.14	37.52
Ecartype	4.43	0.84	0.81	0.71	0.64	1.2	6.41

Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
C	1.9	0.88	0.66	1.66	0.71	0.96	0.84
Ecartype	0.23	0.05	0.02	0.16	0.01	0.04	0.03

Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de macération de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
C	1.9	0.88	0.64	0.73	0.67	0.72	0.71
Ecartype	0.23	0.05	0.01	0.01	0.015	0.02	0.02

Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
C	1.9	0.88	0.76	0.75	0.73	0.67	0.68
Ecartype	0.23	0.05	0.02	0.02	0.005	0.02	0.03

Teneurs cellulaires en MDA en présence de l'extrait de décoction de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
C	0.51	0.88	0.68	0.88	0.97	0.76	1.66
Ecartype	0.05	0.05	0.03	0.03	0.04	0.01	0.19

Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'ultrason de pétale de safran

C	PB	ConA	1	10	25	50	100
MoyPCAR	0.013	0.014	0.015	0.013	0.047	0.040	0.014
Ecartype	0.001	0.002	0.002	0.001	0.006	0.003	0.001

Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de macération de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
MoyPCAR	0.013	0.01	0.005	0.006	0.021	0.019	0.008
Ecartype	0.001	0.002	0.002	0.01	0.006	0.003	0.001

Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait d'infusion de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
MoyPCAR	0.013	0.014	0.007	0.005	0.019	0.013	0.004
Ecartype	0.001	0.002	0.002	0.001	0.006	0.003	0.001

Teneurs cellulaires en PCAR en présence de l'extrait de décoction de pétale de safran

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
MoyPCAR	0.013	0.014	0.007	0.005	0.026	0.016	0.044
Ecartype	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'ultrason

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	2.35	3.42	3.53	3.47	3.27	3.24	3.71
Ecartype	0.15	0.03	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de macération

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	2.35	3.42	0.52	0.48	0.51	0.6	0.55
Ecartype	0.15	0.03	0.02	0.08	0.02	0.10	0.05

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait d'infusion

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	2.35	3.42	0.6	0.81	0.71	0.68	1.31
Ecartype	0.15	0.32	0.12	0.17	0.28	0.13	0.18

Les teneurs lymphocytaires en GSH en présence de l'extrait de décoction

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	2.35	3.42	0.53	0.66	0.75	0.55	0.31
Ecartype	0.15	0.32	0.04	0.15	0.38	0.08	0.04

L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'ultrason

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	6.76	10.01	7.96	11.06	13.18	8.77	8.05
Ecartype	0.65	1.38	1.08	0.59	1.4	1.5	1.2

L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de macération

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	6.76	10.01	7.96	11.06	13.18	8.77	8.05
Ecartype	0.62	0.97	5.80	1.51	0.47	2.59	2.17

L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait d'infusion

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	13.53	10.01	22.25	11.17	10.38	8.35	12.93
Ecartype	6.5	1.38	15.53	0.49	1.61	3.16	1.32

L'activité enzymatique de la catalase en présence de l'extrait de décoction

C	PB	Con A	1	10	25	50	100
moy	13.53	10.01	10.37	11.87	10.67	9.97	9.31
Ecartype	6.51	1.38	0.56	1.76	0.72	3.66	2.92