

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

أبو بكر بلقايدجامعة تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMSEN

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الكون و الأرض

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

Département de BIOLOGIE

MÉMOIRE

Présenté par

- *Achour Zoubida*
- *Bouabdallah Nihel*

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Biologie de la Nutrition

Thème

***ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES
POLYSACCHARIDES EXTRAIT DES FEUILLES
DU SAFRAN «Crocus sativus»***

Soutenu le 26/06/2023,

devant le jury composé de :

Présidente Mme Belyagoubi Nabila Professeur Université Aboubekr Belkaid– Tlemcen

Encadreur Mme Loukidi Bouchra Professeur Université Aboubekr Belkaid– Tlemcen

Examineur Mr Belyagoubi Larbi MCA Université Aboubekr Belkaid– Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord ALLAH le tout puissant pour nous avoir donné la volonté, la patience et le courage de réaliser ce Modest travail.

*Nous remercions chaleureusement notre encadreur **Mme Loukidi Bouchra** professeure à la faculté des Sciences Naturelles et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou BakrBelkaid, qui a assuré la réalisation de ce travail sous son excellente direction, qui a guidé judicieusement nos recherches. Nous gardons en mémoire ses qualités d'encadreur, et ses conseils bienveillants. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude.*

*Nous remercions profondément **Mme Belyagoubi Benhamou Nabila** professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à **Mr Belyagoubi Larbi**, Maitre de conférences classe A, à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, membre de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Notre remerciement s'adresse à **Mr Chouari Kamel**, pour son aide pratique.*

Enfin, nous tenons à remercier vivement toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin et directement ou indirectement durant cette aventure.

Dédicace

Je dédie ce travail en signe de reconnaissance :

A mes chers parents qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes chers frères : **Mohammed, Karim**

A ma belle-sœur : **Nor El Houda**

Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A ma chère grand-mère **Zoubida**, qui je souhaite une bonne santé.

A mes chères amies : **Nassima, Saida, Amina, Wafaa, Rihab, Farah, Manel, Wiem**, pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

A mes très chères cousin et cousines

A toute la famille **Achour**

A toute la famille **Betaouaf**

Sans oublier mon binôme **Bouabdallah Nihel** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de se travaille

MERCI

ZOUBIDA

Dédicace

En témoignage de ma reconnaissance et de mon amour, je tiens à dédier cet humble travail

A Mon **cher père**, ce grande homme pour ton soutien, ton affection, à l'amour que tu m'offres quotidiennement et ta bonté exceptionnelle. Tu as toujours été à mes cotes pour m'encourager, tu es mon meilleurs partenaire dans la vie, je te dois ma réussite.

A ma **chère maman**, tu m'as donné la vie, ton affection me couvre, ta bienveillance me Guide et ta présence à mes cotes a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

Mes chers parents quoi que je fasse ou que je dis, je ne saurai point vous remercier comme il se doit. J'implore le tout puissant pour vous accorder une bonne santé et longue vie.

A **mes chers grands - parents** que dieu prolonge leur vie.

A **mon cher frère** et **ma chère sœur** à qui je souhaite longue vie, réussite et que Dieu réalise tous leurs souhaits.

A **mon fiancé** pour se presseuse et ses encouragements.

A tous les membres de famille paternelle et maternelle.

Un grand merci à **ma chère amie, mon binôme** dans ce mémoire de recherche je souhaite Que l'amitié qu'il nous a réuni persiste pour toujours et que nous arriverons à réaliser nos souhaits.

Je vous remercier pour votre aide et votre soutient, et merci d'être présent lorsque j'en avais besoin.

NIHEL

ملخص

الاستخلاص هو خطوة مهمة جداً في استرداد المركبات الحيوية النشطة. تمت مقارنة أربع طرق استخلاص (غليان، غمر، موجات فوق صوتية، وموجات فوق صوتية مع NaOH) وتقييم النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات البوليساكاريدات من أوراق نبات الزعفران (*Crocus sativus L*). تم تحديد العائدات لكل استخلاص على النحو التالي: 18.32٪، 5.54٪، 3.94٪، 2.08٪ للغليان، الموجات فوق الصوتية مع NaOH، الغمر، الموجات فوق الصوتية على التوالي. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة DPPH. أظهرت المستخلصات المحضرة بواسطة طريقة الموجات فوق الصوتية نشاطاً راديكالياً مهماً. تم إجراء النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة انتشار الأفراس على سبع سلالات وتحديد الحد الأدنى لتثبيط النمو والحد الأقصى لتثبيط النمو ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Enterococcus faecalis* بتركيز 125000 ميكروجرام/مل للسلالات الأربعة. لذا، تعتبر أوراق الزعفران مصدرًا طبيعيًا يحتوي على أنشطة حيوية لم تستغل بعد. الكلمات الرئيسية: *Crocus sativus L*، متعدد السكريات، الاستخلاص، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات

Résumé :

L'extraction est une étape très importante dans la récupération des composés bioactifs. Il s'agit de comparer quatre méthodes d'extractions (Reflux, Infusion, Ultrason et Ultrason avec NaOH) et l'évaluation de l'activité antioxydant et de l'activité antimicrobienne des extraits de polysaccharide des feuilles de *Crocus sativus L*(Safran). Les rendements sont déterminés pour extrait : 18,32%, 5.54%, 3.94%,2.08% reflux, ultrason avec NaOH, infusion, ultrason, respectivement. L'activité antioxydant a été déterminée par la méthode DPPH. Les extraits obtenus par la méthode ultrason présente une activité radicalaire importante. L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque sur sept souches, et la détermination de la CMI et CMB contre les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* avec une concentration de 125000µg /mL pour les quatre souches.

Donc, les feuilles du safran constituent une source naturelle qui détient les activités biologiques et qui restent d'être exploiter.

Mot clés : *Crocus sativus L*, polysaccharides, extraction, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Extraction is a very important step in the recovery of bioactive compound. The aim is to compare four methods of extractions (reflux, infusion, ultrasound and ultrasound with NaOH) and the evaluation of the antioxidant activity and antimicrobial activity of polysaccharide extracts of the leaves of *Crocus sativus L*(Saffron). The yields are determined for extract: 18.32%, 5.54%, 3.94%, 2.08% reflux, ultrasound with NaOH, infusion, ultrasound, respectively. Antioxidant activity was determined by the DPPH method. The extracts obtained by the ultrasonic method have an important radical activity. Antimicrobial activity was carried out by the disc diffusion method on seven strains, and the determination of MIC and BMC *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* strains with a concentration of 125000 μ g/mL for all four strains.

So saffron leaves are a natural source that holds the biological activities and that remain to be exploited.

Keywords: *Crocus Sativus L*, polysaccharides,extraction, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Matériels et méthodes.....	7
Echantillon.....	7
1 .Préparation des extraits de polysaccharide <i>C .Sativus</i>.....	7
1.1. Infusion.....	7
1.2. Ultrason.....	8
1.3. Ultrason avec NaOH.....	9
1.4. Reflux.....	9
2. Rendement d'extraction.....	11
3. Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH.....	12
3.1. Principe du teste de DPPH.....	12
3.2. Teste du piégeage du radical libre DPPH.....	12
4. Etude du pouvoir antimicrobien.....	13
4.1. Souches testées.....	13
4.2. Conservation des souches.....	13
4.3. Milieux de culture.....	13
4.4. Préparation de l'inoculum.....	14
4.5. Ensemencement.....	14
4.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne du l'extrait de polysaccharide.....	16
4.7. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB).....	16
Résultats et discussions.....	17
CONCLUSION.....	22
Références bibliographiques.....	23

Liste des abréviations

CMB : Concentrations minimales bactéricides.

CMI : Concentrations minimales inhibitrices.

DPPH : Diphényl-1-picrylhydrazino

EC : Efficient Concentration value

G : Gramme

HCL : L'acide chlorhydrique

NaOH : L'Hydroxyde de sodium

TC : Test de contrôle

TCE : Test de l'échantillon

% : Pourcentage

Liste des tableaux

Tableau 1 : Source des principaux polysaccharides.....	5
Tableau 2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	13
Tableau 3 : Concentrations et masses des extraits de polysaccharides du safran dans les puits.....	16
Tableau 4 : Rendements d'extraction des extraits de polysaccharides obtenus à partir des feuilles du safran à différent mode d'extraction.....	17
Tableau5 : les concentrations Ec50 des tests du DPPH.....	19
Tableau 6 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits bruts des polysaccharides.....	20
Tableau 7 : CMI et CMB des extraits bruts des polysaccharides.....	21

Liste des figures

Figure 1 : Coupe transversale d'une feuille de <i>crocus sativus</i> L.....	2
Figure 2 : Anatomie du <i>crocus sativus</i> L.....	4
Figure 3 : Les feuilles du safran séchées et broyer au niveau du laboratoire.....	7
Figure 4 : L'extraction des polysaccharides avec la technique Ultrason.....	8
Figure 5 : L'extraction des polysaccharides par la technique Reflux.....	10
Figure 6 : Evaporateur rotatif.....	10
Figure 7 Filtration par papier Whatman	10
Figure 8 : Représentation graphique de rendement d'extraction.....	17
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de DPPH de l'extrait obtenue par Reflux.....	18
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de DPPH de l'extrait obtenue par Ultrason.....	19

Introduction

L'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique à travers le monde est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès de la population et cela malgré les progrès de la médecine moderne (OMS, 2008). Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique aux substances, dites actives qu'elles renferment. Pour évaluer l'activité biologique de ces plantes, il est impératif de recourir à des tests biologiques appropriés (Tyihak et al., 2007).

Parmi ces plantes médicinales, il existe le *crocus sativus L* de la famille Iridacée, communément appelé Safran, cultivé en Iran, l'Inde, la Grèce (Zargari, 1990), l'Espagne, Afghanistan, Maroc, tandis que l'Algérie et la Turquie sont de très petits producteurs (Tantry et al., 2017).

Le safran (*Crocus sativus L.*), connu sous le nom d'or rouge ou roi des épices dans le monde, est un ingrédient multifonctionnel et une épice onéreuse, qui est utilisé depuis non seulement comme condiment culinaire, mais aussi comme source de nourriture favorable et colorant, parfums et encres (Belyagoubi et al., 2021)

Le Crocus est la seule espèce qui produit le safran, sa classification comprend (Winterhalter & Straubinger, 2000) :

- **Régne** : Végétale
- **Division**: Spermatophyte
- **Sous-division**: Angiosperme
- **Classe**: Monocotylédone
- **Sous-classe**: Liliidae
- **Ordre**: Liliales
- **Famille**: Iridaceae
- **Genre**: Crocus

Le *C. sativus* est une plante monocotylédone, herbacée, pérenne et vivace qui a une floraison automnale et qui est inexistante à l'état sauvage. C'est une plante rustique, à cause de sa morphologie et de sa physiologie. Elle peut atteindre de 10 à 25 cm de hauteur. Sa fleur de couleur mauve est composée de 6 pétales, de 3 étamines jaunes et d'un pistil se divisant 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 (Winterhalter & Straubinger, 2000). (Figure 2)

A l'automne, chaque corme produit 6 à 10 feuilles verticales, elles apparaissent au moment de la survenue des fleurs ou après la floraison et durent tout l'hiver pour finalement disparaissent

vers la fin du mois d'avril en s'étalant puis en se dessèchent. Ces feuilles vert pale, dressées et étroites (jusqu'à 3mm de large) prennent naissance dans une gaine membraneuse au départ du corne (**Crozet et al., 2012**).

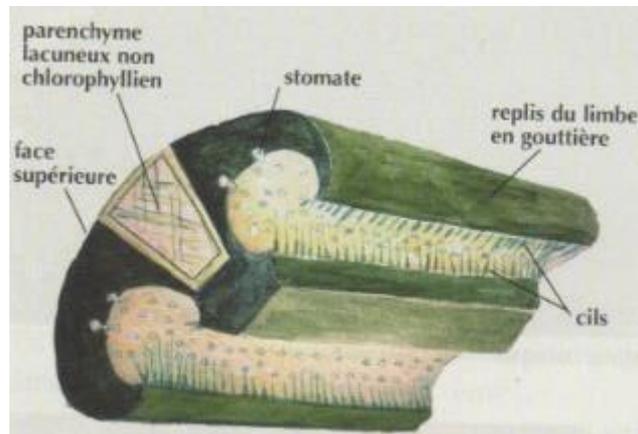


Figure 1 : coupe transversale d'une feuille de *Crocus* (**Arvy et al., 2003**)

Le safran est une plante de jours courts qui peut supporter des conditions climatiques très rudes. Très froid, adapté aux régions aux hivers froids et aux étés chauds et secs ; il peut résister aux températures jours en dessous de -10°C ou au-dessus de $+40^{\circ}\text{C}$ (**Molina et al., 2005**).

La culture du safran s'adapte à une large gamme de sols profonds, bien drainants et riches en matière organique. Le safran peut néanmoins tolérer des sols à teneur relativement élevée en calcaire (parfois supérieures à 20%); une terre argilo-calcaire qui ne retient pas l'eau est idéale. Le safran est indifférent au pH du sol. Il se porte aussi bien dans des sols acides que dans des sols basiques (**Winterhalter & Straubinger, 2000**).

La détermination de la composition chimique du safran est délicate, car elle suppose une identification botanique correcte, des stigmates non adultérés et sans déchets floraux (**Basker, 1999; Moghaddasi, 2010**). Des données moyennes de l'analyse chimique du safran sont indiquées ci-dessous:

- ✓ Glucide (12 à 15%): glucose, fructose, gentibose, xylose et ramnose.
- ✓ Eau (9 à 14%)
- ✓ Cellulose (4 à 7%)
- ✓ Polypeptides (11 à 13 %)
- ✓ Lipides (3 à 8 %): campesterol, stigmastérol et β -sitostérol.
- ✓ Matières minérales (1 à 1.5 %)

- ✓ Vitamines: B2 ou riboflavine (56,4 à 138 µg/g) et B1 ou thiamine (4,0 à 0,9 µg/g).
- ✓ Divers, non azotés (40%)
- ✓ Acides gras: acides palmitique, stéarique, oléique, et linoléique.
- ✓ Caroténoïdes: α , β , et γ -crocétine, crocine (10%), picrocrocine (4%), α et β -carotène, lycopène, phytoène et zéaxanthine.
- ✓ Huiles essentielles (0,3 à 2,0%): où domine le safranal (60%).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires polyphénols biologiquement actifs, etc. (**Boudjouref, 2011**). Les métabolites primaires peuvent également servir de principe particulièrement actifs dans le cas des polysaccharides végétaux largement utilisés dans les plantes pharmacopées traditionnelles (**Brudieux, 2007 ; Warrand, 2004**)

Les principaux actifs biologiques composants du safran sont les crocins, une famille de caroténoïdes solubles dans l'eau de couleur rouge, qui sont tous des glycosides de crocetin. Le safran contient également du picrocrocine et safranal en plus petites quantités. Picrocrocine est la substance principale responsable du goût amer de safran, alors que le safranal produit l'arôme caractéristique du safran. Crocins et les crocétines présentent une activité antioxydant importante (**Botsoglou, 2005**).

Le safran n'a aucune toxicité dans les études animales (LD50 : 20g/kg), non cytotoxique dans les études in vitro (LD50 : 20mg/mL). En revanche, les cormes sont toxiques pour les petits animaux. Chez l'homme, les études de toxicité suggèrent que les paramètres hématologiques et biochimiques étaient dans les limites normales avec l'extrait du safran. Par suite, le safran est considéré comme non toxique même à fortes doses, supérieure à 1,5g par jour. (**Mohamadpour et al., 2013**).

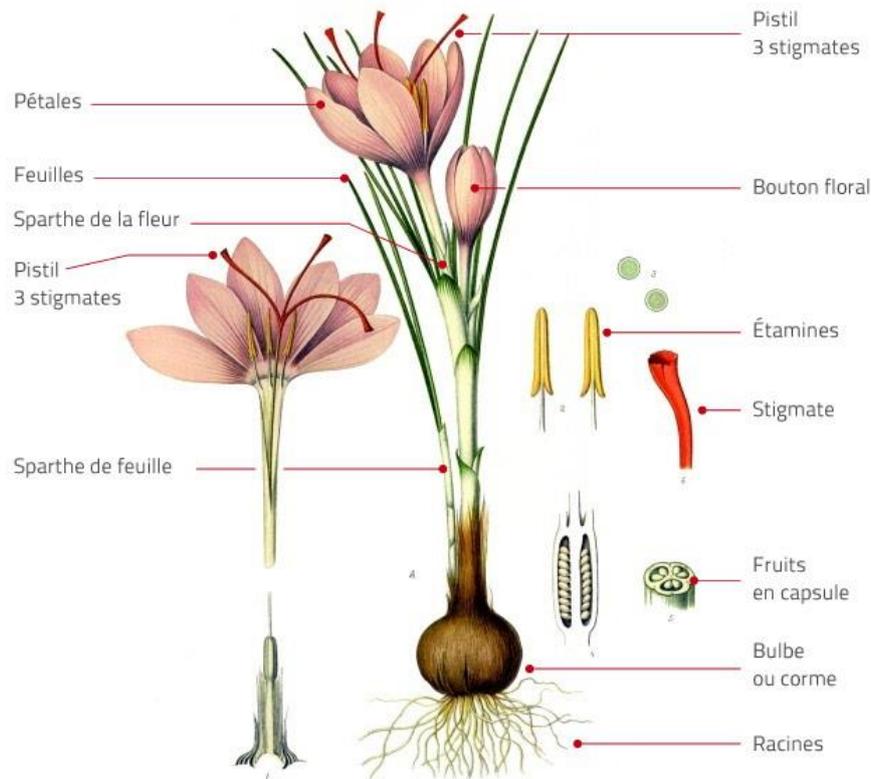


Figure 2: Anatomie du *Crocus sativus L*

Des études d'ethnobotanique et d'ethnopharmacologie ont montré que des extraits végétaux enrichis en polysaccharides ont longtemps été utilisés en phytothérapie, par divers groupes culturels, de par le monde. Plusieurs travaux effectués sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le monde montrent que ces plantes possèdent des activités biologiques telles que celles anticancéreuses et antifongiques et aussi des activités antibactériennes **Angone et al., 2010**).

Les polysaccharides sont des macromolécules, biodégradables d'origine végétale ou microbienne **(Desplanques, 2008)**. Ils forment un groupe diversifié de glucides, ce que les chercheurs ont réévalués l'importance de glucides et envisage leurs nombreuses applications, notamment dans le domaine biomédical, en raison de leur large éventail de propriétés thérapeutiques **(Renaud et al., 2005)**.

Des polysaccharides extraits des feuilles des espèces végétales, possèdent des effets laxatifs. Ils sont utilisés aussi comme lubrifiants, Il est apparaît que les polysaccharides de différentes plantes médicinales peuvent présenter des activités biologiques d'importance exceptionnelle pour l'humanité dans le futur **(Boual, 2014)**. Il existe de nombreuses sources de polysaccharides végétaux. Il se distingue les polysaccharides de réserve (amidon, caroube),

les polysaccharides de structure (cellulose, hémicellulose, pectines), les polysaccharides exsudats (gomme arabique), enfin les mucilages (Warrand, 2004).

Tableau 1 : Source des principaux polysaccharides (Louis, 2004).

Origine des polysaccharides	Polysaccharides
Végétal	Agar, agarose Alginate Amidon Arabinogalactane Arabinoxylane β -glucane Carraghénane Cellulose Galactomannane Glucomannane Pectine Ulvane Xylane (hémicellulose) Xyloglucane

La cellulose est le composant principal des parois cellulaires des plantes et la substance organique la plus abondante sur terre. (RUFF, 2008).

Les polysaccharides de safran sont composés de six monosaccharides à savoir, rhamnose, acide galcturonique et glucose, saccharose galactose, xylose et arabinose (Zhang et al., 2019).

Les polysaccharides présentent des critères intéressants qui suscitent un grand intérêt pour leur application dans des secteurs variés : agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, industrie du papier, du textile et autres (Kouassi, 2017).

De nombreux polysaccharides présentent des activités biologiques, comme activités anti inflammatoires, anticancéreuses, antivirales, antioxydantes (Liu et al ., 2015).

Le safran pourrait être utilisé comme source facilement accessible d'antioxydants naturels, comme additifs alimentaires ou suppléments nutritionnels (**Zhang et al., 2019**).

L'objectif de notre travail, est **l'étude des activités biologiques des polysaccharides extraits des feuilles de safran, *C. sativus* (safran)**.

La 1^{ère} partie, Introduction dans laquelle on a présenté notre objet d'étude qui est *C. sativus*

La 2^{ème} partie, étudie l'activité antioxydant et l'activité antimicrobienne des différents extraits des feuilles du safran réalisés au préalable.

La 3^{ème} partie regroupent les résultats, la discussion, et la conclusion.

MATERIEL ET METHODES

ECHANTILLON

Les feuilles de la plante *C. sativus* (**Figure 3**) ont été récoltées dans la station AIN FEZZA djebel Zaafran, Daira de Tlemcen (safranière Chikhi), wilaya de Tlemcen pendant le mois de novembre 2022. Sécher à une température ambiante dans un endroit sec à l'abri de la lumière diffusé par **Pr Loukidi Bouchra**.



Figure 3 : Feuilles du safran séchées et broyer au niveau du laboratoire (photo originale).

1. PREPARATION DES EXTRAITS DE POLYSACCHARIDE DE *C. sativus*

Il s'agit de 4 différentes méthodes d'extractions ; les extraits obtenus à partir de poudre qui a été préparé selon les procédés classique de préparation d'extrait utilisé en milieu villageois qui est l'infusion, et par reflux, ultrason et ultrason NaOH.

1.1. Infusion

Il s'agit d'une suspension d'un solide dans un liquide chaud ou d'un arrosage d'un solide. Ce liquide sert à dissoudre les ingrédients utiles puis à refroidir le mélange.

Mode opératoire

Un échantillon d'essai de 5 g de poudre de *C. sativus* (feuille) a été placé dans un ballon rempli de 200 ml d'eau distillée bouillante (40°C). Laisser l'ensemble pendant 30 minutes jusqu'à refroidissement. Après filtration sur papier filtre Whatman, le filtra a été concentré sous vide sur un évaporateur rotatif à 50°C. Ensuite, les extraits ont été traités avec de l'éthanol (3 :1 V : V) qui ont été mis en conservation au réfrigérateur à 4 °C pendant 24 h.

Puis on continue à centrifuger l'extrait à 8000 rpm pendant 20 minutes, on récupère le surnageant, puis on refait le lavage à l'éthanol (3 :1 V : V), on refait la centrifugation et on récupère tout le précipité avec l'hexane et on l'évapore à 40° C jusqu'à dessèchement total (Lorenzi et matos, 2008).

1.2. Ultrason

Généralement, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a été développée pour extraire certaines molécules d'intérêt thérapeutique (Chematet al., 2003).

Mode opératoire

Un échantillon d'essai de 5 g de poudre de *C. sativus* (feuille) a été placé dans un ballon rempli de 150 ml d'eau distillée sur l'ultrason (40°C) (Figure 4). Laisser l'ensemble pendant 15 minutes. Après filtration sur papier filtre Whatman, le filtra a été concentré sous vide sur un évaporateur rotatif à 50°C. Ensuite, les extraits ont été traités avec de l'éthanol (3 :1 V : V) qui ont été mis en conservation au réfrigérateur à 4 °C pendant 24 h. Puis on continue à centrifuger l'extrait à 8000 rpm pendant 20 minutes, on récupère le surnageant, puis on refait le lavage à l'éthanol (3 :1 V : V), on refait la centrifugation et on récupère tout le précipité avec l'hexane et on l'évapore à 40° C jusqu'à dessèchement total (Yang et al, 2017)

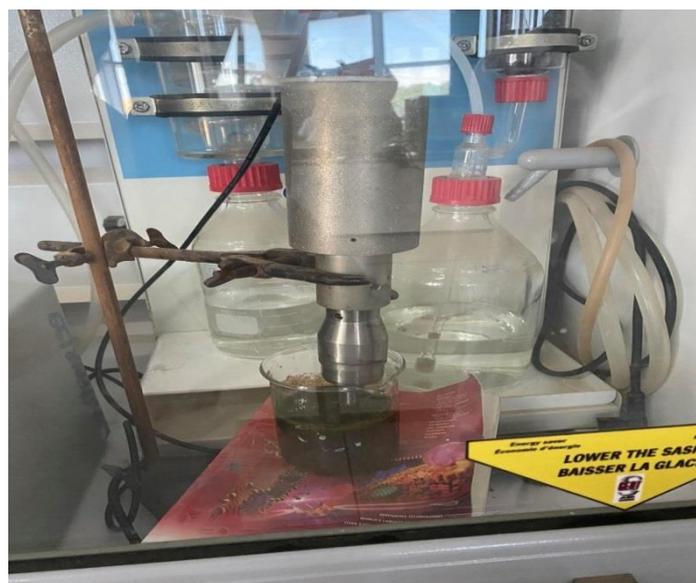


Figure 4 : L'extraction des polysaccharides avec la technique Ultrason
(photo prise au laboratoire)

1.3. Ultrason (NaOH)

Mode opératoire : Un échantillon d'essai de 5 g de poudre de *C. Sativus* (feuille) a été placé dans un ballon rempli de 100 ml d'eau distillée avec NaOH (0,2 %) sur l'ultrason (40°C) (**Figure 4**). Laisser l'ensemble pendant 15 minutes. Après filtration sur papier filtre whatman, le filtra a été concentré sous vide sur un évaporateur rotatif à 50°C. Ensuite, les extraits ont été traités avec de l'éthanol (3 :1 V : V) qui ont été mis en conservation au réfrigérateur à 4 °C pendant 24 h. Puis on continue à centrifuger l'extrait à 8000 rpm pendant 20 minutes, on récupère le surnageant, puis on refait le lavage à l'éthanol (3 :1 V : V), on refait la centrifugation et on récupère tout le précipité avec l'hexane et on l'évapore à 40° C sèche (**Yang et al, 2017**).

1.4. Reflux

Le reflux est donc par définition l'état d'équilibre thermique obtenu lorsque le mélange réactionnel est à ébullition et que les vapeurs dégagées se condensent sur les parois froides du réfrigérant et retournent dans le mélange réactionnel. De cette manière, il n'y a pas de perte de matière (**Anthony, 2002**).

Mode opératoire

Un échantillon d'essai de 5 g de poudre *C. sativus* (feuille) a été placé dans un ballon rempli de 150 ml d'eau distillée sur le reflux (100°C). Laisser l'ensemble pendant 2 heures (**figure 5**). Après filtration sur papier filtre Whatman (**figure 7**), le filtra a été concentré sous vide sur un évaporateur rotatif à 50°C (**figure 6**). Ensuite, les extraits ont été traités avec de l'éthanol (3 :1 V : V) qui ont été mis en conservation au réfrigérateur à 4 °C pendant 24 h. Puis on continue à centrifuger l'extrait à 8000 rpm pendant 20 minutes, on récupère le surnageant, puis on refait le lavage à l'éthanol (3 :1 V : V), on refait la centrifugation et on récupère tout le précipité avec l'hexane et On l'évapore à 40° C jusqu'à dessèchement total (**Yang et al, 2017**).

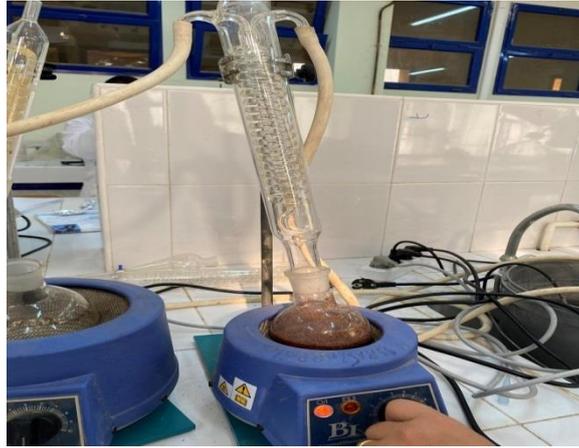


Figure 5 : l'extraction des polysaccharides par la méthode reflux
(photo prise au laboratoire)



Figure 6 : Evaporateur rotatif (photo prise au laboratoire).

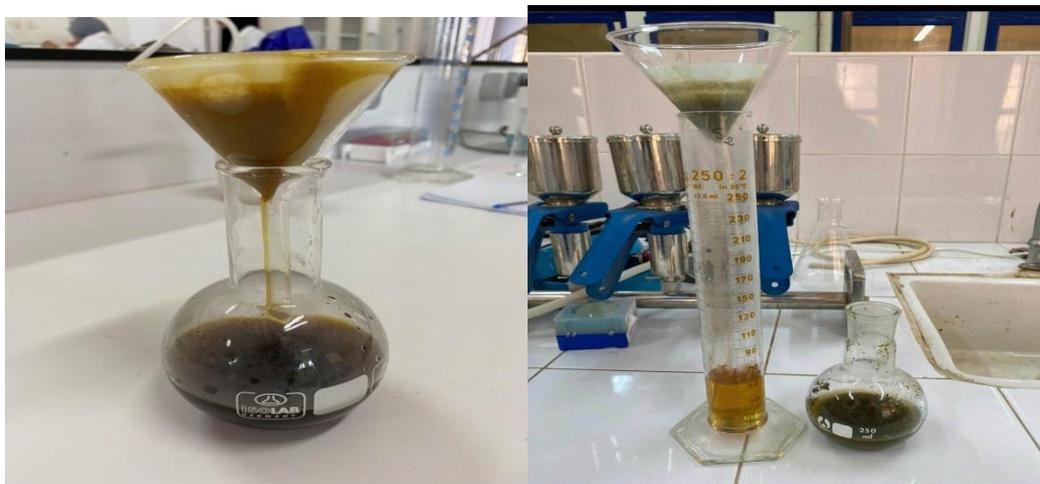


Figure 7 : Filtration par papier Whatman (Photo prise au laboratoire)

Les extraits de polysaccharides obtenus après l'évaporation à sec sont pesés et récupérés avec un mélange de solvant eau distillée- Hcl en déterminant la concentration et récupéré par la suite dans des tubes a hémolyse qui va être conservés au réfrigérateur à une température de 5°C jusqu'à l'utilisation.

On a fait l'étude de l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne sur les extraits obtenus par le reflux et l'ultrason

2. Rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant le transfert du filtrat à évaporer) (**Mohammedi , 2005**).

$$R(\%) = \left(\frac{m_{ext}}{m_{ech}} \right) \times 100$$

R (%) : le Rendement

MEXT : la masse des extraits après évaporation du solvant en g

MECH : la masse sèche de l'échantillon végétal (safran) en g

3. Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH

3.1. Principe du test de DPPH

La méthode consiste à mesurer l'activité anti-radicalaire de la technologie de capture des radicaux libres au DPPH (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazino). DPPH, (C₁₈H₁₂N₅O₆; PM= 394.33), est un radical libre stable soluble dans le méthanol (ou éthanol). Violet Forte, son absorbance maximale est de 517 nm. Lorsque la molécule antioxydant diminue les radicaux libres DPPH, le violet disparaît et devient rapidement jaune pâle (Blois, 1958).

3.2. Test du piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Un volume de 50 µl de différentes concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4mg/ml) de l'extrait est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH à la même concentration utilisée. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

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

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

Où : A_C : représente l'absorbance du contrôle négatif ; A_E : représente l'absorbance de l'échantillon.

Pour comparer l'efficacité de cet extrait avec celle de l'acide ascorbique, nous avons calculé la concentration efficace EC_{50} (Efficient Concentration value) qui est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH à 50 %. Ce paramètre est déterminé en traçant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

4-Etude du pouvoir antimicrobien

4.1. Souches testées

Pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne, on a utilisé les souches de références qui sont mentionnées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	LVR
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	LVR
<i>Klebsiellapneumoniae</i>		ATCC 700603	LAMAABE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	LVR
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAMAABE
<i>Enterococcusfaecalis</i>		ATCC 29212	LVR
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPSAB

LVR : Laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen ; **LAMAABE** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement ; **LAPSAB** : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie Synthèse et Activité Biologique.

4.2. Conservation des souches

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée entubes à essais. Les cultures pures sont conservées à +4 °C à l'obscurité jusqu'à son utilisation. Pour une conservation à long terme les isolats ont été stockés à - 20 °C dans le bouillon Mueller Hinton (ou Sabouraud pour *Candida*) additionné de 30% (v / v) de glycérol.

4.3. Milieux de culture

- Bouillon Mueller Hinton (B.M.H).
- Gélose Mueller-Hinton (G.M.H).
- Bouillon Sabouraud (B.S).
- Gélose Sabouraud pour la levure (G.S).

Ils sont utilisés pour l'antibiogramme des souches bactériennes et fongiques et pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

- Gélose nutritive : elle est utilisée pour la conservation des souches.

Les antibiotiques utilisés :

- Ampicilline (AMP) 10 μ g (Biocare) Algerie
- Amoxiciline (AMX)

4.4. Préparation de l'inoculum

- ✓ Une pré-culture des souches microbiennes et préparée dans le Bouillon B.M.H pour les bactéries et le bouillon B.S pour les levures afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance.
- ✓ Après 18-24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48h d'incubation à 30 °C pour les levures, la turbidité est ensuite ajustée au standard Mc Farland 0.5 avec un colorimètre, ce qui correspond à $\approx 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm) et $\approx 10^6$ UFC /ml pour les levures (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm).
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien le milieu (B.M.H ou B.S) stérile s'il est trop chargé.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum (Rahal et al., 2008; Vitali et al., 2016).

4.5. Ensemencement

Les boîtes Pétri sont coulées à une épaisseur de 4 mm, car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un résultat erroné :

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (Rahal et al., 2008).

4.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne du l'extrait de polysaccharide

* Méthode de diffusion sur gélose

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave puis imprégnés de 10µL/disque (5 mg). Ces disques sont déposés à la surface de la gélose (G.M.H pour les bactéries et G.S pour les levures) préalablement ensemencée en surface avec la suspension microbienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits.

L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 37°C pendant 48 h pour les *Candida albicans* (NCCLS, 1997; CLSI, 2015).

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition. Deux répétitions sont effectuées pour chaque charge (Belyagoubi et al., 2021).

4.7. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI, CMB) d'inhibition de la croissance microbienne par les extraits. La concentration minimale bactéricide (ou fongicide) (CMB ou CMF) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait ne laissant pas de microorganismes survivantes de l'inoculum après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h (Abedini, 2013).

La méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001). Tous les tests ont été effectués dans le bouillon B.M.H pour les bactéries et le bouillon B.S pour les levures.

Des dilutions en série sont préparées dans une microplaque à fond en U (plaque à micro titration) de 96 puits

Tout d'abord, nous mettons 100 µL de bouillon B.M.H (ou B.S) dans les puits. Ensuite, nous déposons 100 µl des extrait des polysaccharides Dans le puits 2, ensuite le puits 3 et puis

effectuons les dilutions successives (100 μ L de puits 3 dans puits 4 et ainsi de suite). De plus, on met 100 μ l de la suspension bactérienne (ou fongique) dans les puits 1 puis 3 à 22 pour obtenir un volume final de 200 μ l avec une concentration finale de microorganismes de $\approx 5 \times 10^5$ UFC/ml.

Il faut impérativement désinfecter la micropipette à l'alcool pour éviter les problèmes de contaminations et il est important d'homogénéiser le tube contenant la souche en le passant au vortex avant de l'ajouter dans les puits (Abedini, 2013).

Les microplaques des bactéries et des *C. albicans* ont été incubées respectivement pendant 24 h à 37°C et pendant 48 à 30°C.

La lecture est faite visuellement.

La CMI est définie comme la plus faible concentration inhibitrice de l'extrait par laquelle le microorganisme ne démontre pas une croissance visible.

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

Tableau 3 : Concentrations et masses des extraits de polysaccharides du safran dans les puits

Numéro	1	2	3	4	5	6	7	8	...	18
Concentration dans le puits de l'extrait Reflux et Ultrason (μ g/ml)	TC	TCE	125000	62500	31250	15625	7812.5	3906.25	...	3.81



**RESULTATS ET
DISCUSSION**

L'extraction

Il s'agit des feuilles de *C. sativus* (safran) sélectionné. 4 extraits ont été obtenus, les 4 tableaux indiquent les rendements obtenus pour chaque extrait :

Tableau 4 : Rendements d'extraction des extraits de polysaccharide obtenus à partir des feuilles du safran à différent mode d'extraction (extrait sec)

Technique d'extraction	Par reflux	Par ultrason (NaOH)	Par infusion	Par ultrason
Rendement (%)	18.32	5.54	3.94	2.08

:

Le meilleur rendement d'extraction des quatre méthodes utilisées, est le reflux avec un taux d'extraction moyen de **18.32%** suivi l'ultrason avec NaOH est de **5.54%** et de l'infusion avec **3.94%** Statistiquement (**tableau 4**), la méthode d'extraction de reflux diffère significativement de l'extraction par l'ultrason. Cette différence entre le reflux et les deux autres méthodes d'extraction pourrait être au temps d'extraction, qui est long dans le cas de reflux (2heures) par rapport aux autres méthodes.

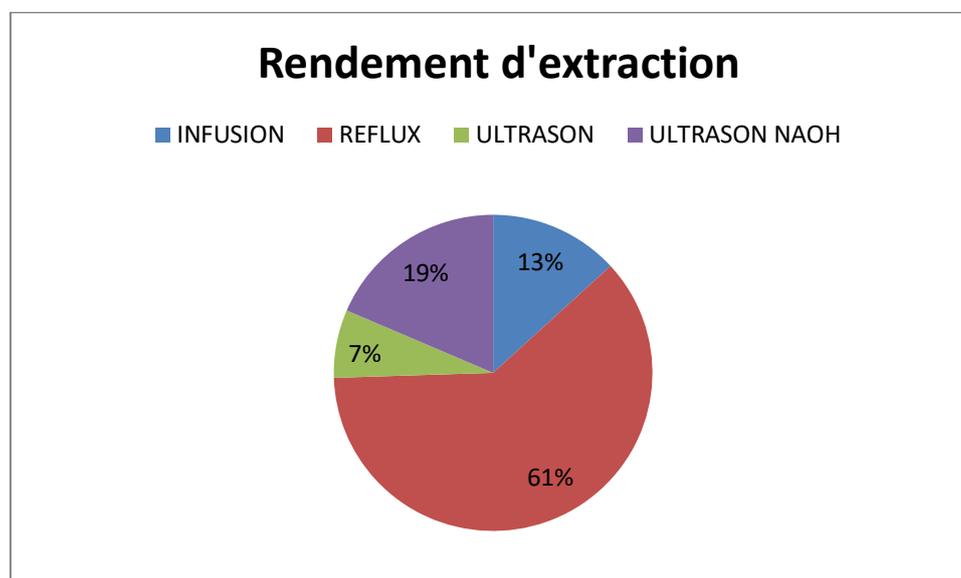


Figure 8 : Représentation graphique de la somme des rendements d'extraction.

L'étude de **Kadkhodae et Hemmati-Kakhki (2007)** sur une poudre d'un échantillon du safran iranien de diamètre de 0,5mm a montré que l'extraction des trois composés (picrocrocine, safranal et crocine) augmente de manière linéaire en fonction du temps d'extraction par ultrason et les teneurs ne se stabilisent pas en fin de la durée d'extraction (10min)

D'après cette étude, il pourrait être conclu que l'extraction des composés principaux du safran est influencée considérablement par la méthode d'extraction, son niveau d'énergie (agitation, puissance ou amplitude) et sa durée. En outre, lors de l'extraction des principes actifs du safran, il est nécessaire de prendre en considération d'autres paramètres afin d'atteindre les objectifs souhaités à savoir la granulométrie de la poudre, le ratio solvant/ échantillon, l'étape de la filtration de l'extrait, le type du filtre, les méthodes du séchage et les conditions de stockage (**Straubinger et al., 1997; Kadkhodae et al., 2007**)

II. Evaluation de l'activité antioxydante

Les résultats de l'effet antioxydant des polysaccharides des feuilles du safran réalisé par le test du DPPH sont représentés dans les figures 09 et 10 et le tableau 5.

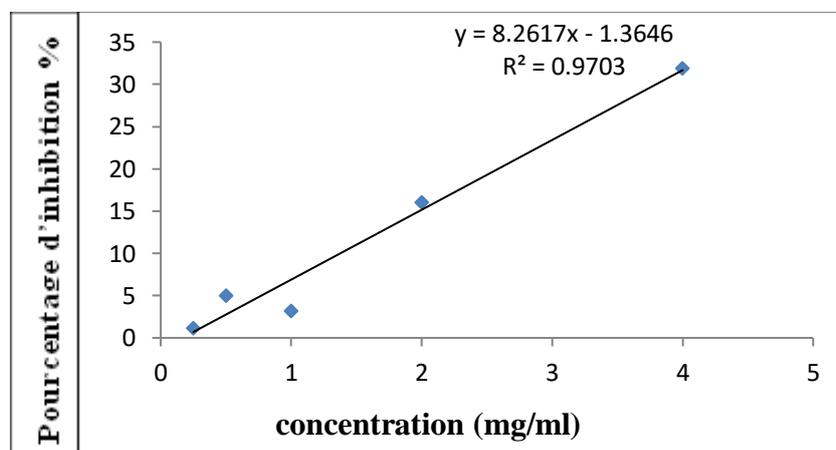


Figure 9 : % d'inhibition en fonction de concentrations de l'extrait obtenu par reflux.

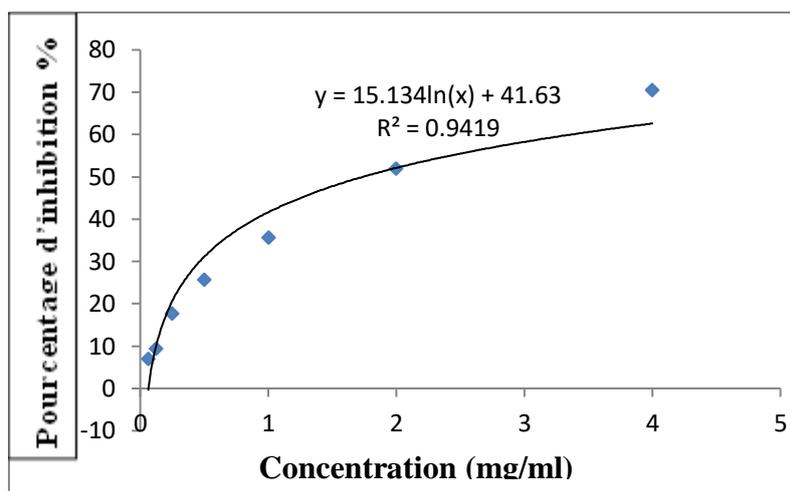


Figure 10: % d'inhibition en fonction de concentrations de l'extrait obtenu par ultrason.

Tableau5 : Concentrations EC₅₀ des tests du DPPH.

Extrait bruts	EC ₅₀ (mg/mL)
	DPPH
Reflux	6,187 ± 0,041
Ultrason	1,938 ± 0,45
Acide ascorbique	0.090 ± 0.0023

L'activité anti radicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al ., 2008).

Les deux extraits détiennent une activité anti-radicalaire exprimée en concentration EC₅₀ égale à 1.938 et 6.187mg/mL pour l'extrait obtenu par ultrason et l'extrait obtenu par reflux, respectivement. Ces valeurs restent faibles par rapport à celle à l'acide ascorbique (0,090 mg/mL).

Assimopoulou et al. (2005) ont indiqué que l'activité antioxydante du safran pouvait être attribuée à deux composés bioactifs, la crocine et le safranal, qui manifestent des activités anti-radicales DPPH de 65% et 34%, respectivement

Selon **Lahmas et al. (2018)**, ont révélé une activité anti-radicalaire intéressante de l'extrait du safran obtenu avec une concentration IC₅₀ de 0,5 mg/mL pour les feuilles séchées.

Selon **Makhloufet al. (2011)**, l'extrait brut de stigmates de *C. sativus* peut être considéré comme une excellente source d'antioxydants, ayant une activité antioxydante élevée.

Cette différence est probablement due à la différence des méthodes d'extraction.

III. Evaluation du pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne des extraits de polysaccharides des feuilles du safran est évaluée sur 7 souches. Les résultats obtenus de la méthode de diffusion sur disques sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits bruts des polysaccharides (5 mg/disque).

Microorganismes	REFLUX	ULTRASON	Contrôle négatif (Eau+ HCl)	Contrôle(+) Amp (1 mg)	Contrôle(+) Amx (2.5 mg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.75±0.35	0±0	9.5±0.7	0±0	0±0
<i>Escherichia coli</i>	6.75±0.35	7.25±0.35	9±0	21.9±0.14	16.1±0.28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.5±0.7	10.5±0.7	11.5±0	7±0.14	0±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0±0	0±0	0±0	28.05±0.7	24.1±0.14
<i>Bacillus subtilis</i>	0±0	0±0	0±0	35.1±0.57	28.05±0.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.75±0.35	0±0	11.75±03.5	32.8±0.28	26.25±0.35
<i>Candida albicans</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Nous remarquons dans le **tableau 6** que l'extrait obtenu par reflux présente un effet antibactérien sur les souches *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* à 5mg/disque avec des zones d'inhibition de 8.75±0.35, 6.75±0.35, 9.5±0.7 et 7.75±0.35mm, respectivement. A la même charge, l'extrait obtenu par ultrason a révélé un effet antibactérien

contre les souches *E. coli* et *K. pneumoniae* avec des zones d'inhibition de 7.25 ± 0.35 , 10.5 ± 0.7 mm, respectivement.

l'AMX et L'AMP a exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis la majorité des bactéries Gram - et tous les bactéries Gram+ et le effet antimicrobienne est contre *B.subtilus*.

Par manque de solvant de solubilité des polysaccharides spécifique dans nos laboratoires de recherche, ont a été obligés d'ajouter du HCl avec l'eau distillé (1 :4 : V : V). Ce dernier, présente une certaine activité anti microbienne à lui seul.

Tableau 7: CMI et CMB des extraits bruts des polysaccharides du safran sur les microorganismes testés.

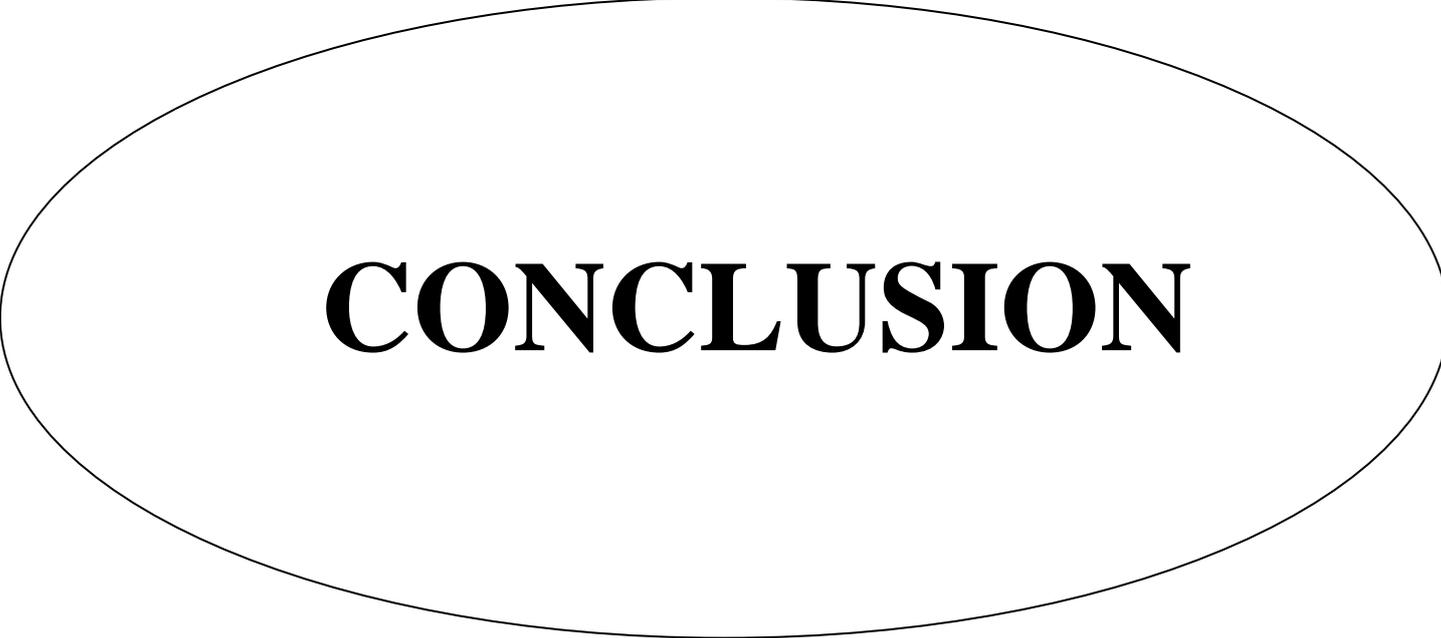
Microorganismes	REFLUX		ULTRASON	
	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125000	>125000	ND	ND
<i>Escherichia coli</i>	125000	>125000	125000	>125000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125000	>125000	125000	>125000
<i>Enterococcus faecalis</i>	125000	>125000	ND	ND

D'après le **Tableau 7**, les extraits obtenus par reflux à un effet inhibiteur sur les quatre souches à savoir *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K pneumoniae* et *E. faecalis* une concentration CMI de $125000 \mu\text{g}/\text{mL}$. Tandis que l'effet bactéricide CMB, cet extrait a enregistré son effet à une concentration supérieure à $125000 \mu\text{g}/\text{mL}$ sur ces quatre souches.

Pour l'extrait ultrason, les valeurs de CMI sont enregistrées contre deux souches à savoir *E. coli* et *K. pneumoniae* à $125000 \mu\text{g}/\text{mL}$ alors que la CMB a mentionné son effet à une concentration supérieure à $125000 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour ces deux souches.

D'après ces résultats, nous pouvons dire qu'ils sont très faibles par rapport à celle du **Belyagoubi et al. (2021)**, ont trouvé que l'extrait des fleurs est plus actif contre les souches Gram +. Certains travaux tels que l'étude de **Zaazaa et al. (2021)** qui a révélé la présence d'un effet antibactérien d'extraits aqueux de *C. sativus* a été réalisée contre six souches bactériennes appartenant aux bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

D'après l'étude **de Jedouali (2017)**, l'activité antimicrobienne d'extraits méthanolique ayant des concentrations différentes (4500µg/ puits, 9000µg/ puits et 13500µg /puits) contre les six bactéries étudiées , les résultat révélé que seul l'extrait de feuilles *C.sativus* représente une source de substance ayant une activité antimicrobienne contre ces bactéries.et , à mesure que la concentrationdes extraits augmentait également .aucun activé antimicrobienne n'a été observée *S.aureus* ,*B.subtilis* ,*P.aeruginosa* et *Proteus Mirabilis* .qui a découvert que Staphylocoques sont résistants aux extraits méthanolique des feuilles de *C.sativus*. De plus, n'a trouvé aucune activité antibactérienne de l'extrait de *crocus sativus* lorsque ceux-ci ont été testés contre *Proteus* ou *Staphylococcus*.



CONCLUSION

Le présent travail avait pour but d'étude des activités biologiques des polysaccharides extraits des feuilles de safran, *C. sativus* (safran).

Pour cela nous avons comparé quatre types extractions de polysaccharides extraits des feuilles du safran. La comparaison porte sur le rendement des quatre méthodes d'extraction par reflux, infusion, ultrason, ultrason avec NaOH.

Les résultats montrent que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu par le reflux, suivi par ultrason avec NaOH, infusion et ultrason.

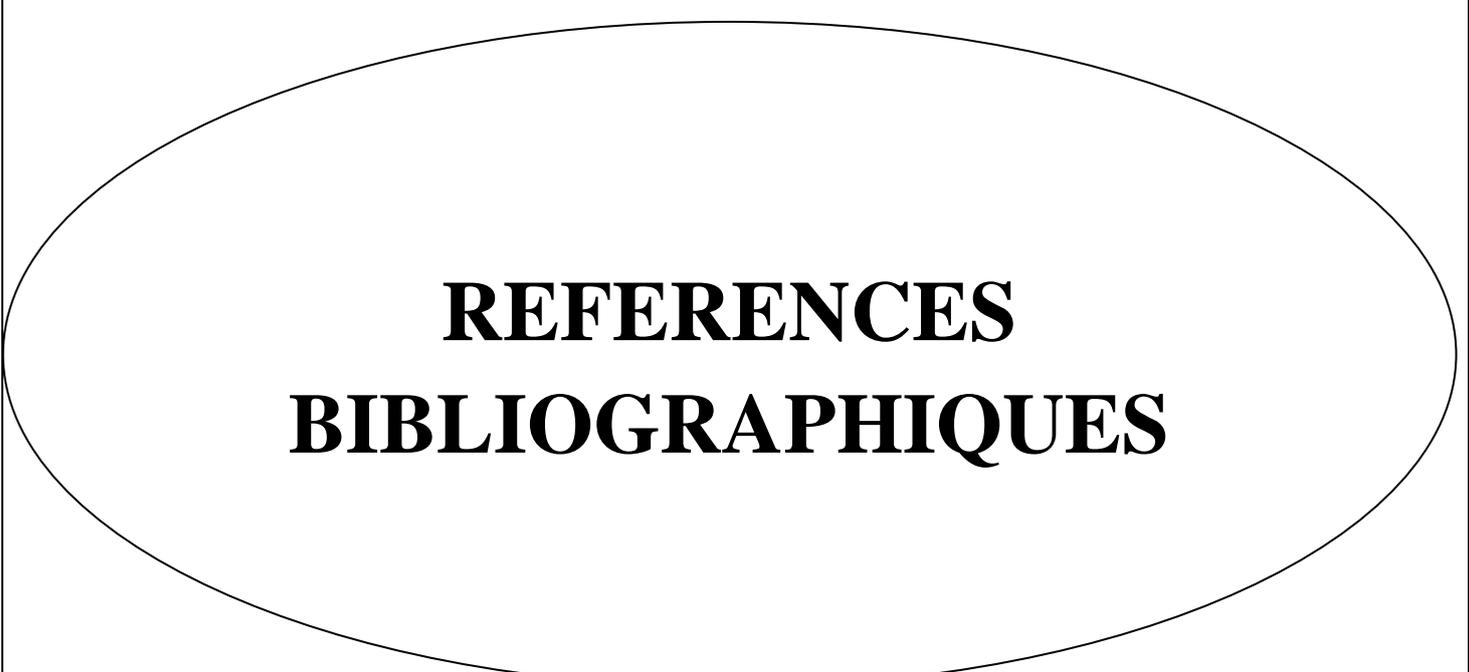
Cette étude montre que la méthode d'extraction par reflux est probablement la meilleure méthode par rapport aux trois autres méthodes pour extraire les polysaccharides.

Au niveau de l'activité anti-oxydante, elle diffère en fonction de l'extrait. L'extraction par ultrason présente une activité anti radicalaire intéressante, par contre l'extrait obtenu par reflux ne présente aucune activité anti-oxydante.

Concernant l'effet antimicrobien testé sur les 7 souches, les extraits obtenus par le reflux et l'ultrason ont montré des effets inhibiteurs et bactéricides contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*

Comme perspective, il serait intéressant d'étendre l'éventail de ce travail et de réaliser les points suivants:

- Optimiser la méthode d'extraction et le solvant de solubilité
- Etudier la composition chimique des extraits actifs et identifier les principes actifs responsables des activités biologiques pour mieux comprendre leur mode d'action
- Etudier d'autres propriétés biologiques telles que l'activité antimicrobienne contre d'autres souches pathogènes et les virus, anti-inflammatoires et antidiabétiques.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abedini, A., (2013). Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae) sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé – Lille II-France.200p

Angone, SA., Nguema-Ona,E., Driouich,A.(2010). La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale.8p

Anthony, B., (2002). Fiche sur la technique du montage de reflux.

Arvy M., Gallouin F. (2003).Epices, aromates et condiments. Belin Ed. , pp.216-219.

Assimopoulou,AN., Sinakos,Z ., Papageorgiou,VP . (2005). Activité anti-radicalaire de l'extrait de *Crocus sativus* L. et de ses constituants bioactifs.997p

Basker, D.(1999).Saffronchemistry. Medicinal and Aromatic Plants: Industrial Profiles. 8:45-52.

Belyagoubi-Benhamou, N., Belyagoubi, L., Loukidi, B., Mudasir, A., Assadpour, E., Boudghène-Stambouli, M., Kharazmi, MS and Jafari,SM.(2023).Bioactivity and applications of saffron floral bio-residues (tepals): a natural by-product for the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.16p

Belyagoubi, L., Loukidi, B.,Belyagoubi-Benhammou, N.,Gismondi, A., Marco, GD., AD'Agostino, A.,Canini, A.,Benmahieddine,A., Rouigueb,K., Ben Menni1,D., Atik-Bekkara1,F. (2021).Safron: Stigmas and Flowers as Source of Bioactive Compounds.14p

Blois, MS., (2005).Antioxydant determinations by the use of stable free radical.Nature 26 1 (958) : 1199.

Besombes, C., (2008). « Contribution à l'étude des Phénomènes d'extraction hydrothermomécaniques d'herbes aromatiques ». Application généralisées, Thèse de doctorat. Université de la Rochelles.289p

Botsoglou, N.A. (2005). Effet du safran alimentaire (*Crocus sativus* L.) sur la stabilité oxydative du jaune d'œuf .vol 46.

Boual, Z., (2014). Caractérisation Physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa.159p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Boudjouref., (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait d'*Artemisiacampestris* L, mémoire de magister. Université Ferhat Abbes Sétif.64p

Brudieux, V., (2007). Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. A l'occasion de la relation structure/activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. 220p

Chemat S, Lagha A, Ait Amar H, chemat f. (2003). Ultrasound assisted micro wave digestion. *Ultrasoni. Sonochemi*, 11, 5-8.

CLSI., (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute .Vol 35.

Crozet A., Durfort S., Sus-Rousset H, (2012).*Crocus sativus* L. (Iridaceae), le safran. *Phytothérapie*, 10 (2), pp. 121-125.

Desplanques, S., (2008). Optimisation des propriétés d'adhérence d'un adjuvant végétal par adjonction de polysaccharide dans une formulation.228p

Jadouali.S.M , Atifi.H, Bouzoubaa.Z , Majourhat.K , Gharby.S , Achemchem.F , Elmoslih.A ,Laknifli.A , Mamouni. R;(2018). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves,, Volume 9, Issue 1, Page 113-118.

Kadkhodae R, Hemmati-Kakhki A. (2006). Extraction of bioactive compounds of safran

Kouassi,MC.,(2017).Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes.. *Chimie organique. Normandie Université*, 2017. Français. ffNNT : 2017NORMR078ff.295p

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

Le Nard, M., De Hertogh, AA. (1993). Bulb growth and development and flowering. In *The Physiology of Flower Bulbs*. Amsterdam. The Netherlands. Elsevier. 29-44.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liu, J., Willför, S., Xu, C. (2015) A Review of Bioactive Plant Polysaccharides: Biological Activities, Functionalization, and Biomedical Applications. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*, 5 (1), 31–61

Louis, S. (2004) .Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. Thèse de Doctorat. Université de Lyon. Paris .260 p.

Lorenzi, H., Matos, F. (2008). Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas. 512p.

Makhlouf H, Saksouk M, Habib J & Chahine R. (2011). Determination of antioxidant activity of saffron taken from the flower of *Crocus sativus* grown in Lebanon. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10. (41): 8093-8100, ISSN 1684–5315.

Moghaddasi M. (2010). Saffron chemicals and medicine usage. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(6):427- 430. 2010.

Mohamadpour AH, Ayati Z, Parizadeh MR, Rajbai O and Hosseinzadeh H. (2013). Safety Evaluation of Crocin (a constituent of saffron) Tablets in Healthy Volunteers. *Iran J Basic Med Sci*. 16(1):39-46.

Molina, RV., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, JL., Garcia-Luis, A. (2005). Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.) *Sci Hort*. 103: 361-379.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA, M27-A. Vol 37.

OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé). (2015). Fact sheet on traditional medicine. 78p.

Rahal, K. (2008). Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 5ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie. 195p

Renaud, M., Belgacem, MN., Rinaud, OM., (2005). Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions polymer, vol 46 : 12348-12358.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ruff, Y., (2008). Biopolymers dynamiques : oligo et polysaccharides. Thèse de doctorat. Louis Pasteur Strasbourg, 308p.

Straubinger M, Jezussek M. Waibel R & Winterhalter P. (1997). Novel glycosidic constituents from saffron Journal Agriculture and Food Chemistry, 45: 1678–1681.

Tantry, A. M., A. Dar, and B. Singh. (2017). An economic analysis of production and marketing of saffron in Jammu and Kashmir. International Journal of Social Relevance & Concern 5 (10):12–9.

Tyihak, E., Billes, F., Ziegler I.M., Mikosch, H.(2007). Spectroscopie vibrationnelle du resvératrol. p 669-679

Vitali, L.A., Beghelli, D., Biapa Nya, P.C.(2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. Arabian J Chem; 9(6): 775-786.

WARRANT J. (2004) - Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs de mucilage de lin (*Linum usitatissimum*). Thèse de Doctorat. Université de Picardie Jules Verne, 238 p.

Winterhalter, P., Straubinger, M. (2000). Saffron-renewed interest in an ancient spice. Food Rev Int. 16(1):39- 59.

Yang, J., Chen, X., Shen, M., Chen, Y., Yu, Q., Xie, J.(2017). Structure, fonction et application avancée du polysaccharide traité aux micro-ondes .

Zaazaa, L., Mrabti, H., ED-Dra, A., Bendahbia, K., Hami, H., Soulaymani, A., Ibriz, M.(2021). Determination of Mineral Composition and Phenolic Content and Investigation of Antioxidant, Antidiabetic, and Antibacterial Activities of *Crocus sativus* L. Aqueous Stigmas Extracts. 7p.

Zargari, A. (1990). Traitement avec des plantes, pharmacogénose. Publications de l'Université de Téhéran, Téhéran, 2, 7-67.

Zhang A., Shena Y., Cena M., Honga X., Shaoa Q., Chena Y., Zhengé B.(2019) Polysaccharide and crocin contents, and antioxidant activity of saffron from different origins industrial Crops & Products 133 111_117