



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMCEM

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



Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par :

M^{me}. ELHADJ SAÏD Amel

En vue de l'obtention du diplôme de **Master en Biologie**

Filière : **Sciences alimentaires**

Thème

Etude *in vitro* des activités biologiques : cyto-toxique, anti-hémolytique et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux du pétale de safran

Soutenu le : 20 juin 2024, devant le jury composé de:

Présidente : MOKHTARI Nassima

Maître de conférences, Université de Tlemcen

Examinatrice : LOUKIDI Bouchra

Maître de conférences, Université de Tlemcen

Promotrice : GUERRICHE Amina

Maître de conférences, Université de Tlemcen

Année universitaire : 2023-2024

Résumé

Depuis l'Antiquité, le safran (*Crocus sativus*) est une épice très prisée pour ses propriétés. Etant un végétal très riche en composants bénéfiques pour la santé humaine, il représente un aliment médicinal très précieux. Les stigmates de safran sont la majeure partie de cette plante pour laquelle il est essentiellement cultivé, or les scientifiques se penchent sur la valorisation de ses pétales, considérés comme des déchets. Ces bio-résidus sont désormais étudiés pour leur intérêt pharmacologique. Le but de ce travail est de mener une recherche sur les effets cyto-toxicologique, anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits aqueux des pétales de safran. Nos résultats ont mis en évidence une bonne activité biologique de l'extrait aqueux des pétales de safran qui peuvent être utilisés dans plusieurs domaines pharmaceutiques et biomédicaux.

Mots clés : *Crocus sativus*, Cyto-toxicologie, Anti-inflammatoire, Anti-hémolytique.

Abstract

Since ancient times, saffron (*Crocus sativus*) has been a highly prized spice. As a plant rich in components beneficial to human health, it is a highly valuable medicinal food. Saffron stigmas are the main part of this plant, for which it is mainly cultivated, but scientists are now looking into the recycling of its petals, which are considered to be waste. These bio-residues are now being studied for their pharmacological value. The aim of this study was to investigate the cyto-toxicological, anti-haemolytic and anti-inflammatory effects of aqueous extracts of saffron petals. Our results showed that the aqueous extract of saffron petals has good biological activity and can be used in a number of pharmaceutical and biomedical fields.

Key words : *Crocus sativus*, Cyto-toxicology, Anti-inflammatory, Anti-haemolytic.

المخلص

منذ العصور القديمة، كان الزعفران (*Crocus sativus*) من التوابل ذات القيمة العالية. كنبات غني بالمكونات المفيدة لصحة الإنسان، فهو غذاء طبي ذو قيمة عالية. وصمات الزعفران هي الجزء الرئيسي من هذا النبات، الذي يُزرع فيه بشكل أساسي، لكن العلماء يبحثون الآن في إعادة تدوير بتلاته، التي تعتبر نفايات. تتم الآن دراسة هذه المخلفات الحيوية لقيمتها الدوائية. كان الهدف من هذه الدراسة هو التحقيق في الآثار السمية للسيتو ومضادة لانحلال الدم ومضادة للالتهابات لمستخلصات مائية من بتلات الزعفران. أظهرت نتائجنا أن المستخلص المائي لبتلات الزعفران له نشاط بيولوجي جيد ويمكن استخدامه في عدد من المجالات الصيدلانية والطبية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الزعفران، السموم الخلوية، مضاد للالتهابات، مضاد انحلال الدم.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie du fond de mon cœur le Bon Dieu de m'avoir donnée courage, la volonté, et la persévérance afin de pouvoir accomplir ce travail.

*Je remercie chaleureusement **M^{me}. GUERRICHE** qui a guidé judicieusement mes recherches.*

Je garde en mémoire ses qualités d'encadrant et ses conseils bienveillants. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude.

Je vous remercie de m'avoir donnée la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants, d'être rigoureuse et enthousiaste.

*Je remercie également la présidente du jury **M^{me}. MOKHTARI** d'avoir accepté de faire partie du jury de ce travail.*

*Aussi, je remercie **M^{me}. LOUKIDI** pour sa présence, ainsi de bien vouloir accepter d'examiner ce travail et de l'enrichir par une discussion pertinente.*

Finalement, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

À vous tous, un grand Merci.

DEDICACES

Avec l'aide de Dieu le Tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédie :

*A ma mère qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous ses sacrifices
consentis et ses précieux conseils.*

*A mon mari qui s'est toujours montré soucieux et qui a toujours espéré me voir réussir
dans la vie quelques soient les contraintes et les obstacles.*

*A mes enfants, que je désire, qu'ils retrouvent dans ce travail, le témoignage de mon
profond amour pour eux*

A mon frère et mes sœurs pour leur présence et soutien.

*A mon encadrante **M^{me}. GUERRICHE** qui m'a dirigée dans ce labeur.*

*A tous mes enseignants, qui m'ont marquée par leur dévouement, et qui ont contribué à
enrichir mes connaissances scientifiques et à tous les enseignants du département de
Biologie.*

Liste des Figures

Figure 1 : Aspect général de safran (Cagla, 2018).	4
Figure 2 : Cycle de développement annuel de safran (Palomares, 2015).	6
Figure 3 : Stigmates de safran (Benayache S et al, 2013)	8
Figure 4 : Structure chimique de la crocétine (Christodoulou et <i>al.</i> , 2015).	10
Figure 5 : Structure chimique de la crocine (Lechtenberg et <i>al.</i> , 2008).	11
Figure 6 : Structure chimique de la picrocrocine (Christodoulou, 2015).	11
Figure 7 : Structure chimique du safranal (Christodoulou et <i>al.</i> , 2015).	12
Figure 8 : Anthocyanines et flavonoïdes présents dans les pétales des fleurs du safran	14
Figure 9 : Photographie de la poudre des pétales de safran	21
Figure 10 : Photographie de la solution après séchage.....	22
Figure 11 : Photographie de la suspension des globules rouges à 10%	23
Figure 12 : Comparaison des pourcentages de tests de cytotoxicité entre l'acide gallique et les extraits aqueux du pétale de safran.	27
Figure 13 : Comparaison des pourcentages de l'hémolyse des globules rouges par l'extrait aqueux des pétales de safran	28
Figure 14 : Comparaison des pourcentages de tests anti inflammatoires entre le diclofénac et les extraits aqueux du pétale de safran.....	29

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de safran (Dupont, 2007)	4
Tableau 2 : Composants des stigmates des fleurs du safran (Benmostefa et Guellil, 2017).....	9
Tableau 3: Les compositions minérales des pétales de safran (Fahim et <i>al.</i> , 2012)	13

Liste des Annexes

Annexe A. 1 : Test de cytotoxicité (pourcentage d'hémolyse) de l'acide gallique et de l'extrait aqueux du pétale de safran.	49
Annexe A. 2 : Test anti-hémolytique (Pourcentage de stabilité membranaire) de l'extrait aqueux du pétale de safran.	49
Annexe A. 3 : Test anti-inflammatoire (Pourcentage de l'inhibition de la dénaturation des protéines) de l'extrait aqueux du pétale de safran.	49

Sommaire

Introduction	10
Synthèse bibliographique	2
I.Chapitre 01 : Généralités sur le safran	3
1.Historique	3
2.Description et classification botanique.....	3
3.La culture du safran récolte et rendement	4
II.Chapitre 02 : Stigmates	8
1.Propriétés des stigmates	8
2.Composition chimique.....	8
3.Substances bioactives des stigmates.....	9
3.1.Crocétine.....	9
3.2.Crocines	10
3.3.Picrocrocine	11
3.4.Safranal.....	11
III.Chapitre 03 : Résidus du safran, les pétales	13
1.Définition des pétales du safran	13
2.Composition chimique des pétales de safran.....	13
2.1.Les pigments.....	13
3.Les effets thérapeutiques et pharmacologiques des pétales de safran.....	14
4.Utilisation du pétale de safran en cosmétologie et en parfumerie.....	15
5.La toxicité du pétale de safran.....	16
IV.Chapitre 04 : Activité biologique du pétale safran	17
Matériels et Méthodes	20
1.Préparation de l'extrait	21

1.1.Préparation des pétales de safran.....	21
1.2.Extraction des composés phénoliques des pétales de safran	21
1.2.1.Préparation de la solution aqueuse	21
2.Détermination de l'activité cytotoxique, anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits de pétales de safran	22
2.1.Préparation de la suspension des GR humains	22
2.2.Test de cyto-toxicité de l'extrait.....	23
2.3.Evaluation de l'activité anti-hémolytique, <i>in vitro</i> , des extraits aqueux par la méthode de stabilisation membranaire des GR.....	24
2.4.Activité Anti-inflammatoire des extraits aqueux de pétales de safran	24
Résultats et Interprétation	26
1.Activité cyto-toxique de l'extrait aqueux du pétale de safran.....	27
2.Activité anti-hémolytique (stabilisation membranaire des GR) de l'extrait aqueux du pétale de safran	28
3.Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux du pétale de safran	29
Discussion	30
Conclusion	35
Références bibliographiques	37
Annexes.....	48

Introduction

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales remontent aux anciennes civilisations, qui attestent l'importance de l'usage de ces plantes en médecine, en cuisine et en pharmacologie. (Lahmas et al., 2005).

Le safran provient de l'espèce *Crocus sativus L.* qui est un végétal de la famille des Iridacées. Il est cultivé et produit principalement en Iran, en Grèce, au Maroc, en Inde, en Espagne et en Italie. Les stigmates de safran représentent l'épice obtenue de cette plante, dont il faut 150 000 fleurs de safran pour produire seulement 1 kg de stigmates secs (Palomares, 2015). Le safran se multiplie par voie végétative au moyen d'un bulbe (Gresta et al., 2009). Il a de grandes fleurs voyantes de couleur violette ou pourpre-violacée, avec un style filiforme divisé en trois stigmates rouges odorants.

Partout dans les safranières, on récolte des fleurs de safran et la séparation des stigmates s'effectuent à la main (Melnyk et al., 2010).

Le safran est également connu par le nom de : « or rouge » qui est une appellation totalement justifiée puisqu'il est vendu entre 30 et 40 euros le gramme, cette précieuse épice suit le prix de l'or, étant la plus coûteuse au monde (Palomares, 1988 ; Ben Mostefa, 2017). Il peut être de différentes qualités dépendant de sa pureté, sa couleur, son arôme et sa saveur qui sont évalués par la norme internationale ISO (ISO/TS, 2003). Après avoir récolté les stigmates du safran, la partie fleurie, notamment les pétales, est jetée comme un déchet dans la production d'épices compte tenu de sa quantité énorme.

Cependant, les pétales sont des composants les plus importants de la fleur de safran car ils constituent une source de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, glycosides, kaempférol, des composés minéraux, et des anthocyanines ayant des activités physiologiques différentes (Hosseini et al., 2018).

Tout comme les stigmates qui sont connus pour leurs effets biologiques anti-oxydant, anti-inflammatoire, anti-tumoral, etc. Les composés volatils présents dans les pétales sont étudiés dans l'intention d'une valorisation thérapeutique des déchets floraux grâce à sa richesse en molécules bioactives comme les polyphénols (Bergoin, 2005).

L'utilisation du pétale de safran a fait donc l'objet de nombreuses études qui, d'une manière générale, ont conduit à valoriser les sous-produits et les déchets du safran pouvant avoir plusieurs utilisations intéressantes.

Dans cette optique, notre travail de Master a pour objectif de déterminer *in vitro* la cyto-toxicité de l'extrait aqueux du pétale de safran récolté dans la wilaya de Tlemcen Algérie, ainsi que ses activités biologiques à savoir leur activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire. Le but de cette étude est de valoriser le pétale de safran et de l'utiliser dans plusieurs applications : nutritionnel, cosmétique et pharmacologique.

Synthèse bibliographique

I. Chapitre 01 : Généralités sur le safran

1. Historique

Le terme « safran » est issu du latin « safranum », qui, lui-même tiré de l'arabe « zaferân » et dont l'origine porte une notion fondamentale, la couleur jaune. D'autres sources mentionnent que « safranum » viendrait du persan « Zarparan », zar signifiant « or » et d'un autre mot qui signifie « plume », ou « stigmaté ». Favre (2008) affirme que la ressemblance des appellations par les différentes langues renseigne sur la même étymologie du mot.

Les médecines ayurvédiques, mongoles, chinoises, égyptiennes, grecques et arabes ont longtemps considéré le safran comme une panacée, selon Les premiers écrits médicaux remontant au temps de l'antiquité égyptienne, vers 1550 avant J.-C. à travers le papyrus d'Ebers. Ce manuscrit, a répertorié plus de sept-cents substances d'origine végétale, en faisant alors, le socle de la pharmacopée égyptienne. Les qualités du safran y étaient déjà recensées, particulièrement pour ses effets stimulants, euphorisants, digestifs et antispasmodiques (Lazérat et Souny, 2009).

Les stigmates séchés de la fleur de safran représente une drogue végétale, car, utilisée partout dans le monde et dans différentes époques de l'Histoire pour ses bienfaits pharmaceutiques et thérapeutiques (Funel, 1990 ; Cardon, 2003).

2. Description et classification botanique

A son état sauvage, le safran était inconnu et a nécessité l'intervention de l'Homme pour survivre. Arvy et Gallouin (2003) affirment que c'est une plante triploïde et stérile, il se propage par voie végétative grâce à son corme, organe de réserve à la forme d'un bulbe. C'est un végétal monocotylédone, herbacée, pérenne et vivace à une floraison. Sa morphologie et sa physiologie lui confèrent une certaine rusticité. Sa hauteur est comprise entre 10 à 25 cm. Possédant une fleur de couleur mauve est avec 6 pétales, 3 étamines jaunes et un pistil divisé en 3 longs stigmates de couleur rouge vif brillant et velouté de 3 à 4 cm. Les stigmates sont brillants à l'ouverture de la fleur, minces à la base et plus larges à l'extrémité, avec une très forte odeur et qui se développent avec ou après la fleur. Le safran se multiplie à travers ses cormes de 3 à 5 cm de diamètre, qui représente la partie souterraine de la plante renfermant les substances de réserve nécessaires à la floraison et au bourgeonnement. Le safran ne se reproduit pas par voie sexuée car son pollen est stérile, cependant la fleur du safran ne produit pas de graines viables et sa multiplication dépend essentiellement de l'Homme. Un plant de safran comporte souvent deux à trois bulbes et un bulbe donne généralement une à trois fleurs. (Winterhalter et Straubinger, 2000) (Figure 1).

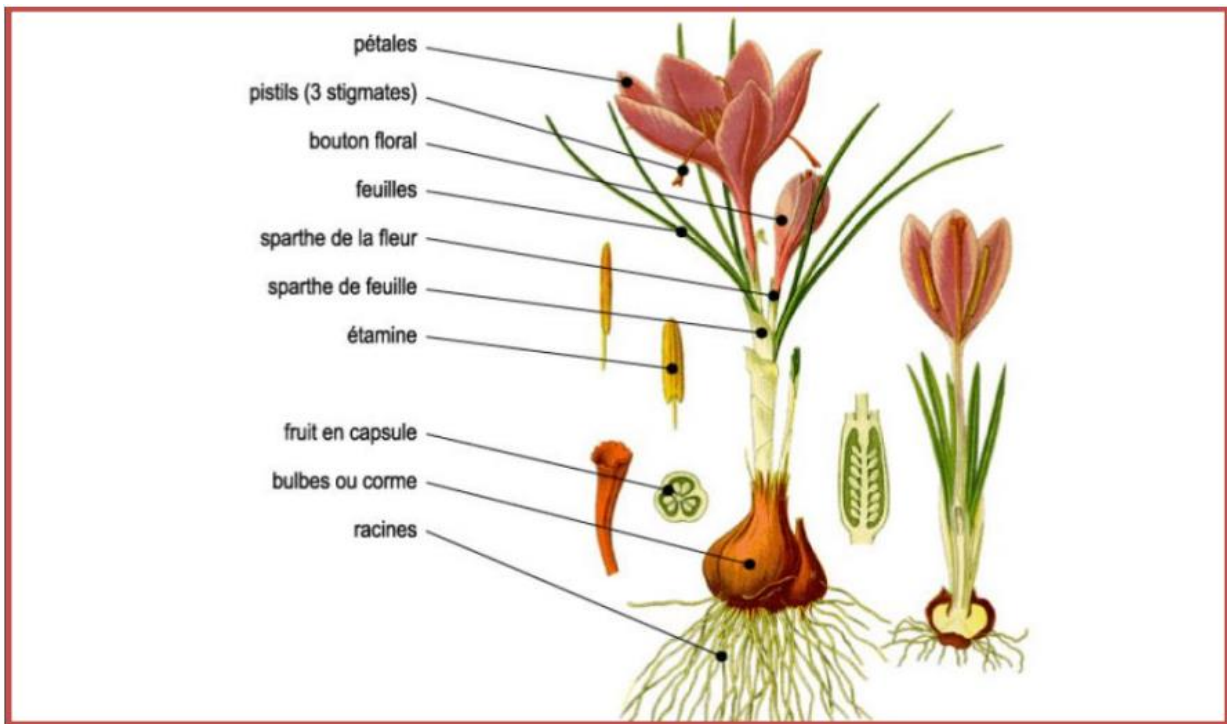


Figure 1 : Aspect général de safran (Cagla, 2018).

Selon la classification botanique de Cronquist de 1981 se basant sur des critères anatomiques, morphologiques et chimiques afin de différencier les angiospermes, le safran appartient aux taxons décrits dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de safran(Dupont, 2007)

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

3. La culture du safran récolte et rendement

La végétation du safran est connue par le fait d'être inversée : ses feuilles sortent de terre en septembre et la plante fleurit en octobre, puis se dessèche en mai de l'année suivante. C'est alors en automne, pendant que tous les autres végétaux entrent en dormance pour la saison d'hiver, que le safran fleurit. Lui, par contre, s'endort au printemps et ses feuilles disparaissent

complètement quand le bourgeonnement des autres plantes commence (**Benmostefa et Guellil, 2017**). Le safran ne fleurit qu'une fois par an et doit être récolté dans un très court laps de temps. Il est récolté pendant 3 à 4 semaines en octobre-novembre (**Rahimi, 2015**) (Figure 2). Le calibre du bulbe et état sanitaire déterminent la qualité du matériel végétal de départ. En vue d'une bonne production dès la première année, il est nécessaire de prendre de gros bulbes de 5 à 8 cm de diamètre. Les bulbes les plus petits, appelés bulbilles, ne vont fleurir que les années d'après. Il est impératif de prendre en considération les conditions favorables du milieu de développement des plants de safran y compris le sol qui doit être d'une texture légère, perméable, aérée, pauvre en matières minérales mais riche en matières organiques, de pH neutre, aux alentours de 6,5-7. Et aussi, il devra être frais, humide et très bien drainé.

Les sols de nature silico-calcaire ou argilo-calcaire sont les mieux adaptés au safran et qui sont fertiles et assez profonds, sain, sans fumier frais ni herbes fraîchement enfouies. Le safran peut être planté d'une altitude du niveau de la mer à près de 2000 m, mais il est plus préférentiellement adapté aux flancs des collines et aux vallées montagneuses, variant entre 600 et 1700 m d'altitude. En outre, cette plante peut être cultivée dans un endroit sec et stérile où il y a une pénurie d'eau extrême en été (**Seddiqui et al., 2018**).

Molina et al. (**2005**) indiquent que la culture du safran exige la chaleur et le plein soleil, il favorise un climat méditerranéen continental, avec des hivers frais et des étés chauds et secs.

La plantation s'effectue généralement à la main ou avec les mêmes engins que ceux utilisés pour les pommes de terre ou les oignons (**Branca et Argento, 2010**).

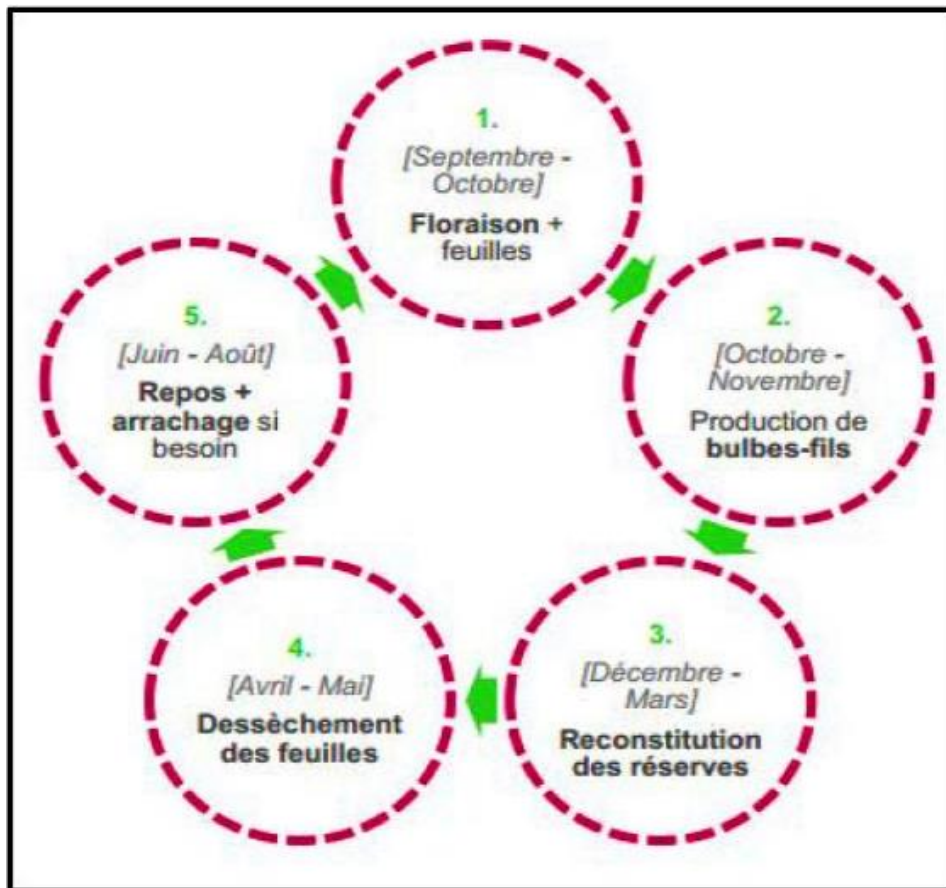


Figure 2 : Cycle de développement annuel de safran (Palomares, 2015).

Une main-d'œuvre qualifiée est exigée pour une bonne récolte de safran, car les stigmates nécessitent une certaine délicatesse pour être prélevés avec précaution, pour être séchés et conservés ensuite loin de l'humidité et de la lumière. Les plants de safran fleurissent après 4 à 6 semaines de la plantation et la floraison dure plusieurs semaines. La durée de vie de la fleur de safran est très courte et limitée (entre 24 et 48 heures). Elle est vite fanée sous l'action du soleil, et ses pistils se décolorent et perdent de leur arôme. La cueillette des fleurs de safran demeure ainsi très délicate.

La fleur est récoltée entièrement en la coupant à la base de sa corolle avant même son ouverture, très tôt, après l'aube et avant la levée de soleil et l'arrivée de sa chaleur, pour éviter le dessèchement des stigmates qui se fait rapidement tout juste après l'ouverture de la fleur si elle est bien exposée aux rayons du soleil. Cependant, on ramasse les fleurs cueillies dans des paniers très solides. Si la cueillette se réalise après l'ouverture entière des fleurs, le safran est considéré alors de second choix, car il perdra ses qualités organoleptiques après son exposition aux rayons et à la chaleur du soleil (Kafi et al. 2002).

Une fois la récolte effectuée, vient l'émondage des fleurs qui consiste à séparer les stigmates de tout le reste de la fleur du safran (Ursat, 1913). En moyenne, 100 fleurs donnent 3g de stigmates frais qui pèsent environ 600 mg après être séchés. Afin d'obtenir un kilo de stigmates

frais, il faut cueillir près de 150 000 fleurs et il faut compter environ cinq kilos de stigmates frais pour avoir un kilo de safran sec utilisé comme épice (Negbi, 1999).

Finalement, il est très indispensable de conserver l'épice de safran, après séchage, à l'abri de l'humidité pour éviter qu'elle perde son arôme et sa couleur, puisqu'elle est très hygroscopique. Il est recommandé de mettre les stigmates dans des bocaux en verre avec des couvercles en liège, ce qui va empêcher l'oxygène de passer à l'intérieur (Ursat, 1913), et l'idéal serait que ces récipients soient hermétiques et sombres, et de les conserver à basse température comprise entre 5 et 10° C (Gresta et al., 2007).

II. Chapitre 02 : Stigmates

1. Propriétés des stigmates

Les stigmates mesurent de 20 à 40 mm, étroits à la base et plus large à l'extrémité, de couleur rouge vif avec un aspect brillant velouté, et possèdent une forte odeur. Ils représentent l'épice de safran commercialisée après séchage (Ferrence, 2004). Ils prennent la forme d'un cornet après être enroulés sur eux-mêmes. et prenant une forme de cornet suite à l'enroulement sur eux-mêmes. Arvy et Gallouin (2003), montrent que l'extrémité des stigmates est renflée et denticulée sur les côtés (Figure 3).

Le safran, comme plante médicinale, a été toujours utilisé pour ses bienfaits carminatifs. Au Moyen-âge, les européens l'utilisaient pour le traitement des infections respiratoires et les maladies de gorge notamment, la toux et aussi le rhume, la scarlatine, la variole, les cancers, l'hypoxie et l'asthme (Sullivan R., 2011).



Figure 3 : Stigmates de safran (Benayache et al., 2013)

2. Composition chimique

Les stigmates de safran se composent de plus de 150 composants : des glucides lipophiles et hydrophiles, des protéines, des acides aminés, des minéraux, du mucilage, de l'amidon, des gommes, des vitamines. Cependant, ces composants chimiques varient selon les conditions de croissance et du pays d'origine (Rios et al, 1996).

Une bonne et exacte classification botanique, avec des stigmates non adultérés et sans déchets floraux, détermine la composition chimique correcte du safran. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) classe en moyenne les résultats de l'analyse chimiques du safran (Benmostefa et Guellil, 2017).

Tableau 2 : Composants des stigmates des fleurs du safran (Benmostefaet Guellil, 2017).

Les composés		Le montant
Eau		9 à 14%
Cellulose		4 à 7%
Lipides	campestérol	3 à 8 %
	stigmastérol	
	β-sitostérol	
Polypeptides		11 à 13 %
Matières minérales		1 à 1.5 %
Composants non azotés		40%
Vitamines	B2 ou riboflavine	56,4 à 138 µg/g
	B1 ou thiamine	4,0 à 0,9 µg/g
Huiles essentielles		0,3 à 2,0% où domine le safranal (60%)
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		

3. Substances bioactives des stigmates

Rios et ses collaborateurs (1996) ont mené plusieurs études analytiques afin d'aboutir à la caractérisation d'un grand nombre de composés bioactifs du safran. Les quatre principaux composés bioactifs du safran sont : la crocine (esters de mono-glycosyl ou di-glycosylpolyène), la crocétine (un précurseur naturel de l'acide caroténoïde dicarboxylique de la crocine), la picrocrocine (monoterpène glycoside précurseur du safranal et produit de la dégradation de lazéaxanthine) et le safranal. Ces composés sont non seulement responsables du profil sensoriel du safran (couleur, couleur, goût et arôme), mais aussi des caractéristiques bénéfiques pour la santé.

3.1. Crocétine

La crocétine est l'un des colorants naturels de la famille des caroténoïdes, mais elle n'a pas la fonction de provitamine. Cette classe regroupe majoritairement les hydrocarbures dont la formule brute est $C_{40}H_{56}$ ou des dérivés oxygénés. Cependant, il y a un petit groupe avec des groupes carboxyliques et acides ne pouvant pas être inclus dans la structure et la définition chimiques générales.

La crocétine (l'aglycone de la crocine), l'acide 8,8-diapo-8,8-caroténoïque est caractérisé par une structure diterpénique et symétrique avec sept doubles liaisons et quatre groupes méthyle.

Il cristallise en aiguilles rouges avec un point de fusion de 285 °C, alors qu'en solution, il a une couleur jaune. Il est légèrement soluble en solution aqueuse basique (20 µm à pH= 8), mais il est très soluble dans les bases organiques, comme la pyridine. Un précipité jaune se forme si sa solubilité est moins de sa concentration (**Christodoulou et al., 2015**).

Les crocétines (α -crocétine ou crocétine I, crocétine II, β -crocétine, γ -crocétine) contenues dans le safran sont issues de la dégradation oxydative du précurseur de la zéaxanthine, après rupture, il donne naissance à la crocétine (**Grilli et Canini, 2010 ; Christodoulou et al., 2015**). Selon plusieurs rapports de recherche, 94% de la crocétine totale du safran existe sous forme de molécules de glycosides et seulement 6% se présentent sous forme de crocétine libre (**Habibi et Bagheri, 1989**). La crocétine est principalement connue pour ses propriétés antioxydantes (en raison de sa structure chimique). Elle représente le constituant le plus récent du safran qui a fait l'objet d'une étude continue, en tant que métabolite de la crocine (**Christodoulou et al., 2015**).

La structure chimique de la crocétine est représentée dans la figure 4.

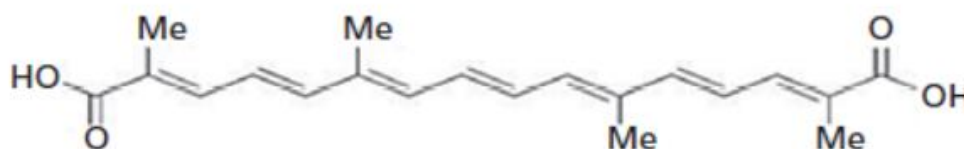


Figure 4 : Structure chimique de la crocétine (**Christodoulou et al., 2015**).

3.2.Crocines

Pfander et Schurtenberger (**1982**) définissent les crocines comme un groupe de caroténoïdes hydrophiles étant des esters polyènes mono- ou diglycosyliques de crocétine dans lesquels le D-glucose et/ou le D-gentiobiose se présentent sous forme de résidus glucidiques.

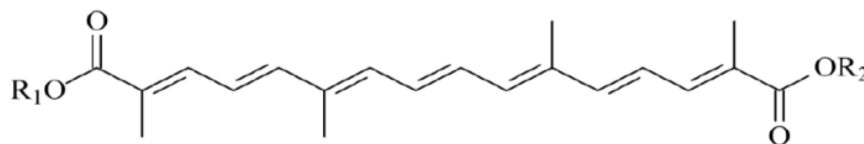
La crocine est en fait de l'acide 8,8'-diapocarotène-8,8'-dioïque, avec une formule chimique de $C_{44}H_{70}O_{28}$ avec une masse moléculaire de 976,96 g/mol (**Samarghandian et Borji, 2014**). La crocine est d'une couleur rouge foncée et de forme des cristaux (**Bolhasani et al., 2005**). La crocine se dissout rapidement dans l'eau pour former une solution de couleur orange, ce qui lui confère la propriété de colorant alimentaire naturel.

En plus d'être un excellent colorant, elle est considérée comme antioxydant qui atteint les radicaux libres, en protégeant les cellules et les tissus contre l'oxydation (**Assimopoulou et al., 2005; Papandreou et al., 2006; Soeda et al., 2007**).

Les crocines représentent environ 6 à 16% de la matière sèche totale du safran, cette quantité dépend de la variété, des conditions de croissance et des méthodes de transformation (**Gregory et al., 2005**). Hautement soluble dans l'eau, l'ester di- β -D-gentiobiosyle de la crocine ou de la

crocétine-all-trans possède la plus grande capacité de coloration, en comparant aux autres caroténoïdes du safran (**Tarantilis et al., 1995**), bien qu'elle soit également soluble dans le méthanol et l'éthanol.

La structure chimique de la crocine est représentée dans la figure 5.



R1 et R2 peuvent être H, glucose ou gentiobiose.

Figure 5 : Structure chimique de la crocine (**Lechtenberg et al., 2008**).

3.3.Picrocrocine

C'est un glycoside monoterpénique et précurseur des composants de l'arôme du safran (safranal) son nom est le 4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-1-cyclohexen-1-carboxaldéhyde (HTCC).

Cette molécule représente le deuxième composant le plus abondant (environ 1 à 13% de la matière sèche du safran) (**Samarghandian et Borji, 2014; Pitsikas, 2016; Grilli et Canini, 2010**). Elle est glycosidée, n'a pas d'odeur ni de couleur et, est responsable de la saveur amère du safran.

La picrocrocine est soluble dans les solvants polaires, mais est insoluble dans les solvants apolaires. Elle est plus soluble dans l'eau que dans une solution alcoolique (eau/alcool) (**Alonso et al., 2001**).

La structure chimique de la picrocrocine est représentée dans la figure 6.

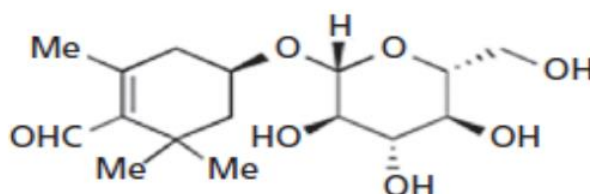


Figure 6 : Structure chimique de la picrocrocine (**Christodoulou, 2015**).

3.4.Safranal

Le safranal (2,6,6-triméthyl-1,3-cyclohexadiène-1-carboxaldéhyde) est un aldéhyde monoterpénique et aglycone de picrocrocine à une masse moléculaire de 150. 21 g/mol.

Ce composé est responsable de l'arôme du safran et composant principal de l'huile essentielle distillée de safran et il n'est pas présent dans les stigmates frais, mais se forme à partir de l'action de la β -glucosidase sur la picrocrocine au cours de la déshydratation

(chauffage combiné à une action enzymatique) et de stockage (**Carmona et al., 2006; Maggi et al., 2010**). Les chercheurs Kuhn et Winterstein (**1933**), qui furent les premiers à l'obtenir à partir de l'hydrolyse de la picrocrocine. Il est le composant volatil le plus abondant du safran (> 60% de la huile essentielle) (**Roedel et Petrzika, 1991 ; Tarantilis et Polissiou, 1997**).

Le safranal comprend environ 30 à 70% d'huile essentielle et 0,001 à 0,006% de matière sèche de safran (**Maggi et al., 2009**). Il a été également démontré qu'il possède un potentiel antioxydant élevé (**Assimopoulou et al., 2005 ; Kanakis et al., 2007**) ainsi qu'une cyto-toxicité envers certaines cellules cancéreuses *in vitro* (**Escribano et al., 1996**).

La structure chimique du safranal est représentée dans la figure 7.

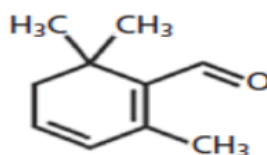


Figure 7 : Structure chimique du safranal (**Christodoulou et al., 2015**).

III. Chapitre 03 : Résidus du safran, les pétales

1. Définition des pétales du safran

Le pétale de safran est le principal sous-produit de la transformation du safran. Il contient plusieurs composés tels que des agents minéraux, anthocyanes, flavonoïdes, glycosides, alcaloïdes et kaempférol (**Hosseini et al., 2018**).

Les pétales font partie des matières premières plus abordables que les stigmates, quoiqu'ils ne sont pas considérés comme une herbe médicinale utilisée traditionnellement, des chercheurs se penchent sur leur potentiel dans divers traitements.

2. Composition chimique des pétales de safran

L'analyse chimique des pétales de safran a démontré la présence des protéines 10,20%, les graisses 5,3%, les cendres 7,00% et les fibres 8,80% (**Fahim et al., 2012**), ils sont également riches en composés phénoliques (**Ramin, 2013**), dont les flavonoles (kaempférol 12,6%) (**Hadizadeh et al., 2003 ; Zeka et al., 2015**), les caroténoïdes (crocine, 0,6 % et crocétine) (**Zeka et al., 2015**), les anthocyanines environ 1712.19mg/l ce qui donnent la couleur violette des pétales (**Khazaei et al., 2015**), et les terpénoïdes tels que les crocusatines (**Li et al., 2004**), les alcaloïdes (**Termentzi et Kokkalou, 2008**), et les tanins (**Hosseinzadeh et Younesi, 2002**). La teneur en minéraux des pétales du safran est indiquée dans le tableau 3 (**Fahim et al., 2012**).

Tableau 3: Les compositions minérales des pétales de safran (**Fahim et al., 2012**)

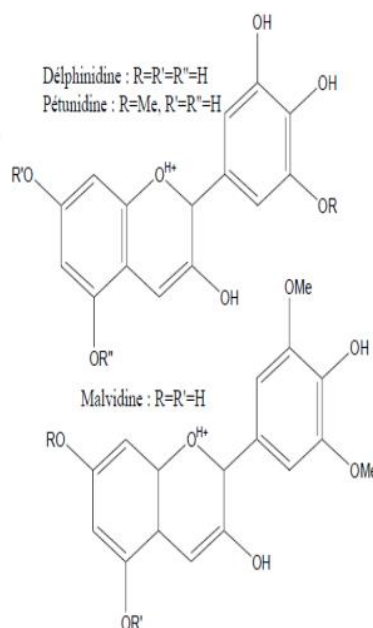
Les composés	Le montant
Sodium (Na)	25.75mg/100g
Potassium (K)	542.13 mg/100g
Calcium (Ca)	486.25 mg/100g
Cuivre (Cu)	0.87 mg/100g
Fer (Fe)	17.99 mg/100g
Magnésium (Mg)	2.93 mg/100g
Zinc (Zn)	1.80 mg/100g
Phosphore (P)	209.90 mg/100g

2.1. Les pigments

Saito (**Saito et al., 1960**) a déterminé la présence de deux anthocyanines violettes dans les pétales de safran et Garrido et ses collaborateurs (**1987**) ont identifié dans un extrait aqueux de pétales trois flavonols: la myricétine aglycones, la quercétine et le kaempférol. Pour classer les espèces de safran (taxonomiques) une recherche a été menée dans le but d'extraire et d'identifier les anthocyanes et les flavonoïdes présents dans les pétales de safran, comme le montre la figure 8 (**Norbek et Kondo, 1998**).

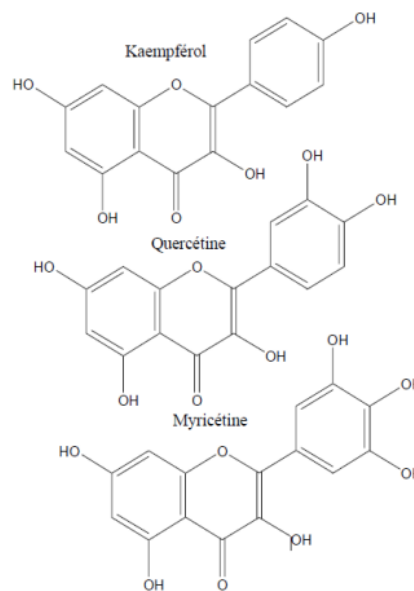
Anthocyanines (%)*

- Delphinidine-3,5-di-O-β-glucoside (>30%)
- Pétunidine-3,5-di-O-β-glucoside (>10%)
- Delphinidine-3-O-β-rutinoside (>10%)
- Pétunidine-3-O-β-rutinoside (<5%)
- Delphinidine-3-O-β-glucoside-5-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (<5%)
- Pétunidine-3,7-di-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (>10%)
- Malvidine-3,7-di-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (<5%)



Flavonoïdes (%)*

- Quercétine-3-O-β-sophoroside (>40%)
- Kaempférol-3-O-β-sophoroside (>20%)
- Myricétine-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside
- Quercétine-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside
- Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside
- Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-(6-O-malonyl) glucoside
- Kaempférol-3-O-α-(2,3-di-O-β-glucosyl) rhamnoside
- Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-(6-O-acétyl) glucoside
- Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside



* numéros cas (délphinidine [528-53-0], kaempférol [520-18-3], quercétine [117-39-5] et myricétine [529-44-2])

Figure 8 : Anthocyanines et flavonoïdes présents dans les pétales des fleurs du safran

3. Les effets thérapeutiques et pharmacologiques des pétales de safran

Plusieurs indiquent que les pétales du safran ont une activité antinociceptive et anti-inflammatoire et ceci peut être dû à présence des flavonoïdes, tanins, anthocyanines, alcaloïdes et saponines (**Hosseinzadeh et Younesi, 2002**).

Les pétales de safran possèdent aussi des effets antidépresseurs similaires aux stigmates, et cette activité dépend de kaempférol qui est un composé actif (**Basti et al., 2006; Hosseinzadeh et al., 2007**).

De même l'extrait des pétales du safran aurait des vertus antidiabétiques et permet de prévenir la néphropathie induite par les streptozotocines. Les chercheurs ont noté une

diminution de l'urée, du taux d'azote uréique du sang et de la glycémie (**Zarezadeh M et al., 2017**).

Concernant l'effet antioxydant la plupart des médicaments à base de plantes contiennent des composés antioxydants. Une étude a montré que les pétales de safran augmentent la teneur en antioxydants par l'élimination des radicaux libres et la réduction des dommages cellulaires (**Ardalan et al., 2012**).

Concernant l'extrait méthanolique des pétales de safran a montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia Coli*, *Shingella*, cet effet lié à la présence de composés phénoliques (**Asgarpanah et al., 2013**).

D'après une étude, l'extrait des pétales de safran a réduit la toxicité rénale par la réduction des taux d'acide urique et de créatinine ce qui lui donne une activité néphroprotecteur (**Omid et al., 2015**). Les pétales de safran ont aussi des effets protecteurs sur les syndromes métaboliques et réduisent les risques de l'obésité, l'hypertension et le diabète (**Hosseini et al., 2018**).

Aussi les niveaux de sodium (Na) et de potassium (K) détectés suggèrent que les pétales de safran pourraient s'avérer utiles pour la diminution de la pression artérielle élevée (**Fahim et al., 2012**).

Enfin Le safran a été efficace pour réduire les taux élevés de lipides pendant un stress hyperlipidémie (**Asdaq et al., 2009**).

4. Utilisation du pétale de safran en cosmétologie et en parfumerie

De nos jours, Divers résultats de recherches indiquent que les pétales de safran sont riches en crocine et en kaempférol, ce qui représente une source importante de composés bioactifs pour des applications potentielles. Le kaempférol, représentant ainsi une source importante de composés bioactifs pour des formulations cosmétiques potentielles (**Ahrazem et al., 2017**). En outre ses propriétés antioxydantes, la fleur de safran présente de nombreux intérêts pour les applications cosmétiques.

En effet les pétales sont connus pour leurs effets anti UV qui protègent la peau des rayons UV dangereux. Et ceci grâce à la présence des molécules anti oxydante (crocine, safranal, crocétine) (**Mirhadi et al., 2019**).

Les pétales contiennent aussi des terpénoïdes, tels que les crocusatines, qui ont une action anti-sébacé (**Li et al., 2004**).

Et les pétales de safran ont des effets antioxydants dérivés des composés de kaempférol, la crocine, la crocétine et le safranal, alors que ces composés éliminent les rides dues à l'âge et au stress (**Kerscher et al., 2011 ; Bernad et al., 2020**).

La fleur de safran est connue, également, pour réduire la mélatanine dans laquelle des taches

brunes apparaissent (**Moshiri et al., 2015**). La fleur de safran contient des composés de crocine qui peuvent inhiber l'activité de l'enzyme tyrosinase en endommageant les liaisons hydrogène dans la tyrosinase, ce qui provoque un réarrangement et des changements de conformation de l'enzyme (**Pinon et al., 2011**).

5. La toxicité du pétale de safran

Les doses thérapeutiques ne présentent pas de toxicité significative dans les études cliniques et expérimentales, c'est donc la quantité qui cause la toxicité (**Bostan et al., 2017**). Ceci est confirmé par une expérience dans laquelle, l'examen pathologique a montré des lésions du foie et des poumons chez les animaux ayant reçu des fortes doses du pétale de safran (**Karimi et al., 2010**). (Jusqu'à 3,6 g/kg durant deux semaines). Les extraits de pétales de safran réduisent le poids corporel, l'hématocrite, l'hémoglobine et les érythrocytes, également (**Hosseini et al., 2018**). Selon les études toxicologiques, la toxicité du stigmaté est plus élevée que le pétale de safran (**Hosseini et al., 2018**).

Synthèse bibliographique

IV. Chapitre 04 : Activité biologique du pétale safran

Les composés bioactifs des pétales de safran ont un rôle crucial en pharmacognosie, ce qui a été le résultat de plusieurs études sur leurs propriétés physico-chimiques et biochimiques. Plusieurs recherche ont démontré leurs effets sur le cancer, leurs propriétés antioxydantes, leur effet sédatif, etc (**Premkumar et Ramesh, 2010; Mokhtari-Zaer et al., 2020**).

Actuellement, le pétale de safran est utilisé comme agent organique dans les industries agricoles (**Astarei et al., 2006**). Les études phytochimiques ont signalé la présence de flavonoïdes et d'anthocyanines dans le pétale de safran qui ont montré des effets bénéfiques en tant que composés supplémentaires (**Zeka K. et al.,2015**). Le pétale de safran a été, traditionnellement, consommé comme anti-tumoral et antidépresseur antispasmodique, stomachique, curatif de l'anxiété. En fonction de ses propriétés économiques, de ses composés phyto-chimiques et de son utilisation traditionnelle, le safran peut être utilisé dans différents domaines médicaux (**Mortazaviet al., 2012**).

Une étude a montré l'activité anti-oxydante du pétale de safran chez des agneaux en utilisant la méthode des radicaux libres 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Les extraits de pétales de safran ont été administrés par gavage à des doses de 500, 1000 et 1500 mg/kg pendant 15 jours. Au dernier jour de l'essai, les résultats ont montré que le pétale de safran augmentait la teneur en antioxydants à toutes les doses (**Ardalan et al., 2012**). Et grâce à ces propriétés anti-oxydantes, le pétale de safran hydro-alcoolique a réduit la toxicité du cisplatine qui est un médicament chimio-thérapeutique, induisant une hépto-toxicité et, dont l'effet secondaire est lié au stress oxydatif et à la production de ROS, qui endommagent la membrane cellulaire (**Cersosimo, 1993 ; Robbins et al., 2002**). L'effet du pétale du safran a été démontré dans une étude où des rats ont reçu du cisplatine (0,4 mg/kg) pendant 8 semaines et du pétale de safran hydro-alcoolique (80 mg/kg) a été gavé pendant 8 semaines. Le cisplatine a réduit les enzymes anti-oxydantes, augmenté le malondialdéhyde (MDA) et provoqué des lésions hépatiques (**Mohajeri, 2011**). D'autres recherches ont encore prouvé que les pétales de safran sont des hépto-protecteurs, dans une étude menée sur le tétrachlorure de carbone (CCl₄), étant un agent toxique pour le foie et entraînant des lésions par dégénérescence graisseuse, nécrose cellulaire, fibrose et cirrhose (**Manibusan et al., 2007**). Les antioxydants et les piègeurs de radicaux libres peuvent protéger les cellules hépatiques contre l'hépto-toxicité induite par les produits chimiques (**Kamalakkannan et al., 2005**). L'extrait aqueux de pétales a été administré à la dose de 1 g/kg après 1 et 6 heures d'injection de CCl₄. Les niveaux d'alanine aminotransférase (ALT) et d'aspartate aminotransaminase (AST) ont diminué après le traitement par les extraits éthanoliques et aqueux de pétales. Les études histo-pathologiques ont également montré que les extraits de pétales réduisaient les lésions hépatiques induites par le CCl₄. Les propriétés anti-

Synthèse bibliographique

oxydantes du pétale ont réduit la fonction du cytochrome P450 pour la génération de métabolites du CCl₄ sous forme de radicaux libres (**Iranshahi, 2001**).

Babaei A. et ses collaborateurs (**2014**) ont démontré dans une étude menée sur des rats ayant reçu de l'extrait de pétales de safran à des doses de 0, 75, 150, 225 et 450 mg/kg pendant 14 jours, aucune différence n'a été observée entre les groupes traités et le groupe témoin en ce qui concerne les paramètres hématologiques tels que les globules rouges (GR), l'hémoglobine, l'hématocrite et les plaquettes. L'extrait de pétales de safran a augmenté les IgG à la dose de 75 mg/kg par rapport aux autres groupes. Les résultats de la pathologie n'ont révélé aucune lésion de la rate. Cette étude a montré que le pétale de safran avait un effet immunostimulant à la dose de 75 mg/kg.

De plus, l'activité anti-tumorale des pétales de safran a été évaluée en utilisant des crevettes de saumure et des disques de pomme de terre. Les résultats ont montré que les valeurs IC₅₀ des extraits de safran étaient de 5,3mg/ml pour les extraits de pétales contre les tumeurs (**Hosseinzadeh et al., 2005**).

D'autre part, chez des rats diabétiques avec streptozotocine (STZ) qui est un composé toxique pour les cellules β du pancréas et entraîne une baisse du taux d'insuline et une augmentation de la glycémie (**Lenzen, 2008**). Dans ce cas, l'extrait de pétales de safran a été administré par voie orale à des doses de 100 ou 200 mg/kg pendant 28 jours. Le STZ a augmenté la glycémie à jeun (FBS), le volume d'urine, l'azote uréique du sang (BUN) et les niveaux de créatinine (Cr). L'extrait à la dose de 200 mg/kg a réduit le FBS, tandis que le volume d'urine et le niveau d'azote uréique sanguin ont diminué avec les deux doses. Le niveau de Cr n'a pas été modifié par le pétale de safran. L'extrait a également amélioré les dommages histologiques induits par le STZ. Selon cette étude, l'extrait protège contre la néphropathie induite par le STZ (**Zarezadeh et al., 2017**).

Les études ont montré l'efficacité des pétales sur l'obésité et des études menées sur des rats en surpoids l'ont confirmé. Les rats ont été soumis à un régime riche en graisses pendant 10 semaines. Ensuite, le stigmate de safran (40 mg/kg), le pétale (80 mg/kg) et la combinaison des deux (80 mg/kg) ont été administrés par gavage aux rats pendant 3 semaines. Les résultats ont montré que les extraits réduisaient le cholestérol total, les triglycérides et le LDL, tout en augmentant les niveaux de HDL. Les extraits ont également réduit l'indice d'athérosclérose (LDL/HDL), l'indice athérogène (TC/HDL) et les enzymes hépatiques, notamment l'ALT, l'AST et la phosphatase alcaline (ALP). Les niveaux de leptine et d'insuline ont été réduits par les extraits de safran. Les résultats indiquent que les extraits de safran augmentent le niveau d'antioxydants, tout en réduisant la peroxydation des lipides. Cependant, les extraits ont amélioré la dyslipidémie chez les rats obèses en réduisant l'athérosclérose et la résistance à l'insuline

Synthèse bibliographique

(Hoshyar et al., 2016).

L'effet de l'extrait de pétales de safran a été étudié aussi, sur la pression sanguine de rats anesthésiés. Les extraits aqueux et éthanoliques de l'extrait de pétale de safran ont réduit la pression artérielle à la dose de 50 mg/100g. La réduction de la pression artérielle pourrait être liée à l'effet des pétales sur le cœur ou la résistance périphérique. Dans cette étude, l'administration de l'extrait n'a pas modifié la fréquence cardiaque. Cependant, les résultats ont montré que l'effet de l'extrait sur la résistance périphérique est un facteur important dans la diminution de la pression artérielle **(Fatehiet al., 2003).**

Les pétales de safran étant un bon rénoprotecteur aussi car, dans une autre étude, de l'acétaminophène a été injecté à des rats à raison de 600 mg/kg. L'extrait de pétales de safran a également été administré à des doses de 10 et 20 mg/kg pendant 8 jours. L'acétaminophène a augmenté les taux de créatinine et d'acide urique ainsi que les changements pathologiques dans les reins. L'extrait à forte dose a réduit la toxicité rénale par la réduction des taux d'acide urique et de créatinine **(Omid A et al., 2015).**

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1. Préparation de l'extrait

1.1. Préparation des pétales de safran

Les pétales de safran ont été récoltés de la région d'Ain Fezza Willaya de Tlemcen. Elles ont été séchées à l'ombre et à température ambiante. Une fois totalement sèche, les pétales sont moulus en poudre fine (Figure 9).

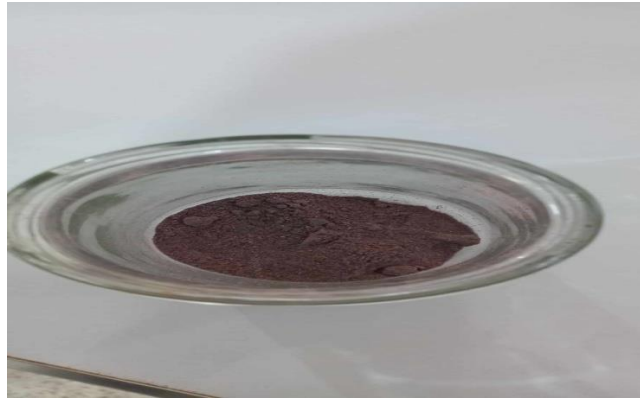


Figure 9 : Photographie de la poudre des pétales de safran

1.2. Extraction des composés phénoliques des pétales de safran

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

1.2.1. Préparation de la solution aqueuse

Pour la macération, le solvant utilisé est l'eau distillée. Pour cela, 50g de pétales de safran séchées et moulues sont mises dans un bécher, puis 400ml d'eau distillée sont ajoutées au bécher. la préparation est conservée au réfrigérateur pendant 72heures à 4°C pour une macération froide.

La préparation est filtrée par la suite avec du papier filtre standard.

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

Matériels et méthodes



Figure 10 : Photographie de la solution après séchage

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

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

Où :

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

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

L'extrait sec obtenu est pesé et récupéré par 3 ml d'eau physiologique, puis conservé à 5°C jusqu'à leur utilisation.

2. Détermination de l'activité cytotoxique, anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits de pétales de safran

2.1. Préparation de la suspension des GR humains

Des échantillons de sang frais (environ 8 ml) sont récupérés dans des tubes héparinisés, au niveau du laboratoire, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires entre 20 et 45 ans. Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de GR est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume est mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GR), avec une solution isosaline et utilisé immédiatement (Figure 11).

Matériels et méthodes

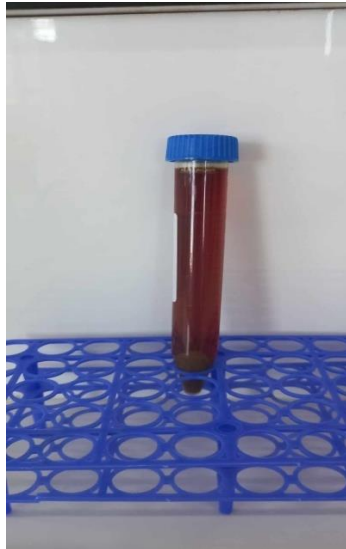


Figure 11 : Photographie de la suspension des GR à 10%

2.2. Test de cyto-toxicité de l'extrait

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

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

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

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

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

Où : **Ac** = Absorbance du contrôle positif ; **At** = Absorbance du test.

Matériels et méthodes

2.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, des extraits aqueux par la méthode de stabilisation membranaire des GR

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

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

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

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

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

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

2.4. Activité Anti-inflammatoire des extraits aqueux de pétales de safran

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

Mode opératoire : La méthode consiste à préparer quatre solutions :

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

Matériels et méthodes

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

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

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

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

Résultats et Interprétation

Résultats et Interprétation

Rendements

Le calcul du rendement est réalisé pour la macération concernant le pétale de safran dans l'eau, il est de 13%.

1. Activité cyto-toxique de l'extrait aqueux du pétale de safran

Le test *in vitro* de cyto-toxicité représenté par le pourcentage d'hémolyse des GR est effectué en utilisant des GR d'un donneur sain en bonne santé. Plusieurs concentrations de l'acide gallique (polyphénol de référence) et un extrait aqueux sont testés. Le pourcentage de l'hémolyse est calculé en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des GR par hémolyse, en comparant au contrôle négatif (C-, solution de GR dans de l'eau physiologique, avec un taux d'hémolyse très faible, 15%) et au contrôle positif (C+, solution de GR dans de l'eau distillée dans le but de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau A.1 dans les annexes et la figure 12.

Nos résultats montrent que la cyto-toxicité est minimale à la concentration de 50 µg/mL et elle est dose-dépendante c'est-à-dire elle est directement proportionnelle à la concentration. Plus cette dernière augmente et plus nous avons une cyto-toxicité significative.

L'acide gallique a un effet hémolytique de 54.13% à la concentration de 150 µg/mL comparé à l'extrait aqueux des pétales de safran qui le dépasse avec ses 55%, donc, on remarque que l'effet des extraits aqueux des pétales de safran est similaire à celui de l'acide gallique.

On peut alors constater que la concentration de 50 µg/mL demeure la meilleure pour une activité cyto-toxique élevée de l'extrait aqueux des pétales.

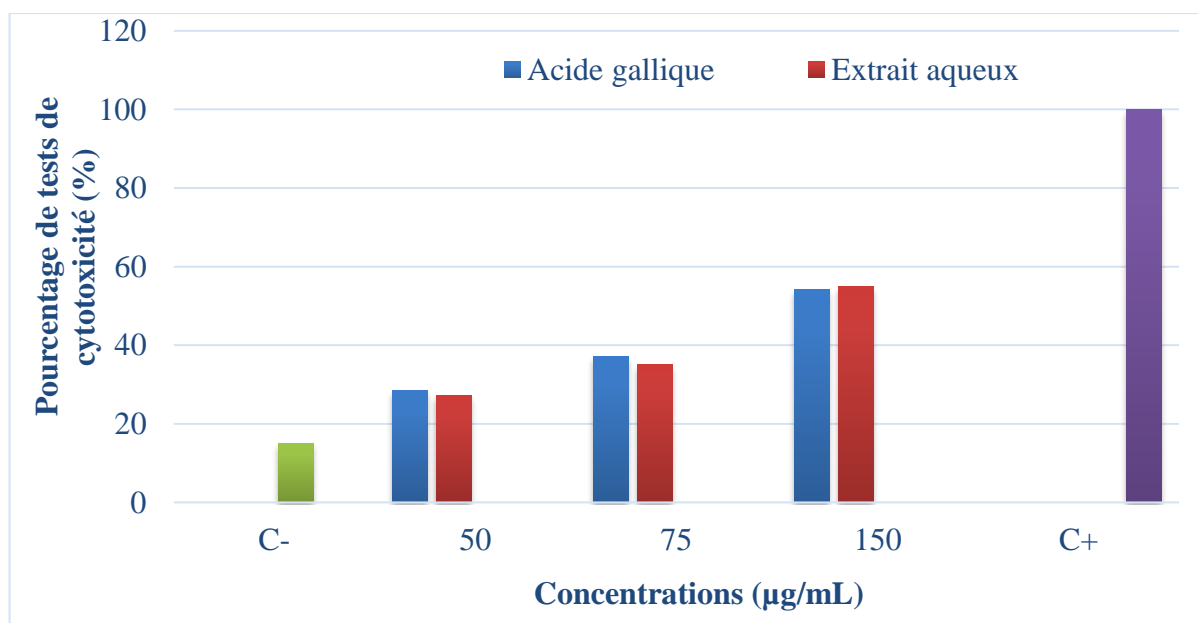


Figure 12 : Comparaison des pourcentages de tests de cytotoxicité entre l'acide gallique et les extraits aqueux du pétale de safran.

Résultats et Interprétation

C- : 15% ; C+ : 100%

2. Activité anti-hémolytique (stabilisation membranaire des GR) de l'extrait aqueux du pétale de safran

La méthode de stabilisation de la membrane des GR a été utilisée dans le test afin de réaliser l'étude de l'activité anti-hémolytique *in vitro* de l'extrait aqueux des pétales de safran.

La stabilisation membranaire est évaluée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour la concentration de l'extrait aqueux utilisé et en le comparant à l'acide gallique étant un polyphénol à activité anti-hémolytique.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau A.2 dans les annexes et dans la figure 13.

Nos résultats montrent que les extraits aqueux ont un effet anti-hémolytique meilleur à la concentration de 50 µg/mL, et diminue plus la concentration augmente, d'où l'augmentation de l'hémolyse.

L'acide gallique représente un effet anti-hémolytique fort (65.63%) à la concentration de 50 µg/mL qui est un peu plus grand, en comparaison avec l'extrait aqueux des pétales de safran (52.26%). Cet effet anti-hémolytique diminue à un taux de 37,18 % à la concentration de 75 µg/mL et arrive à 28.44 % à la concentration de 150 µg/mL et s'approche des extraits de pétales de safran, plus la concentration augmente (Figure 13).

Le taux alors, d'hémolyse des GR de l'acide gallique est plus qu'avec les extraits aqueux des pétales de safran. On remarque que quelque soit la concentration utilisée, l'acide gallique dépasse toujours les extraits aqueux des pétales de safran.

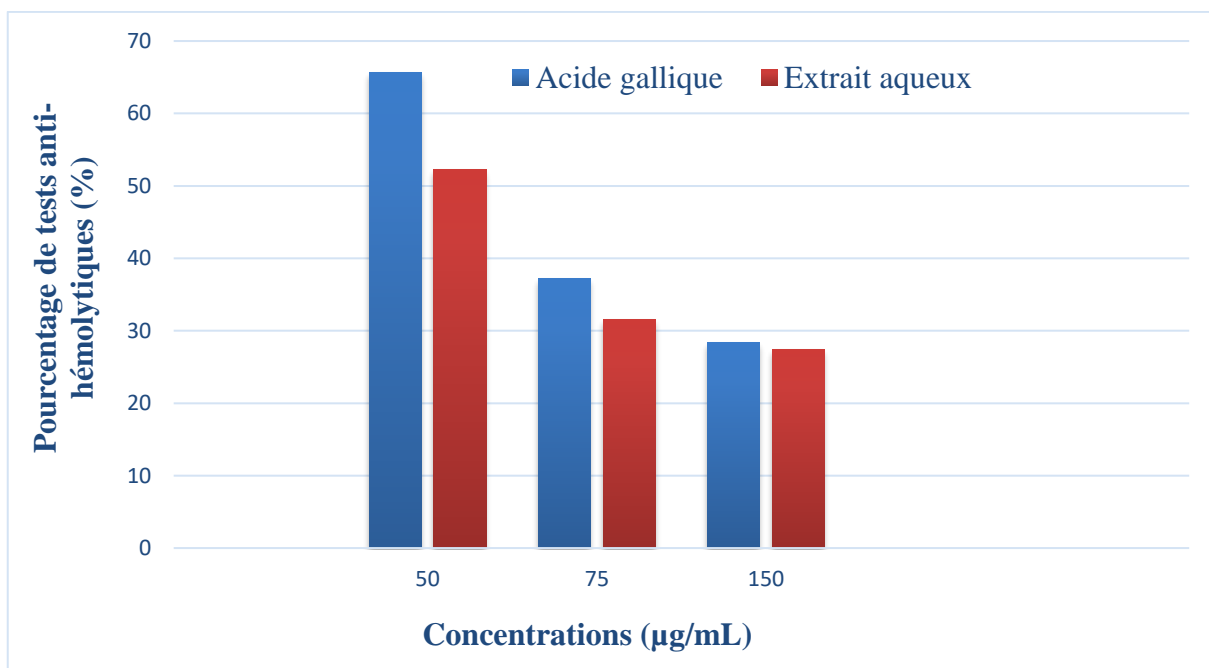


Figure 13 : Comparaison des pourcentages de l'hémolyse des GR par l'extrait aqueux des pétales de safran

Résultats et Interprétation

3. Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux du pétale de safran

La méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire de l'extrait. La protéine utilisée pour ces tests est le sérum albumine bovine (SBA).

Les résultats de l'inhibition de la dénaturation de la SBA sont donnés dans le Tableau A.3 dans les annexes et la figure 14.

L'activité anti-inflammatoire d'extrait aqueux des pétales de safran, a été interprétée en histogramme dans la figure suivante (Figure 14), comparant à l'activité du diclofénac, à savoir qu'il est un médicament anti-inflammatoire.

Nos résultats montrent qu'à une concentration de 50 μ g/mL, les pourcentages des tests des extraits aqueux et du diclofénac sont presque égaux tandis qu'à une concentration de 75 μ g/mL, les extraits aqueux sont d'une activité anti-inflammatoire supérieure à celle du diclofénac (96.15%), or en atteignant une concentration double de 150 μ g/mL, on constate que le pourcentage des extraits aqueux diminue. D'où, 75 μ g/mL est la meilleure pour une activité anti-inflammatoire optimale des pétales de safran.

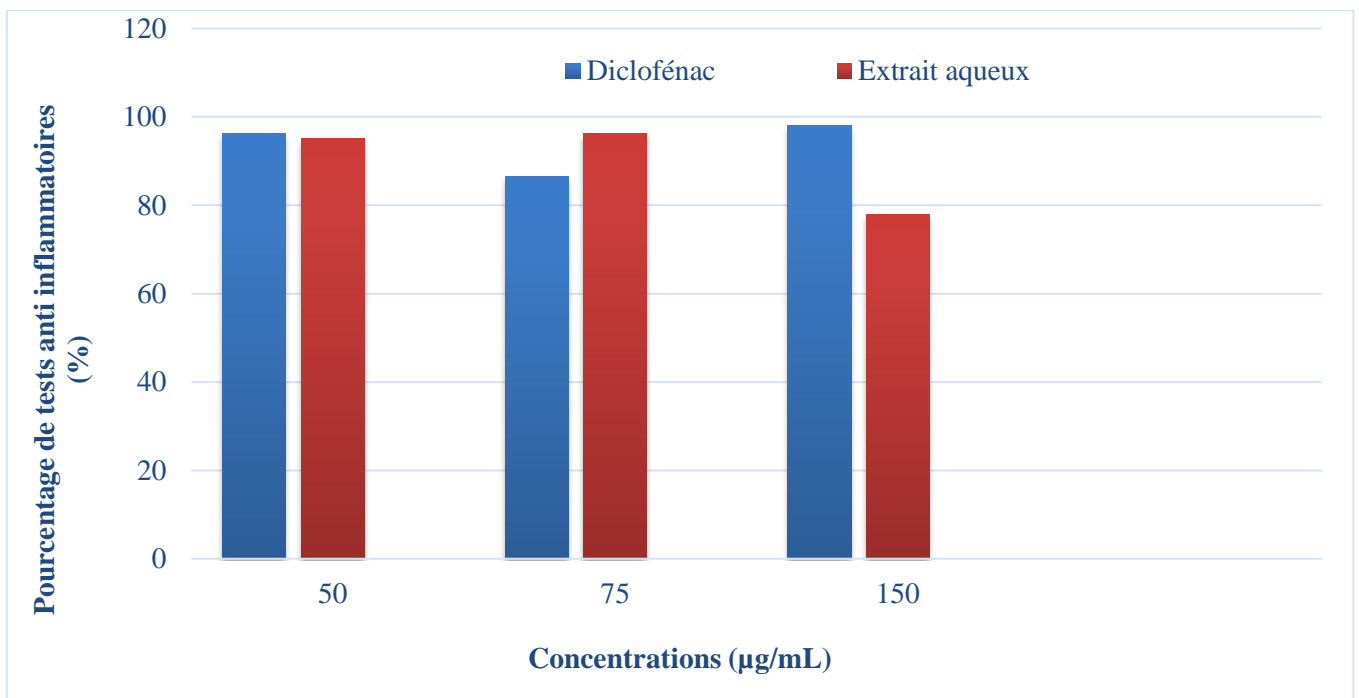


Figure 14 : Comparaison des pourcentages de tests anti inflammatoires entre le diclofénac et les extraits aqueux du pétale de safran

Discussion

Discussion

Le safran est une épice bien connue, produite depuis longtemps, principalement dans le bassin méditerranéen. Au cours des dernières années, le safran a été considéré comme une culture alternative pour la diversification de l'agriculture et une nouvelle source de revenus, du fait de son prix élevé (**Matteo et al., 2020**). L'intérêt médicinal et thérapeutique du safran est dû à sa riche composition en polyphénols, en flavonoïdes et tanins (**Al-faraji, 2017**).

Les recherches, aujourd'hui, se concentrent sur les qualités que possède le safran dans le but de découvrir ses composés bioactifs, bien que les stigmates ne représentent qu'une très faible partie de la plante, elle demeure la partie la plus étudiée par les scientifiques et pourtant, les pétales n'ont été que très peu étudiés.

Les pétales constituent les bio-résidus les plus abondants du safran. Comme ils sont source naturelle de polyphénols aux propriétés antioxydantes, ils pourraient être transformés pour générer de précieux produits de bioraffinerie pour des applications dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires et devenir une nouvelle source de revenus tout en réduisant les biodéchets (**Matteo et al., 2020**).

Cette étude a pour but d'évaluer les activités biologiques des pétales de safran dont l'activité cytotoxique, anti-hémolytique et anti inflammatoire qui peuvent présenter des caractéristiques similaires à celles des stigmates. En effet, l'importance du safran pour différents types de maladies dans la médecine populaire est bien connue (**Lautenschläger et al., 2013**). Cependant, les fleurs de safran sont considérées comme déchets utilisées uniquement comme engrais. Des rapports récents ont identifié une activité pharmacologique dans des extraits de pétales de safran (**Hosseinzadeh et al., 2002 ; Fatehi et al., 2003**). Cela appelle à des études plus approfondies, notamment en tant qu'agent chimiothérapeutique prometteur dans le traitement du cancer à l'avenir (**Somayeh, 2015**).

Dans notre étude, nous avons utilisé l'extrait aqueux des pétales de safran. Il est difficile d'aboutir à une comparaison exacte aux résultats de la bibliographie vu la variabilité des paramètres, car le rendement dépend de plusieurs paramètres tels que les propriétés chimiques de la plante étudiée, le solvant utilisé et l'humidité.

Le rendement de l'extrait aqueux du pétale de safran est de 13%. Nos résultats sont presque similaires à d'autres études, qui ont obtenu un pourcentage de 16.045% (**Belarbi et Belabasse, 2022**).

La présence des polyphénols est plus importante dans la fraction aqueuse comparativement à d'autres fractions méthanolique et éthanolique, ceci peut être expliqué du fait que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles (**Belarbi et Belabasse, 2022**).

En ce qui concerne la cyto-toxicité, elle est la capacité d'un matériau d'essai (agent biologique ou

Discussion

chimique) à causer des dommages aux membranes des cellules vivantes ou la mort des cellules, altérant ainsi la viabilité des cellules. Les tests de cyto-toxicité reposent sur un raisonnement simple comme le reflet d'un dommage chimique aux membranes cellulaires et corrèle cette mesure à des critères de stimulation établis. L'un des avantages de ce test est qu'il est facile à réaliser et que les matériaux sont facilement disponibles, tels que les GR (**Singleton et al., 1994**). Ainsi, selon Novaes et ses collaborateurs, l'étude de la cyto-toxicité des extraits de végétaux, *in vitro*, est souvent effectuée en utilisant le GR comme modèle.

De plus, les GR sont très sensibles aux substances chimiques et toute toxicité se manifeste par une cytolysse et hémolyse. Cette dernière entraîne la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant, ce qui peut être détecté visuellement par l'apparition d'une teinte rose à rouge (**Lee et Feldman, 1997**).

Nos résultats démontrent une bonne diminution de la toxicité à des concentrations de 50 et 75 µg/mL, respectivement. Cet effet est similaire à celui de l'acide gallique qu'est la molécule de référence dans ce test. Cependant, les extraits aqueux du pétale de safran, ont un effet de cyto-toxicité dépendant de la concentration de la matière végétale, de la méthode utilisée pour l'extraction et de la durée d'exposition de ce dernier dans le solvant.

Ces résultats peuvent être expliqués du fait qu'à une concentration élevée, parmi les constituants de plantes, les flavonoïdes sont induits dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et l'augmentation de la conductimétrie et donc l'hémolyse des érythrocytes, à cause des effets pro-oxydants qu'ils peuvent susciter (**Galati et al., 2002**).

Aussi, d'autres études ont constaté que le safran peut inhiber la croissance de certaines cellules pathogènes comme les cellules cancéreuses (**Feizzadeh et al., 2008**).

Par ailleurs, dans d'autres recherches, d'après (**Hosseini et al., 2018**) et selon les études toxicologiques, si l'on prend les stigmates de safran par exemple, leur toxicité, est plus importante que celle des pétales. Selon cette étude, les pétales de safran peuvent être utilisés comme médicament alternatif ou complémentaire en médecine.

Toutefois, maintes recherches ont prouvé que les extraits de plantes médicinales sont très efficaces sur la stabilisation de la membrane du GR (**Sadique et al., 1989; Oyedapo et al., 2010 ; Gadamsetty et al., 2013**). La méthode anti-hémolytique des GR est donc, la meilleure méthode pour déterminer, *in vitro*, le pourcentage de la stabilisation membranaire (**Oyedapo et al., 2010**). La membrane érythrocytaire ressemble à la membrane lysosomale, dont la stabilisation est importante afin de limiter la réponse inflammatoire, qui empêche la libération de constituants lysosomaux de neutrophiles activés, comme les enzymes bactéricides et les protéases, ce qui provoque une inflammation tissulaire et des dégâts, suite à une libération cellulaire supplémentaire (**Murugasan et**

Discussion

al., 1981).

L'activité anti- hémolytique des extraits de plantes dépend de leur composition chimique et aussi de leurs concentrations (**Costa-Lotufu et al.**, 2005).

Selon les résultats obtenus avec l'extrait aqueux, plus la concentration diminue les pétales de safran ont un meilleur effet anti-hémolytique, la concentration de 50 µg/mL demeure la mieux considérée, similaire à celle de l'acide gallique dont l'effet est proche de celui de l'extrait des pétales et diminue à des concentrations élevées.

Ces résultats peuvent être expliqués du fait que les GR sont considérés comme une cible majeure pour les radicaux libres à cause de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines actives, qui sont des promoteurs puissants d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahimzadeh et al.**, 2009).

D'autres études ont également démontré que l'extrait de safran obtenu à partir de la fleur contenait de grandes quantités de composants poly-phénoliques qui peuvent réduire efficacement l'activité des radicaux libres et fournir une forte protection sur différentes cellules contre certains dommages oxydatifs, mais cette protection est dose-dépendante. Il a été démontré aussi que le safran est une excellente source d'antioxydants, possède une capacité antioxydante supérieure à celle du raisin blanc (**Makhlouf et al.** 2011). L'activité anti-hémolytique du safran et de ses ingrédients est également étudiée chez Khalili et ses collaborateurs (**Khalili et al.**, 2014), qui ont constaté que l'extraction de safran inhibait fortement l'hémolyse induite par H₂O₂ dans le sang des souris. Cette découverte est similaire aux résultats de (**Okan et al.**, 2016) indiquant que le safran et ses ingrédients actifs sont connus pour exercer un effet protecteur contre le stress oxydatif (**Sebastin et al.**, 2016). Donc, un effet protecteur contre les dommages sur les cellules somatiques ainsi que sur les érythrocytes est observé. Dans cette étude les ingrédients actifs du safran, à savoir le safranal et la crocine ont exercé un effet protecteur sur l'augmentation de la fragilité des érythrocytes induite par le tétrachlorométhane (CCL₄), un produit chimique transparent, ininflammable et toxique qui peut s'évaporer rapidement de sa forme liquide (**Kus et al.**, 2005). Une exposition plus longue à ces ingrédients peut également résultats significatifs sur les paramètres hématologiques.

Le traitement actuel de l'inflammation s'effectue grâce aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens. Ces molécules bien qu'elles soient efficaces, présentent le plus souvent des effets secondaires indésirables, qui peuvent empêcher leur utilisation à long terme.

Le Diclofénac sodique (acide phényl acétique), est l'un des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens le plus utilisé, grâce à ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques puissantes. C'est un inhibiteur de la COX-2 et agit en diminuant le niveau d'acide arachidonique libre (**Goodman et Gilman**, 2001). Des études ont démontré que de nombreux flavonoïdes et polyphénols

Discussion

présents dans certaines plantes et contribuent de manière significative à l'activité anti-inflammatoire (Luo *et al.*, 2002 ; Okoli et Akah, 2004).

En outre, des risques d'altérations dangereuses comme la dénaturation de protéines subissant une perte de leur structure et qui mène à l'exposition d'auto-antigène (Clos, 2012), sont provoqués par une activation incontrôlée ou prolongée de l'inflammation *in vivo*, et ceci donnant naissance à de graves maladies (Lanneau, 2010).

En effet, la dénaturation protéique est un processus durant lequel la protéine perd sa conformation tridimensionnelle, suite à son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique (acide ou base forte) (Lanneau, 2010), perturbant certains sites qui vont devenir des auto-antigènes (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994). Les agents qui possèdent des propriétés protectives contre cette dénaturation protéique, seraient alors, de bons candidats pour le développement de nouvelles molécules à caractère anti-inflammatoire (Chandra *et al.*, 2012). L'activité anti-dénaturante des extraits pourrait être le résultat de l'interaction de certains composants avec deux sites présents au niveau de certaines protéines (Williams *et al.*, 2002 in Duganath *et al.*, 2010).

Cependant, on remarque que l'activité anti-inflammatoire des pétales de safran est optimale à une concentration de 75 µg/mL, et diminue donc à des doses supérieures, notamment comme dans notre travail à 150 µg/mL. Quant au diclofénac, l'activité anti-inflammatoire augmente à des concentrations élevées. Comparativement aux stigmates et dans une étude menée par (Benmostefa et Guellil, 2017), ceux-ci ont présentent une activité anti-inflammatoire plus élevée que celle des pétales, les flavonoïdes restent majoritairement élevés au niveau des stigmates comparés aux pétales, La présence de flavonoïdes, de tanins, d'anthocyanines, d'alcaloïdes et de saponines peut être la cause de l'activité anti-inflammatoire aiguë et/ou chronique (Srivastava *et al.*, 2010).

Dans les recherches menées par Lu et ses collaborateurs (2008), on approuve que les composants des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, doivent leurs effets pharmaceutiques à leur capacité de se lier aux protéines plasmatiques. En effet, selon une étude précédente de Dufour et Dangles (2004) sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine, cette dernière possède une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

Conclusion

Conclusion

Le travail effectué tout au long de ce mémoire a permis de souligner les effets des pétales de safran, qui font aujourd'hui leur entrée dans la médication occidentale.

Le safran a été présent dans toutes les civilisations, que ce soit pour son rôle culinaire, pour sa qualité de colorant ou pour ses caractéristiques ancestrales enracinées dans la médecine populaire. En effet, les propriétés des pétales, cyto-toxique, anti-hémolytique et anti-inflammatoire ont été reconnues au cours des derniers siècles, leur conférant une place notable dans le Codex où figuraient plusieurs préparations pharmaceutiques.

Dans ce travail de Master, nous avons procédé avec la méthode de l'extraction aqueuse pour extraire les polyphénols du pétale de safran, puis nous avons testé leurs activités biologiques *in vitro*. Cette extraction a donné un bon rendement de 13%.

Nos résultats ont montré que les extraits du pétale de safran sont faiblement toxiques à la concentration de 50 µg/mL puisqu'ils induisent une faible activité hémolytique.

Les résultats de ce présent mémoire montrent, également, que ces extraits sont pourvus des effets anti-hémolytique et en comparant à la molécule de composés phénoliques testée, à savoir l'acide gallique. Ainsi, ils engendrent une stabilité membranaire du globule rouge qui est similaires à d'autres membranes cellulaires comme la membrane lysosomale. Les extraits du pétale de safran présentent alors, une bonne activité anti-hémolytique.

De nos jours, le traitement de l'inflammation nécessite des anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens. Ces molécules, étant efficaces mais présentent le plus souvent des effets secondaires indésirables à long terme. Dans ce contexte, le recours aux solutions alternatives comme les principes bioactifs extraits de plantes, peut être une bonne voie à explorer pour la conception de nouvelles molécules efficaces et sans effets secondaires. Les différents extraits du pétale ont aussi montré une inhibition efficace de la dénaturation thermique de l'albumine sérique avec des pourcentages maximaux de 52.26%. Ils possèdent alors, une activité anti-inflammatoire surtout à faible concentration.

Ce travail permet donc de conclure que le pétale de safran n'est pas un déchet et ne doit pas être jeté. Toutefois, il contient des molécules bioactives qui peuvent être extraites et utilisées dans différents domaines.

A cet effet, les résultats obtenus ouvriront de larges perspectives pour d'autres recherches en vue de :

- La détermination et la purification des molécules bioactives responsables de l'activité.
- L'évaluation de leur activité anti-inflammatoire *in vivo* en étudiant la toxicité.
- La détermination de leur mécanisme et de leur mode d'action.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- _Ahrazem O., Diretto G., Argandoña J., Rubio-Moraga Á. et Julve JM. (2017).** Evolutionarily distinct carotenoid cleavage dioxygenases are responsible for crocetin production in *Buddlejadavidii*. *J Exp Bot*;68:4663–77.
- _Akhondzadeh S., Sabet MS., Harirchian MH., Togha M., Cheraghmakani H., Razeghi S. et Moradi, A. (2010).** Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer’s disease : a 16week, randomized and placebocontrolled trial. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35(5), 581-588.
- _Al-Faraji ASAR. (2017).** Effectofthesaffron flower (*Crocus sativus L.*) extractstowardthebacterium *Staphylococcus aureus* thatcausesconjunctivities PUS. *IJABR*, 7(2), 296-298
- _Algrech C. (2001).** “Le safran du Quercy.” *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27;9-16;18-26.
- _Alonso GL., Salinas MR., Garijo J. et Sanchez-Fernandez MA. (2001).** Composition ofcrocins and picrocrocin from Spanish saffron (*Crocus sativus L.*). *Journal of FoodQuality*, 24(3), 219–233.
- _Ardalan T., Ardalan P. et Heravi M. (2012).** Kinetic study of free radicals scavenging by saffron petal extracts. *J chem health risks*, 2: 29-36.
- _Arvy M. et Gallouin F. (2003).** *Epices, aromates et condiments*. Edition Belin. France, 216-219 p.
- _Asdaq SMB. et Inamdar MN. (2009).** Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 358–372.
- _Asgarpanah J., Darabi-Mahboub E., Mahboubi A., Mehrab R. et Hakemivala M. (2013).** In-vitro evaluation of *Crocus sativus L.* petals and stamens as natural antibacterial agents against food borne bacterial strains. *Iran J pharm*.9(4):69-82.
- _Assimopoulou AN., Papageorgiou V.P et Sinacos Z. (2005).** Radical scavenging activity of *Crocus sativus L.* extract and its bioactive constituents-, *phytotherapy Resaerch* 19(11), p. 1 PMID 16317646.
- _Astarei AR., Eskandari-Torbaghan M. et Abbasi-Ali Kamar R. (2006).** Effect of saffron (*Crocus sativus L.*) petals on germination and primary growth of cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *II Int Symp Saffron Biol Technol* ; 739: 87-91.
- _Basti AA., Moshiri E., Noorbala AA., Jamshidi AH., Abbasi SH. et Akhondzadeh S. (2006).** Comparaison of petal of *Crocus sativus L.* and fluoxetine in the traitement of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. *Progress in neuro-psycho pharmacology and biological pschiatry*, 31, 439-442.

Références bibliographiques

- _Babaei A., Arshami J., Haghparast A. et Mesgaran MD. (2014).** Effects of saffron (*Crocus sativus*) petal ethanolic extract on hematology, antibody response, and spleen histology in rats. *Avicenna J Phytomed.*4:103–109.
- _Belarbi S. et Belabbase N. (2022).** Etude phytochimique et évaluation de la CAT des, extrait par "butanol, méthanol et eau" des pétales du safran (Mémoire de master, université Abou bekrBelkaid, Tlemcen).
- _Benayache S., Benaissa O., Amrani A., Bicha S., Zama D., Benayache F. et Marchioni E. (2013).** Free radical scavenging action of phenolic compounds from *Limonium Bonuelli* (Plumbaginaceae). *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre.* 5(5) P: 234-240.
- _Ben Mostefa I. et Ghellil Z. (2017).** Dosage des polyphénols de la fleur de *Crocus sativus*. *L.* (Mémoire de master, université Abou bekrBelkaid, Tlemcen). 17-20-47.
- _Bergoin M., (2005).** Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants.
- _Bernad DC., Estefania VC., Joaquin JP. et Maria JF. (2020).** Review: Saffron's Activity as an Active Ingredient in Cosmetics. *Indonesian journal of pharmaceutics*,3:1-18
- _Bolhasani A., Bathaie SZ., Yavari I., Moosavi-Movahedi AA. et Ghaffari M. (2005).** Separation and purification of some components of Iranian saffron, *Asian J. Chem.* 17, 725-229.
- _Bostan Badie H., Soghra M. et Hossein H. (2017).** Toxicology effects of saffron and its constituents: a review, *journal of Basic Med Sc*, 20 (4), 12 p
- _Bouhlali EDT., Sellam K., Bammou M., Alem C. et Filali-zehzouti Y. (2016).** *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 6 (05): 156-162.
- _Branca F. et Argento S. (2010).** Evaluation of saffron pluriannual growing cycle in central Sicily. *Acta Hort.* 850, 153–158.
- _Bulmus V., Woodward M., Lin L., Murthy N., Stayton P. et Hoffman A. (2003).** A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of controlled release*, 93(2), 105-120.
- _Cardon D. (2003).** Le monde des teintures naturelles. Belin Ed. France. pp. 234-239.
- _Carmona M., Zalacain A. et Alonso G. (2006).** The chemical composition of saffron: color, taste and aroma. *BomarzoSL* , 57-62p .
- _Cersosimo RJ. (1993).** Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharmacother.*;27:438–4341.
- _Chandra S., Chatterjee P., Dey P. et Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 178-180.

Références bibliographiques

_Christodoulou E., Kadoglou NP., Kostomitsopoulos N. et Valsami G. (2015). Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *Journal PharmPharmacol.* 67(12), 1634-1649.

_Clos J. (2012). *L'immunité chez les animaux et les végétaux*. Paris : Ed Elodie Lecoquerre. 296p.

_Costa-Lotufo LV., Khan MTH., Ather A., Wilke DV., Jimenez PC., Pessoa C. et Moraes MO. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 99(1): 21-30.

_Dufour C. et Dangles O. (2004). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *BiochimicaBiophysica Acta.* 1721: 164– 173.

_Dupont G. (2007). *Abrégé de botanique systématique moléculaire*. Edition 14. Paris. 285 p.

_Dwyer A., Hawrelak J. et Whitten D. (2011). Herbal Medicines, other than St. John's Wort, in the treatment of Depression : a systematic Review. *Alternative medicine review.* 16 (1), pp. 40-49.

_Escribano J., Alonso GL., Coca-Prados M. et Fernandez JA. (1996). Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus L.*) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Letters*, 100, 23–30.

_Fahim NK., Janati SF. et Feizy J. (2012). Chemical composition of agriproduct saffron (*Crocus sativus L.*) petals and its considerations as animal feed. *GIAD J Food ;* 37:197- 201.

_Fatehi M., Rashidabady T. et Fatehi-Hassanabad Z. (2003). Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacol.* 84:199–203.

_Favre E. (2008). *Le safran - l'anti kilo l'anti déprime*. Terre d'hommes Ed. 177 p.

_Feizzadeh B., Afshari JT., Rakhshandeh H. et al. (2008). Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse broblast. *Urol J* 5(3): 161–7.

_Ferrence SC. et Bendersky G.(2004). Therapy with Saffron and the Goddess at Thera. *Perspectives in Biology and Medicine*, 47 n°2. 199-226.

_Funel MT. Arrêté du 24 août 1990 portant mise en application des additions et modifications à la dixième édition de la Pharmacopée française. Legifrance.

_Galati G., Sabzevari O., Wilson JX. et O'Brien PJ. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 177 (1): 91-104.

_Gadamsetty G., Maru S., Tyagi A. et Chakravarthula SN. (2013). Anti-inflammatory,

Références bibliographiques

- cytotoxic and antioxidant effects of methanolic extracts of *Drypetes sepiaria* (Euphorbiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 10(5): 274-282.
- _Garrido JL., Diez de Bethencourt C. et Revilla E. (1987). Flavonoid composition of hydrolyzed tepal extracts of *Crocus sativus L.* *An. Bromatol.*, 39 (1): 69-80.
- _Goodman G. (2001). *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th edition. McGraw Hill Company, Newyork. P: 690-695.
- _Gregory MJ., Menary R.C. et Davies NW. (2005). Effect of drying temperature and air blow on the production and retention of secondary metabolites in saffron. *J. Agric. Food Chem.* 53 (15), 5969e5975.
- _Gresta F., Lombardo G., Siracusa LG. et Ruberto G. (2008). Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. *Agronomy of Sustainable Development* 28 : 95-112
- _Grilli Caiola M. et Canini A. (2010). Looking for saffron's (*Crocus sativus L.*) parents. *Functional Plant Science & Biotechnology*, 4(2), 1e14.
- _Gutheil WG., Reed G., Ray A., Anant S. et Dhar A. (2012). Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(1):173-9.
- _Habibi MB. et Bagheri B. (1989). *Agriculture processing and chemicals and standards of saffron*. Khorasan. Iran: Iran science research center.
- _Hadizadeh F., Khalili N., Hosseinzadeh H. et Khair-Aldine R. (2003). Kaempferol from saffron petals. *Iran J Pharm Res*; 2: 251-252.
- _Hoshyar R., Hosseinian M., Naghandar MR., Hemmati M., Zarban A., Amini Z. et al. (2016). Anti-dyslipidemic properties of Saffron: Reduction in the associated risks of atherosclerosis and insulin resistance. *Iran Red Cres Med J.* 18:e36266.
- _Hosseini, A., Razavi, BM. et Hosseinzadeh H. (2018). Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vole 21 n° 11, p. 1093.
- _Hosseinzadeh H. et Younesi HM. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus L.* stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2(7), 1-80. doi:10.1186/1471-2210-2-7.
- _Hosseinzadeh H., Behravan J., Ramezani M. et Ajgan K. (2005). Anti-tumor and cytotoxic evaluation of *Crocus sativus L.* stigma and petal extracts using brine shrimp and potato disc assays. *J Med Plants*. 3:59–65.
- _Hosseinzadeh, H., Motamedshariaty V., Hadizadeh F. (2007). Antidepressant effect of kaempferol, a constituent of saffron (*Crocus sativus*) petal, in mice and rats. *Pharmacologyonline*, 2:367-370.
- _Iranshahi M., Khoshangosht M., Mohammadkhani Z. et Karimi G. (2011). Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of saffron stigma and petal on liver toxicity induced

Références bibliographiques

by carbon tetrachloride in mice. *Pharmacologyonline*. 1:203–212.

_Jacquier-Sarlin MR. et Polla BS. (1994). Protéines de stress : soi, non-soi et réponse immune. *Médecine/sciences*. 101: 31-41

_Kafi M., Rashed MH., Koocheki A. et Mollafilabi A. (2002). Saffron (*Crocus sativus L.*), Production and Processing. Center of Excellence for Special Crop, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

_Kamalakkannan N, Rukkumani R, Varma PS, Viswanathan P, Rajasekharan KN, Menon VP.(2005). Comparative Effects of Curcumin and an Analogue of Curcumin in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Basic Clin PharmacolToxicol*. 97:15–21.

_Kanakis CD., Tarantilis PA., Tajmir-Riahi HA. et Polissiou MG. (2007). Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: Stability and antioxidative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(3), 970–977.

_Karimi E., Oskoueian E., Hendra R. et Jaafar HZ. (2010). Evaluation of *Crocus sativus L.* stigma phenolic and flavonoid compound and its antioxidant activity. *Addition Article Information*. 15(9): 6244-6256.

_Kerscher M. et Buntrock H. (2011). Anti-aging creams. What really helps. *Hautarzt*, 62:607-613.

_Khalili M., Ebrahimzadeh MA. et Safdari Y. (2014). Antihemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cells. *Arh Hig Rada Toksikol*. 65: 399-406.

_Khazaei KM., Jafari SM., Ghorbani M., Kakhki AH. et Sarfarazi M. (2015). Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology. *Food analytical methods*, 9(7), 1993–2001.

_Kondhare D. et Lade H. (2017). Phytochemical profile, aldose reductase inhibitory, and antioxidant activities of indian traditional medicinal *Coccinia grandis L.* fruit extract. *3 Biotech*. 378.

_Kuhn R. et Winterstein G. (1933). Picrocrocin, the terpene glucoside of saffron and the biogenesis of the carotenoid carboxylic acid. *Naturwissenschaften*. 21, 527.

_Kus I., Ogeturk M., Oner H. et al. (2005). Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell BiochemFunct*. 23, 169-174.

_Lautenschläger M., Lechtenberg J. et Sendker A. (2014). Effective isolation protocol for secondary metabolites from saffron: semi-preparative scale preparation of crocin-1 and trans-crocetin. *Fitoterapia* 92 290–295.

_Lazérat V. et Souny (2009). *Secrets de safran*. Lucien Souny Ed. Saint-paul. 125p.

_Lechtenberg M., Schepmann D., Niehues M., Hellenbrand N., Wunsch B., et Hensel A.

Références bibliographiques

(2008). Quality and Functionality of Saffron: Quality Control, Species Assortment and Affinity of Extract and Isolated Saffron Compounds to NMDA and σ_1 (Sigma-1) Receptors. *Planta Medica*, 74(07), 764–772.

_Lee M. et Feldman M. (1997). The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut*. 41(4):425-426.

_Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin induced diabetes. *Diabetol*. 51:216–226.

_Li CY., Lee EJ. et Wu TS. (2004). Antityrosinase Principles and Constituents of the Petals of *Crocus sativus*. *Journal of natural products*. 67(3), 437– 440.

_Lu E. (2008). in Duganath N, Rubesh- Kumar S, Kumanan R, Jayaveera KN (2010). Evaluation of anti-denaturation property and anti-oxidant activity of traditionally used medicinal plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. (12): 1-7.

_Luo XD., Basile MJ. et Kennelly EJ. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllumcainito* L. (star apple). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (50): 1379-1382.

_Maggi L., Carmona M., del Campo CP., Kanakis CD., Anastasaki E., Tarantilis PA. et al. (2009). Worldwide market screening of saffron volatile composition. *J. Sci.Food Agric*. 89, 1950e1954.

_Maggi L., Carmona M., Zalacain A., Kanakis CD., Anastasaki E., Tarantilis PA. et al. (2010). Changes in saffron volatile profile according to its storage time. *Food Research International*, 43, 1329e1334.

_Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*.

_Makhlouf H., Saksouk M., Habib J. et 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.

_Manibusan MK., Odin M. et Eastmond DA. (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ SciHealth Part C*. 25:185–209.

_Matteo C., Sonia D., Stefania S., Dario D. et Valentina S. (2020). *Crocus sativus* L.

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

_Mirhadi E., Hooriyeh N. et Bizhan MN. (2019). An updated review on therapeutic effects of nanoparticle-based formulations of saffron components (safranal, crocin, and crocetin).*journal of pharmaceutical Investigation*,50:47-58.

Références bibliographiques

- _Mohajeri Dariush DY. (2011)** Protective effects of *Crocus sativus* petal against cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Med Sci J Islamic Azad Univ*; 21:251–261.
- _Mokhtari-Zaer A., Saadat S., Ghorani V., Memarzia A. et Boskabady MH. (2020).** The effects of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents on immune system: experimental and clinical evidence. In: *Saffron*. Academic Press, pp. 193–217.
- _Molina RV., Valero M., Navarro Y., Guardiola JL. et Garcia-Luis A. (2005).** Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, Vol 19 n° 103, p. 1.
- _Mortazavi SM., Kamali Moghaddam M., Safi S. et Salehi R. (2012).** Saffron Petals, a By Product for Dyeing of Wool Fibers. *Prog. Color Colorants Coat*, 75-84.
- _Murugasan N., Vember S. et Damodharan C. (1981).** Studies on erythrocyte membrane-IV. *In vitro* haemolytic activity of Oleander extract. *Toxicol Lett.* (8) :33-38.
- _Negbi, M. (1999).** Saffron cultivation. In *Saffron: Crocus sativus L.* (pp. 1-17). CRC Press.
- _Novaes MRCG., Novaes LCG., Melo AL. et Recôvan VL. (2007).** Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun. Ciênsaúde.* 18(3) :1227- 1236.
- _Norbek R. et Kondo T. (1998).** Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae). *Phytochemistry* 47: 861-64
- _Okan A., Gokhan O., Irfan B. et Ibrahim A. (2016).** Effect of safran, safranal and crocin which are active ingredients of Saffron (*Crocus*) on erythrocyte fragility and hematological parameters in carbon tetrachloride intoxicated rats. *East Journal of Medecine*, 21(4), 173-177.
- _Omidi A., Riahinia N., MontazerTorbati MB. et Behdani MA. (2015).** Evaluation of protective effect of hydroalcoholic extract of saffron petals in prevention of acetaminophen-induced renal damages in rats. *Veterinary science development*, 5(1).
- _Oyedapo OO., Akinpelu BA., Akinwunmi KF., Adeyinka MO. et Sipeolu FO. (2010).** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry.* 2(4): 46-51.
- _Palomares C. (1988).** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament ? (Thèse de doctorat). Université De Lorraine. France. Université Mentouri de Constantine. Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants, in disease and health. *Int J BiomedSci.* 4(2):89-96.
- _Palomares C. (2015).** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament ? (Thèse de doctorat). Université De Lorraine. France.
- _Papandreou MA., Kanakis CD., Polissiou MG., Efthimiopoulos S., Cordopatis P., Margarity M. et al. (2006).** Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *Journal of Agricultural*

Références bibliographiques

and Food Chemistry, 54(23), 8762–8768.

_Pitsikas N. (2016). Constituents of saffron (*Crocus sativus L.*) as potential candidates for the treatment of anxiety disorders and schizophrenia. *Molecules*, 21,303e314.

_Premkumar K. et Ramesh A. (2010). Anticancer, Antimutagenic and Antioxidant Potential of Saffron: An Overview of Current Awareness and Future Perspectives. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4 (Special Issue 2), 91-97 Global Science Book. ISSN 1749-0472.

_Rahimi M. (2015). Chemical and Medicinal Properties of saffron, *Journal of Bulletin Of Environment, Pharmacology And Life Sciences*, 4(1) , 5 p.

_Ramin R. et Hossein H. (2013). Safranal : From an Aromatic Natural Product to a Rewarding Pharmacological Agent. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol 16 n° 01, p. 2.

_Rios JL., Recio MC., Giner RM. et Manez S. (1996). A update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*, 10, 189–193.

_Robbins ME., Zhao W., Davis CS., Toyokuni S. et Bonsib SM. (2002). Radiation-induced kidney injury: a role for chronic oxidative stress? *Micron*.33:133–141.

_Roedel W. et Petrzika M. (1991). Analysis of the volatile components of saffron. *J. High. Res. Chromatogr.* 14, 771e774.

_Sadique J., Al-Rqobah WA., Bughait MF. et El-Gindy AR. (1989). The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60: 525-532.

_Savica R., Grossardt BR., Bower JH., Ahlskog JE. et Rocca WA. (2013). Risk factors for Parkinson's disease may differ in men and women: an exploratory study. *Horm Behav.* 63: 308–314.

_Samarghandian S. et Borji A. (2014). Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus L.*) and its ingredients. *Pharmacognosy research*, 6(2), 99.

_Saito N., Mitsui S. et Hayashi K. (1960). Delphin, the anthocyanin of medicinal saffron and its identity with hyacin as shown by paper chromatography of partial hydrolysates. *Bot. Mag. Tokyo*, 36:340-345.

_Schmidt M., Betti G. et Hensel A. (2007). Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13), 315-319.

_Sebastin Santhosh M, Hemshekhar M, Thushara RM et al. (2013). Viperarusselli venom-induced oxidative stress and hematological alterations: Amelioration by crocin a dietary colorant. *Cell Biochem Funct.*31, 41-50.

_Singla RK. et Bhat GV. (2011). Crocin: An overview. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(4), 281e286.

_Singleton BK., Libretto SE., Sibley PR., Mifsud CVJ. et Andrews CM. (1994). An *in vitro*

Références bibliographiques

haemolysis test as an alternative to the draize test for ocular irritation. *Comp haematol int.* 4, 49-54.

_Soeda S., Ochiai T., Shimeno H., Saito H., Abe K., Tanaka H. et al. (2007).

Pharmacological activities of crocin in saffron. *Journal of Natural Medicine*, 61(2),102–111.

_Somayeh R., Sohrab M., Maryam H. et Seyed Abbas S. (2013). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus L.*): *Journal of Food Sciences Technol*, 52(4), 1881–1888.

_Srivastava R., Ahmed H., Dixit RK., Dharamaveer et Saraf SA. (2010). *Crocus sativus L.* A comprehensive review. *PharmacognRev*, 4: 200

_Sullivan R. (2011). Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des lignanes du lin (*linum usitatissimum* et *linum flavum*) et amélioration de l'extraction des Lignanes. l'université d'Orléans.

_Tarantilis PA. et Polissiou MG. (1997). Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 45, 459e462.

_Termentzi, A. et Kokkalou, E. (2008). LC-DAD-MS (ESI+) Analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. *Planta Medica*, 74(5), 573- 581. doi:10.1055/s-2008-1074498.

_Ursat J. (1913). Le safran du Gatinais. Pithiviers.45 p.

_Williams LAD., Connar AO., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker JA., Conrad J., Vogler B., Rosner H. et Kraus W. (2008). The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J.* 57 (4): 327- 331.

_William LAD. (2002). in Duganath N, Rubesh - Kumar S, Kumanan R, Jayaveera KN (2010). Evaluation of Anti-Denaturation Property and Anti-Oxidant Activity of Traditionally Used Medicinal Plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* (12) : 1-7.

_Winterhalter P. et Straubinger M. (2000). Saffron-renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*, 16(1): 3959.

_Zarezadeh M., Vazifeshenas-Darimiyan K., Afshar M., Valavi M., Serki E. et Hosseini M. (2017). Effects of Extract of *Crocus sativus* Petal on Renal Function in Diabetic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci.*27:11–24.

_Zarinkamar F., Tajik S. et Soleimanpour S. (2011). Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in *Crocus sativus L.* *Crop Science*, 5(7), 831e838.

Références bibliographiques

Zeka K., Ruparelia KC., Continenza MA., Stagos D., Vegliò F. et Arroo RRJ. (2015).
Petals of *Crocus sativus L.* as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol.
Fitoterapia, 107, 128–134.

Annexes

Annexes

Test cyto-toxicité	Acide gallique	Extrait aqueux
150mg/ml	54.13	55
75mg/ml	37.14	35
50mg/ml	28.48	27.14

Annexe A. 1: Test de cyto-toxicité (pourcentage d'hémolyse) de l'acide gallique et de l'extrait aqueux du pétale de safran.

Test anti-hémolytique	Acide gallique	Extrait aqueux
150mg/ml	28.44	27.47
75mg/ml	37.18	31.55
50mg/ml	65.63	52.26

Annexe A. 2 : Test anti-hémolytique (Pourcentage de stabilité membranaire) de l'extrait aqueux du pétale de safran.

Test anti-inflammatoire	diclofénac	Extrait aqueux
150mg/ml	98.07	77.88
75mg/ml	86.53	96.15
50mg/ml	96.15	95.15

Annexe A. 3 : Test anti-inflammatoire (Pourcentage de l'inhibition de la dénaturation des protéines) de l'extrait aqueux du pétale de safran.

