



**Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention de
Licence Sciences et Techniques
Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources (BVPR)**



**L'activité antifongique de l'extrait de pétales du safran (*Crocus sativus L*)
sur certaines maladies cryptogamiques de post- récolte.**

Au sein de l'école nationale d'agriculture

Présenté par :

-Mlle Meryem Smahi

Encadré par :

-Mr Mohamed Ali Tahri Jouti (FST Fès)

-Mme Nadia Naim (ENA)

Soutenu le : 06/07/2022

Devant le jury composé de :

-Mr Mohamed Ali Tahri Jouti (FST Fès)

Encadrant

-Mr Lhlali Rachid (ENA)

Encadrant

-Mr Abderahim Lazreq (FST Fès)

Examineur

Année universitaire : 2021/2022



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'étude à tous ceux qui me sont chère

A Ma mère :

Vous êtes la flamme de mes jours, quoi que je dise ou que je fasse, je ne saurai point te remercier comme il doit votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force. Je vous aime maman.

A La mémoire de mon père :

Si je pouvais écrire une histoire, ce serait la plus belle histoire jamais racontée d'un père gentil et aimant qui avait un cœur d'or. Je pourrai écrire des millions de pages mais je ne pourrai jamais dire à quel point je l'aime, j'espère qu'il sera fier de moi.

Dieu te bénisse.

A Ma grande mère :

C'est la personne la plus idéale dans ma vie, que dieu la procure la bonne santé et longue vie.

A l'âme de mon grand-père :

Vous êtes toujours été pour moi un exemple, un modèle, une référence d'homme, de père, et les meilleurs des grands pères dont on puisse rêver. Dieu ait son âme.

A Mon frère :

Tu es un cadeau et une bénédiction dont je serai éternellement reconnaissante.

A toute ma famille :

Que dieu vous protège et vous offre santé et longue vie.

Et à toute autre personne que j'ai involontairement oublié de citer.



Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Dieu le Tout Puissant ALLAH de m'avoir donné les ressources morales, physiques, matérielles et intellectuelles pour accomplir ce travail.

Cette étude n'aurait certainement pas pu voir le jour sans l'assistance de plusieurs personnes.

Je tiens tous d'abord à remercier Mr Lahlali Rachid de m'avoir accordé ce stage et de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le travail au laboratoire de l'école nationale d'agriculture de Meknès.

Je tiens à remercier vivement mon encadrant de la FST Mr. Tahri Jouti Mohamed Ali d'avoir mis à ma disposition ses connaissances, ses expériences, et ses précieux conseils.

Encore une fois merci bien Mr. Tahri Jouti Mohamed Ali pour vos aides, vos conseils et vos réponses précises.

Un remerciement particulier s'adresse à mon encadrante Mme Nadia Naim pour son accompagnement et ses conseils valeureux qui m'ont été d'une grande utilité tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury à savoir, Mr Abderahim Lazreq, Mr Mohamed Ali Tahri Jouti, Mr Lhlali Rachid, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce modeste travail.

Et finalement j'exprime mes vifs remerciements à toute personne ayant participé de près ou de loin au bon déroulement de ce stage et à la réalisation de ce modeste travail.



Liste des figures

Figure 1 : Description botanique de la plante du <i>safran</i>	5
Figure 2 : Broyage de pétale du <i>Safran</i> Figure 3 : Poudre de pétales du <i>safran</i>	14
Figure 4 : Décoction des pétales du <i>safran</i>	14
Figure 5 : Différents échantillon du <i>safran</i>	15
Figure 6 : Montage de l'hydrodistillation	16
Figure 7 : Préparation du test in vivo pour la détection de l'efficacité de l'E.A sur les champignons.....	18
Figure 8 : <i>Rhizopus stolonifer</i> témoin et l'effet de pétales du <i>Crocus sativus</i> L des différentes concentrations sur la croissance de mycélium	21
Figure 9 : Effet de diffèrent concentration sur le mycélium de <i>Penicillium digitatum</i>	21
Figure 10 : <i>Penicillium digitatum</i> témoin	22



Liste des tableaux

Tableau 1: Pourcentage d'humidité du <i>safran</i> pour différent échantillon du safran.....	20
Tableau 2 : Effet de l'E.A sur le diamètre de mycélium champignons à travers différentes concentrations	20
Tableau 3 : Effet des E.A sur la croissance des spores de champignon	22
Tableau 4 : Effet de l'E.A sur le diamètre de contamination des fruits inoculés par les champignons	23



Liste des abréviations

- C.S : *Crocus sativus*
- E.A : Extrait aqueux
- H.E : Huile essentielle
- I.G : Germination de spores
- M.I : Masse initiale
- M.F : Masse finale
- PDA : Potato dextrose agar
- P.S : Pétales du safran
- TF : Témoin fongicide
- Tm+ : Témoin positive (qui est inoculé par le champignon)
- Tm- : Témoin négative



Résumé :

Dans ce présent travail, l'effet de l'extrait aqueux de pétales du *safran* de différentes concentrations sur trois champignons *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus*. Les pétales du *safran* ont subi une décoction dans l'eau distillée stérile.

L'évaluation *in vitro* de l'effet antifongique des extraits a montré une activité différente selon la concentration de l'extrait utilisé. En effet, l'extrait le plus efficace est 5% pour *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea* et 6% pour *Rhizopus stolonifer*.

Les mêmes extraits ont été testés pour leur effet antifongique, sur les fruits, les traitements ont généralement réduit les symptômes des champignons en fonction de la concentration et du temps d'application.

Deux composants chimiques ont été déterminés dans l'extraits, et pourrait être impliqués dans l'effet antifongique. Ces résultats démontrent que les extraits aqueux des pétales du safran peuvent être envisagés pour des études ultérieures en tant que stratégie biologique contre les champignons post-récolte.

Mots clés :

Crocus sativus, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, extrait aqueux, effet antifongique.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La protection au niveau des productions végétales est actuellement encore réalisée par l'application des produits phytosanitaires chimiques, or ces derniers constituent des dangers pour la santé humaine et l'environnement.

L'intégration progressive de nouvelles pratiques tenant compte non seulement de la dimension environnementale, mais aussi de la dimension socioéconomique est requise. Parmi les moyens de protection des végétaux, la lutte biologique, par utilisation des plantes médicinales et aromatiques est une voie possible pour minimiser la pollution et les nuisances associées à l'utilisation de produits chimiques de synthèse et réduire fortement leur impact négatif sur l'environnement et d'assurer une sécurité alimentaire.

Dans ce cadre, cette étude s'inscrit dans la recherche d'alternative inoffensive et non polluante, tels les extraits des plantes aromatiques et médicinales, précisément les extraits aqueux des pétales *Crocus sativus*, pour valoriser les déchets de cette plante, les pétales ont été testés pour le pouvoir antifongique in vitro et in vivo sur *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifers*.

PARTIE I :
PRESENTATION DE L'ECOLE
NATIONALE D'AGRICULTURE
DE MEKNES (ENA)

I. Présentation de l'école nationale d'agriculture de Meknès

L'École nationale d'agriculture de Meknès (ENA) est un établissement public marocain d'enseignement supérieur agronomique, du développement rural et de la recherche scientifique, situé à Meknès. L'ENA a été créée en 1942, lors du protectorat français au Maroc sous le nom de l'école marocaine d'agriculture et avec un cycle de Bac+2 au début, l'école assurait à l'époque la formation des techniciens spécialisés en agriculture.

Il est situé à 10 km au sud-est de la ville de Meknès, l'École nationale d'agriculture est un établissement public doté de l'autonomie financière et morale sous la tutelle du ministère de l'agriculture et de la pêche maritime.

L'ENA a le privilège d'être le premier établissement d'enseignement supérieur agricole au Maroc. Elle a formé des centaines de cadres agricoles qui ont contribué très tôt au développement agricole du Maroc et de certains pays amis.

Aujourd'hui, l'ENA est une institution aux dimensions internationales ; en plus de la formation des ingénieurs agronomes, elle contribue à la recherche dans tous les domaines de l'agriculture et du développement rural. En effet, sa situation dans l'une des principales régions du pays lui confère une large ouverture sur tous les types d'agriculture et lui ouvre de grandes possibilités pour la formation et la recherche.

PARTIE II :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur le safran

1. Description botanique

Crocus sativus est une plante inconnue à l'état sauvage qui a eu besoin de la main de l'homme pour subsister. Triploïde et stérile, il se reproduit par multiplication végétative grâce à son corne, organe de réserve ressemblant à un bulbe. Sa corne en fait une plante pérenne, vivace puisqu'il lui permet d'emmagasiner des réserves tout au long de l'hiver. Possède comme caractéristique une végétation inversée ; en effet, la floraison a lieu en octobre- novembre alors que la période de dormance se fait durant les mois estivaux. (1)

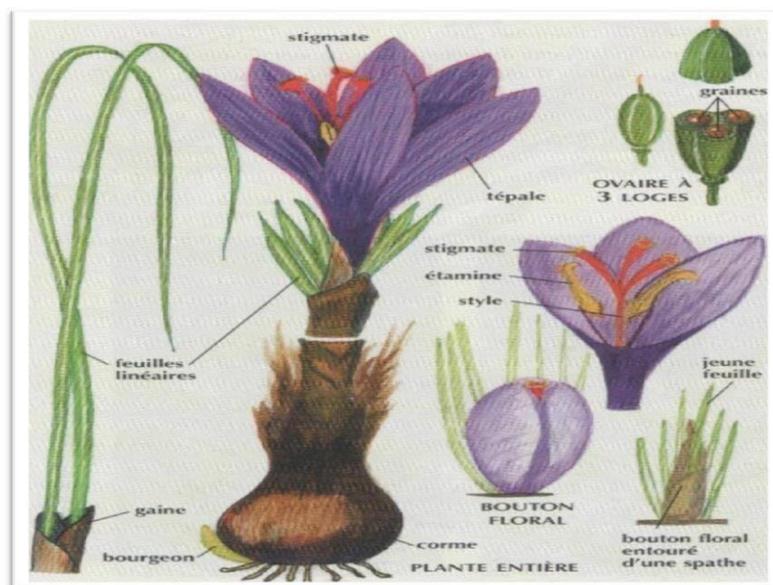


Figure 1: Description botanique de la plante du safran

2. Classification botanique

- ❖ Règne : végétale
- ❖ Embranchement : *Spermatophyte*
- ❖ Sous-embranchement : *Angiosperme*
- ❖ Classe : *Monocotylédones (Liliopsida)*
- ❖ Sous-classe : *Liliidae*
- ❖ Ordre : *Liliales*
- ❖ Famille : *Iridaceae*
- ❖ Sous-famille : *Crocoïdeae*
- ❖ Genre : *Crocus*
- ❖ Espèce : *C.sativus*

3. Appareil végétatif

La plante herbacée est pourvue d'une sorte de bulbe nommé cormus qui correspond à un rhizome court et vertical ayant environ 4 cm d'épaisseur et 3 cm de diamètre.

La partie blanchâtre et charnue à l'intérieur est riche en amidon, la partie extérieure, quant à elle, est composée de plusieurs tuniques brunes, à fibres réticulées ayant un rôle de protection et aussi de genèse des futures feuilles et fleurs.

Comme la reproduction se fait de manière végétative, chaque corne après floraison donnera naissance sur sa partie supérieure à plusieurs petits cormus, tout en dégénéralant, ce qui explique l'élévation en terre de 2 cm environ chaque année. Une corne ne fleurit donc qu'une seule fois et la floraison s'amplifie d'années en années. Lors de sa première année, un bulbe peut donner une à trois fleurs. (1)

4. Appareil reproducteur

Les fleurs de *Crocus sativus* commencent à voir le jour dès le début de l'automne, vers la fin du mois de septembre. D'une gaine blanche, translucide nommée spathe sortira un bouton floral d'une couleur pourpre. Sortant de terre par temps frais et humide, la fleur apparaît grande solitaire, presque régulière et hermaphrodite pour ensuite faner en vingt-quatre à quarante-huit heures.

Appartenant à la famille des Iridacées, on retrouve bien la symétrie trimère caractérisant ces végétaux. À l'aide du diagramme floral présenté ci-dessous, on peut noter la formule florale comme : (3+3) tépales + 3 étamines + 3 carpelles. (2). En effet, cette fleur actinomorphe est constituée de six tépales avec trois sépales sur le verticille extérieur et trois pétales sur le verticille intérieur, de trois étamines et de trois carpelles. (1)

5. Le fruit

Le fruit se développe très rarement puisque du fait de la triploïdie de *Crocus sativus*, la fécondation ne se fait quasiment jamais.

Il se présente sous forme d'une capsule membraneuse, allongée, trigone et loculicide qui contient trois loges. Chaque loge renferme plusieurs petites graines pourvues d'un embryon minuscule et d'un albumen corné abondant. (1)

6. Production du safran au Maroc

La production du safran au Maroc varie d'une année à l'autre, mais elle est en moyenne de 3 tonnes. Les prix du safran au Maroc ont connu une importante augmentation lors des dix dernières années.

En effet, lors des années 1990, le prix moyen stagnait autour de 5000 MAD/kg (1€ = 11 MAD ; MAD = Dirham Marocain), puis à partir de 1997, les prix ont progressivement augmenté pour atteindre des niveaux historiques en Août 2009 où le prix était de 28 000 MAD/kg, soit plus de 5 fois celui des années 90.

L'augmentation la plus importante du prix du safran (78 % de l'augmentation totale) a été enregistrée lors des années 2007 à 2010. Cette évolution suit la conjoncture mondiale des prix du safran qui ont connu une augmentation importante depuis 2006.

Cette augmentation des prix du safran au Maroc est également due aux efforts de valorisation de ce produit entamés dans la région depuis 2007 dans le cadre de la nouvelle stratégie de développement des produits du terroir.

Les prix du safran connaissent également des fluctuations intra-annuelles résultant de la variation de l'offre et de la demande. Ils sont à leur plus bas niveau lors de la période de récolte (Octobre et Novembre) en raison de l'abondance de l'offre et à leur maximum en été (Juin et Juillet) suite à sa baisse. (3)

Le Maroc est le quatrième pays producteur de safran après l'Iran, l'Inde et la Grèce avec seulement 1,5 % de la production totale mondiale.

Il existe peu de statistiques sur le volume des exportations marocaines de safran, mais en se basant sur la valeur des transactions commerciales, les exportations de safran n'ont pas dépassé les 2 Millions MAD entre 1998 et 2008, alors qu'à partir de 2009, ces exportations ont connu une augmentation soudaine et marquée en atteignant les 40 Millions MAD.

Cette augmentation brusque pourrait s'expliquer par le développement du circuit formel de commercialisation du safran lors des dernières années. (3)

7. Constitution du safran

Ses 3 principaux composants sont : la crocine responsable de la couleur jaune orange, picrocrocine responsable de la saveur et le safranal composé volatile majeur responsable de l'odeur et de l'arôme du safran. La qualité du safran dépend de la concentration de ses trois principaux métabolites. Le safran en poudre est bien plus facile à falsifier en y ajoutant du curcuma, carthame, souci, etc. Il possède plusieurs activités biologiques et pharmacologiques, parmi elles une activité antioxydante contre le DPPH et le FRAP, une activité antibactérienne et antifongique contre plusieurs types de bactéries et de champignons et des effets anti-tumoraux, anti-alzheimer. (1)

II. Valorisation des pétales du safran

La valorisation et l'utilisation d'extraits végétaux comme nouveaux inhibiteurs verts de l'entartage font partie des sujets de recherche les plus innovants. Il est bien noté que pour avoir un seul kilo de safran il nous faut moyennant 110.00 à 170.000 de fleurs. « Maroc _ La culture du safran génère plus de 139 millions de dirhams » (4). D'où, dans cette étude vise à évaluer l'efficacité des extraits des déchets *C.sativus* contre les 3 champignons (*Botrytis cinerea* /*Penicillium digitatum*/*Rhizopus*) in vitro et in vivo et à savoir l'extrait aqueux de pétales a teneur totales en polyphénols et en flavonoïdes.

III. Description des champignons

1. *Botrytis cinerea*

a. Description

Botrytis cinerea est un phytopathogène aéroporté au mode de vie nécrotrophe qui attaque plus de 200 cultures hôtes dans le monde et Il est responsable de la moisissure grise. (5).

Bien qu'il existe des fongicides pour son contrôle, de nombreuses classes de fongicides ont échoué en raison de sa plasticité génétique. Il est devenu un modèle important pour l'étude moléculaire des champignons nécrotrophes. (6)

b. Classification

- ❖ Règne : Fungi
- ❖ Embranchement : Ascomycète

- ❖ Sous-embranchement : Pezizomycotina
- ❖ Classe : Leotiomycètes
- ❖ Ordre : Helotiales
- ❖ Famille : Sclerotiniaceae
- ❖ Genre : Botryotinia

2. *Penicillium digitatum*

a. Description

Penicillium digitatum : est l'agent pathogène post-récolte le plus important et le plus largement signalé chez les agrumes.

La principale menace de cet agent pathogène est due à son spore, qui apparaissent sous forme de poudre fine et sont en suspension dans l'air. L'extrémité de la tige est le site d'entrée le plus courant pour l'espèce *Penicillium*. Dans les fruits infectés, une sporulation très abondante peut être observée, le fruit est complètement recouvert de mycélium blanc suivi de spores vertes et bleuâtres de *Penicillium digitatum*.

L'odeur terpéneuse typique se propage dans les environs où ces champignons infectent les fruits. Il est tout à fait possible que ce champignon produit de l'éthylène en quantité suffisante, entraînant la sénescence rapide des fruits adjacents. (7)

b. Classification

- ❖ Règne : Fungi
- ❖ Classe : Eurotiomycetes
- ❖ Sous-classe : Eurotiomycetidae
- ❖ Ordre : Eurotiales
- ❖ Famille : Trichomaceae
- ❖ Genre : *Penicillium*
- ❖ Espèce : *Penicillium digitatum*.

3. *Rhizopus stolonifer*

a. *Description*

Rhizopus stolonifer est l'opportuniste le plus répandu dans le monde parmi les espèces mucorales responsables d'infections humaines. D'autre part, l'espèce est utilisée depuis l'Antiquité pour fermenter des aliments et des condiments traditionnels africains et asiatiques à base de graines de soja moulues (8).

b. *Classification*

- ❖ Domaine : Eucaryote
- ❖ Royaume : Champignons
- ❖ Embranchement : Zygomycota
- ❖ Sous-embranchement : Mycormycotine
- ❖ Ordre : Mucorales

PARTIE III :
LA LUTTE BIOLOGIQUE
CONTRE LES CHAMPIGNONS

I. La lutte biologique

La lutte contre les agents pathogènes telluriques, se fait principalement via les bactéries appartenant aux quatre genres (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, et *Pseudomonas*), et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium*, *Trichoderma*, et *Fusarium oxysporum* non pathogènes (9).

En effet, dans certains types de sols dits suppressifs, les effets de la maladie restaient faibles.

En analysant ces sols, la présence de souches saprophytes de *Fusarium oxysporum*, non pathogènes pour la plante, a été détectée, d'où leur utilisation en lutte biologique (9).

D'autres recherches se sont orientées vers l'usage des métabolites secondaires des plantes (biopesticides botaniques) comme méthode alternative de lutte biologique.

Les extraits de ces plantes auraient ainsi des propriétés protectrices

1. Biopesticides botaniques

Les pesticides botaniques sont des métabolites secondaires naturels (composés phytochimiques) présents dans les plantes. Il s'agit des extraits de plantes, des substances volatiles végétales et des huiles naturelles qui exercent des activités de lutte contre les ravageurs / Pathogènes. Des substances isolées ou de mélanges complexes, présentant une gamme d'activités biologiques, agissant comme répulsifs, insecticides, fongicides, nématocides et bactéricides. (11)

Divers organes des plantes pesticides sont utilisés pour la préparation des extraits qui peuvent être des extraits aqueux, organiques, ou des huiles essentielles.

2. Biopesticides botaniques et production agricole

Les biopesticides végétaux représentent une des alternatives à la dépendance aux pesticides chimiques. Même si, employés seuls, ils sont généralement moins efficaces à court terme que leurs homologues chimiques. Néanmoins, ils présentent de nombreux avantages écologiques qui ne peuvent pas être ignorés. Utilisés dans une stratégie de lutte intégrée en combinaison avec les pesticides chimiques, ils permettent de limiter la quantité d'intrants ainsi que l'apparition de nuisibles résistants.

PARTIE IV :

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel et méthodes

1. Origine de la plante

Les pétales ayant fait l'objet de l'étude ont été prélevés de Serghina région de Boulmane, les pétales sont référencés et transportés au laboratoire de phytopathologie de l'ENA dans un sachet en plastique propres. Ils ont été séchés à l'étuve à 35°C puis broyer. La poudre obtenue est utilisée pour les différents tests de l'étude.



Figure 2 : Broyage de pétale du Safran



Figure 3 : Poudre de pétales du safran

2. Matériels végétaux

Etant donné que plusieurs études antérieures ont montré le rôle important des extraits de plantes dans le contrôle de différents champignons pathogène de plantes, l'extrait de pétales du safran ont été sélectionnés pour des tests d'activité fongicide, où l'extraction a été effectuée au laboratoire de phytopathologie à l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès (ENAM).

3. Obtentions des extraits végétaux

La technique d'extraction adoptée dans ce travail est la décoction. En effet, c'est une technique qui consiste à faire bouillir dans l'eau une substance pour en extraire les principes solubles ; liquide ainsi obtenu.



Figure 4 : Décoction des pétales du safran

4. Caractérisations des plantes

a. Polyphénols et flavonoïdes

Le principe en générale pour le dosage c'est que les colorations produites sont proportionnelles aux quantités de polyphénols et flavonoïdes présents dans les extraits végétaux dans un intervalle d'absorption précis.

II. Méthodes

1. Paramètre d'humidité pour le safran

Pour tester la qualité du safran et son pourcentage d'humidité pour différents échantillons. On suit le protocole suivant :

On prend 0,5g de safran de différent types (safran étuve /safran ombré /safran lyophilisé frais/ safran lyophilisé secs), et on pose chaque échantillon dans l'aluminium, et après on les mets dans l'étuve pendant 16h à 103°C.

Et pour calculer pourcentage d'humidité on utilise la relation suivante:

$$W = \left(\frac{\text{Masse initiale} - \text{Masse finale}}{\text{Masse initiale}} \right) \times 100$$



Figure 5 : Différents échantillon du safran

2.

Extraction de l'H.E à partir de pétales de safran

Après broyage de pétales du safran, on pèse 50g du P.S sont ajoutés à 500ml d'eau distillée

dans un ballon rodé d'un 1l, on ajoute 3 pierre de ponce pour homogénéiser la T°C (200°C) à l'intérieur du ballon .et on l'agite, comme montre la photo du montage de l'hydrodistillation ci-dessous :

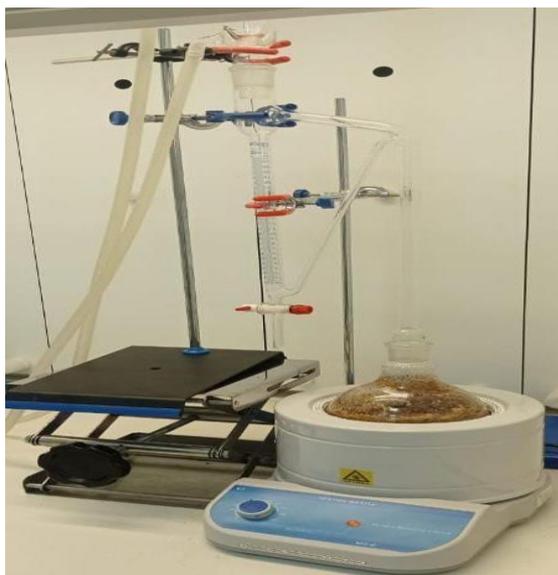


Figure 6 : Montage de l'hydrodistillation

III. Essai in vitro de l'effet antifongique des extraits des pétales de safran

1. Croissance de mycélium

Pour tester l'effet des extraits aqueux sur la croissance de mycélium pour chaque champignon. L'essai s'est basé sur le protocole de (10).

Il consiste à : - Peser les différentes masses 2 ; 5 ; 10 g pour *Botrytis cinerea* et 2 ; 5 ; 10 ; 12g pour *Penicillium digitatum* et 2 ; 3 ; 5 ; 10g pour *Rhizopus stolonifer*.

- Ajouter aux différentes quantités 200 ml de l'eau distillé pour atteindre la concentration souhaitée dans des flacons de 250ml.

- Agiter la suspension résultante.

- Mettre les flacons dans une micro-onde pour la décoction pendant 6 min.

- Puis on les filtre par un papier filtre à café, après la décoction quelques volumes sont diminués, et on calcule la quantité qu'il faut ajouter de PDA poudre pour chaque volume, par la relation suivante d'après le mode d'emploi :

Comme exemple pour :

1L	→	40g
200ml	→	X ?

-Autoclaver pendant 20min à 121°C

-Refroidir les E.A

- Distribuer dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre
- Inoculer les plaques avec le disque de culture de *Botrytis cinerea* /*Penicillium digitatum*/*Rhizopus stolonifer*.
- Incuber à 28°C pendant 7 jours.
- Les agents pathogènes cultivés sur PDA sans poudre végétale vont servir de témoins.
- Calculer le pourcentage d'inhibition.

Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (MGI) = [(diamètre de la colonie sur le traitement témoin - diamètre de la colonie sur le traitement avec extrait) / diamètre de la colonie sur le traitement témoin] × 100.

2. Germination des spores:

La méthode utilisée pour étudier l'effet de l'extrait aqueux sur la germination des spores pathogènes, selon (10), consistait à mélanger la suspension de conidies de chaque espèce préparée, avec chaque concentration d'extrait aqueux 1 % ; 2,5% ; 5% pour *Botrytis cinerea* et 1% ; 2,5% ; 5% ; 6% pour *Penicillium digitatum* et 1 % ; 1,5% ; 2,5% ; 5% pour *Rhizopus stolonifer* à volume égal (1v: 1v). Le contrôle consistait à utiliser la même quantité de suspension de spores sans extrait végétal. Les mélanges ont été incubés à 25 ° C dans des tubes de micro-centrifugeuse stériles. La germination des spores a été observée au microscope optique après 24 h d'incubation. La spore est considérée comme germée si la longueur du tube germinatif est plus longue que son plus petit diamètre.

Le taux d'inhibition de la germination des spores est déterminé selon la formule suivante : IG (%) = [(Gc - Gt) / Gc] × 100 Où, Gc et Gt représentent le nombre moyen de spores germées dans les tubes témoins et traités, respectivement. Des triples (trois répétitions) ont été évalués pour chaque concentration d'extrait de pétales.

IV. Essai in vitro de l'effet antifongique des extraits des pétales de safran

Les Oranges et les pommes et les tomates désinfectées et blessées, ont été traités avec 30 µl d'extrait aqueux de pétales à toutes les concentrations (1%/ 2,5%/ 5%/6%). Après 2 heures de périodes d'incubation à température ambiante sous haute à flux laminaire, chaque plaie a été

inoculée avec 20 μ l de suspension sporale (on prend 2 mètre carré de champignon dans 15ml d'eau stérile pure).

Pour les pommes sont inoculés par *Botrytis cinerea*, les tomates par *Rhizopus stolonifer*, et les oranges par *Penicillium digitatum*. Les fruits traités avec de la suspension et de l'eau distillée stérile ont respectivement servis de témoins inoculé et non inoculé ainsi témoin fongicide. (10) Le test a été réalisé avec trois répétitions pour chaque traitement. Après 7 jours, on fait notre lecture.

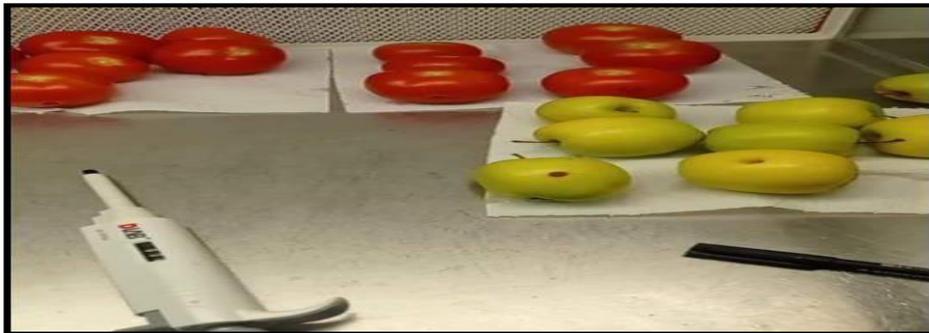


Figure 7 : Préparation du test in vivo pour la détection de l'efficacité de l'E.A sur les champignons.

V. Activité biochimique

1. Flavonoïde

On prépare un extrait méthanolique : on prend 10g de pétale dans 100ml de méthanol 80% puis pour séparer l'extrait et le méthanol (80%) on le met dans l'étuve à 35°C pendant 48h afin d'obtenir un extrait sec.

0,5 ml d'extrait méthanolique a été mélangé avec 0,3ml de solution de NaNO_2 (5%). Le mélange a été incubé dans l'obscurité pendant 6 min à T° ambiante. Pour la suite, 0,6 ml d' AlCl_3 (10%) a été ajouté et stocké pendant 5 min.

Ensuite, 3ml de NaOH (1M) ont été ajoutés et le dernier volume a été porté à 10 ml avec l'eau distillée. L'absorbance était prise à 510nm après 15min d'incubation, les valeurs ont été exprimées en mg d'équivalent Quercétine (10).

2. Polyphénols

0,5 ml de chaque échantillon et on ajoute 2,5ml de folin-ciocolteu et incubé pendant 5min à T° ambiante après vortex. Ensuite, 2ml d'une solution de carbonate de sodium à 7,5% ont été ajoutés. Le mélange après agitation, incubé dans un bain d'eau chaude à 45°C pendant 15min. Enfin, l'absorbance est mesurée à 765nm contre un blanc. Résultats exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (10).

PARTIE IV :

RESULTAT ET DISCUSSION

I. Paramètre d'Humidité :

Tableau 1: Pourcentage d'humidité du safran pur différents échantillon du safran :

Echantillon	Masse prise d'essai	Masse après 16h	Humidité $W = (M_i - M_f / M_i) / 100$
Safran étuve	0,500	0,438	6,80%
Safran ombré	0,500	0,462	7,60%
Safran Lyophilisé frais	0,502	0,430	12,88%
Safran lyophilisé secs	0,501	0,403	14,171%

- Les valeurs obtenues montrent que la meilleure qualité du safran est le safran d'étuve car elle a le plus petit pourcentage d'humidité, suivie par le safran ombré puis le safran lyophilisé frais alors que le safran lyophilisé secs est la mauvaise qualité parmi les quatre échantillons.

II. Extraction de l'Huile Essentielle à partir des pétales du safran :

Après extraction, notre expérience n'a pas donné lieu à la présence d'huile essentielle dans les pétales du safran.

III. Test in vitro :

1. Croissance de mycélium :

Tableau 2 : Effet de l'E.A sur le diamètre de mycélium champignons à travers différentes concentrations :

Concentration Champignon	Témoïn	1	1,5	2,5	5	6	Taux d'inhibition (MCI%)
Diamètre de Penicillium digitatum en mm	70/75/67	34,5/35,5/30	–	30/27/26,4	0/0/0	0/0/0	78,37%
Diamètre moyenne en mm	70,66	33,33	–	27,8	0	0	
Diamètre de Rhizopus stolonifer en mm	65,1/62,7/6 7,9	48,8/53,2/47,9	40/41,1/42,2	41,8/40/39,5	0/0/0	0/0/0	59,68%
Diamètre moyenne en mm	65,23	49,96	41,1	40,43	0	0	

- On observe que le diamètre de mycélium de deux champignons diminuent par comparaison avec le témoin en fonction d'augmentation des concentrations jusqu'à l'inhibition totale, à l'utilisation des concentrations 5% et 6% et le taux d'inhibition dépasse 59% ce qui montre la haute efficacité des E.A sur le mycélium des champignons, surtout sur le *Penicillium digitatum*.
- Pour le *Botrytis cinerea*, il y avait des contaminations même si on a répété le test plusieurs fois .

Les photos ci-dessus montre *Rhizopus stolonifer* témoin et *Penicillium digitatum* et après l'application de l'E.A du pétale du *Crocus sativus L* :

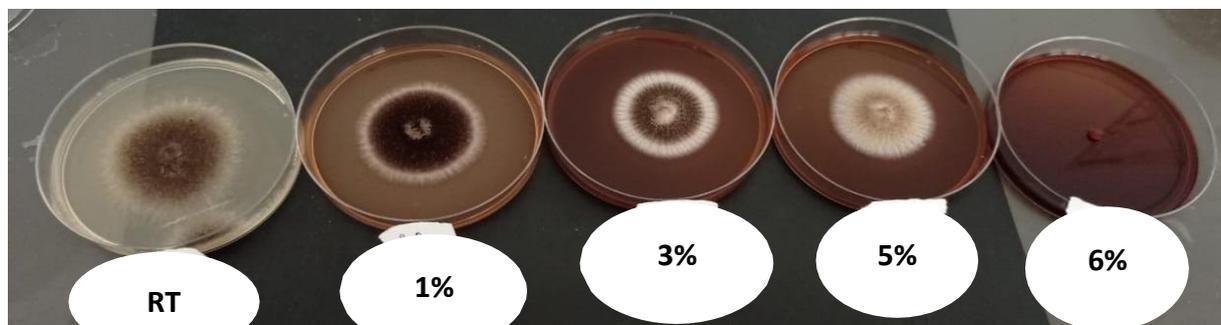


Figure 8 : *Rhizopus stolonifer* témoin et l'effet de pétales du *Crocus sativus L* des différentes concentrations sur la croissance de mycélium.

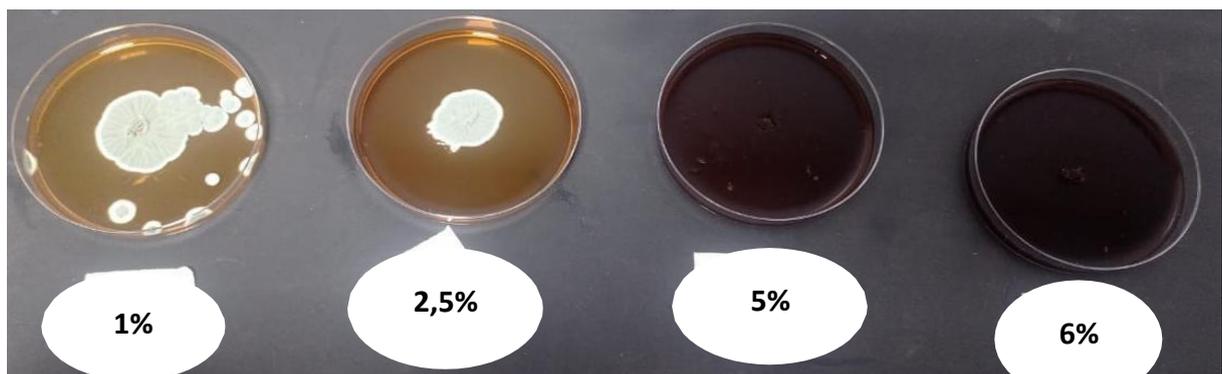


Figure 9 : Effet de différent concentration sur le mycélium de *Penicillium digitatum*.



Figure 10 : *Penicillium digitatum* témoin

2. Croissance des spores :

Tableau 3 : Effet des E.A sur la croissance des spores de champignon :

Concentration / Croissance	Témoin	1	1,5	2,5	5	6	Taux d'inhibition (IG%)
Croissance des spores de <i>Penicillium digitatum</i> en mm	76/67	36/42	26/25	19/20	5/15	0/0	73,71%
Croissance moyenne des spores en cm	71,5	39	25,5	19,5	10	0	
Croissance des spores de <i>Rhizopus stolonifer</i> en mm	57/67	22/20	19/16	16/17	2/0	0/0	81,45%
Croissance moyenne des spores en mm	62	21	17,5	16,5	1	0	
Croissance des spores de <i>Botrytis cinerea</i> en mm	63/80	28/27	18/13	10/7	0/1	0/0	85,45%
Croissance moyenne des spores en mm	71,5	27,5	15,5	8,5	0,5	0	

I. Test in vivo

Tableau 4 : Effet de l'E.A sur le diamètre de contamination des fruits inoculés par les champignons.

Concentration	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
L'activité antifongique de l'extrait de pétales de safran (<i>Crocus sativus</i> L) sur certaines maladies cryptogamiques de post-récolte.	1%	1,5%	2,5%	5%	6%		
Diamètre de contamination							



- On observe la contamination diminue en utilisant les concentrations des E.A pour les trois champignons et une très faible contamination à l'utilisation de 6% si on ne dit pas une inhibition totale de la contamination, alors les E.A des pétales du safran ont le même résultat à 6% qu'avec l'utilisation des fongicides. Donc les E.A de P.S sont une très bonne alternative qui peut remplacer les fongicides qui ont des effets dangereux.

I. Activité biochimique

Polyphénols totaux des pétales :4,85mgGAE/GMS

Flavonoïde totaux : 1,29mgQE/GMS

Alors, il y a 4,85mgGAE/GMS de polyphénols et 1,29mgQE/GMS de flavonoïdes dans 10g de pétales.

- la présence des polyphénols donnent aux pétales du safran un effet antioxydant et une défense contre les agressions, et les flavonoïdes contre les stress biotique et abiotiques et la défense contre les pathogènes ce qui répond aux résultats obtenu en test in vivo et in vitro.

Discussion générale et conclusion

Cette étude a été réalisée pour étudier l'activité antifongique de l'extrait de pétales du safran (*Crocus sativus* L) sur certaines maladies cryptogamiques de post-récolte causée par *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer*. L'étude a été divisée en trois phases. Dans la première phase, l'activité antifongique des E.A in vitro, dans la seconde l'effet de ces E.A a été testé sur le développement du champignon sur fruit, et finalement la caractérisation photochimique des extraits a été évaluée.

Après l'utilisation de l'E.A sur la croissance de mycélium on a observé une diminution marquante de diamètre de mycélium de *Penicillium digitatum* qui a été au témoin 70,66mm puis il commence à diminuer à 1% d'une valeur 33,33mm, puis 27,8mm à 2,5% jusqu'à inhibition totale à 5% et 6%, avec un taux d'inhibition de 78,37% pour toutes les concentrations. La même remarque pour *Rhizopus stolonifer* à témoin son diamètre est 65,23mm puis il diminue à 1% d'une valeur 49,96 mm puis 41,1mm à 1% et 40,43 à 2,5% jusqu'à inhibition totale à 5% et 6%, et le taux d'inhibition est 59,68%. Alors, L'E.A aqueux de pétales du safran est efficace sur le mycélium des deux champignons mais plus sur le mycélium de *Penicillium digitatum*.

La croissance de spores de trois champignons a été impressionnée par l'activité antifongique de l'extrait aqueux de pétales du safran, pour le *Penicillium digitatum*, au témoin le diamètre est 71,5mm puis commence à diminuer à 1% d'une valeur de 39 mm, et 25,5mm à 1,5%, 19,5mm à 2,5%, puis 10mm à 5% et une inhibition totale à 6%. Pour le *Rhizopus stolonifer* à témoin 62mm puis commence à 1% de diminuer 21mm, et 17,5mm à 1,5%, ensuite 16,5mm à 2,5%, et finalement elle s'inhibe à 6%. Et finalement pour les spores de *Botrytis cinerea* au témoin leurs diamètre a été 71,5mm puis commence à diminuer jusqu'à inhibition totale à 6%. Ces résultats éprouvent l'efficacité des E.A de pétales du safran.

La Contamination de *Rhizopus stolonifer* sur tomate à témoin positive est égale à 49,89cm et commence à diminuer après l'utilisation des E.A de pétales du safran à 2.5% le diamètre est 25,19mm ,puis 18,033mm à 5% et une inhibition presque totale à 6%, la même remarque pour le diamètre de contamination *Botrytis cinerea* sur pommes au témoin positive le diamètre est 4,26mm puis commence à diminuer 1,143mm à 2,5%, et 0,333mm à 5% et 0,16mm à 6%. Et le même effet de l'E,A de pétales du safran sur le diamètre de contamination de *Penicillium digitatum* sur oranges à témoin positive le diamètre est 3,33mm ,et à 2.5% est 1,33mm ,puis

0,46 mm à 5%, et presque inhibition totale "0,067" à 6%. Alors les E.A aqueux de P.S ont donné presque le même résultat que les fongicides surtout à l'utilisation de la concentration 6%. Donc les E.A de pétales du safran sont une très bonne alternative qui peut remplacer les fongicides qui ont des effets dangereux.

Pour l'activité biochimique, on a trouvé que dans 10g de pétales du safran, il y a 4,85mgGAE/GMS de polyphénols et 1,29mgQE/GMS de flavonoïdes.

De manière cohérente, dans un premier temps, les résultats obtenus et l'étude biochimique qu'on avait fait, nous ont permis de déduire que l'utilisation de pétales du safran dans la littérature est due aux présences des métabolites secondaires qui ont un effet antioxydant ce qui inhibe la germination et le développement des champignons.

En outre la concentration 5% et 6% ont bien dévoilé une inhibition totale des trois espèces fongiques. De plus il a été constaté que le pourcentage d'inhibition dépassait 50% pour toutes les concentrations étudié sur les trois champignons. Ce qui montre l'efficacité des extraits des pétales du safran sur les champignons post-récolte.

Finalement, les extraits aqueux ne cessent de montrer un niveau élevé d'activité antifongique, alors il faudra encourager et développer encore plus.

Références Bibliographiques

- (2). Lahmadi, S., Guesmia, H., Zeguerrou, R., and Maaoui, M. (2013). La Culture Du *Safran*(*Crocus Sativus L.*) En Regions Arides Et Semi Arides Cas Du Sud Est Algerien. 18–27
- (3).Aboudrare, A., Aw-Hassan, A., and Lybbert, T.J. (2014). Importance Socio-économique du Safran pour les Ménages des Zones de Montagne de la Région de Taliouine-Taznakht au Maroc. Rev. Marocaine des Sci. Agron. Vétérinaires 2, 1–14.
- (4).Mohamed E, Abdallah H, Illham k, Brahim E, Said B, Mohamed E, Mbark B, Said M, Ali D, (2021) . Valorization of *Crocus Sativus L* waste extracts as efficient, eco-friendly and economical inhibitors of scaling: Experimental and computational investigations. Journal of Molecular Liquids.doi.
- (5).Masami N,Katsumi A,(2013). virulence factors of *botrytis cinerea*.journal of general plant pathology.doi.
- (6).Brian W,Bettina T,Paul T, Jana A, Van K,(2007). *botrytis cinerea* : the cause of grey mould disease .journal of molecular plant pathology.doi.
- (7).Milind S,Iadaniya ,(2008).POSTHARVEST DISEASES AND THEIR MANAGEMENT,journal citrus fruit .doi.
- (9).Saighi I,benhamdi M,(2020). Identification et caractérisation des maladies fongiques de pomme de terre et essai de lutte biologique par les extraits végétaux dans la région d'EL-Oued.Journal Informations et ressources scientifiques sur le développement des zones arideset semi-arides.doi.
- (10).Olga R,Letricia B,Charaf E,Estelle N,Marta B,Cédric D, Stéphanie P,Caroline S,(2020). Bioaccessibilité polyphénolique et méthylxanthine des biscuits fonctionnels de coque de fève de cacao : approche métabolomique et perméabilité intestinale à travers des modèles cellulaires Caco-2.Journal MDPI.doi.

(11).Chengala L,SinghNandita, (2017). Botanical pesticides– a major alternative to chemicalpesticides: A review; International. Journal of Life Sciences.doi.

Web graphiques

(1). <https://agronomie.info/fr/description-de-la-plante-du-safran/> (consulté le 30 mai 2022)

(8). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/47661> (consulté le 30 mai 2022)

