



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID-TLEMCEN

كلية علوم الطبيعة و الحياة وعلوم الأرض و الكون

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, DES SCIENCES DE LA TERRE ET

DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Presenté par :

ZEGGAI ZAKARIA

Filière : Sciences alimentaires

Spécialité : Sécurité Agroalimentaire Et Contrôle de Qualité

Thème:

Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles du safran «*Crocus sativus*» contre les bactéries responsables des infections alimentaires.

Soutenu le 26/06/2023, devant le jury composé de :

Présidente	Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Mr. BELYAGOUBI Larbi	M.C.A	Université de Tlemcen
Encadrant	Mme. LOUKIDI Bouchra	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme.BELLIFA Samia	M.C.A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022-2023

Remerciement

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant qui nous a accordé le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite. Merci de guider nos pas pour la réalisation de ce travail.

Merci

A notre encadrant, Monsieur **BELYAGOUBI Larbi**, qui a assuré la réalisation de ce travail sous son excellente direction et avec patience.

A Madame la Professeure **LOUKIDI-BOUCHENAK KHELLADI Bouchra**, pour son soutien durant toute la période de préparation de nos mémoires, pour les souches microbiennes de référence, pour le matériel végétal du Safran et pour son aide précieuse en matériel et en produits.

A Madame la Professeure **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, pour son soutien et accompagnement durant la préparation de nos expériences et d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame Docteur **BELLIFA Samia** pour les souches bactériennes de référence, et merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame la Doyenne **Pr. SOULIMANE-MOKHTARI Nassima Amel**, de nous avoir autorisés à accéder au Laboratoire pédagogique de Microbiologie et de nous approvisionner par le matériel et les produits chimiques.

A le doctorante Monsieur **CHAOURI kamel**, pour la fourniture des extraits testés du Safran et leur aide, soutien et accompagnement durant la réalisation de notre mémoire de Master.

A Madame la Professeur **BOUCHERIT-OTMANI Zahia** pour la fourniture de la souche de référence de *Candida albicans*.

A Madame Docteur **MHAMMEDI Imane** pour les souches bactériennes de référence.

Aux Professeurs Madame **BEKHECHI-BENHABIB Chahrazed** et Monsieur **AZZI Rachid** pour la fourniture des milieux de culture nécessaires pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Aux responsables des laboratoires de Microbiologie pour leur aide et assistance, leur patience et leur appui pendant toute la période de préparation de nos mémoires de Master.

À tous nos professeurs et toute la direction pédagogique.

Merci

A ma famille, mes amis et à tous les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenu et encouragé depuis le début de ce travail de fin d'étude.



Dédicace

Mes parents , vous m'avez doté d'une éducation digne, vous n'avez jamais dit non a mes exigences et vous n'avez épargné aucun effort pour me rendre heureuse, votre présence a mes cotés a toujours été ma source de force, votre amour, votre affection, votre soutien, votre encouragement, vos conseils et vos prières a mon égard ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vous devez ma vie, ma réussite et tout mon respect. Je vous aime.

Mes frères et ma sœur et sa fiancé

Et tout la famille ZEGGAI

Mes amis

Résumé

Depuis longtemps, la connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes en médecine traditionnelle, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne. Parmi ces plants «le safran» (*Crocus sativus .L*) qui a commencé à être cultivé depuis des siècle et qui est une plante médicinale et aromatique et aussi une épice rare d'une grand valeur commercial. Une grande quantité de produits à base de safran ayant peu ou pas de valeur commerciale sont gaspillés lors de la transformation des stigmates telque les fleurs et les feuilles.

Cette étude se concentre sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits du feuilles de safran *C. sativus* contre les bactéries responsable des infections alimentaires et des intoxications alimentaires par la méthode de diffusion sur gélose, CMI et CMB, afin de de donner une valeur ajoutée aux feuilles qui sont considérées comme des déchets de la production du safran.

Les résultats obtenus ont indiqué que les extraits des feuilles *C. sativus* présente un effet antibactérien considérable sur les souches bactériens à Gram négatif et un effet antibactérien moyen sur les souches à Gram positif.

Les feuilles de *C. sativus* peuvent être utilisées comme une source de substances naturelles à activité antimicrobienne.

Mots clés : *Croccus sativus*, Feuilles, Infections alimentaires, Germes pathogènes, Activité antimicrobienne.

ملخص

إن المعرفة الإنسان في استخدام النباتات في الطب التقليدي، سواء كانت نباتات غذائية أو طبية أو سامة، قديمة جدا . ومن بين هذه ، الذي بدأ زراعته بشكل كثيف منذ عدة قرون، وهو نبات طبي وعطري وأيضا من *Crocus sativus .L* النباتات "الزعفران" التوابل النادرة ذات القيمة التجارية الكبيرة. ولكن يتم إهدار كمية كبيرة من منتجات الزعفران ذات القيمة التجارية القليلة أو معدومة عند معالجة الوصمات مثل الزهور والأوراق.

تركز هذه الدراسة على تقييم النشاط المضاد للمكروبات لمستخلصات مختلفة من أوراق الزعفران (كروكيس ساتيفوس) ضد البكتيريا المسؤولة عن التسمم الغذائي والتسمم الغذائي من خلال طريقة الانتشار ، من أجل إعطاء قيمة مضافة للأوراق التي تعتبر نفايات من إنتاج الزعفران.

وتشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مستخلصات أوراق الزعفران لها تأثير كبير مضاد للجراثيم على السلالات (غرام -) وتأثير متوسط مضاد للجراثيم على السلالات (غرام +).

و أكدنا أن أوراق الكساتيفوس تتضمن نشاط مضاد للميكروبات ضد السلالات المستخدمة و التي أدت إلى حساسية أنواع معينة من البكتيريا.

الكلمة المفتاحية : كروكس ساتيفوس، ورقة، العدوى الغذائية، الجراثيم الممرضة، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract

For a long time man's knowledge of the use of plants in traditional medicine, whether alimentary, medicinal or toxic plants, has been very ancient. Among these plants "saffron" (*Crocus sativus* .L), which began to be intensively cultivated in the centuries and which is a medicinal and aromatic plant and also a rare spice of great commercial value, But a large amount of saffron products with little or no commercial value are wasted when processing stigmas such as flowers and leaves.

This study focuses on the evaluation of the antimicrobial activity of different extracts of the leaves of saffron *C. sativus* against bacteria responsible for food infection by the AGAR and CMI CMB diffusion method, in order to give an added value to the leaves which are considered as waste from saffron production.

The results obtained indicate that extracts of the leaves *C.sativus* have a considerable antibacterial effect on the strains (Gram-) and an average antibacterial effect on the strains (Gram+).

And we confirmed that the leaves of *C.sativus* include antimicrobial activity against the strains used and which resulted in sensitivity of certain types of bacteria.

“ Evaluation of the antibacterial activity of saffron leaf extracts have an inhibitory effect on the growth of gram + and gram- and yeast bacteria.”

Key word: *Crocus sativus*, leaf, food Infections, pathogenic germs, antimicrobial activity.

Liste des abréviations

AMP: Ampiciline

AMX: Amoxiciline

B.M.H : Bouillon Mueller Hinton .

B.S : Bouillon Sabouraud

Bs: *Bacillus subtilis*

Ca: *Candida albicans*

CMI: Concentration Minimal Inhibitrice

CMB: Concentration Minimal B

COL: Colistin

D.O :Densité optique .

Ec: *Escherichia coli*

Ef: *Enterococcus faecalis*

G.M.H :Gélose Mueller-Hinton

G.S : Gélose Sabouraud

G.N : Gélose nutritive

Kp: *Klebsiella pneumoniae*

mm: millimètre

mg : milligram

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Sa: *Staphylococcus aureus*

US : Ultrason

Liste des figures

Figure 01: La morphologie de la plant Safran « <i>Crocus sativus</i> L».....	2
Figure 02: Effets bénéfiques des composants du safran sur les maladies neuropsychiatriques et liées à l'âge.....	4
Figure 03: La a poudre végétale (les feuilles de safran).....	6
Figure 04: Les extraits utilisés.....	7
Figure 05: Les antibiotiques utilisés	9
Figure 06: Ajuste la D.O avec un coloremètre.....	9
Figure 07: Plaque 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.....	13
Figure 08: Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations.....	16
Figure 09 : Effet de différents antibiotique sur les souches (Ec , Bs , Ef ,Pa).....	17

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	8
Tableau 02 : Concentrations et masses des extraits aqueux du feuilles de <i>C.sativus</i> dans les puits.....	13
Tableau 03 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits des feuilles de <i>C. sativus</i>	15
Tableau 04: CMI et CMB (ou CMF) de les extrait des feuilles <i>C.sativus</i> sur quelques micro-organismes.....	18

Table des matières

<i>Liste des abreviations</i>	I
<i>Liste des figures</i>	□
<i>Liste des tableaux</i>	□
<i>Table des matières</i>	□
□. Introduction	1
□. Materiel et méthode	6
Matière végétale.....	6
1.Préparation des extraits	6
1.1.Préparation des extraits aqueux	6
1.2.Préparation des extraits par succession des solvants	6
1.3.Préparation des extraits d'acetate d'ethyl	7
2.Etude du pouvoir antimicrobien.....	8
2.1.Souches testées.....	8
2.2.Conservation des souches	8
2.3.Milieus de culture	8
2.4.Les antibiotiques utilisés.....	9
2.5.Les antifongiques utilisés.....	9
2.6.Préparation de l'inoculum.....	9
2.7.Ensemencement	10
2.8.Application des disques d'antibiotiques	10
2.9.Lecture	10
3.Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits du feuilles de safran.....	10
3.1.Méthode de diffusion sur gélose	11
3.2.Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB).....	11
Résultat et Discussion	14
1.Méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)	15
2.Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode en milieu liquide	18
Conclusion	21
Résumé.....	22
Référence	23

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Elles constituent une source importante de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires. Face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques, la recherche de nouvelles molécules actives et à large spectre d'action est devenue une nécessité (**Chaouche et al., 2016**).

Parmi les plantes médicinales «le SAFRAN» (*Crocus sativus* L.), connu sous le nom d'«or rouge» ou «roi des épices dans le monde», est un ingrédient multifonctionnel et une épice onéreuse, qui est utilisé depuis non seulement comme condiment culinaire, mais aussi comme source de nourriture favorable et colorant, parfums et encres (**Belyagoubi et al., 2021**). était également utilisé pour teindre les textiles, mais était rarement utilisé uniquement pour teindre des soies précieuses ou à des fins spéciales, notamment médicales (**Jansen, 2005**).

Cette épice historique,est originaire de régions d'Asie,Il a commencé à être cultivé intensivement au 10ème siècle en Perse à Derbinah et Ispahan. Mais les anciens égyptiens et Les grecs et romains le connaissaient parmi les premiers ,comme il est mentionné dans les manuscrits de papyrus écrits en hiéroglyphes, comme dans l'Iliade d'Homère. après le safran était importé de l'est en Espagne depuis des siècles, où il est considéré comme le meilleur au monde (**Hamza, 2016**). Puis la culture du safran s'est déplacée de l'Andalousie vers le Maghreb. le Maroc est en tête. L'Algérie a du connaître cette culture dans les contrées proches de l'Andalousie comme à Tlemcen et probablement à Bejaïa. Durant l'époque coloniale l'expérimentation proprement dite a eu lieu dans les années 1920 au Jardin du Hamma (**Zobeidi et Benkhalifa, 2014**). Le mot « safran » est d'origine arabe « za'faran » qui veut dire « colorer avec du safran », il lui-même dérivé d'asfar « jaune» et de «asfar safra » «fleur jaune» et les mots « *Crocus* » et « safran » est proche-orientale. est issu des grecs «krokus» qui signifie « fil » et désigne le stigmate du safran (**Crozet et al., 2012 ; Katzer, 2001**).

Crocus sativus, une plante inconnue à l'état sauvage, a eu besoin de l'intervention humaine pour survivre. Elle est triploïde et stérile, et se reproduit par reproduction végétative grâce à son corne, organe de réserve semblable à un bulbe . Les tubercules lui permettent de stocker le stockage pendant l'hiver, ce qui en fait une plante vivace (**C.R.T.S.R.A, 2012**). Épice vivace bulbeuse de la famille des Iridacées, elle est appréciée comme épice dorée. Les plantes ne se reproduisent pas par graines. La partie souterraine, le bulbe, se divise pour donner naissance à de nouvelles plantes. Les

fleurs fleurissent en automne. Les fleurs lilas à violettes sont caractérisées par trois stigmates de 25 à 30 mm de long attachés aux pétales, qui sont récoltés comme safran. Il y a aussi 3 étamines jaunes qui ne sont pas récoltées faute d'ingrédients actifs. Cette stigmatisation est associée à des styles qui contiennent peu d'ingrédients actifs et uniquement du safran de qualité inférieure. Une à sept fleurs fleurissent de chaque bulbe (Wani.A et a.l, 2011).

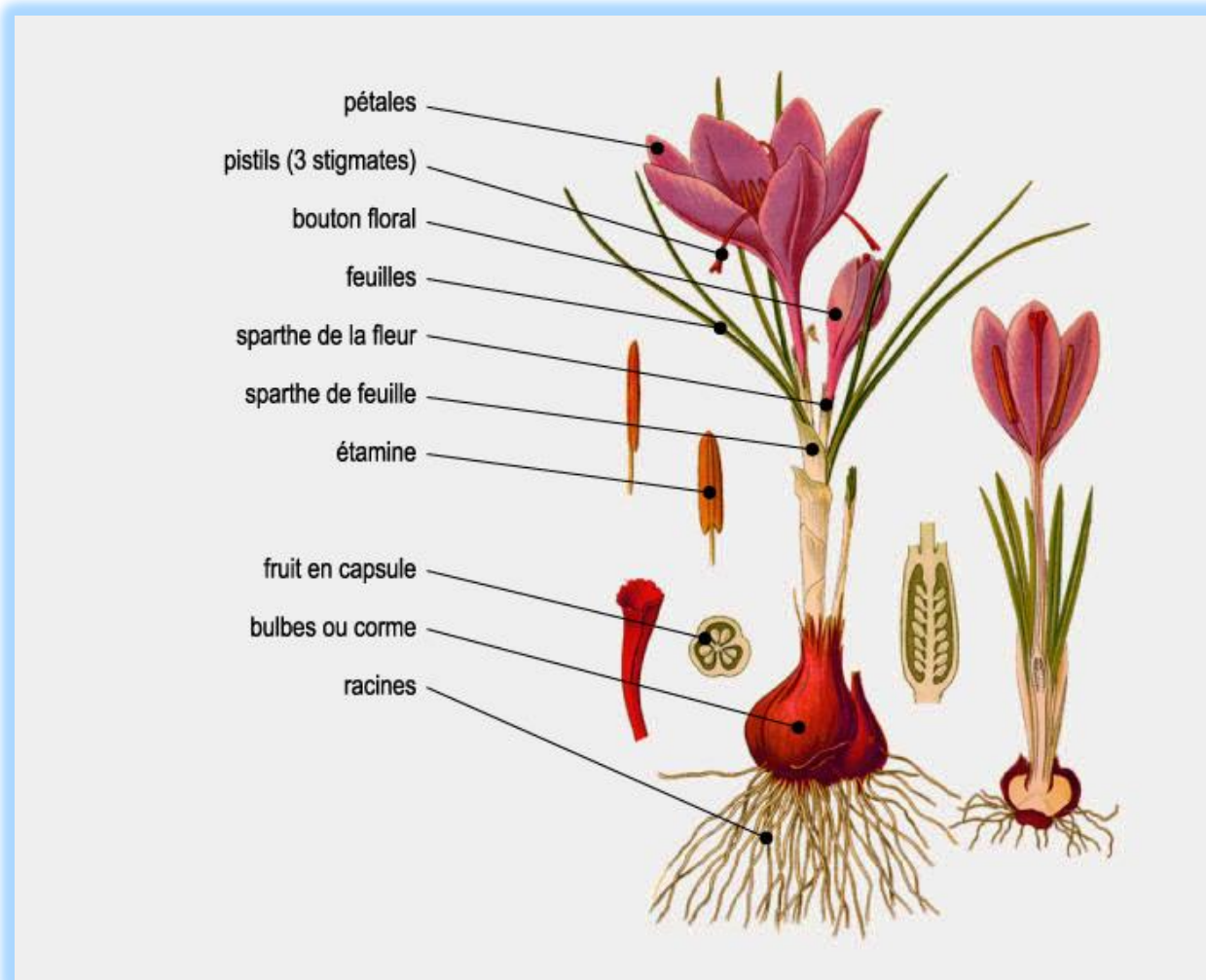


Figure 01: La morphologie de la plant Safran «*Crocus sativus* L». (www.safrandesaulnes.fr ;11 juillet 2023)

Crocus sativus s'octroie une culture à contre saison puisque la végétation a lieu en hiver et l'entrée en dormance commence dès le début de l'été. La pérennisation de cette plante se fait grâce à la multiplication végétative à partir du corme souterrain.

Ainsi, la culture du safran est totalement dépendante de l'homme et cela depuis des siècles (Palomares, 1988). Il pousse dans une large gamme de sols, mais se développe mieux dans des sols

argileux calcaires profonds, bien drainés, avec une texture lâche qui permet une pénétration facile des racines. les meilleurs sols pour la production de safran sont ceux à texture sablonneuse ou limoneuse, mais le plus important est un sol bien drainé. Dans des conditions non irriguées, des niveaux élevés de matière organique améliorent la texture du sol et la capacité de rétention de l'eau, ce qui favorise des rendements élevés. Néanmoins, la plante peut tolérer des hivers rigoureux, survivant à des gels de -10 °C ainsi qu'à de courtes périodes sous la neige (**New Zealand Institut, 2003**).

Le safran a fait l'objet d'études phytochimiques approfondies et une variété de molécules biologiquement actives ont été isolées. Le safran est non toxique dans les études animales (DL₅₀ - 20,7 g/kg), non cytotoxique dans les études *in vitro* (DL₅₀- 200 mkg/ml). De différents laboratoires dans le monde, ont rapportés des données sur l'effet du safran sur les maladies coronariennes ; activités antigénotoxiques et cytotoxiques (**Abdullaev., 2007**).

En médecine traditionnelle, le safran a été utilisé comme aphrodisiaque, antispasmodique, expectorant et agent pour contraster les maux d'estomac, la tension, la dépression et l'insomnie. Parmi ces constituants, la crocétine et la crocine sont considérées comme les principaux composants bioactifs actifs, qui exercent leurs propriétés pharmacologiques principalement par leur forte activité antioxydante. (**Belyagoubi et al., 2021**). Actuellement, l'impact du safran sur le système nerveux central, principalement sur les maladies mentales, est largement étudié et de nombreuses données sont disponibles. Il existe également des preuves substantielles montrant que le safran a plusieurs avantages sur les maladies liées à l'âge, y compris les maladies cardiovasculaires, les maladies oculaires,. Les principaux effets bénéfiques des principaux composants du safran sur les maladies neuropsychiatriques et liées à l'âge sont résumés dans la (**Figure 02**) (**El Midaoui et al., 2022**).

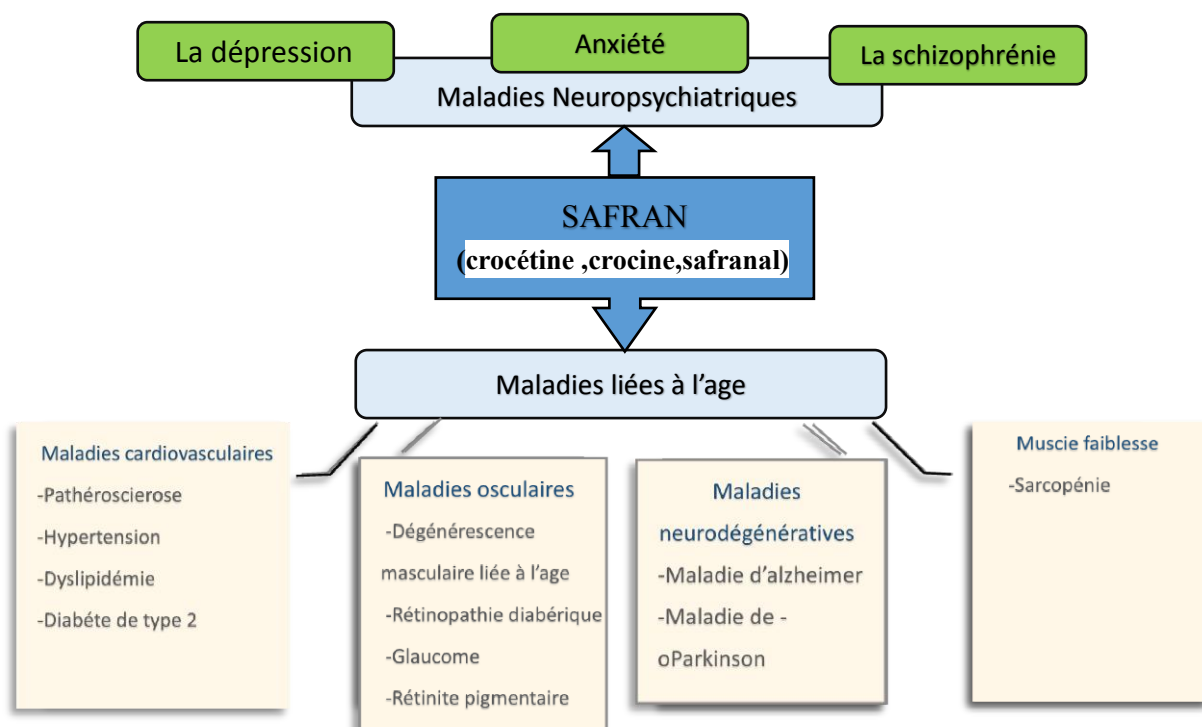


Figure 02 : Effets bénéfiques des composants du safran sur les maladies neuropsychiatriques et liées à l'âge. (Jadouali , 2018)

L'épice de safran est appréciée dans le monde entier pour sa capacité à fournir de la couleur, du goût et de l'arôme aux aliments et pour ses propriétés biomédicales, en tant qu'activités antitumorales et antioxydantes.

Cependant, une grande quantité de produits à base de safran ayant peu ou pas de valeur commerciale sont gaspillés lors de la transformation des stigmates. Ces deux coproduits, fleurs et feuilles, sont actuellement inutilisés et ont été très peu étudiés. Les autres parties de la fleur sont des sous-produits ou des bio-résidus. La feuille a été utilisée comme nourriture pour les ruminants (Jadouali , 2018).

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles de safran *crocus sativus L.* contre les bactéries responsables des toxi-infection . et donne une valeur économique ajouté au feuilles de safran.

Matériel et Méthodes

◆ Matière végétale

C. sativus a été collecté dans le Djebel Zaafran de la Commune d'Ain Fezza (coordonné à Latitude : 34°52'36" Le Nord, Longitude : 01°12'55" L'Ouest et L'altitude 863 m : Province de Tlemcen), en Algérie, le novembre 2018. Les stigmates ont été séparés du matériel floral (à l'exception des stigmates) et séchés à l'air à l'ombre dans une pièce ventilée à température ambiante pendant plusieurs jours (**Figure 3**) (**Belyagoubi et al., 2021**). Le matériel végétal a été fourni par Pr. LOUKIDI Bouchra.



Figure 03 : Poudre végétale des feuilles de safran.

1. Préparation des extraits

Les extractions des feuilles de safran ont été réalisés par le doctorant CHAOURI kamel

1.1. Préparation des extraits aqueux

20g de la poudre végétale (les feuilles de safran) a été mise à une extraction par macération à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans 150 ml de l'eau distillée pendant 24h. Après macération, on a utilisé le papier Whatman pour filtrer les mélanges. Ces dernières ont été évaporées les solutions aqueuses obtenues dans un évaporateur rotatif de type HAHNVAPOR HS-2005V-N à sec à 50°C sous pression réduite.

1.2. Préparation des extraits par succession des solvants :

Obtention de la fraction méthanoïque et la fraction aqueuse :

Afin d'obtenir la fraction aqueuse, les feuilles ont été soumises à différentes extractions dans différents solvants de polarité croissante

Extraction des huiles fixes:

Par la méthode Soxhlet, peser avec précision 20 mg de la poudre des feuilles de *C. sativus* et remplir une cartouche propre est bouchée avec du coton puis mettre dans un siphon qui est relié à un

ballon contenant 250ml d'hexane. Après 3 heures d'extraction à une température comprise entre 40 à 45°C, récupérer les huiles fixées. Ensuite l'hexane a été évaporé dans un évaporateur rotatif à une température de 45°C et être concentrées.

Pour une évaporation complète de l'hexane, la cartouche a été placée dans un four pendant 16 heures à une température de 30 à 35°C Le résidu sec a subi des extractions par macération pendant 72 heures par utilisation successives des solvants du moins polaire au plus polaire

- ✧ Fraction de dichlorométhane
- ✧ Fraction d'acetylacetate
- ✧ Fraction Acetone
- ✧ Fraction Butanol
- ✧ Fraction Methanol
- ✧ Fraction Aqueuse

1.3.Préparation des extraits d'acétate d'éthyle ;

-Macération eau/Méthanol 70/30 (48h)

-Filtration

-Evaporation à sec

-ajouter 100ml HCl 2N pendant 1H sous reflux

-lavage par acétate d'éthyle V/V (la répéter 3 fois)

-Evaporer la phase aqueuse.

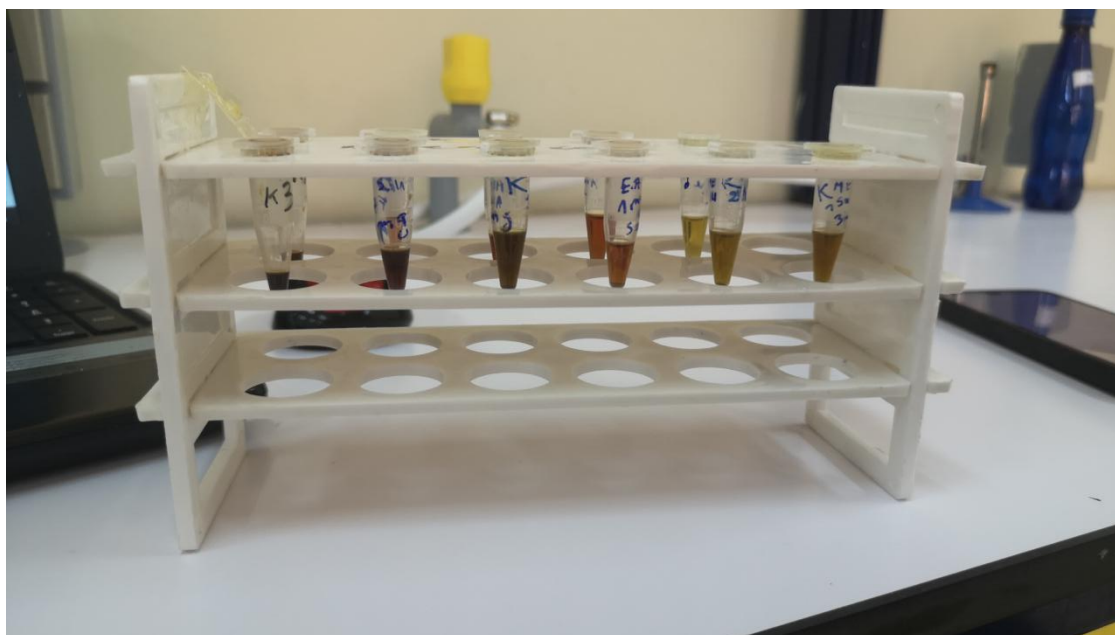


Figure 04: Les extraits utilisés

2-Etude du pouvoir antimicrobien

2.1. Souches testées

Pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne, on a utilisé les souches de références qui sont mentionnées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

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

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

2.2. Conservation des souches

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée en tubes à essais. Les cultures pures sont conservées à +4 °C à l'obscurité jusqu'à son utilisation. Pour une conservation à long terme les isolats ont été stockés à - 80 °C dans le bouillon Mueller Hinton (ou Sabouraud pour *Candida*) additionné de 30% (v / v) de glycérol.

2.3. Milieux de culture :

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

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

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

2.4. Les antibiotiques utilisés (Fig.05)

- ❖ Ampicilline (AMP) 10 µg (Biocare) Algérie (A)
- ❖ Amoxiciline (AMX) (B)
- ❖ Colistine (COL)(C)

2.5. Les antifongiques utilisés

- ❖ Nystatine 100 µg (Sigma-Aldrich) (NYS)(D)

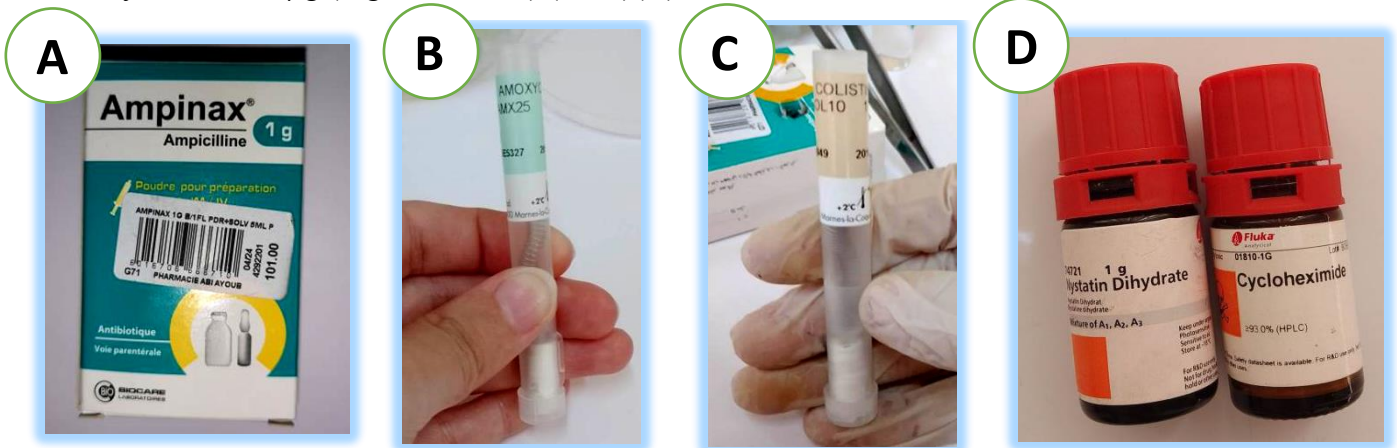


Figure 05 : Les antibiotiques utilisés (A: Amp ; B: Amx ; C: Col ; D: Nys)

2.6. Préparation de l'inoculum

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



Figure 06 : Ajuste la D.O avec un colorimètre

2.7. Ensemencement

Les boîtes Pétri sont coulées à une épaisseur de 4 mm, car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un résultat erroné. Ensuite, Les boîtes sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant l'ensemencement afin d'éliminer l'humidité.

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al., 2008**).

2.8. Application des disques d'antibiotiques

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm entre les centres.

Un disque de 6 mm de diamètre d'antibiotique est déposé aseptiquement sur la surface du milieu ensemencé.

Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application (**Ammari et al., 2005**).

Ensuite, les boîtes sont placées à 4 °C pendant environ 2 h, ceci pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives et aussi de ralentir la croissance microbienne (**Kitouni, 2007**). Puis, on les place à l'étuve pour une incubation de 24 h à 37°C ± 1 pour les bactéries et de 48 h à 30°C ± 1 pour les *Candida*.

2.9. Lecture

- ✓ On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition dans les deux directions perpendiculaires autour des disques à l'aide d'une règle graduée sur le fond de la boîte.
- ✓ On compare les résultats aux valeurs critiques selon le diamètre d'inhibition, puis on classe la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou Résistance (**CASFM, 2005, 2018**).

3. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de safran

3.1. Méthode de diffusion sur gélose

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave puis imprégnés de 10 µL d'extrait aqueux des feuilles de safran avec des charges respectives de

1 et 3 mg/disque. Ces disques sont déposés à la surface de la gélose (G.M.H pour les bactéries et G.S pour les levures) préalablementensemencée en surface avec la suspension microbienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits.

Des disques d'ampicilline (**10 µg**) et d'amoxiciline (**25µg**) ont été utilisés aussi des disques d'colistine (**10 µg**) et de la nystatine (**100 µg**) pour les *Candida*.

L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les *Candida* (NCCLS, 1997; CLSI, 2015).

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

3.2. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

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

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

Des dilutions en série sont préparées dans une microplaque à fond en U (plaque à microtitration) de 96 puits dans la gamme de concentration choisie (**75 000 µg/ml à 0.143 µg/mL**) (Figure 07 et Tableau 02).

Tout d'abord, nous mettons 100 µL de bouillon B.M.H (ou B.S) dans les puits. Ensuite, nous déposons 100 µl des extraits aqueux du feuille de safran *C.sativus L* dans le puits 2, ensuite le puits 3 et puis effectuons les dilutions successives (100 µL de puits 3 dans puits 4 et ainsi de suite). De plus, on met 100 µl de la suspension bactérienne (ou fongique) dans les puits 1 puis 3 à 22 pour obtenir un volume final de 200 µl avec une concentration finale de micro-organismes de $\approx 5 \times 10^5$ UFC/ml. Il faut impérativement désinfecter la micropipette à l'alcool pour éviter les problèmes de contaminations et il est important d'homogénéiser le tube contenant la souche en le passant au vortex avant de l'ajouter dans les puits (Abedini, 2013).

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

La lecture est faite soit visuellement. La CMI est définie comme la plus faible concentration inhibitrice de l'extrait par laquelle le micro-organisme ne démontre pas une croissance visible (ou

démontre une coloration jaune avec le réactif INT).

Pour déterminer la CMB, on prélève 10 µL des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (G.M.H ou G.S) et on incube les boîtes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 24 h. Le lendemain, on peut déterminer grâce à cette culture la CMB. **(Belyagoubi , 2021).**

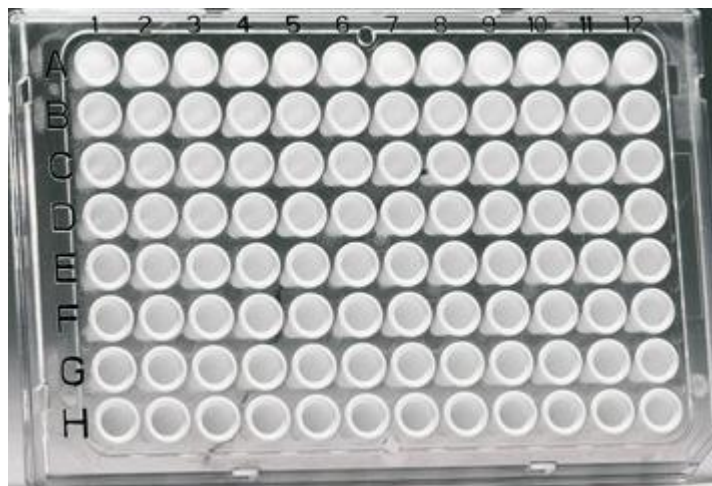


Figure 07 : Plaqué 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.

Tableau 02: Concentrations et masses des extraits aqueux du feuilles de *C.sativus* dans les puits

Numéro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...	18
Concentration dans le puits (µg/ml)	TC	TCE	75000	37500	18750	9375	4688	2344	1172	586	293	146.5	...	2.29
Masse de l'extrait sec (µg)/puits	/	/	7500	3750	1875	937.5	468.8	234.4	117.2	58.6	29.3	14.65	..	0.229

TC : Témoin de culture ; TCE : Témoin de la couleur de l'extrait aqueux

Résultats et Discussion

1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)

Nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques pour mettre en évidence et démontré le pouvoir antimicrobienne des extraits des feuilles de Safran (*C. sativus*) de la station d'Ain Fezza vis-à-vis de six souches bactériennes et une levure *C. albicans* ATCC10231 Les charges ont été prises dans l'ordre 1 et 3 mg/disque. Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disques sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 03 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits des feuilles de *C. sativus*.

Extrait/ antibiotique		Zone D'inhibition						
		Bactérie						
		Gram-			Gram+			levure
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>C. albicans</i>
K1	1 mg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 mg	6.75±0.35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
K2	1 mg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.75±0.35
	3 mg	6.75±0.35	ND	ND	ND	6.65±0.35	ND	8.75±0.35
K3	1 mg	8.75±0.35	6.65±0.35	ND	ND	6.8±0.28	ND	ND
	3 mg	8.8±0.28	6.65±0.35	6.7±0.28	ND	7.25±0.35	ND	ND
K1'	1 mg	9.85±0.35	ND	ND	ND	ND	ND	21.25±0.35
	3 mg	8.8±0.28	ND	ND	ND	ND	ND	19.25±0.35
K2'	1 mg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 mg	9.85±0.35	ND	ND	ND	ND	8.45±0.21	9.75±0.35
K3'	1 mg	12.2±0.42	ND	ND	7.25±0.35	ND	ND	ND
	3 mg	11.15±0.35	6.95±0.21	9.35±0.21	9.25±0.25	ND	ND	6.65±0.35
AMP	1mg	ND	7±0.14	21.9±0.14	28.05±0.7	35.1±0.57	32.8±0.28	ND
AMX	2.5mg	ND	ND	16.1±0.28	24.1±0.14	28.05±0.7	26.25±0.35	ND
COL	1mg	14±0.28	14±0.28	14±0.28	9.6±0.14	12±0.38	ND	ND
NYS	10mg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34.8±0.28

K1: Fraction méthanolique (sans ultrason)

K2: Extrait acétate éthyle (sans ultrason)

K3: Extrait acétate éthyle (avec ultrason)

K1': Fraction aqueux (sans ultrason)

ND : Non déterminé

K2': Extrait aqueux (sans ultrason)

K3': Fraction acétone (sans ultrason)

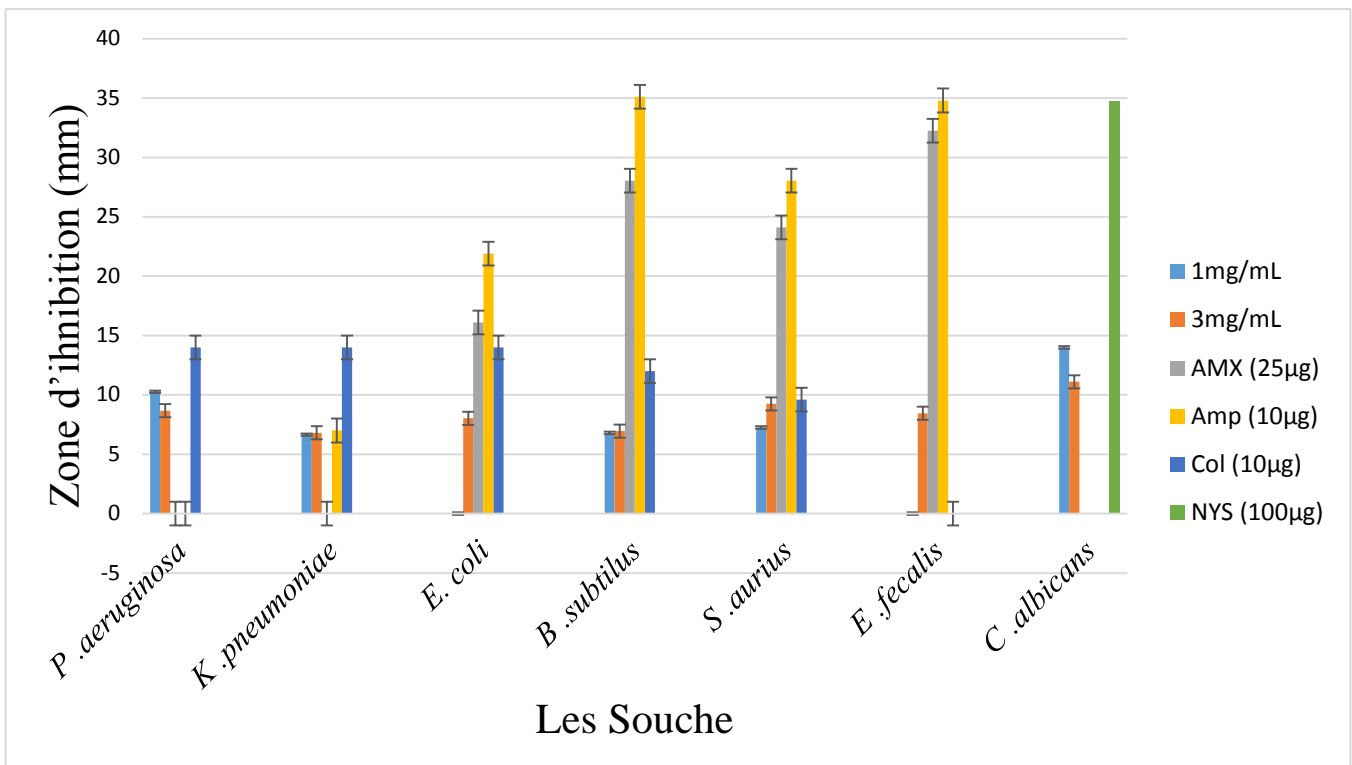


Figure 08 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations.

D'après nos résultats illustrés dans le **Tableau 7**, nous remarquons que les extraits des feuilles *C. sativus* présente un effet antibactérien considérable sur la souche *P. aeruginosa* (**Gram-**) et surtout l'extrait **k3'** (Fraction acétone (sans ultrason)); par contre on remarque aussi que les extraits des feuilles de *C. sativus* présente un effet antibactérien très faible sur la souche *E. fecalis*.

Et nous constatons que les deux extraits **K3** « Extrait acétate éthyle (avec ultrason) » et **K3'** « Fraction acétone (sans ultrason) » présente un effet antibactérien sur toutes les souches **Gram-** et un effet moyen sur les souches **Gram+**.

Par contre l'extrait **K1** «Fraction méthanolique (sans ultrason)» s'est montré actif uniquement sur la souche *P. aeruginosa* avec un effet négligeable (**6.75 mm**) par la charge 3mg, cela explique que l'extrait **K1** n'a aucune activité antimicrobienne vis-à-vis des souches utilisées.

On observe aussi que *C. albicans* a donné des zones d'inhibition les plus grandes de **21.25 mm** (1mg/disque) et **19.25 mm** (3mg/disque).

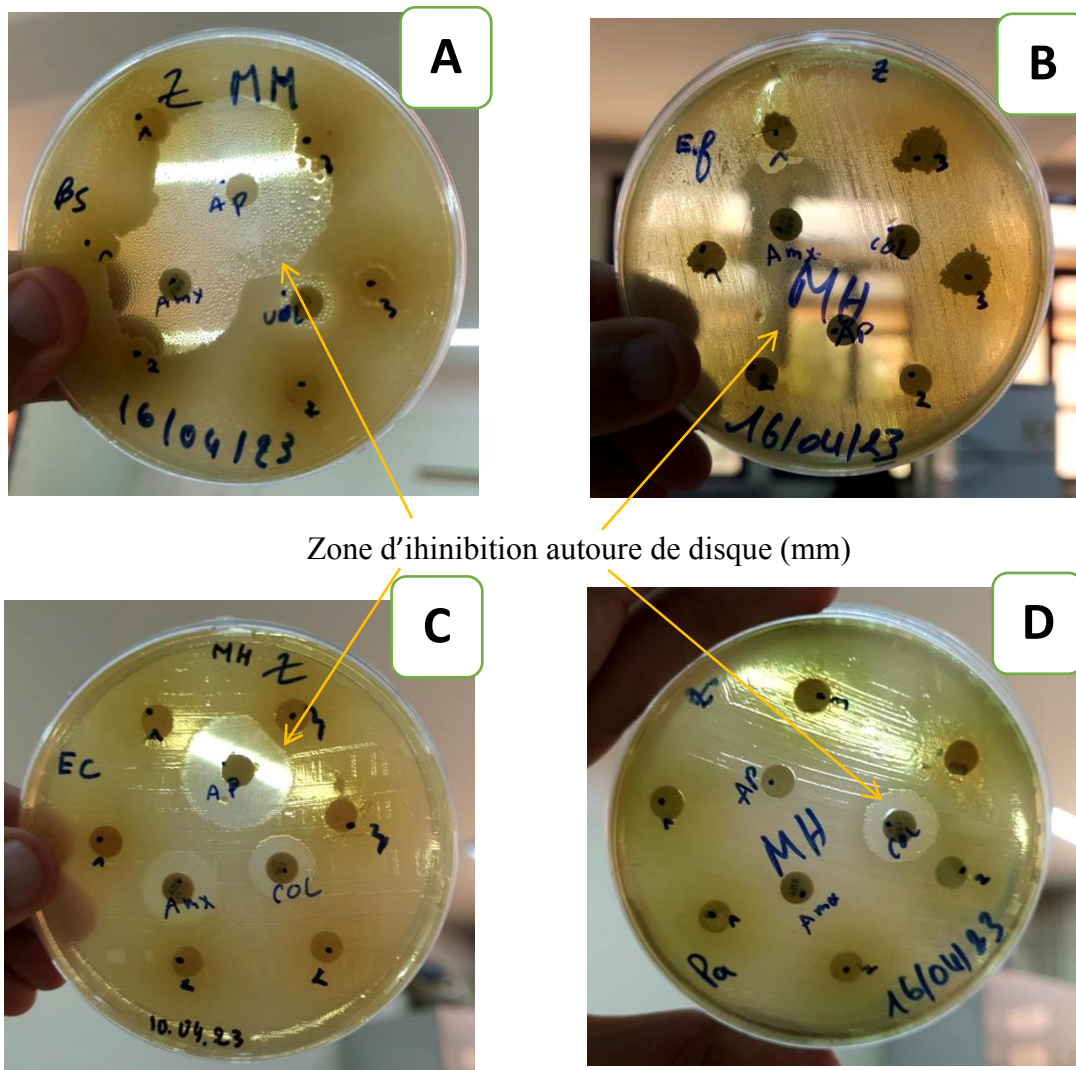


Figure 09 : Effet de différents antibiotique sur les souches

(**A**:*B subtilis* , **B**:*E faecalis* , **C**:*E coli* , **D**:*P aeruginosa*).

D'après les résultat mentionnés dans **les Figures 8 et 9** , la Colistine et a exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis de tout les bactéries à Gram + et à Gram - , aussi l'Amoxicilline et l'Ampicilline ont exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis la majorité des bactéries à Gram - et toutes les bactéries à Gram+. Concernant l'antifongique la nystatine, une forte activité

inhibitrice a été enregistré contre *C.albicans* avec des zones d'inhibition de l'ordre de **34.80 mm** pour la charge de 1mg/disque.

Les résultats obtenus ont montré que les extraits des feuilles de safran *C. sativus* possèdent une activité antimicrobienne sur les souches testées avec une différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-.

2.Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode en milieu liquide:

Tableau04 :CMI et CMB (ou CMF) des extrait des feuilles de *C. sativus* sur les souches testées.

	(µg/mL)	K1	K2	K3	K1'	K2'	K3'	
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	CMI	>75000	18750	4688	17000	37500	18750
		CMB	>75000	75000	>75000	>136363	>136363	>136363
	<i>E.coli</i>	CMI	ND	ND	18750	ND	ND	ND
		CMB	ND	ND	75000	ND	ND	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	CMI	ND	ND	37500	ND	ND	ND
		CMB	ND	ND	75000	ND	ND	ND
Gram+	<i>E. faecalis</i>	CMI	ND	ND	ND	68181	136363	ND
		CMB	ND	ND	ND	>136363	>136363	ND
	<i>B. subtilis</i>	CMI	ND	ND	37500	ND	ND	ND
		CMB	ND	ND	>75000	ND	ND	ND
Levure	<i>C. albicans</i>	CMI	ND	37500	ND	ND	ND	ND
		CMB	ND	75000	ND	ND	ND	ND

ND : Non déterminé

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 04, les valeurs de la CMI sont comprises entre 4.688 mg/mL et 136.363 mg/mL. La plupart des valeurs de la CMB sont supérieures à 75 mg/mL.

Nous remarquons aussi que les valeurs de CMI des extraits **K2**, **K3**, **K1'**, **K2'** et **K3'**, sont comprises entre 4.68 mg/mL et 18.5 mg/mL. Concernant l'extrait **K1** les valeurs sont supérieures à 75 mg/mL. Par contre tous les extraits ont montré une valeur de CMB supérieure ou égale à 75 mg/mL pour la souche *P. aeruginosa*.

Les extraits **K1'** et **K2'** ont montré un effet antimicrobien sur *E. faecalis* (Gram+) avec des valeurs de CMI de l'ordre de 68.181 mg/mL et 13.363 mg/mL, respectivement et une valeur de CMB supérieure à 136.363 mg/mL. Pour l'extrait **K2** une activité antifongique a été enregistrée sur *Candida albicans* avec des valeurs de CMI et CMB de l'ordre de 37,5 mg/mL et 75 mg/mL, respectivement.

D'après l'étude de **Jadouali (2018)**, l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques (4500 µg/puits, 9000 µg/puits et 13500 µg/puits) contre six bactéries testées *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *Proteus mirabilis* et *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* a révélé que seul l'extrait des feuilles *C. sativus* représente une source de substances ayant une activité antimicrobienne contre ces bactéries sauf sur *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *Proteus mirabilis*.

Conclusion

Conclusion

Ce présent travail réalisé a démontré que les feuilles de Safran *C. sativus* de Tlemcen montre des propriétés antimicrobiennes intéressantes sur les 7 souches pathogènes.

Les résultats ont montré que les extraits de feuilles de *C. sativus* présentent un effet antimicrobien sur toutes les souches (à Gram +, à Gram - et la levure). Nous avons conclu que les deux extraits de feuilles de safran «Extrait acétate éthyle (avec ultrason)» et «Fraction acétone (sans ultrason)» ont une activité antibactérienne plus importante contre les bactéries testées à Gram - et à Gram + respectivement *B. subtilus* et *S. aureus*. Un effet inhibiteur a été enregistré aussi sur *P. aeruginosa* et *C. albicans* à différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus, nous avons confirmé que les feuilles de *C. sativus* possèdent une activité antimicrobienne.

Nous envisageons comme perspective:

- Détermination de la composition phytochimique des extraits testés.
- Préparation des produits à base de substances naturelles extraites à partir des feuilles du safran .
- Evaluation de d'autres activités biologiques : Antioxydante , Anti-inflammatoire , Antidiabétique.
- Détermination des mécanismes d'action des molécules bioactives de safran.

Résumé

Depuis longtemps, la connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes en médecine traditionnelle, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne. Parmi ces plants «le safran» (*Crocus sativus .L*) qui a commencé à être cultivé depuis des siècle et qui est une plante médicinale et aromatique et aussi une épice rare d'une grand valeur commercial. Une grande quantité de produits à base de safran ayant peu ou pas de valeur commerciale sont gaspillés lors de la transformation des stigmates telque les fleurs et les feuilles.

Cette étude se concentre sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits du feuilles de safran *C. sativus* contre les bactéries responsable des infections alimentaires et des intoxications alimentaires par la méthode de diffusion sur gélose, CMI et CMB, afin de de donner une valeur ajoutée aux feuilles qui sont considérées comme des déchets de la production du safran.

Les résultats obtenus ont indiqué que les extraits des feuilles *C. sativus* présente un effet antibactérien considérable sur les souches bactériens à Gram négatif et un effet antibactérien moyen sur les souches à Gram positif.

Les feuilles de *C. sativus* peuvent être utilisées comme une source de substances naturelles à activité antimicrobienne.

Mots clés : *Croccus sativus*, Feuilles, Infections alimentaires, Germes pathogènes, Activité antimicrobienne.

Références bibliographiques :

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

Abdullaev, F.(2007): *Biological properties and medicinal use of safron (Crocus sativus L.). Acta Hort. (ISHS) 739, 339–345 . <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.739.44>*

Ammari, H., Benslimani, A., Rahal, K., Tali Maamar, H., (2005). *Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. 4ème Ed. Algérie, p : 84.*

Belyagoubi.L ., Loukidio.B; Belyagoubi-Benhammou.N ;Gismondi.A · Di Marco.G ; D'Agostino.A ; Canini.A ;Benmahieddine.A ;Rouigueb.K ; Ben Menni.D ; Atik-Bekkara.(2012) .; *Valorization of Algerian Safron: Stigmas and Flowers as Source of Bioactive Compounds.*

CASFM, (2018). *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris: Société Française de Microbiologie. Disponible sur le lien: <http://www.sfm-microbiologie.org>.*

Chaouche.T , Haddouchi.F , Zerhouni .K , Sidi yekhlef.A ;(2016) *Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of Helichrysum stoechas subsp. rupestre .*

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

Crozet, A., de Sus-Rousset, H. & de Durfort, S.J. (2012) *Crocus sativus L. (Iridaceae), le safran(I). Phytothérapie 10, 121–125.*

C.R.T.S.R.A (Centre de Recherche Scientifique sur les Regions Ardis el omar) ;(2012) *Ficher technique de la culture du safran en regions ardis .;*

Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier .p476 .*

El Midaoui.A , Ghzaiel.I ,Dominique.V , Ksila.M ,Zarrouk.A , Thomas.N ,Khalouki.F et al

.;2022; *Saffron (Crocus sativus L.): A source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age Related Diseases.*

Hamza.Eljbali;(2016) أسرار العلاج بالنباتات الطبية و المكسرات و التوابل . (n.p.): Dar Al Ausra Media and Dar Alam Al-Thaqafa for Publishing.:(page23)

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

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse doctorat :Microbiologie : Université Mentouri-Constantine.

Katzer.G (2001).*Saffron (Crocus sativus L); Gernot Katzer's Spice page.*

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

NCCLS "National Committee for Clinical Laboratory Standards". (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.

New Zealand Institut .(2003). New Zealand institute for Crop & Food Research Ltd. **Reformule**

Palomares C. (1988). LE SAFRAN, PRECIEUSE EPICE OU PRECIEUX MEDICAMENT.Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants, in disease and health. *Int J BiomedSci.* 4(2):89-96. 2008.

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

Vitali, L.A., Beghelli, D., Biapa Nya, P.C .(2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermu* .

Wani.A ; Mohiddin.F.A ; Khan Rouf Hamza.A .(2011). *Saffron : A repositior of medicinal properties.*

Zobeidi.Z & Benkhalifa.A (2014). *La culture du Safranier (Crocus sativus L.) en Algérie,*
DOI :10.13140/RG.2.2.20923.67368/1.
m ammi. Arabian J Chem; 9(6): 775-78