

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة أبي بكر بلقايد تلمسان

UNIVERSITEABOU-BEKRBELKAID-TLEMCEN

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

Département de Biologie



Mémoire

Présenté par *BAI Fatima Zohra & CHABANE Amani*

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences alimentaires

Option : Sécurité Agroalimentaire Et Assurance De Qualité

Thème :

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits du pétale du Safran *Crocus. sativus L*
contre les microorganismes responsables des infections alimentaires**

Soutenu le 26.06.2023, devant le jury composé de :

Président	Mme. BELYAGOUBI Nabila	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	M. BELYAGOUBI Larbi	MCA	Université de Tlemcen
	Mme. LOUKIDI Bouchra	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BELLIFA Samia	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023



Remerciements

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 la doctorante Madame **MELIANI Nouria**, 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 nos familles, nos amis et à tous les personnes qui de près ou de loin nous ont soutenus et encouragés depuis le début de ce travail de fin d'étude.



Dédicaces

Je dédie ce travail à la femme qui m'adonnée naissance, ma source de vie, à ma très chère maman.

À l'âme de l'homme qui m'a appris le courage et la force, à mon père

À celles qui sont toujours à mes cotes, mes précieuses sœurs Ismahane, Nour El Houda, Imane, Sarra.

A mon très chers frère Abed El Basset.

Aussi à mes petits anges Iyade, Mirale, Boubou Rayane, Islame et Siradje.

Et bien sure Je tien finalement à dédie ce travaille à ma grande mère, mes oncles, mes tantes et toutes mes amies.

BAI Fatima Zohra



Dédicaces

Je dédie ce travail :

Aux plus exceptionnels qui existent dans le monde mes parents, **GHOUTI** et **FATMA**. Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études qu'Allah me les garde.

A mes chers frères et mes chères sœurs **AYMEN**, **AHMED**, **AMIRA**, **ANFEL**.

À mon marie **GHOUTI** pour son soutien tout au long de l'année, son amour, qu'il reçoit à cette occasion l'expression de tout mon amour.

Je dédie mon bébé que j'attends, et qui m'a accompagné durant toute la période de préparation de mémoire.

A toute ma famille **CHABANE** et ma belle-famille **MAZOUNI**.

CHABANE Amani

Résumé

Crocus sativus L est une plante largement utilisée pour la production de l'épice de safran à partir des stigmates, tandis que le reste des fleurs récolté est jeté.

Ce travail consiste à une valorisation des déchets floraux de safran (les pétales de safran) vu son composition riche en substances bioactives et des différentes familles chimiques et à évaluer leur activité antimicrobienne contre les microorganismes responsables des intoxications et toxi-infections alimentaire.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de pétale de safran *Crocus sativus L* vis-à-vis des souches de références (bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif et une levure) par la méthode de diffusion sur disques qui a été utilisé pour la détermination des diamètres d'inhibitions, la méthode de détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB) et la bioautographie. Ils ont montré une inhibition des germes sauf *S. aureus*, et cela indique qu'il existe un effet bactéricide et bactériostatique et fongistatique des extraits contre les souches testées.

En générale, les pétales de safran montrent une bonne activité antimicrobienne et nous pouvons les considérer comme un antibiotique naturel qui aura une application commerciale et économique dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux

Mots clés : *Crocus sativus*, Extraits de pétales de safran, Infections alimentaires, Micro-organismes, Activité antimicrobienne.

Abstract

Crocus sativus L is a plant widely used for the production of saffron spice from the stigmas, while the rest of the harvested flowers are discarded.

This work consists of a valuation of saffron floral waste (saffron petals) given its composition rich in bioactive substances and different chemical families and to evaluate their antimicrobial activity against the microorganisms responsible for food poisoning and toxic infection.

The evaluation of the antimicrobial activity of *Crocus sativus L* saffron petal extracts against reference strains (gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria and a yeast) by the disk diffusion method which was used for the determination of inhibition diameter, the determination method inhibitory concentrations (CMI and CMB) and bioautography. They showed inhibition of germs except *S. aureus*, and this indicates that there is a bactericidal and bacteriostatic and fungistatic effect of the extracts against the strainstested.

In general, saffron petals show good antimicrobial activity and we can consider them as a natural antibiotic against food poisoning, which will have commercial and economic application in the pharmaceutical and biomedical fields.

Keywords: *Crocus sativus*, saffron petals extracts, food infection, microorganisms and antimicrobial activity.

ملخص

كروكوس ساتيفوس ل نبات يستخدم على نطاق واسع لإنتاج توابل الزعفران من الوصمات ، بينما يتم التخلص من بواقي الأزهار المقطوفة.

خلال هذه الدراسة سنتطرق إلى تقييم نفايات الزعفران الزهرية (بتلات الزعفران) نظراً لكونها غنية بالمواد النشطة بيولوجياً والعائلات الكيميائية المختلفة ولتقييم نشاطها المضاد للميكروبات ضد الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن التسمم الغذائي و العدوى السامة.

تقييم النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات بتلات الزعفران ضد السلالات المرجعية (البكتيريا الممرضة موجبة الجرام وسالبة الجرام والخميرة) بواسطة طريقة الانتشار القرصي التي تمكن من تحديد قطر التثبيط , طريقة تحديد التركيزات المثبطة (CMI و CMB) والتصوير الحيوي يمكن من إظهار تثبيطاً من الجراثيم باستثناء *S. aureus*، وهذا يشير إلى وجود تأثير مبيد للجراثيم ومضاد للجراثيم والفطريات للمستخلصات ضد السلالات المختبرة.

بشكل عام ، تُظهر بتلات الزعفران نشاطاً جيداً كمضاد للميكروبات ويمكن اعتباره مضاداً حيوياً طبيعياً ضد التسمم الغذائي و الذي سيكون له تطبيق تجاري و اقتصادي في الميدان الصيدلاني و البيوطبي.

الكلمات المفتاحية: كروكوس ساتيفوس ل ,مستخلصات بتلات الزعفران, التسمم الغذائي, الكائنات الحية الدقيقة, النشاط المضاد البكتيري.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>I</i>
<i>Abstract</i>	<i>II</i>
<i>ملخص</i>	<i>III</i>
<i>Table des matières</i>	<i>IV</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>VI</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>VII</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>VIII</i>
<i>Généralités</i>	<i>1</i>
<i>Matériel Et Méthode</i>	<i>5</i>
1. Introduction	6
2. Les extraits de pétales de safran	6
2.1. Extrait aqueux	6
2.2. Extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle	7
2.3. Fraction méthanolique	7
2.4. Fraction aqueuse	7
3. Souches testées	8
4. Milieux de culture	8
5. Antibiotiques et antifongiques utilisés	9
6. Étapes préliminaires à l'étude	11
6.1. Préparation de l'inoculum	11
6.2. Ensemencement	11
7. Méthodes d'analyses	12
7.1. Méthode de diffusion sur disque	12
7.1.1. Mode opératoire.....	12
7.1.2. L'incubation.....	12
7.1.3. Lecture	12
7.2. Méthode de Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB).....	13
7.2.1. Définition de CMI et CMB.....	13
7.2.2. Mode opératoire.....	13
7.2.3. Incubation	15
7.2.4. Lecture	15
7.2.5. Détermination de CMB :	15
7.2.6. Lecture des boites	16
7.3. La bioautographie	16
7.3.1. Définition.....	16

7.3.2. Mode opératoire.....	16
1. Introduction	19
2. Résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque	19
2.1.1. Résultats d'antibiotique (contrôle positif)	19
2.1.2. Extrait aqueux	20
2.1.3. Extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle	21
2.1.4. Fraction méthanolique et fraction aqueuse	21
3. Résultats de la CMI et CMB/CMF	23
4. Résultats de la bioautographie	27
<i>Conclusion et Perspectives</i>	<i>29</i>
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>31</i>

Liste des abréviations

μorg : microorganismes.

BMH : Bouillon Mueller Hinton.

BS : Bouillon Sabouraud.

HCl : Chlorure d'Hydrogène.

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie du <i>Crocus.sativus</i> L	2
Figure 1 : Extrait aqueux.....	6
Figure 3 : Extrait d'acétate d'éthyle.....	7
Figure 4 : Ampicilline (AMP) 10µg(Biocare)	9
Figure 5 : Nystatine 100 µg (Sigma-Aldrich)	10
Figure 6 : Amoxicilline (AMX) 25µg (bio Rad).....	10
Figure 7 : Colistine (COL) 10µg (bio Rad).....	11
Figure 8 : Dessin explicite de la méthode des dilutions sur plaque	14
Figure 9 :Manipulation des dilutions sur plaque.....	15
Figure 10 :Confirmation de CMB	15
Figure 11 : Dépôt d'échantillon sur plaque de couche mince	16
Figure 12 :Bioautographie sur les boîtes de pétri.....	17
Figure 13 : Zones d'inhibition moyenne de la fraction méthanolique et aqueuse.	22
Figure 14 : Résultats de méthode de diffusion sur disques.....	23
Figure 15 : Des microplaques après incubation	25
Figure 16 : Résultat de CMB	26
Figure 17 : Composants d'extrait après migration	27
Figure 18 : Résultat de bioautographie de <i>C. albicans</i>	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Apport en nutriment et minéraux de pétale et stigmates de safran	3
Tableau 2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	8
Tableau 3 : Les milieux de culture utilisé dans cette étude	9
Tableau 4 : Concentrations et masses des extraits des pétales de Safran dans les puits.....	14
Tableau 5 : zones d'inhibition moyenne des contrôles positifs (mm)	19
Tableau 6 : Zones d'inhibition moyennes des trois charges d'extrait aqueux :.....	20
Tableau 7 : Zones d'inhibition moyennes d'extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle :....	21
Tableau 8 : Résultat de CMI et CMB ($\mu\text{g/ml}$)	24
Tableau 9 : Les rapports CMB/CMI des différentes extrait et microorganismes.	26

Généralités

Depuis l'antiquité, les plantes sont réputées pour leurs usages diversifiés dans le secteur alimentaire, médicinale, phytothérapie ou autres. Parmi ces plantes on s'intéresse au *Crocus sativus L*, autrement dit le safran.

Le mot safran vient du latin safranum, également Açafrao portugais, zafferano italien et azafrán espagnol (**Harper, 2001**). Safranum lui-même vient du mot arabe aşfar (أصفر) qui signifie "jaune", à travers un synonyme du mot za'farān(زعفران), le nom de l'épice Arabe (**Katzer, 2001**). Selon d'autres sources, en fonction de la présence de la culture Safran sur le plateau Iranien, le safran viendra de Zarparanen Perse (زرپران, zar (زر) signifiant « or » et par (پر) signifiant « plume », ou « stigmate »), vu dire une plume d'or (**Asbaghi et al., 1988**).

Crocus sativus L une espèce parmi 85 espèces de genre *Crocus*, est une plante cormous qui appartient à la famille des Iridacées (**Dupont et al., 2007**). Elle est largement utilisée pour la production de safran à partir des stigmates, C'est la partie précieuse de la fleur. Le safran représente l'épice la plus chère au monde, pour une variété de raisons. D'une part, il nécessite 150 000 fleurs de crocus pour l'obtention de seulement 1 kg de safran sec (**Palomares, 2015**). D'autre part, il ne s'agit pas d'une plante sauvage car les fleurs de safran ne produisent pas des graines viables alors la plante dépend des mains d'homme pour sa reproductibilité (**Lilia et al., 2017**), donc, c'est la cherté de main d'œuvre qui influence son prix, sans mentionner ses vertus culinaires, pharmaceutiques et médicinales. Le safran a traversé différentes cultures, civilisations et continents, aujourd'hui, L'Iran, l'Espagne, le Maroc, l'Inde, la Grèce et l'Italie sont les principaux producteurs.

Les fleurs de safran sont violettes, hermaphrodites, régulières, constituées de 6 tépales (3 pétales et 3 sépales), 3 étamines jaunes et un pistil, divisées en 3 longs stigmates rouge vif, veloutés, de 3 à 4 cm de longueur (**Winterhalter et al., 2000**) la figure ci-dessous explique la morphologie de la fleur.

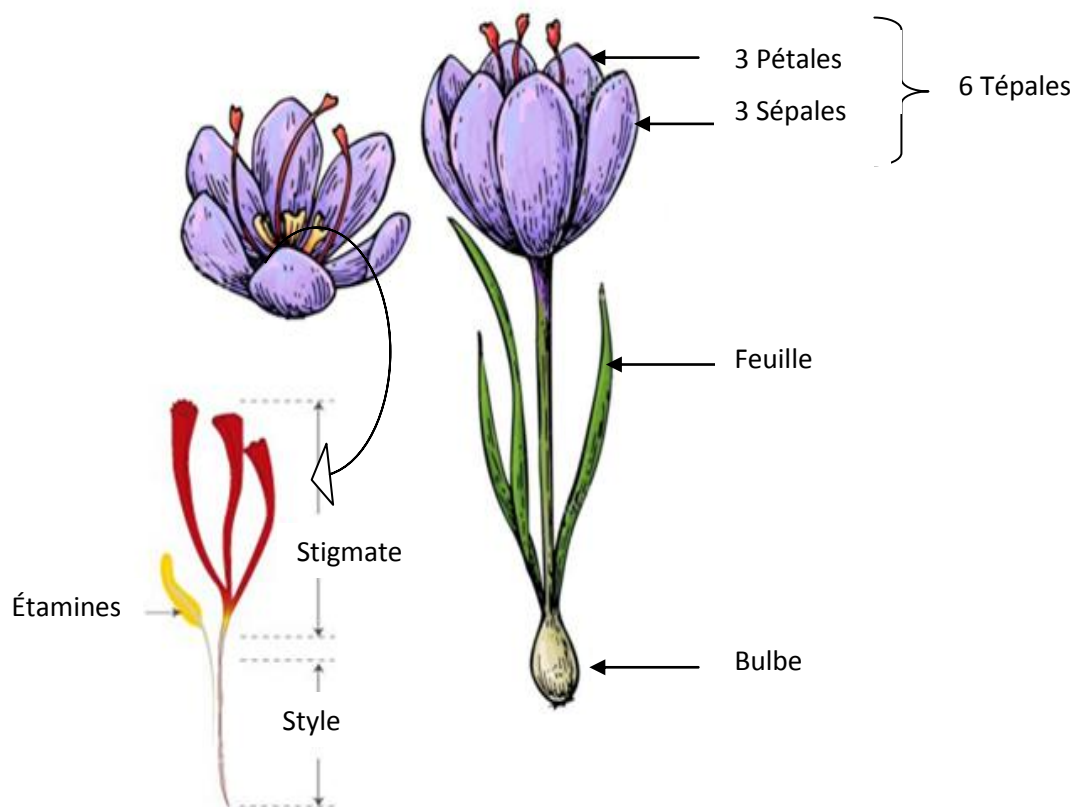


Figure 2: Morphologie du *C. sativus L*

Les analyses chimiques faites sur *C. sativus L* ont révélé la présence des métabolites primaires diversifiés (protéines, sucres, fibres, graisses et minéraux) comme indiqué dans le tableau 01, et une variété des métabolites secondaires biologiquement actifs, qui sont :

- Les caroténoïdes (crocine et crocétine), responsables de la couleur d'épice.
 - Les flavonoïdes et leurs dérivés sont de loin le deuxième type le plus abondant de composants bioactifs présents dans les stigmates de *C. sativus L*. Les principaux flavonoïdes sont le kaempférol, l'astragale, la vitexine...etc.
 - la picrocrocine, responsable de gout amer du safran.
 - le safranal (huile essentiel), responsable d'arome et odeur caractéristique du safran.
- (Palomares, 2015 ; Abu-Izneid et al., 2020).**

Diverses études thérapeutiques ont été décrites : le safran avec ses constituants bioactifs ont montré plusieurs propriétés bénéfiques, notamment, antioxydants ; anti cancérogène ; antidépresseur ; antitussive ; antidiabétique ; anti Alzheimer et anti inflammatoires. Ses

métabolites secondaires existent aussi dans d'autres parties de la fleur mais avec des proportions variées.

Traditionnellement, seuls les stigmates sont collectés, séchés et utilisés comme épices, tandis que le reste des fleurs est jeté (Environ 90% du plante récolté est jeté). Cependant, la composition phytochimique de ces parties de la fleur récemment suscité l'intérêt de la communauté scientifique à cause de sa composition riche en substances bioactives et en raison d'une valorisation de déchets floraux de safran (**Fahim et al., 2012; Caser, 2020 ; Belyagoubi-Benhammou et al., 2023**)

Les pétales de safran ont révélé leur potentiel en tant que riche source de différentes familles chimiques. La teneur de safran en nutriments et éléments minéraux sont cité dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Apport en nutriment et minéraux de pétale et stigmates de safran (**Fahim et al, 2012**). **Les stigmates (Palomares, 2015)**

Composé	Quantité	
	Pétales sec	Stigmates séchés
Protéines	10.20 %	12%
Matières grasses	5.3 %	5%
Cendres	7 %	-
Fibres	8.80 %	5%
Sodium	25.75 mg/100 g	5% Minéraux totaux
Potassium	542,13 mg/100g	
Calcium	486,25 mg/100 g	
Cuivre	0,87 mg/100 g	
Fer	17.99 mg/100g	
Magnésium	2,93 mg/100g	
Zinc	1.80 mg/100g	
le phosphore	209,90 mg/100 g	

(-) : absence d'information

Ils sont également composé de : caroténoïdes (crocine et crocétine) anthocyanines (la cause de couleur de pétales) et composés phénoliques. On ne peut pas ignorer la présence la plus intense des flavonoïdes dans les pétales que le reste de la fleur de safran (**Belyagoubi-Benhammouet al., 2023**). Le principale flavonole de pétale est le kaempférol 3-O-sophoroside avec un pourcentage de 12.6% (**Hosseini et al., 2018**). La diversité des composés bioactif montre une variété de propriété et activité biologique de ces pétales.

Certaines agents infectieux qui se trouvent dans les aliments et les boissons provoquent des infections alimentaires en produire des toxines protéiques ou glucido-lipidoprotéiques (**Birembaux, 2017**). Les toxi-infections alimentaires sont causées par les microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, virus,...) qui se multiplient et libèrent des toxines responsables des troubles (**Prescott et al., 2010**) au temps que les intoxications sont causées par des toxines présent dans l'aliment par deux mécanismes : Endogène (toxicose produit dans l'organisme) ou Exogène (toxicose produit en dehors de l'organisme) (**Maiga Fatoumata, 2019**). Cependant, l'utilisation d'agents antimicrobiens ou de conservateurs est efficace pour éliminer la présence ou inhiber la croissance microbienne. Des recherches ont montré que certains produits naturels tels que les huiles essentielles, les herbes et les épices ont des propriétés antimicrobiennes ou antifongiques et peuvent donc être utilisés comme agents antimicrobiens, la question posé est; est ce que des extraits de pétales de safran peuvent aussi prévenir leurs croissance ?

Notre travail porte sur l'étude de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits de pétale de *C. sativus L* contre les microorganismes responsables des intoxications et toxi-infections alimentaires.

Matériel Et Méthode

1. Introduction

Dans le cadre d'étudié l'activité antimicrobienne des extraits de pétales de *C. sativus L* contre les microorganismes contaminant les denrées alimentaire, le laboratoire pédagogique de microbiologie ; département de biologie de faculté de science de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Baker Belkaid-Tlemcen, nous a accueillis pour l'élaboration de ce thème de fin d'étude. Ces manipulations microbiologiques font intervenir des microorganismes pathogènes, Donc il est indispensable de se protéger contre les contaminations tout en respectant les conditions d'asepsie et les consignes de sécurité.

2. Les extraits de pétales de safran

Pour effectuer cette étude on a utilisé les extraits suivants avec une concentration de 100mg/ml (1mg/10 μ L): Les extractions ont été réalisées par la doctorante MELIANI Nouria.

2.1. Extrait aqueux

Cet extrait est obtenu par une macération de matière végétale brute (pétale de *C.sativus L*) dans l'eau distillé pendant 48h à 4°C. Après la macération deux étapes sont effectué ; la filtration et l'évaporation dans le rotavapor à45°C. L'extrait est récupéré dans de l'eau distillé à une concentration bien déterminé. Voici une figure (figure 2) d'extrait aqueux.

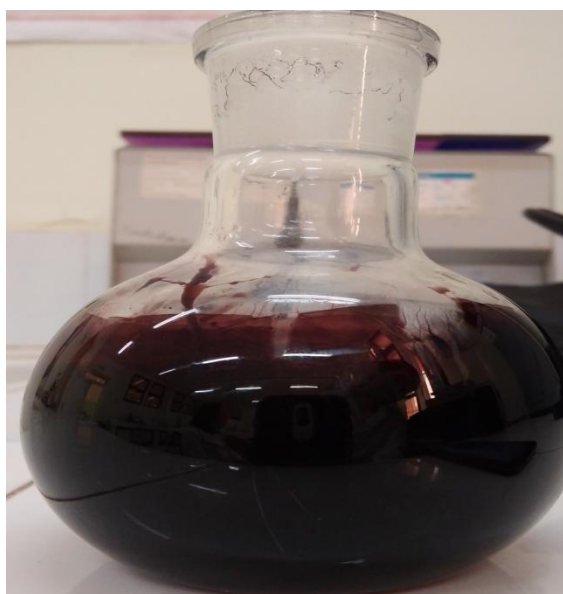


Figure 3 : Extrait aqueux

2.2. Extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle

L'obtention de l'extrait acétate d'éthyle est comme suit :

10g de la matière végétale est macéré dans un solvant eau, méthanol (70/30 (v/v)) pendant 48h à 4°C. Cette étape est suivie par une filtration et évaporation pour obtenir un extrait sec. En suite, l'hydrolyse acide d'extrait sec dans le ballon par l'ajoute de 100ml de HCl à 2N en reflux pendant 1h à 45°C. Finalement, un lavage à l'acétate d'éthyle est effectué pour obtenir l'extrait. La figure 3 représente un extrait d'acétate d'éthyle (Li et al., 2020).

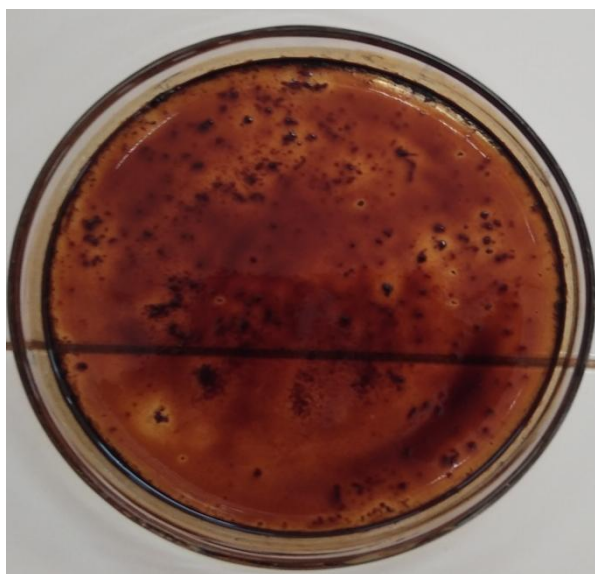


Figure 3 : Extrait d'acétate d'éthyle

2.3. Fraction méthanolique

Est obtenu suite à un fractionnement dans des solvants à polarité croissante : dichlorométhane ; acétate d'éthyle ; acétone ; butanol ; méthanol, c'est une macération dans 100mL de méthanol. Après une filtration et évaporation, l'extrait est récupéré dans de l'eau distillé.

2.4. Fraction aqueuse

C'est la dernière fraction dans l'eau distillé après le fractionnement dans les solvants cité précédemment, la macération dans 100mL d'eau distillé. Après les étapes de filtration et évaporation, l'extrait est récupéré dans l'eau distillé.

3. Souches testées

Dans le but de tester l'effet antimicrobien in vitro des extraits de pétale, on a utilisé des souches de références qui sont mentionnées dans le tableau suivant :

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

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	LVR
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	LVR
<i>Klebsiellapneumoniae</i>		ATCC700603	LAMAABE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	LVR
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAMAABE
<i>Enterococcusfaecalis</i>		ATCC 29212	LVR
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPSAB

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

4. Milieux de culture

Les milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne ce qui permet à l'étude de l'activité antimicrobienne. Les milieux utilisés durant cette étude, sont indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Les milieux de culture utilisé dans cette étude

Milieu de culture	pH	Utilisation
Gélose nutritive	6.0	pour la conservation des souches
Bouillon Mueller Hinton	7.4	pour le repiquage des bactéries
Gélose Mueller-Hinton	7.4	Pour l'évaluation d'activité antimicrobienne des bactéries
Bouillon Sabouraud	5.6	Pour le repiquage de levure
Gélose Sabouraud	5.6	Pour l'évaluation d'activité antimicrobienne de levure

5. Antibiotiques et antifongiques utilisée

Les antibiotiques utilisés sont illustrée dans les figures ci-dessus :



Figure 4: Ampicilline (AMP) 10µg(Biocare)



Figure 5: Nystatine 100 μg (Sigma-Aldrich)

Pour l'AMP et Nystatine On a utilisé des disques de 6 mm de diamètre imbibés d'antibiotique à des charges bien définies selon CLSI(2015).



Figure 6: Amoxicilline (AMX) 25 μg (bio Rad)

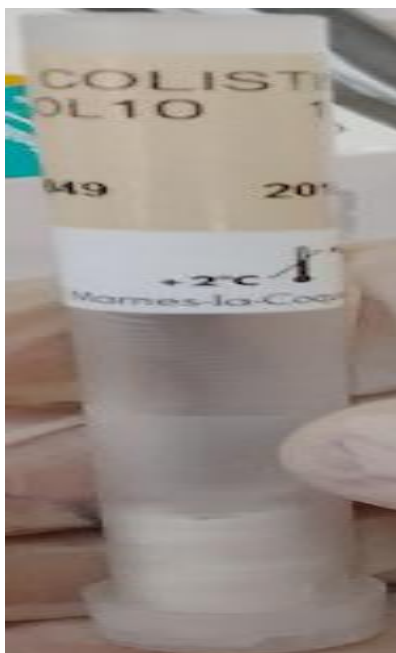


Figure 7: Colistine (COL) 10µg (bio Rad)

6. Étapes préliminaires à l'étude

6.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est un échantillonnage de microorganismesensemencé dans un milieu de culture biologique par inoculation.

- Dans les bouillons (BMH pour les bactéries et BS pour les levures), on a réalisé une pré-culture des souches pour garantir la croissance.
- Après incubation de 18/24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 30°C pour les levures, la turbidité est ensuite ajustée au standard Mc Farland 0.5 avec un colorimètre, on ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien le milieu (BMH ou BS) stérile pour le diluer s'il est trop chargé. Les normes correspondent à 10^8 UFC/mL pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm) et 10^6 UFC /mL pour les levures (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm).
- On doit faire l'ensemencement dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. (Rahal et al., 2008 ; Vitali et al., 2016).

6.2. Ensemencement

Les boîtes Pétri sont coulées à une épaisseur de 4 mm. Ensuite, ils sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant l'ensemencement afin d'éliminer l'humidité.

- dans le tube de la suspension bactérienne, on trompe un écouvillon stérile puis on doit 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. et on Répète l'opération 2 fois, en tournant la boîte 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.
- on doit recharger l'écouvillon à chaque fois quand on ensemence une boîte de Pétri. (**Rahal et al., 2008**).

7. Méthodes d'analyses

7.1. Méthode de diffusion sur disque

7.1.1. Mode opératoire

Cette méthode consiste en une diffusion sur milieu solide (la gélose Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) qui a été ensemencé avec les différentes souches bactériennes, un support (disque de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave) contenant 10µL de l'extrait (à différentes charges :0,25mg ;0,5mg ;1mg) et des antibiotiques (des disques d'ampicilline (10µg) et de colistine (10µg) et amoxicilline (25µg) ont été utilisés comme des contrôles positifs pour les bactéries et des disques de la nystatine(100 µg) pour les *Candida*) à tester sera déposé par-dessus (**Benmahieddine et al., 2021**). Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits et ralentir la croissance microbienne (**Kitouni, 2007**).

Deux répétitions sont effectuées pour chaque charge.

7.1.2. L'incubation

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**).

7.1.3. Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition dans les deux directions perpendiculaires autour des disques avec une règle graduée sur le fond de la boîte sans enlever le couvercle.

7.2. Méthode de Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

7.2.1. Définition de CMI et CMB

CMI : concentration minimale inhibitrice

On cherche la plus petite concentration de l'extrait qui inhibe toute culture visible de la souche. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique de notre extrait.

CMB : concentration minimale bactéricide.

On cherche la plus petite concentration de l'extrait qui ne laisse pas les microorganismes survivants de l'inoculum après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h (**Abedini, 2013**). Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de notre extrait.

Ces paramètres d'inhibitions de la croissance microbienne par les extraits sont déterminés par dilution en milieu liquide (micro-dilution en bouillon) selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (**NCCLS, 2001**).

7.2.2. Mode opératoire

Tous les tests ont été effectués dans B.M.H pour les bactéries et B.S pour les levures. Et les dilutions en série sont préparées dans une microplaque à fond en U (plaque à micro-titration) de 96 puits.

- Nous mettons 100 µL de bouillon B.M.H (ou B.S) dans les puits.

Ensuite, nous déposons 100 µL des extraits (la gamme de concentration (50.000µg/mL à 1,5258µg/mL) 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 microbienne dans les puits 1 puis 3 à 18 pour obtenir un volume final de 200 µL avec une concentration finale de microorganismes de $\approx 5 \times 10^5$ UFC/mL. La figure 8 explique la méthodes des dillustion en série et le tableau ci-dessous explique les concentrations des extraits sélectionnés a effectué cette étude dans les microplaques.

(**Lopez et al., 2018; Benmahieddineet al., 2021**)

Tableau 4 : Concentrations et masses des extraits des pétales de Safran dans les puits

Numéro	1	2	3	4	5	6	7	...	18
Concentration dans le puits (µg/mL)	TC	TCE	50000	25000	12500	6250	3125	...	1,5258

TC : Témoin de culture microbienne.

TCE : Témoin de la couleur de l'extrait étudié.

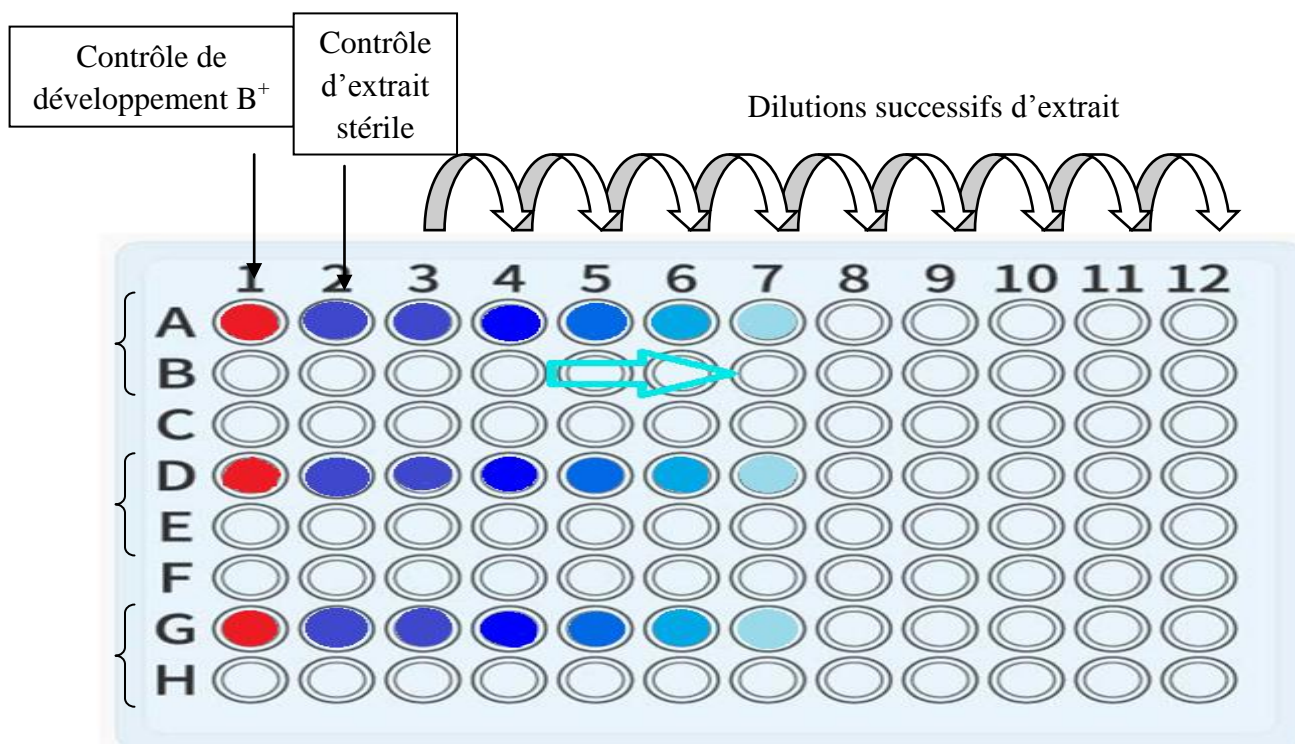


Figure 8: Dessin explicite de la méthode des dilutions sur plaque

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**). Voir figure 9



Figure 9 : Manipulation des dilutions sur plaque

7.2.3. Incubation

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

7.2.4. Lecture

La lecture est faite visuellement, Où l'on observe des troubles dans les puits.

7.2.5. Détermination de CMB :

Pour déterminer la CMB, on prélève 10 μ L des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (G.M.H ou G.S) comme indiqué dans la figure 10 et on incube les boîtes à 37°C \pm 1 pendant 24 h (Benmahieddine et al., 2021).

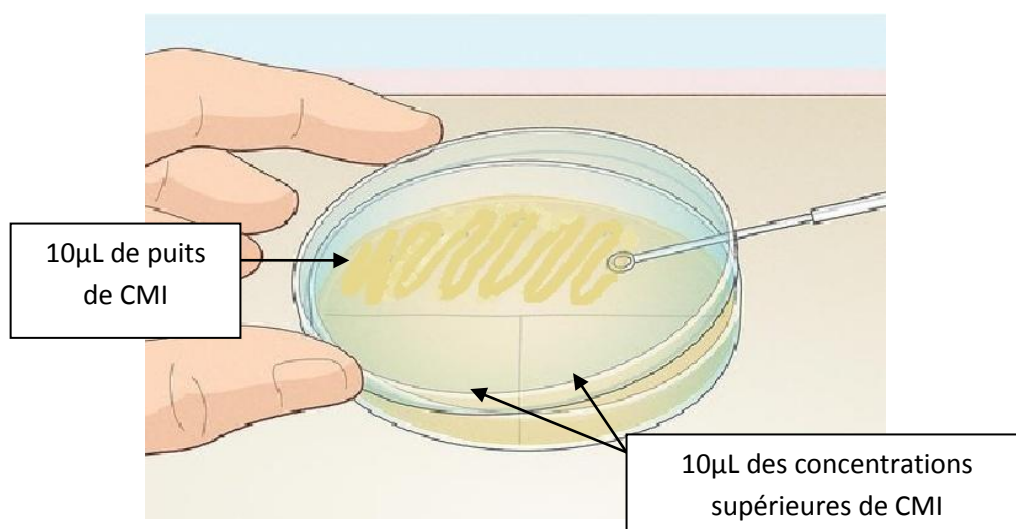


Figure 10: Confirmation des CMB

7.2.6. Lecture des boîtes

Après incubation, on peut déterminer grâce à cette culture la CMB.

7.3. La bioautographie

7.3.1. Définition

Les extraits végétaux sont composés d'un mélange de molécules de propriétés différentes. Cette technique de la bioautographie rend possible de séparer les composés d'extrait et tester l'activité biologique des molécules.

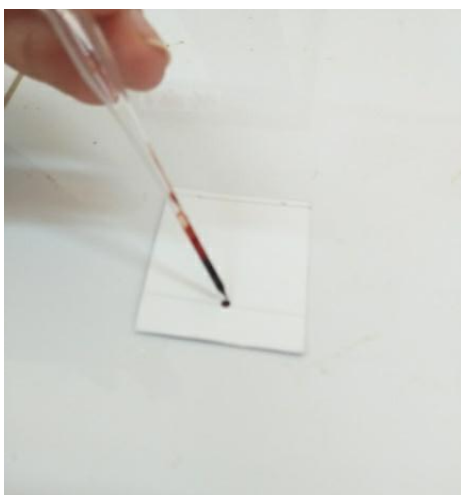


Figure 11: Dépôt d'échantillon sur plaque de couche mince

7.3.2. Mode opératoire

Séparation des molécules d'extrait : La séparation des molécules d'extraits se fait par une chromatographie sur couche mince.

- Préparation d'éluant : c'est un mélange de solvant (100mL d'acétate d'éthyle, 11mL d'acide acétique, 27mL d'eau distillé et 11mL d'acide formique) (**Medic-Šaric et al., 2007**) favorise la migration des flavonoïdes tout au long de la plaque CCM.
- Préparation des plaques CCM: Les différents composés d'extrait sont séparés par la méthode de chromatographie sur couche mince. Sur la plaque contient un gel de silice l'extrait est déposé sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire comme dans la figure 11.
- On dépose les plaques dans une cuve contenant l'éluant.
- Les différentes molécules d'extrait sont séparées et montent par capillarité jusqu'au liquide d'arrivée, ou on peut retirer la plaque de la cuve.

- La révélation se fait par UV à 365nm, et on calcule le Rapport frontale R_f .

L'analyse d'activité biologique (antimicrobienne)

- Les plaques de migration sont déposées sur des boîtes pétries déjàensemencé par les souches microbiennes,
- Après une diffusion des molécules bioactifs de plaque dans les géloses (à 4°C durant environ 4h), on retire les plaques des boîtes comme montrer dans la figure 12, puis on incube à l'étuve pendant 24 h à 37°C pour les bactéries et 48 à 30°C pour la levure (**Messaoudi, 2013**)
- La lecture visuelle nous a permet de vérifié l'inhibition ou la croissance microbienne par mesure de la zone d'inhibition.



Figure 12: Bioautographie sur les boitede Pétri.

Résultats et Discussion

1. Introduction

Ces dernières années, la lutte contre l'utilisation des produits chimiques et artificielle a augmenté même si il s'agit d'un antibiotique, c'est la raison pour quoi on trouve beaucoup d'études s'intéressent aux pouvoir antimicrobien des substances naturelle. L'activité antimicrobienne d'un composé correspond à sa capacité d'inhiber ou détruire complètement les microorganismes, alors est ce que les extraits de pétales de safran y ont ces capacités ? Et est ce qu'ils ont une activité contre l'intoxication alimentaire ? Les résultats de cette études nous a permet de répandre a ces questions.

2. Résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque

Les diamètres des zones d'inhibition sont donnés en mm.

2.1.1. Résultats d'antibiotique (contrôle positif)

Le contrôle positif est utilisé pour confirmer l'exactitude de l'expérience et des résultats. Dans notre cas c'est pour évaluer la résistance ou la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. Les résultats d'inhibition sont donnés dans le tableau et l'histogramme suivant:

Tableau 5 : Zones d'inhibition moyenne des contrôles positifs (mm)

antibiotique / μ org	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
Amp	30,7 \pm 1,2 (S)	22 \pm 2 (S)	33 \pm 1,7 (S)	22 \pm 1,7 (S)	00 \pm 0 (R)	00 \pm 0 (R)	-
Amx	26 \pm 2 (S)	21 \pm 1 (S)	23 \pm 1,7 (S)	17,7 \pm 1,2 (I)	00 \pm 0 (R)	00 \pm 0 (R)	-
Col	00 \pm 0	13,3 \pm 0,6	10,7 \pm 1,2	00 \pm 0	14 \pm 1	14,3 \pm 2,3	-
Nys	-	-	-	-	-	-	36,3 \pm 2,3 (S)

(-) : teste non réaliser ; S : Sensible ; I : Intermédiaire ; R : Résistant.

Amp : (résistante) 14 \leq (intermédiaire) <19 (sensible)

Amx : (résistante) 14 \leq (intermédiaire) < 21 (sensible)

(Joffin et al., 2006).

Zones d'inhibition ≤ 10 , *C. albicans* Résistante ou intermédiaire ; zones d'inhibition > 10 , *C. albicans* sensible (**Bonouman-Ira, 2011**).

- L'ampicilline 10 μ g et l'amoxycilline 25 μ g n'ont eux aucun effet antibactérien à la fois sur *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* car ils sont résistants aux ces antibiotiques. Les autres souches concernées de cette étude révèlent des diamètres d'inhibition variée ou la sensibilité de *B. subtilis* est la plus élevée avec Amp 33 mm. *E. faecalis* et *E. coli* ont des diamètres des zones de 30,7 mm et 22 mm au Amp et 26 mm et 21 mm au Amx respectivement au temps que le comité d'antibiogramme française (**CASFM, 2022**) montrent que *E. faecalis* a des diamètres d'inhibition au Amp 10 μ g entre 15 mm et 21mm, ce qui montrent que notre souche est plus sensible au Amp, et diamètres d'inhibitions de *E. coli* aux Amp et Amx 20 μ g sont entre 15 mm et 22 mm et entre 18 mm et 24mm. ce qui montre la sensibilité d' *E. coli*.
- *S. aureus* et *E. faecalis* eux une résistance au la colistine 10 μ g, au temps que les autres bactéries testé montrent une sensibilité varié de 10,7 mm à 14,3mm.
- *C. albicans* est sensible à la nystatine est montrent un diamètre moyen de zone d'inhibition égale à 36,3 mm contre la nystatine.

2.1.2. Extrait aqueux

L'activité antimicrobienne d'extrait aqueux a été identifié dans une gamme de charge : (0,25mg ; 0,5mg;1mg)

Les diamètres moyens et écart type d'une diffusion sur disques de deux répétitions des trois différentes charges d'extrait aqueux sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6: Zones d'inhibition moyennes des trois charges d'extrait aqueux

Charge / μ org	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
1mg	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
0,5mg	0 \pm 0	6,5 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
0,25mg	0 \pm 0	6,5 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	6,5 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Ces charges d'extrait aqueux ne montrent aucune zone d'inhibition pour tous les germes sauf *E. coli* 6,5 mm à la charge de 0,5 et 0,25 mg. *P. aeruginosa* aussi a une zone d'inhibition de 6,5 mm avec la charge de 0,25mg. Les zones d'inhibition d'extrait aqueux sont très faible peut considérer négligeables.

2.1.3. Extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle

Le tableau 7 représente les moyens et écart type obtenus par une diffusion sur disques d'extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle.

Tableau 7 : Zones d'inhibition moyennes d'extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle

Charge / μ org	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
10 μ L	7 \pm 0	6,5 \pm 0	8 \pm 0	0 \pm 0	7,5 \pm 0,7	7 \pm 0	0 \pm 0
Ethanol 1/10	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0

- On a utilisé l'éthanol comme un contrôle négatif, les diamètres des zones d'inhibition nuls prouvent que nos résultats n'aient pas été affectés par l'activité d'éthanol mais par l'extrait d'acétate d'éthyle.
- Pour la charge de 1mg, le diamètre de zone d'inhibition de *B. subtilis* est plus élevés que *P. aeruginosa* ; *K. pneumoniae* ; *E. faecalis* et *E. coli* avec les diamètres suivant : 8mm ; 7,5mm ; 7mm ; 7mm et 6,5mm respectivement. *S. aureus* et *C. albicans* montrent une résistance à cette concentration d'extrait.

Même les souches résistants aux antibiotiques (*P. aeruginosa* ; *K. pneumoniae* et *E. faecalis*) montrent une sensibilité a l'extrait d'acétate d'éthyle des pétales.

2.1.4. Fraction méthanolique et fraction aqueuse

Les résultats de pouvoir antimicrobien des deux fractions méthanolique et aqueuse sont présenté dans l'histogramme de la figure 13 :

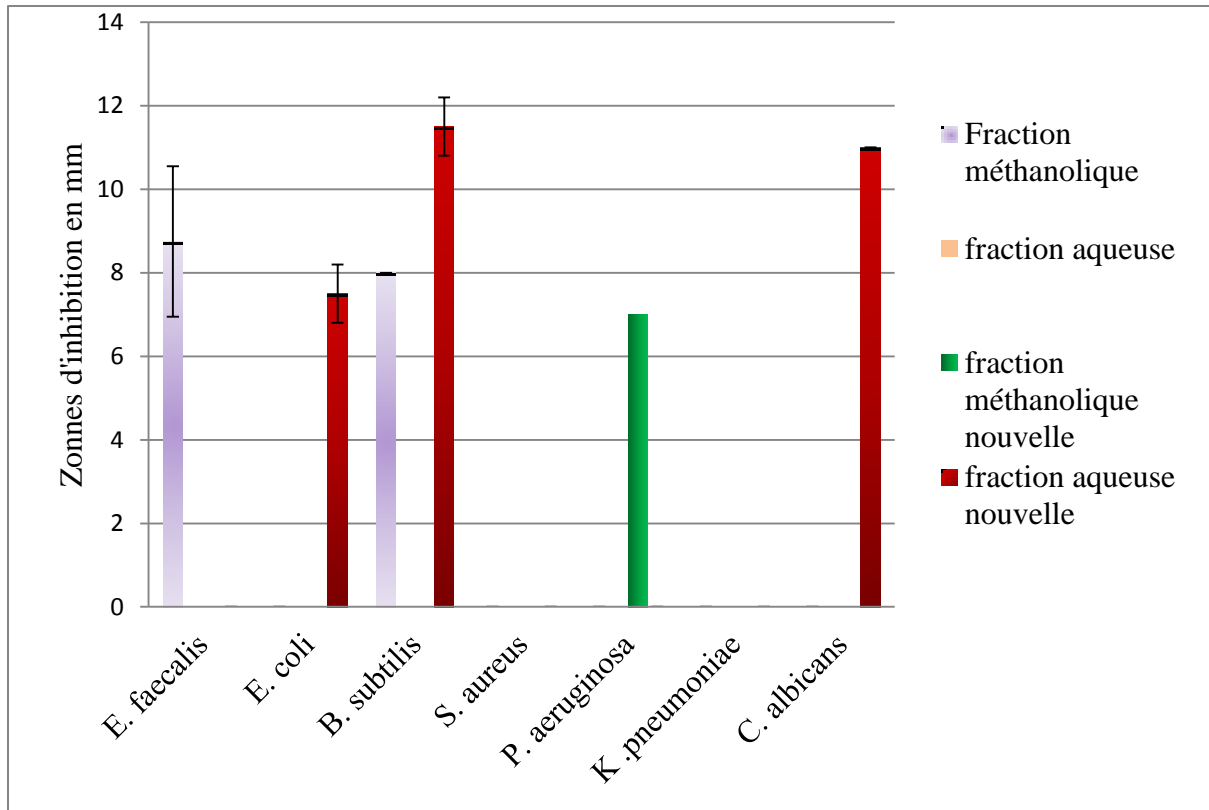


Figure 13: Zones d'inhibition moyenne de la fraction méthanolique et aqueuse.

- Tous les microorganismes sélectionnés pour effectuer ce travail montrent une résistance a ces extraits sauf *E. faecalis* et *B. subtilis* qui sont des bactéries à gram positif, ont montrés une sensibilité à la fraction méthanolique, Les diamètres d'inhibition sont les suivants *E. faecalis* : 8,75mm ; *B. subtilis* : 8mm.
- La fraction méthanolique nouvelle ne montre aucune réaction avec les germes concernés sauf avec *P. aeruginosa* ou elle a montrée une zone d'inhibition de diamètre de 7mm.
- La fraction aqueuse nouvelle est considéré comme le seul extrait inhibe la croissance de *C. albicans* (activité antifongique). Les bactéries qui montrent une sensibilité à l'extrait sont *B. subtilis* et *E. coli* avec des diamètres des zones d'inhibition moyennes de 11,5mm et 7,5mm respectivement.

Voici une figure 14 : résultats d'un test de diffusion sur disques de deux bactéries *B. subtilis* et *E. coli* (A et B respectivement).

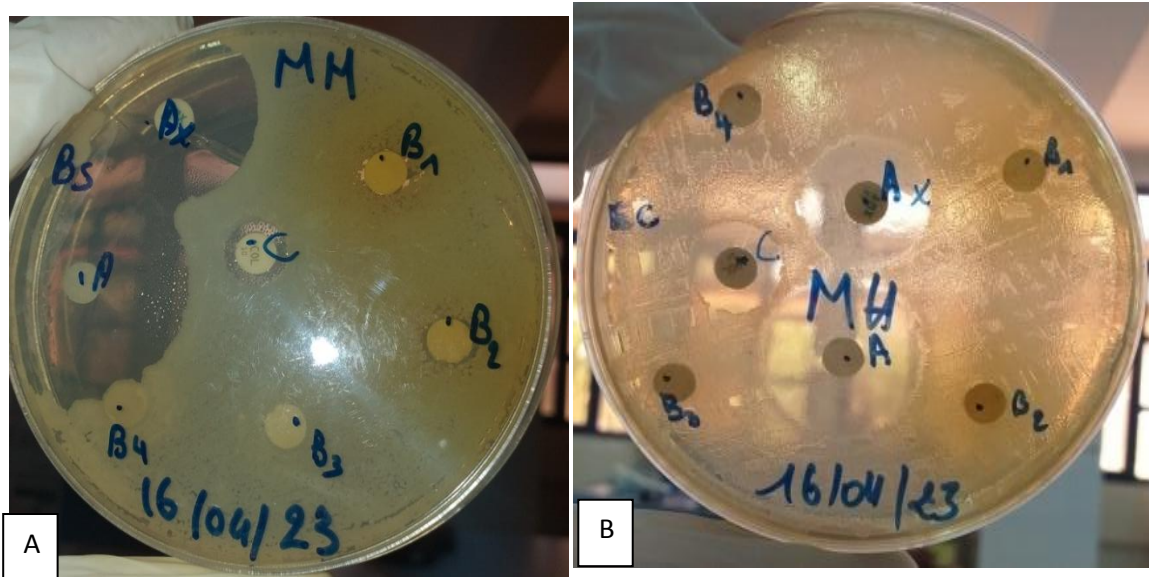


Figure 14 : Résultats de méthode de diffusion sur disques (A : *B. subtilis* ; B : *E. coli*)

Il faut savoir que tous les extraits étudiés ont été actifs contre au minimum 2 microorganismes et au maximum 5 microorganismes.

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque ont confirmé l'existence d'une activité antimicrobienne contre les bactéries responsables d'intoxication alimentaire dans la majorité des extraits du pétale de *C. sativus L.*

L'extrait d'acétate d'éthyle et fraction aqueuse sont ceux qui ont montré l'activité antimicrobienne la plus élevée.

Les essais pratiques ont démontré que *S. aureus* a été résistantes à l'effet des quatre extraits.

D'après l'étude d'**Asgarpanah et al. (2013)**, la fraction aqueuse (1000mg/mL) avait des effets inhibitrice contre *E. coli* et la même fraction avec deux concentrations (1000 et 500mg/mL) avait es zones d'inhibition contre *S. aureus*.

3. Résultats de la CMI et CMB/CMF

Pour chaque couple germe/extrait on détermine les paramètres de CMI et CMB/CMF. La méthode de dilution en série a été effectuée sur les extraits et microorganismes qui montrent une réaction inhibitrice entre eux. Les résultats de CMI et CMB/CMF sont donnée dans le tableau suivant, les concentrations sont données par µg/mL.

Tableau 8 : Résultat de CMI et CMB ($\mu\text{g/mL}$)

$\mu\text{org/extrait}$	Extrait aqueux		Extrait d'acétate d'éthyle		Fraction aqueuse		Fraction méthanolique	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
<i>E. faecalis</i>			6250	25000				
<i>E. coli</i>	25000	50000	12500	50000	6250	>50000		
<i>B. subtilis</i>			3125	50000	25000	>50000		
<i>P.aeruginosa</i>	25000	>50000	6250	50000			12500	>50000
<i>K.pneumoniae</i>			3125	50000				
<i>C. albicans</i>					781,25	>50000		

Il faut savoir que tous les extraits utilisés dans cette méthode sont issus d'une nouvelle extraction. D'après les résultats du tableau 09 les concentrations minimales inhibitrices étaient comprises entre 781,25 μg et 25000 μg .

Le meilleur résultat de CMI pour l'extrait d'acétate d'éthyle était de 3125 $\mu\text{g/mL}$ obtenu avec *B. subtilis* et *K.pneumoniae*, les concentrations 6250 $\mu\text{g/mL}$; 6250 $\mu\text{g/mL}$; 12500 $\mu\text{g/mL}$ sont obtenus contre *E. faecalis* ; *P. aeruginosa* ; *E. coli* respectivement. L'extrait aqueux inhibe la croissance de *E. coli* et *P.aeruginosa* avec une concentration active de 25000 $\mu\text{g/mL}$. La concentration 12500 $\mu\text{g/mL}$ de fraction méthanolique inhibe la croissance de *P. aeruginosa*. Le plus intéressant résultat de CMI pour la fraction aqueuse est celle de levure *C. albicans* (781,25 $\mu\text{g/mL}$), les concentrations 6250 $\mu\text{g/mL}$ et 25000 $\mu\text{g/mL}$ sont obtenus avec *E. coli* et *B. subtilis* respectivement.

Voici des figures de résultats de CMI de *P. aeruginosa* (A) ; *B. subtilis* et *K.pneumoniae* (B).

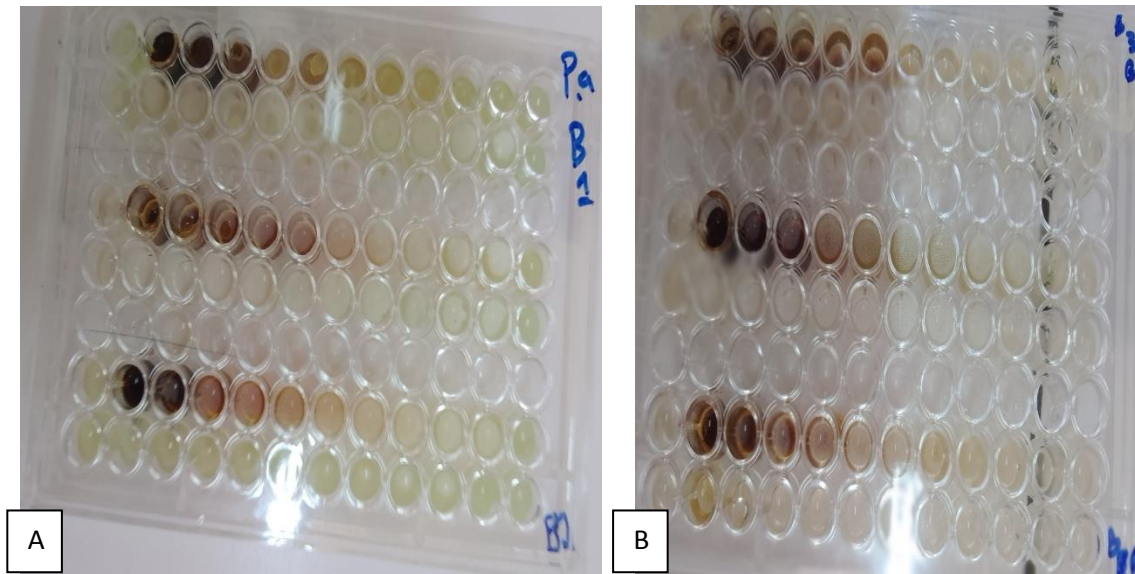


Figure 15 : Des microplaques après incubation (A : *P. aeruginosa*, B : *B. subtilis* et *E. faecalis*)

Les résultats de CMB/CMF ont été nettement plus élevés que les valeurs de CMI correspondantes. Les valeurs de la concentration minimale bactéricides et fongicides sont variées de 25000 $\mu\text{g/mL}$ à > 50000 $\mu\text{g/mL}$. La CMB intéressante est 25000 $\mu\text{g/mL}$ obtenus par le couple (*E. faecalis* /extrait d'acétate d'éthyle). La CMB d'extrait d'acétate d'éthyle des espèces *E. coli* ; *B. subtilis* ; *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* étaient de 50000 $\mu\text{g/mL}$. La CMB d'extrait aqueux de *E. coli* et *P. aeruginosa* est respectivement 50000 $\mu\text{g/mL}$ et >50000 $\mu\text{g/mL}$. La fraction aqueuse a un CMB >50000 $\mu\text{g/mL}$ pour *E. faecalis* et *B. subtilis* et CMF >50000 $\mu\text{g/mL}$. Et CMB > 5 0000 $\mu\text{g/mL}$ pour *P. aeruginosa* dans la fraction méthanolique. La figure 16 représente quelques résultats de CMB.

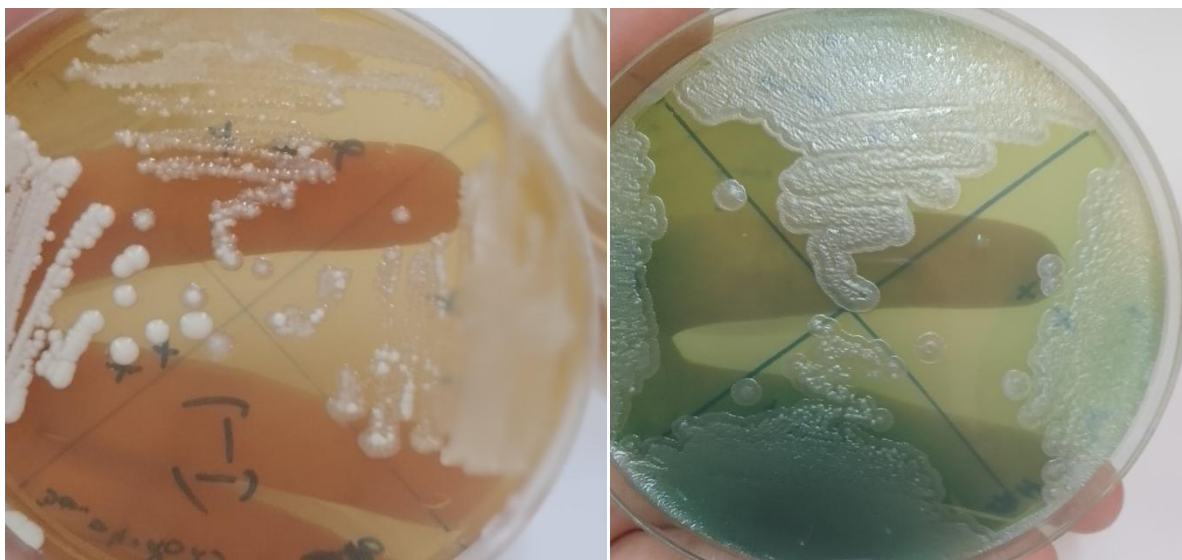


Figure 16 : Résultat de CMB

Les substances antimicrobiennes sont considérées comme des agents bactéricides lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. On parlera d'agents bactériostatiques quand le rapport CMB/CMI est supérieur à 4. (Carbomelle et al, 1987)

Les résultats illustrés dans le tableau 9 montrent que l'extrait aqueux a un effet bactéricide avec *E. coli*, l'extrait d'acétate d'éthyle montre aussi un effet bactéricide avec *E. faecalis* ; *E. coli*. Les restes d'extrait avec les différentes bactéries correspondent à un effet bactériostatique.

Tableau 9 : Les rapports CMB/CMI des différentes extrait et microorganismes.

Extrait/ μ org	Extrait aqueux	Extrait d'acétate d'éthyle	Fractionn aqueuse	Fraction méthanolique
<i>E. faecalis</i>		4		
<i>E. coli</i>	2	4	>8	
<i>B. subtilis</i>		16	>2	
<i>P. aeruginosa</i>	>2	8		>4
<i>K. pneumoniae</i>		16		
<i>C. albicans</i>			>64	

Des extraits de pétales de *C. sativus L* ont un effet bactéricide contre quelques microorganismes provoquant la prolifération des denrées alimentaires. Des concentrations de

CMI peuvent encore ralentir la croissance d'autres souches étudiées vu que l'effet bactériostatique peut encore être présent.

D'après l'étude d'Asgarpanah et al. (2013), la CMI de couple *E. coli* /fraction aqueuse est de 125mg/mL et une CMB de 250mg/mL.

4. Résultats de la bioautographie

Les résultats de CMI et CMB obtenus précédemment nous ont confirmés que l'extrait d'acétate d'éthyle est l'extrait le plus actif, c'est ce que nous a amené à approfondir pour révéler l'activité des molécules d'extrait par une bioautographie.

Après migration on peut constater 4 composants d'extrait. Voici une figure (la figure 17) qui représente la migration des molécules contenues dans l'extrait d'acétate d'éthyle et le rapport frontal de chaque composant.

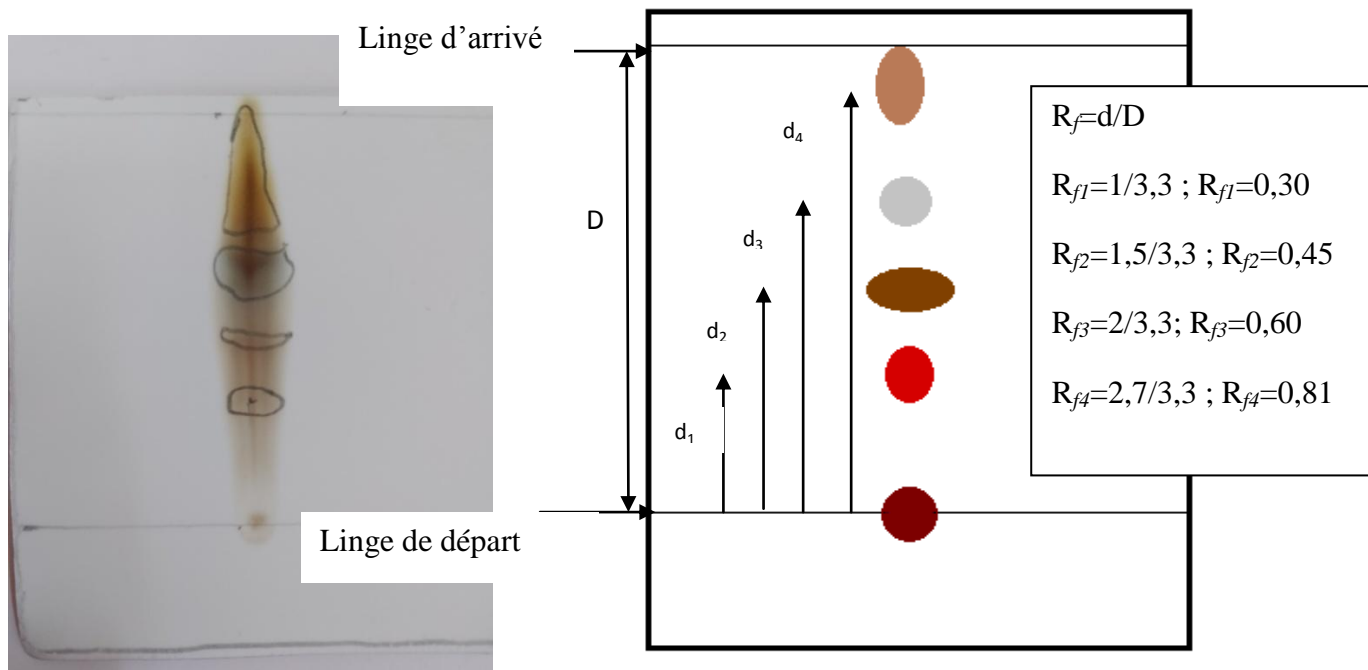


Figure 17 : Composants d'extrait après migration

Après incubation la croissance bactérienne est négative dans toute la partie où on a déposé la plaque CCM. Pour *C. albicans* on a constaté une petite zone d'inhibition parallèle au composé qui a le $R_{f2} = 0,45$ voici une figure illustrative.

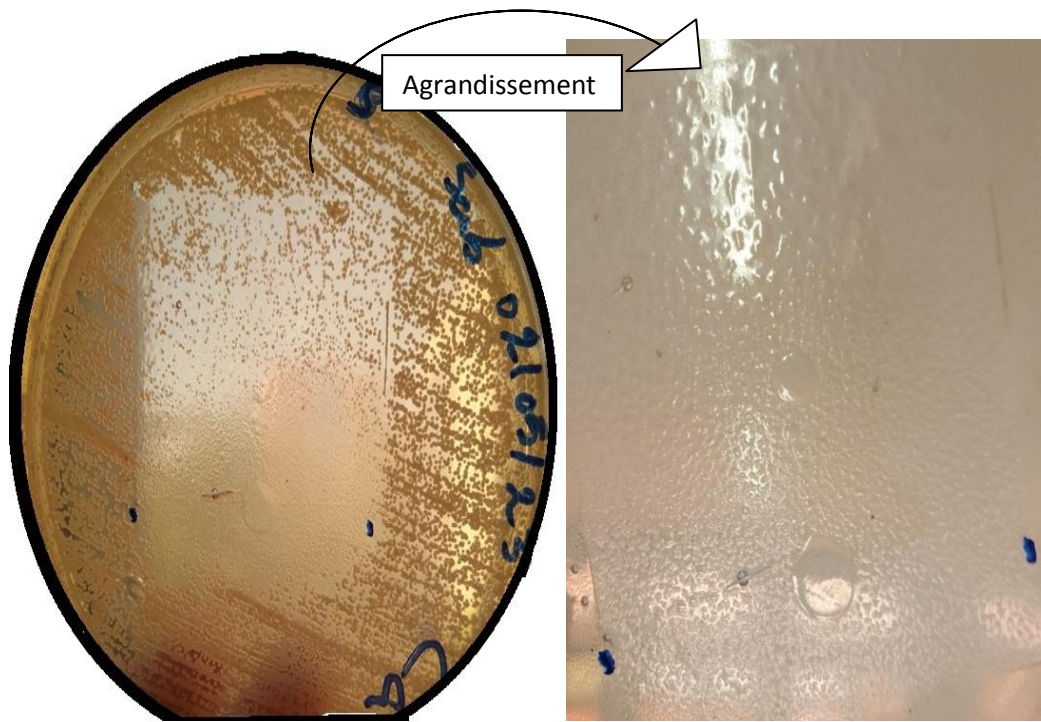


Figure 18 : Résultat de bioautographie de *C. albicans*

Conclusion et Perspectives

L'objectif de notre étude est non seulement d'évaluer l'activité antimicrobienne des pétales de *C. sativus* contre les bactéries responsable des intoxications alimentaire mais aussi pour maitre en évidence l'intérêt des déchets floraux de safran pour un raison d'une valorisation.

Pour confirmer le pouvoir antimicrobien des extraits de pétales de safran, plusieurs méthodes ont été abordés (méthode de diffusion sur disque, détermination des paramètres de CMI et CMB/CMF et la bioautographie).enfin, Les résultats obtenus au cours de cette étude de pouvoir antimicrobien des extraits de pétale ont révélé la présence d'une inhibition des germes utilisé sauf *S. aureus*, et montrent des effets bactéricides et bactériostatiques. Ce qui contribué à confirmer l'existence d'une activité contre les microorganismes sélectionnées à effectuer cette expérience, donc, une activité contre les infections agroalimentaires.

Ces résultats souligne l'importance de l'analyse des composés constituants des extraits pour connaitre est ce qu'un fractionnement ou bien une association des molécules peuvent contribuer a un effet antimicrobien. Donc, il faut réussir la méthode de bioautographie pour isoler les fractions des flavonoïdes les plus actives. Il nous semble plus intéressant de tester les extraits in vivo.

En conclusion, les pétales de safran montrent une bonne résistance contre l'invasion microbienne et jouent un rôle d'antibiotique naturel contre les infections alimentaire, donc, la formulation d'une préparation pharmaceutique naturelle donne une valeur ajouter aux pétales rejeté.

Références Bibliographiques

A

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

Abu-Izneid, T ; AbdurRauf , Anees Ahmed Khalil , Ahmed Olatunde , Ahood Khalid , Fahad A. Alhumaydhi , Abdullah S. M. Aljohani , Md. SahabUddin , MojtabaHeydari , Mars Khayrullin , Mohammad Ali Shariati , AdeyemiOladapoAremu , Ahmed Alafnan&Kannan R. R. Rengasamy.(2020). Nutritional and health beneficial properties of saffron (*Crocus sativus* L): a comprehensive review.

Asbaghi, A., Wiesbaden.(1988). Mots d'emprunt persans en arabe.

Asgarpanah, J., Darabi-Mahboub, E., Mahboubi, A., Mehrab, R., Hakemivala, M., (2013). In vitro evaluation of *Crocus sativus* L. petals and stamens as natural antibacterial agents against food-borne bacterial strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (4):69–82.

B

Belyagoubi-Benhammou, N ; Belyagoubi, L ; Loukidi, B ; Mudasir A. Mir ; Assadpour, E ; Boudghene-Stambouli, M ; Kharazmi, M S ; Jafari, SM. (2023). Bioactivity and applications of saffron floral bio-residues (tepals): a natural by-product for the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p: 3-5.

Benmahieddine, A ., Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., El Zerey-Belaskri, A., Gismondi, A., Di Marco, G ., Canini, A., Bechlaghem, N ., AtikBekkara, F., Djebli, N. (2021). Influence of plant and environment parameters on phytochemical composition and biological properties of *Pistacia atlantica* Desf. *Biochemical Systematics and Ecology* .95: 3.

Birembaux, J. (2017). Conseils à l'officine : prévention des infections alimentaires chez les populations à risques. (Thèse de doctorat). Université de Lille 2.

Bonouman-Ira,V., Angora,E., Djohan1,V., Vanga-Bosson,H., Sylla-Thanon,K.,SBeourou, Touré,AO., Faye-Ketté,H., Dosso,M., Koné1,M. (2011). Profil de résistance des *Candida non albicans* à Abidjan en 2011 *Revue Bio-Africa* - n° 9 - pp. 27-31

C

Carbomelle, B., Denis, F., Man-nonier, A., Pinon, G., Vague, R. (1987). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles.* SIIVIP (ed), Paris: 228-282.

Caser, M., Stelluti,S D S., Donno, D., Scariot, V. (2020). *Crocus sativus L. Cultivation in Alpine Environments:Stigmas and Tepals as Source of Bioactive Compounds.* *Agronomy*,10(10): 1473.

CASFM. (2022). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris: Société Française de Microbiologie.

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

D

Dupont, F ., Guignard, J.L.,Pelt,J .(2007). *Abrèges botanique systématique moléculaire.* 14^{ème} éditionrévisée, Masson.

F

Fahim, N. K., Janati, S F., Feizy, J. (2012). Chemical compositionof agriproduct saffron (*Crocus sativus L.*) petals and its considerations as animal feed. *Gida* 37 (4):197–201.

H

Harper D .2001. “Saffron”, *Online Etymology Dictionary.*

Hosseini, A., Razavi, BM., Hosseinzadeh,H .(2018).Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21:1091–9.

J

Joffin, J-N., Leyral, G.(2006). *Microbiologie Technique Tome 1 Dictionnaire Des Techniques.* Edition 4.

K

Katzer, G.(2001).Saffron (Crocus sativus L.) *GernotKatzer's Spice Pages*. Availablefrom: http://www.unigraz.at/~katzer/engl/croc_sat.html .

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.

L

Li, W., Yang, R., Ying, D;Yu, J., Sanguansri,L., Augustin, M A.(2020). Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of different extraction and hydrolysis procedures.*Industrialcrops and products* 147:112250.

Lopez, S., Lima, B., Agüero, M B., Lopez, M., Hadad, M., Zygadlo, J ., Caballero, D., Raúl Stariolo, R., Suero, E °Feresin, G E., Tapi, A. (2018).Chemical composition, antibacterial and repellent activities of *Azorellatrifurcata*, *Seneciopogonias*, and *Seneciooreophyton* essential oils. *Arabian journal of chemistry*, 11(2):181-187.

M

MaigaFatoumata.(2019). Mémoire Aspects Epidemio-Cliniques Des Intoxications Aigues Chez Les Enfants De 1 A 15 Ans Au Service Des Urgences Pédiatriques Du Chu Gabriel Toure. (Diplôme d'études spécialisées en pédiatrie). Faculté de médecine et d'odontostomatologie, université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako, page 5.

Medic-Šaric, M., Jasprica, I., Mornar, A., Maleš, Z., (2008). Application of TLC in the Isolation and Analysis of Flavonoids. *Chromatographie Science Series*99: p 405-407.

Messaoudi, Or. (2013). contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de knadsa (Bechar). Thèse de magistère en microbiologie appliquée.

N

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.

P

Palomares, C. (2015). Le safran précieuse épice ou précieux médicament. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de lorraine, Faculté de pharmacie: 14-105 p.

Prescott, L M., Harley, J P., Klein, D A. (2010). Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164.

R

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.

T

Talbi, L .,Medjbar, W. (2017). Qualité physico-chimique du safran Algérien. Mémoire de Master. option Chimie. Université Abderrahmane Mira. Faculté des Sciences Exactes Département de Chimie : 43p.

V

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

W

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

Annexe

Résultats obtenus par la méthode des disques

1. Extrait aqueux

charge / μ org	<i>E.faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
1mg/10 μ l	00	00	00	00	00	00	00
0,5mg/10 μ l	00	6,5	00	00	00	00	00
0,25mg/10 μ l	00	6,5	00	00	6,5	00	00

2. Extrait des flavonoïdes par acétate d'éthyle :

charge / μ org	<i>E.faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
1mg/10 μ L	07	6.5	08	00	07	07	00
1mg/5 μ L	6.5	00	00	00	6.5	00	00
Ethanol 1/10	00	00	00	00	00	00	00

charge / μ org	<i>E.faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
1mg/10 μ L	7 \pm 0	6,5 \pm 0	8 \pm 0	0 \pm 0	7,5 \pm 0,7	7 \pm 0	0 \pm 0
1mg/5 μ l	6,5 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	6,5 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ethanol 1/10	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0	00 \pm 0

3. Fraction méthanolique et fraction aqueuse :

Extrait/ μ org	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
Fraction méthanolique	7.5	00	08	00	00	00	00
	10	00	08	00	00	00	00
fraction aqueuse	00	00	00	00	00	00	00
	00	00	00	00	00	00	00

4. Fraction méthanolique et fraction aqueuse (nouvelle extraction):

Extrait/ μ org	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
Fraction méthanolique	00	00	00	00	07	00	00
	00	00	00	00	07	00	00
fraction aqueuse	00	07	12	00	00	00	11
	00	08	11	00	00	00	11
Ampicilline	14	00	20	36	00	16	-

5. Contrôle positif :

antibiotique/ μ org	<i>E.faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.albicans</i>
Ampicilline	30	24	32	21	0	0	-
	30	20	32	21	0	0	
	32	22	35	24	0	0	
Amoxicilline	24	20	22	17	0	0	-
	26	21	22	17	0	0	
	28	22	25	19	0	0	
Colistine	0	14	10	0	13	13	-
	0	13	10	0	15	13	
	0	13	12	0	14	17	
Nystatine	-	-	-	-	-	-	39
							35
							35

Résultats de CMI

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Extrait aqueux	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	...	+
	Extrais d'acétate d'éthyle	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	...	+
	Fraction méthanolique	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	...	+

2. *Escherichia coli*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Extrait aqueux	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	...	+
	Extrais d'acétate d'éthyle	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	...	+
	Fraction aqueuse	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	...	+

3. *Bacillus subtilis*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Extrais d'acétate d'éthyle	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	...	+
	Fraction aqueuse	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	...	+

4. *Klebsiella pneumoniae*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Extrais d'acétate d'éthyle	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	...	+

5. *Enterococcus faecalis*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Extrais d'acétate d'éthyle	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	...	+

6. *Candida albicans*

Numéros		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	18
Observation de trouble	Concentration d'extrais (mg/ml)	TC	TCE	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0,78125	0,390625	0,1953125	...	1,52587891
	Fraction aqueuse	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	...	+

- Tc : témoin de culture ;
- TCE : témoins de couleur des extrais
- + : un trouble dans le puits
- - : pas de trouble

Résultats de CMB

B ⁺ / extraits	Extrait aqueux		Extrait d'acétate d'éthyle				Fraction aqueuse				Fraction méthanolique		
<i>P.aeruginosa</i>	<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>					<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>
	+++	+++	-	++	++	+++					++	+++	+++
<i>E.coli</i>	<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>	<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>			
	-	+++	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>B.subtilis</i>			<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>	<i>p(7)</i>	<i>p(3)</i>		<i>p(4)</i>			
			-	+	+	++	+++	+	+		+++		
<i>K.pneumoniae</i>			<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>	<i>p(7)</i>						
			-	++	+++	+++	+++						
<i>E.faecalis</i>			<i>p(3)</i>	<i>p(4)</i>	<i>p(5)</i>	<i>p(6)</i>							
			-	-	++	+++							

Lvr/ extraits	Extrait aqueux	Extrait d'acétate d'ethyle	Fraction aqueuse							Fraction méthanolique
			P(3)	P(4)	P(5)	P(6)	P(7)	P(8)	P(9)	
<i>C.albicans</i>			++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	

P(N) : le puits d'où on a prélevé les 10µg d'inoculum.

(-) : pas de croissance ; (+) : Une Faible croissance ; (++) : Une croissance intermédiaire ; (+++): une forte croissance.