



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

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

Laboratoire des produits naturels (LAPRONA)

MÉMOIRE

Présenté par

**Khettab Youssra et Zeggai Ikram**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

**En Microbiologie Fondamentale**

**Thème**

**Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles du safran «*Crocus sativus* » contre des souches cliniques «*Acinetobacter baumannii* »**

Soutenu le 23/06/ 2024, devant le jury composé de :

Présidente Mme LOUKIDI Bouchra Professeur Université Tlemcen

Encadrants Mr BELYAGOUBI Larbi MCA Université Tlemcen

Mme AYAD Amel MCB Université Tlemcen

Examinatrice Mme BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila Professeur Université Tlemcen

**Année universitaire 2023/2024**



## **Remerciements**

Nous remercions avant tout **ALLAH**, notre créateur pour nous avoir donné du courage, la volonté et la force pour accomplir ce 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 notre co-encadrante, Madame **AYAD Amel**, pour son aide, sa compréhension et ses conseils tout au long de ce travail et pour les souches microbiennes.

A Madame la Professeure **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila** d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame la professeure **LOUKIDI Bouchra** d'avoir accepté de juger ce travail et pour la fourniture de matériel végétal du safran.

AU doctorant Monsieur **CHAOURI Kamel**, pour la fourniture des extraits testés du Safran.

### **Merci**

À toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin et directement ou indirectement durant cette aventure.

## *Dédicaces*

Avec l'aide de DIEU, tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

### *À mes chers parents*

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

À mes chers frères *Mohammed, Abdelhak* et *Anes*.

À ma chère sœur *Fatima* et son mari

*Ikram*

## *Dédicaces*

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

### *À Mon cher père*

Ce grand homme pour ton soutien, ton affection, à l'amour que tu m'offres quotidiennement et ta bonté exceptionnelle. Tu as toujours été à mes cotés pour m'encourager, tu es mon meilleurs partenaire dans la vie, je te dois ma réussite.

### *À ma très chère mère*

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mes très chers frères *Younes, Hocine, Yacine* à qui je souhaite longue vie, réussite et que Dieu réalise tous leurs souhaits.

À la petite princesse *Anfal Hidayat*.

*Youssra*

استخدام النباتات في الطب التقليدي، سواء كان ذلك الغذاء، الأدوية أو السموم، هو قديم للغاية بالنسبة للإنسان. من بين، النباتات التي تم زراعتها منذ قرون الزعفران (*Crocus sativus*)، حيث تعتبر هذه النبتة ليس فقط عن قيمة الطعام، و لكن عن خصائصها الطبية أيضا.

ومع ذلك، على الرغم من التقدم في مجالات الطب، فإن العدوى المرتبطة بالرعاية الصحية تسبب في مضاعفات خطيرة وحتى الموت لدى المرضى. و من مسببات هذه العدوى *baumannii Acinetobacter* و هو نوع من البكتيريا المقاومة للأدوية، يثير القلق المتزايد بسبب القدرة على البقاء على قيد الحياة في بيئة المستشفيات وفرطها في تطوير المقاومة للعلاجات التقليدية.

لذلك، من الضروري البحث عن بعض المكونات البيولوجية الجديدة مثل الزعفران لمكافحة هذه العدوى. عند معالجة الرموز مثل الزهور والأوراق، يتم إنفاذ كمية كبيرة من المنتجات ذات قيمة تجارية قليلة أو غير محدودة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من مختلف مستخلصات و أجزاء أوراق الزعفران ( المستخلص المائي، المستخلص اسيتات ايثيل، الجزء الميثانولي و الجزء المائي) ضد *Acinetobacter baumannii* من خلال طريقة الانتشار، الحد الأدنى للتركيز المثبط، الحد الأدنى من التركيز المبيد للجراثيم و اوتو- بيوجرافيا من أجل تثمين الأوراق التي تعتبر من مخلفات صناعة الزعفران.

وتشير النتائج إلى أن الجزء المائي من شرائح (*Crocus sativus L*) لها تأثير مضاد كبير للبكتيريا على *Pseudomonas aeruginosa* مع قيمة 0.36 ملغ/ملل و 1.45 ملغ/ملل من اجل CMI و CMB على التوالي و 7 ملم من مناطق التثبيط، مما يؤكد أهميتها في البحث عن حلول علاجية جديدة ضد العدوى البكتيرية.

**الكلمات المفتاحية:** العدوى المرتبطة بالرعاية الصحية، *Crocus sativus*، *Acinetobacter baumannii*، النشاط المضاد للفيروسات.

L'usage des plantes en médecine traditionnelle, qu'il s'agit de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancien pour l'homme. Parmi les plantes cultivées depuis des siècles, le safran (*Crocus sativus*), se distingue non seulement pour sa valeur culinaire, mais aussi pour ses propriétés médicinales.

Cependant, malgré les avancées dans le domaine de la médecine, les infections associées aux soins de santé causent des complications graves et même la mortalité chez les patients. Parmi les agents pathogènes impliqués, *Acinetobacter baumannii* une espèce de bactéries résistantes aux antibiotiques, suscite une préoccupation croissante en raison de sa capacité à survivre dans des environnements hospitaliers et de sa propension à développer une résistance aux traitements conventionnels.

Pour cela, il est nécessaire de rechercher de nouvelles molécules bioactives naturelles à partir de plantes tel que le safran pour lutter contre ces infections.

Lors de la transformation des stigmates tels que les fleurs et les feuilles, une grande quantité de produits à base de safran ayant peu ou pas de valeur commerciale est gaspillée.

Cette étude se concentre sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits et fractions du feuilles de safran (extrait aqueux, extrait d'acétate d'éthyle, fraction méthanolique et fraction aqueuse) contre *Acinetobacter baumannii*, par la méthode de diffusion sur gélose, la CMI, la CMB et la bioautographie, afin de valoriser les feuilles qui sont perçues comme des déchets de la production du safran.

Les résultats obtenus ont indiqué que la fraction aqueuse des feuilles *C. sativus* présente un effet antibactérien considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* avec des valeurs de 0.36 mg/mL et 1.45 mg/mL pour la CMI et la CMB respectivement et des zones d'inhibition de 7 mm, soulignant ainsi son importance dans la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques contre les infections bactériennes.

**Mots clés :** Infections associées aux soins de santé, *Crocus sativus*, *Acinetobacter baumannii*, Activité antimicrobienne.

The use of plants in traditional medicine, whether food, medicinal or toxic plants, is very ancient for man. Among the plants cultivated for centuries, saffron (*Crocus sativus*), is distinguished not only for its culinary value, but also for its medicinal properties.

However, despite advances in medicine, health-care-related infections cause serious complications and even mortality in patients. Among the pathogens involved, *Acinetobacter baumannii*, a species of antibiotic-resistant bacteria, is raising growing concern because of its ability to survive in hospital environments and its propensity to develop resistance to conventional treatments.

For this, it is necessary to search for new natural bioactive molecules from plants such as saffron to fight these infections.

During the processing of stigmas such as flowers and leaves, a large amount of saffron-based products with little or no commercial value is wasted.

This study focuses on the evaluation of the antimicrobial activity of various extracts and fractions of saffron leaves (aqueous extract, ethyl acetate extracted, methanol fraction and aqueous fraction) against *Acinetobacter baumannii*, by the gelose diffusion method, CMI, CMB and bioautography, in order to evaluate the leaves that are perceived as waste from saffron production.

The results indicated that the aqueous fraction of the *C. sativus* leaves has a considerable antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa* with values of 0.36 mg/mL and 1.45 mg/mL for IMC and CMB respectively and inhibition areas of 7 mm, thus underlining its importance in the search for new therapeutic solutions against bacterial infections.

**Keywords:** Healthcare-related infections, *Crocus sativus*, *Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial activity.

## Liste des abréviations

---

**A12:** *Acinetobacter baumannii*

**A24:** *Acinetobacter baumannii*

**A30:** *Acinetobacter baumannii*

**AE :** Acétate d'Éthyle

**AMP:** Ampicilline

**AN:** Acide nalidixique

**B.M.H:** Bouillon Mueller Hinton

**CMI:** Concentration Minimal Inhibitrice

**CMB:** Concentration Minimal Bactéricide

**°C :** degrés Celsius

**D.O :** Densité optique.

**EA:** Extrait Aqueux

**FA:** Fraction Aqueuse

**FM:** Fraction Méthanolique

**G.M.H :** Gélose Mueller-Hinton

**H :** heure

**mm:** millimètre

**mg :** milligramme

**P.aeruginosa:** *Pseudomonas aeruginosa*

**UV :** ultraviolet

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 01</b> : Classification botanique de <i>Crocus sativus</i> .....	5
<b>Tableau 2</b> : Taxonomie d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	13
<b>Tableau 3</b> : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne .....	24
<b>Tableau 4</b> : Milieux de culture .....	24
<b>Tableau 5</b> : Concentrations des extraits des feuilles de <i>C.sativus</i> dans les puits.....	28
<b>Tableau 6</b> : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits des feuilles de <i>C. sativus</i> . .....	32
<b>Tableau 7</b> : CMI et CMB des extraits des feuilles de <i>C. sativus</i> sur les souches testées. ....	33
<b>Tableau 8</b> : Rapport frontal du composant des extraits de safran .....	37

## Liste des figures

---

<b>Figure 1:</b> <i>Crocus sativus</i> L.....	5
<b>Figure 2:</b> Aspect général de <i>Crocus sativus</i> .....	6
<b>Figure 3 :</b> Ampicilline (Biocare) .....	25
<b>Figure 4 :</b> Extraits de safran sur couche mince dans l'éluant .....	29
<b>Figure 5 :</b> Souches bactériennes purifiées .....	31
<b>Figure 6 :</b> Résultats de méthode de diffusion sur disques ( <i>A. baumannii</i> 24, <i>A. baumannii</i> 30, <i>P.aeruginosa</i> ).....	33
<b>Figure 7 :</b> Microplaques après incubation (fraction aqueuse sur <i>P. aeruginosa</i> ) .....	33
<b>Figure 8 :</b> Résultat de CMB pour l'extrait aqueux et la fraction aqueuse (A : <i>Pseudomonasaeruginosa</i> , B: <i>acinetobacter baumannii</i> 24 ).....	35
<b>Figure 9:</b> Révélation des molécules contenant dans les extraits avec 254nm.....	36
<b>Figure 10:</b> Révélation des molécules contenant dans les extraits avec 365 nm.....	36
<b>Figure 11 :</b> Résultat de bioautographie sur <i>P. aeruginosa</i> .....	37

## Table des matières

---

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des Abréviations	
Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Partie I: Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur <i>Crocus sativus</i>	
1. Généralités sur <i>Crocus sativus</i>	
1.1 Historique de safran.....	4
1.2 Etymologie .....	4
1.3 Classification.....	5
1.4 Caractère botanique.....	5
1.5 Principaux composants du safran .....	6
1.5.1 Composants généraux .....	6
1.5.2 Composants biologiquement actifs.....	7
1.6 Propriétés biologiques du safran .....	7
1.6.1 Activité antitussive.....	7
1.6.2 Effets anti-nociceptifs et anti-inflammatoire.....	7
1.6.3 Stress oxydatif.....	7
1.6.4 Anti-cancer et activité anti-tumorale.....	8
1.6.5 Activité antimicrobienne.....	8
1.7 Domaine d'utilisation du safran.....	9
1.7.1 Safran comme teinture.....	9
1.7.2 Parfumerie.....	9
1.7.3 Safran en nourriture.....	9
1.7.4 Usage culinaire.....	9
1.8 Toxicité.....	9
Chapitre II: <i>Acinetobacter baumannii</i>	
2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	
2.1 Historique.....	12
2.2 Définition.....	12
2.3 Classification.....	12

## Table des matières

---

2.4 Caractères bactériologiques .....	13
2.4.1 Caractères morphologiques .....	13
2.4.2 Caractères biochimiques .....	13
2.5 Caractères culturaux .....	14
2.6 Caractères génotypiques.....	15
2.7 Caractères épimiodologie .....	15
2.8 Habitat .....	15
2.9 Pouvoir pathogène d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	15
2.10 Facteurs de pathogénicité d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	16
2.11 Mode de transmission.....	16
2.12 Persistance dans le milieu hospitalier.....	17
2.13 La résistance aux antibiotiques .....	17
2.13.1 La résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux $\beta$ -lactamine .....	17
2.13.1.1 La résistance naturelle.....	17
2.13.1.2 Résistance acquise.....	18
A. Pénicillinases .....	18
B. Céphalosporinase de classe C .....	18
C. Oxacillinase de classe D.....	18
D. Métallo- $\beta$ -lactamases de classe B.....	18
E. $\beta$ -lactamases à spectre élargi .....	19
2.13.2 Résistance aux aminosides.....	19
2.13.3 Résistance aux quinolones.....	19
2.13.4 Résistance aux autres antibiotiques .....	19
Partie II : Etude Expérimentale	
Chapitre I : Matériel et Méthodes	
1. Matériel et Méthodes	
1.1 Introduction.....	22
1.2 Matière végétale.....	22
1.3 Préparation des extraits et des fractions de safran .....	22
1.3.1 Préparation de l'extrait aqueux.....	22
1.3.2 Préparation des fractions méthanoliques et aqueuses par succession des solvants.....	22

## Table des matières

---

1.3.3 Préparation de la d'acétate d'éthyle.....	23
1.4 Souches testées .....	23
1.5 Milieux de culture.....	24
1.6 Enrichissement des bactéries.....	24
1.7 Purification des bactéries .....	24
1.8 Préparation des disques.....	25
1.9 Préparation d'antibiotiques .....	25
1.9.1 Ampicilline.....	25
1.9.2 Acide nalédixique .....	25
1.10 Étapes préliminaires à l'étude .....	25
1.10.1 Préparation de l'inoculum .....	25
1.10.2 Ensemencement .....	26
1.11 Méthodes d'analyses.....	26
1.11.1 Méthode de diffusion sur gélose.....	26
1.11.2 Méthode de Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB).....	27
A. Définition de CMI et CMB.....	27
B. Mode opératoire .....	27
1.11.3 Bioautographie.....	27
1.11.3.1 Mode opératoire .....	28
1.11.3.2. L'activité antimicrobienne.....	29
Chapitre II : Résultats et Discussions	
2. Résultats et Discussions.....	31
2.1 Purification des souches.....	31
2.2 Activité antimicrobienne.....	31
2.2.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	31
2.2.2 Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB).....	33
2.2.3 Bioautographie .....	36
Conclusion et perspective .....	39
Références bibliographiques.....	42
Annexes.....	52

# *Introduction*

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents (EL Rhaffari et Zaid, 2004). Ils sont utilisés pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs (Boudjouref, 2011), ces dernières, en particulier, sont doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires, la peroxydation lipidique et les infections.

De nos jours, la résistance aux antibiotiques représente une menace pour la santé publique. De nouveaux mécanismes de résistance se développent quotidiennement à travers le monde, ce qui rend plus difficile le traitement des maladies infectieuses les plus fréquentes (Yehouenou, et al., 2023).

Une souche bactérienne est considérée comme résistante à un antibiotique donné lorsque son capital génétique est modifié de manière à supporter une dose d'antibiotique supérieure à celle obtenue *in vivo*, sans atteindre des doses toxiques.

Le genre *Acinetobacter* est considéré comme un modèle d'adaptation extrêmement efficace en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques. Au cours des 40 dernières années, *Acinetobacter*, principalement représenté par l'espèce *Acinetobacter baumannii*, est passé d'une bactérie peu importante en infectiologie en raison de sa faible pathogénicité et de sa sensibilité à la plupart des antibiotiques disponibles à l'époque à une bactérie multi-résistante aux antibiotiques (Figueiredo,2011). *Acinetobacter baumannii* est responsable des infections nosocomiales également connues sous le nom d'infections associées aux soins de santé, qui sont contractées par les patients lors de leur séjour dans un établissement de santé (OMS, 2020).

La problématique de la résistance aux antibiotiques rappelle cependant qu'il est important de trouver de nouvelles molécules possédant une activité antibactérienne. Par conséquent, il est intéressant de réaliser un criblage de plantes médicinales contre un groupe de microorganismes résistants et isolés d'infections humaines dans le but de trouver de nouvelles substances auxquels ces germes sont sensibles.

Le safran «*Crocus sativus*», connu sous le nom d'«or rouge» ou «roi des épices dans le monde», est parmi les plantes médicinales utilisées pour lutter contre ces infections grâce à leur propriété qu'elle est riche en composés biologiquement actifs. C'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 pour teindre des soies précieuses ou à des fins spéciales, notamment médicales (**Jansen, 2005**).

Notre étude vise à évaluer non seulement l'efficacité antimicrobienne des extraits de *C. sativus* contre les bactéries pathogènes responsables des infections, mais également à mettre en évidence l'intérêt des déchets floraux de safran pour une valorisation.

Notre travail a été divisé en deux parties :

➤ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier concerne des généralités sur *Crocus sativus* et le deuxième chapitre concerne les *Acinetobacter baumannii*.

➤ La deuxième partie concerne la partie expérimentale où nous développerons le matériel, les méthodes analytiques utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de safran et les résultats obtenus et des discussions.

Enfin nous avons terminés notre travail par une conclusion qui résumera l'ensemble de cette étude et présentera les perspectives.

# **Partie I**

## ***Synthèse bibliographique***

# **Chapitre I**

## ***Généralité sur *Crocus sativus****

## 1. Généralités sur *Crocus sativus*

### 1.1 Historique de safran

L'histoire du safran, que ce soit au niveau de sa culture ou de son usage, remonte à plus de 3500 ans et traverse plusieurs sociétés, continents et civilisations (**delaveaux, 2006**). *Crocus sativus* L, plante dont est extrait le safran, a parcouru les siècles et essaimé dans les différentes régions du globe pour se retrouver cultivé en France à partir du Xe siècle et en Algérie durant l'occupation française. Il ne s'agit pas d'une plante sauvage car elle doit tout à la main de l'homme qui a su la cultiver, la choyer, et l'importer tout autour du bassin méditerranéen (**Palomares, 1988 ; Ben Mostefa, 2017**).

### 1.2 Etymologie

D'après leur écriture et leur prononciation, il est évident que les termes *Crocus sativus* et safran ont des origines différentes. Effectivement, le nom de *Crocus sativus*, qui a été adopté par le scientifique Linné en 1754, serait une transcription en latin du mot grec « krokos », qui signifie filament, poil, en référence à la forme des stigmates qui produiront cette épice célèbre une fois séchée (**Aucante, 2000**).

En ce qui concerne le terme "safran", il est d'origine latin : "safranum", qui est dérivé de l'arabo-persan "za'faran", qui dérive de "asfar", qui signifie "jaune" (fleur jaune) (**Crozet, 2012**). Il est donc indéniable que l'origine est arabo-persane et il est possible de souligner l'existence d'un village qui existait sur les bords de l'Euphrate il y a plus de 4 300 ans, appelé Azupirano, qui signifie « ville du safran ».

Le terme « sativus » signifie « cultivé », car *Crocus sativus* est peu connu pour se développer à l'état sauvage, mais est cultivé depuis très longtemps pour ses stigmates. On retrouve une origine mythologique commune dans les dénominations internationales du mot safran (**Favre, 2008**):

Arabe : za'faran

Anglais : saffron

Allemand : Safran

Chinois : fan huong hua (épice), Xi hong hua (remède)

Espagnol : azafrán

Grec : zafora

Français : safran

Italien : zafferano

Polonais : szafran

Russe : schafraan

### 1.3 Classification

La seule espèce de *Crocus* à produire du safran est *Crocus sativus* L. C'est une espèce de plantes bulbeuses de petite taille appartenant à la vaste famille des Iridacées et au genre *Crocus* (Chahine, 2014 ; Pitsikas, 2016). Il s'agit d'une plante inconnue en pleine nature, mais nécessitant l'intervention de l'homme pour maintenir sa survie. Selon Arvy et Gallouin (2003), il est triploïde et stérile et se reproduit par multiplication végétative grâce à sa corme, un organe de réserve qui ressemble à un bulbe. La représentation photographique de la plante de safran et sa classification sont présentées respectivement dans la figure 1 et le tableau 1.

**Tableau 01** : Classification botanique de *Crocus sativus* L. (Saxena, 2010).

<b>Règne</b> : végétal
<b>Embranchement</b> : Spermatophyte
<b>Sous-embranchement</b> : Angiospermes (Magnoliophyta)
<b>Classe</b> : Monocotylédones (Liliopsida)
<b>Sous-classe</b> : Liliidae
<b>Ordre</b> : Liliales
<b>Famille</b> : Iridaceae
<b>Sous-famille</b> : Crocoïdeae
<b>Genre</b> : <i>Crocus</i>
<b>Espèce</b> : <i>Crocus sativus</i> L.



**Figure 01**: *Crocus sativus* L. (Small, 2016).

### 1.4 Caractère botanique

La fleur de safran en coupe ou entonnoir dressé, parfumée, violette clair ou foncé, aux nervures violettes sombres et aux taches sombres à la base, à feuilles longues et fines, de 5 à 11 par bourgeon, à 6 tépales (trois pétales et trois sépales pétaloïdes). (Abbara, 2017). Les 3 étamines de 22 mm de long, avec un pistil de 10 cm de long, sont composées d'un style mince, jaune orange, et se divisent en 3 longs stigmates rouge orangé ou rouge. (Abbara, 2017) mesurant entre 3 et 4 cm de long (Crozet, 2012). Ces stigmates ressemblent à une corne et sont extrêmement étroits. Leur apparence est éclatante à l'ouverture. Les styles, également connus sous le nom de tiges, relient un stigmate avec le reste de la plante (Rau,

1997 ; Hill,2004). Les stigmates sont les parties utilisées de la plante, avec trois stigmates rouges foncés.

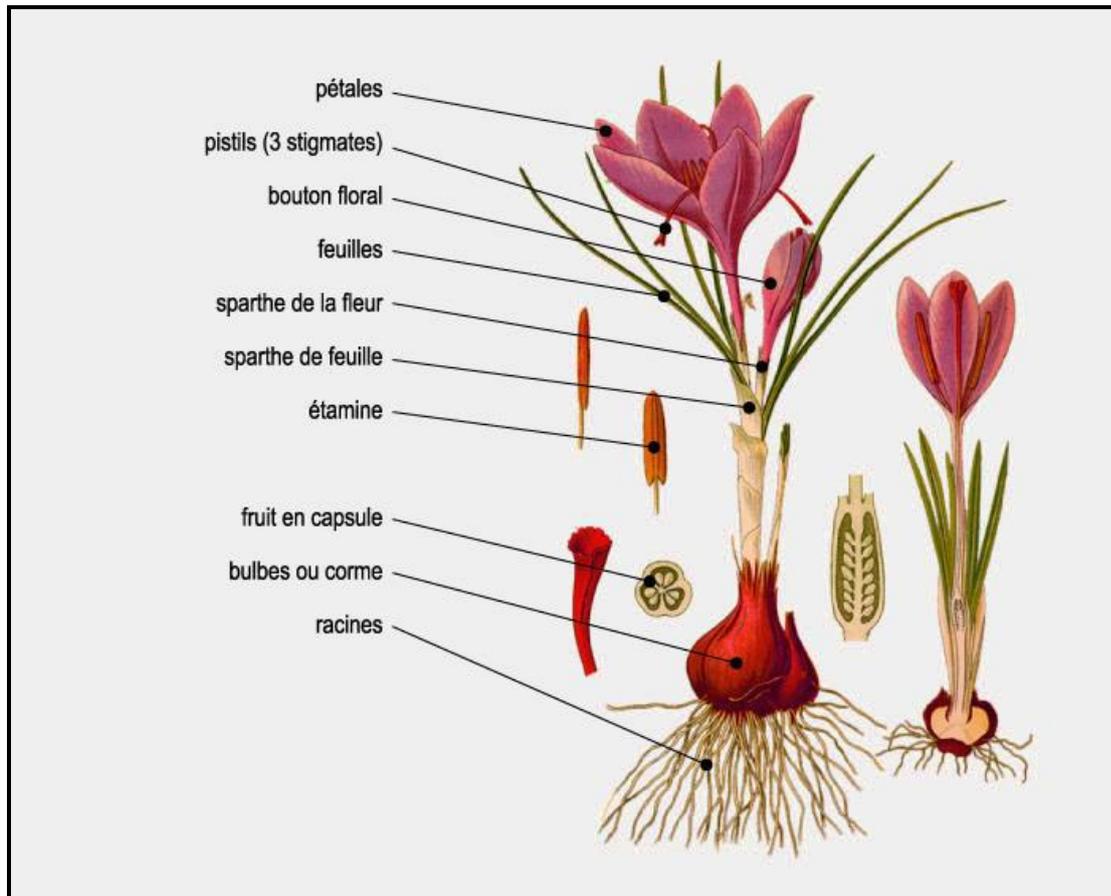


Figure 02: aspect général de *Crocus sativus*(Cagla, 2018).

### 1.5 Principaux composants du safran

Les stigmates sont l'élément actif et le plus crucial de *Crocus sativus*, même si leur composition est très complexe. Étant donné qu'ils doivent être correctement identifiés botaniquement, ils doivent être non adultérés et sans déchets floraux (Basker, 1999) et (Moghaddasi, 2010). Cependant, des analyses chimiques ont été effectuées sur ces derniers et ont révélé la présence de plus de 150 composants volatils et aromatiques. Plusieurs composés non-volatils sont également présents (Abdulleave, 2002).

#### 1.5.1 Composants généraux

- 10 % d'eau.
- 12 % de protéines et d'acides aminés.
- 5 % de graisses, - 5 % de minéraux (Mn, Mg, P, Cu, Ca, Zn, Fe,...).
- 5 % de fibres brutes

- 63 % de sucres incluant l'amidon, les sucres réduits, les pentosanes, les gommages, les pectines et les dextrines.

- Des quantités infimes de vitamine B2 (riboflavine) et de vitamine B1 (thiamine).

Cependant, les proportions de ces constituants peuvent varier en raison des conditions de croissance et du pays d'origine (Melnyk et al., 2010).

### 1.5.2 Composants biologiquement actifs

Les principaux constituants contribuent non seulement au profil sensoriel du safran (couleur, goût, arôme) mais aussi aux propriétés intéressant la santé (Melnyk et al., 2010).

- **La crocine et la crocétine** : qui sont deux pigments caroténoïdes responsables de la couleur jaune-orangée, en effet, l'application principale du safran concernant ses propriétés anti-oxydantes et antitumorales, proviennent essentiellement de la crocine (Gutheil et al., 2012).

- **La picrocrocine** : apportant au safran sa saveur et son goût amer, elle est formée par l'union d'un aldéhyde connu comme étant le safranal et d'un glucide (Tarantilis et al., 1995), le clivage des doubles liaisons adjacentes aux cycles de la zéaxanthine entraîne la formation d'une molécule de crocétine et de deux molécules picrocrocine (Schmidt et al., 2007).

- **Le safranal**: est le composé volatil responsable de l'arôme et de l'odeur si spécifique au safran (Melnyk et al., 2010).

## 1.6 Propriétés biologiques du safran

### 1.6.1 Activité antitussive

L'extrait éthanolique de *Crocus sativus* et son safranique constitutif a permis de réduire le nombre de toux chez les cobayes lorsqu'ils sont injectés intrapéritonéalement lorsqu'une solution d'acide citrique (20%) a été utilisée pour induire la toux (Bhargava, 2011).

### 1.6.2 Effets anti-nociceptifs et anti-inflammatoires

Les stigmates du safran et les extraits de pétales ont présenté des effets anti-nociceptifs dans le test de la douleur chimiquement induite ainsi que l'activité anti-inflammatoire aiguë et / ou chronique, et ces effets peuvent être dus à la présence de flavonoïdes, de tanins, d'anthocyanines, d'alcaloïdes et de saponines (Srivastava et al., 2010).

### 1.6.3 Stress oxydatif

Les propriétés anti-oxydantes du safran se manifestent par son effet inhibiteur sur les réactions en chaîne des radicaux libres. Le safran étant riche en vitamine B2 et provitamine A, il représente un des meilleurs antioxydants naturels pour lutter contre le vieillissement des

cellules. En effet, les caroténoïdes agissent comme une protection active contre les espèces radicalaires. Ainsi, il a été montré que le safran protège les cellules cardiaques en augmentant la défense antioxydante dans le cas d'endommagements dus à l'ischémie-reperfusion et dans le cas des maladies cardiovasculaires (**Chahine, 2014**).

#### **1.6.4 Anti-cancer et activité anti-tumorale**

Les extraits de safran ont un effet anti-tumorale in vivo et in vitro, contre plusieurs types de cancer dont: le cancer colorectal, le cancer hépatocellulaire et le cancer de la prostate. Dans les extraits de safran, les caroténoïdes sont les principes actifs. Les mécanismes anticancéreux du safran ne sont pas encore bien élucidés mais plusieurs activités ont été proposées dont: la promotion de l'apoptose, la réduction de la prolifération et de la synthèse d'ADN des cellules tumorales, la diminution de l'inflammation, la réduction du stress oxydatif et l'augmentation des enzymes anti-oxydantes. Les extraits de safran s'avèrent non toxiques sur les cellules saines, mais sélectivement cytotoxiques pour les cellules cancéreuses. De plus, le safran possède une activité anti-muta-génique. La crocine, dérivée du safran dispose d'un effet inhibiteur puissant sur la formation des colonies cellulaires tumorales. Il a été démontré que le traitement par l'extrait de *Crocus sativus* prolonge significativement, jusqu'à presque trois fois, la durée de vie des souris traitées par la cisplatine (**Chahine, 2014**).

#### **1.6.5 Activité antimicrobien**

Un micro-organisme est un organisme qui ne peut être vu qu'avec l'aide d'un microscope et qui se compose habituellement d'une seule cellule. Les micro-organismes comprennent les bactéries, les protozoaires, les virus et certaines algues et champignons.

L'activité antimicrobienne peut être définie comme la capacité des molécules actives d'inhiber la croissance des bactéries (bactériostatique) ou la possibilité de détruire les cellules bactériennes (bactéricides).

Un micro-organisme multi résistant aux antibiotiques est en augmentation alarmante dans le monde. En tant que module de traitement contre les micro-organismes, les produits naturels ou dérivés de plantes médicinales représentent un symbole de bonne source d'agents antimicrobiens sans aucun effet secondaire indésirable. Différentes parties de *Crocus sativus* L telles que les étamines et la corolle ont été utilisées comme source d'agents antimicrobiens. Les extraits de *Crocus sativus* L contre diverses souches bactériennes ont confirmé une activité améliorée contre les bactéries et les champignons utilisés comme organismes d'essai. (**Rahmani et al., 2017**).

## **1.7 Domaine d'utilisation du safran**

### **1.7.1 Le safran comme teinture**

Les stigmates présentent une teinture jaune soluble dans l'eau, à très fort pouvoir colorant puisqu'une partie de safran peut colorer en jaune 100 000 parties d'eau. Il s'agit d'une teinture directe qui colore les fibres plongées directement dans la solution tinctoriale. Une décoction de stigmates teint en peu de temps la laine, la soie et les fibres végétales en orange ou jaune intense. Plus les teintures sont concentrées en couleurs, plus elles résisteront à l'exposition au soleil et à la lumière (**Cardon, 2003**).

### **1.7.2 Parfumerie**

Avec les fleurs, les agrumes et les bois, les épices sont des constituants essentiels de la parfumerie, et leur utilisation n'a jamais décliné. Elles apportent de la force, du caractère et de la puissance au parfum (**Palomares, 2015**).

### **1.7.3 Safran en nourriture**

Il remplit les fonctions d'une épice, en ajoutant son arôme faible, délicat, sa saveur agréable et sa magnifique couleur jaune pour améliorer la palatabilité (**Srivastava et al., 2010**).

### **1.7.4 Usage culinaire**

Le safran est de plus en plus présent dans les cuisines. Il parfume avec subtilité viandes et poissons, légumes, riz et pâtes, rehausse la saveur des desserts et apporte une couleur exceptionnelle, jaune or, aux plats. Le safran ne révèle jamais ses saveurs instantanément : il a besoin d'infuser une demi-heure minimum pour développer ses arômes. L'infusion de safran dans un liquide acide (citron), du lait, de la crème fraîche, ou une sauce chaude, permet d'introduire l'épice dans un plat en fin de cuisson et de lui éviter ainsi la dégradation due à un long mijotage. Le safran ne supporte ni la friture, ni l'ébullition prolongée. L'acidité optimise son goût, les corps gras le fixent. Le safran peut être mélangé avec d'autres arômes et épices (thym, ail, anis, cannelle, gingembre), il va alors agir comme exhausteur de goût. (**Chahine, 2014**).

## **1.8 Toxicité**

Le safran ne s'écarte pas de la règle édictée par Paracelse, médecin du XVI<sup>e</sup> siècle, mais il faudra en absorber une grande quantité (20g/kg de poids) pour voir ses effets s'inverser et ainsi devenir toxique. Vu le prix de l'épice, l'intoxication est peu probable, d'autant que la quantité utilisée dans la consommation alimentaire quotidienne ainsi que la dose requise pour obtenir les bénéfices sur la santé sont largement inférieures à la dose provoquant des effets secondaires (**Casamayou, 2011**).

Les rapports sur la toxicologie et la sécurité concernant l'épice sont assez confus. Les doses quotidiennes jusqu'à 1,5 g de poudre sont vraisemblablement sans danger. Puisque la dose avérée efficace dans les essais menés sur la dépression correspond approximativement à 30 mg de safran, il y a une grande marge de sécurité. Des effets toxiques sont rapportés à partir de 5 g, avec une dose semi-létale DL50 (dose provoquant 50% de mortalité dans la population étudiée, pendant un temps donné, par administration unique) d'approximativement 20,7 g/kg de poids vif (**Abdullaev et al., 2004**). Par comparaison, la dose semi-létale du sel de table sur le rat par voie orale est de 3,3 g/kg.

Une toxicité légère avec le safran provoque des vertiges, des nausées, des vomissements et des diarrhées, tandis qu'une toxicité plus sévère peut provoquer des engourdissements, des picotements dans les mains et les pieds et une peau et des yeux jaunâtres dus à la précipitation de pigments jaunes sur la peau et la conjonctive. Les saignements spontanés peuvent également être un symptôme (**Schmidt et al., 2007**).

# **Chapitre II**

*Acinetobacterbaumanni*

## 2. *Acinetobacter baumannii*

### 2.1 Historique

Le genre *Acinetobacter* commence à être décrit au début du XXe siècle. Un microbiologiste néerlandais (**Beijerinck, 1911**) a isolé un microorganisme appelé *Micrococcus calcoaceticus* à partir de prélèvements de sol (**Figueiredo, 2011**).

C'est en 1954 que **Brisou** et **Prévost** suggèrent le nom de genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* incapable de se déplacer) afin de rassembler une variété de taxons. Ces bactéries immobiles présentent une coloration Gram négative et une réaction d'oxydase négative. En 1961, **Prévot** présente 18 espèces dans son traité de systématique bactérienne. En 1968, **Baumann et al** ont mené une étude de taxonomie numérique qui démontre que les souches oxydase négative forment un seul genre et ces auteurs limitent le genre *Acinetobacter* aux seules souches oxydase négative (**Figueiredo, 2011**).

**Bouvet** et **Grimont** ont lancé la réorganisation de ce type en 1986. Grâce à l'analyse de 85 souches, ces auteurs ont pu identifier 12 génotypes différents. *L'Acinetobacter calcoaceticus* et *l'Acinetobacter lwoffii* sont les génotypes 1 et 8. On a appelé les génotypes 2, 4, 5 et 7 *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii* et *Acinetobacter johnsonii* respectivement. Il n'y a pas de nom pour les autres génotypes, soit parce qu'il est impossible de les caractériser par leurs caractéristiques phénotypiques, soit parce qu'elles contiennent un nombre insuffisant de souches (**Chahmout, 2011**).

En 2001, **Nemec et al.** décrivent *Acinetobacter ursingii* et *Acinetobacter schindleri*. En 2003, huit nouvelles nomenclatures ont été validement publiées par **Carr et al.** : *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter gernerii*, *Acinetobacter grimontii*, *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter tandoii*, *Acinetobacter tjernbergiae* et *Acinetobacter townnerie* (**Fomba, 2006**).

### 2.2 Définition

Les *Acinetobacter baumannii* sont des coccobacilles, courts, souvent regroupées en diplocobacilles, immobiles, à Gram négatif. Ce sont des aérobies stricts souvent encapsulées ne réduisant pas les nitrates, catalase positive et oxydase négative (**Avril et al., 2000**).

### 2.3 Classification

L'espèce *Acinetobacter baumannii* appartient au genre *Acinetobacter*, longtemps considéré comme un membre de la famille des *Neisseriaceae* et fait partie aujourd'hui de la famille des

*Moraxellaceae* (ordre des *Pseudomonadales* : classe des *Gammaproteobacteria* ; phylum des *Proteobacteriae* ; règne des *Bacteria*). (Tableau 2) (Fomba, 2006).

**Tableau 2** : Taxonomie d'*Acinetobacter baumannii* (khaldi, 2016).

<b>Règne</b>	Bacteria
<b>Embranchement</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria
<b>Ordre</b>	Pseudomonadales
<b>Famille</b>	Moraxellaceae
<b>Genre</b>	<i>Acinetobacter</i>
<b>Espèce</b>	<i>A.baumannii</i>

Certaines espèces sont très proches les unes des autres et il est difficile de les distinguer phénotypiquement en raison de leur haute ressemblance. Pour cela, le terme de complexe *A. baumannii* (ACB) a été créé par Gerner-Smidt et ses collaborateurs pour grouper quatre espèces : *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (Khaldi, 2016).

## 2.4 Caractères bactériologiques

### 2.4.1 Caractères morphologiques

On définit les *Acinetobacter baumannii* comme des cellules de 1,5 µm de longueur qui peuvent prendre différentes formes en fonction de la phase d'évolution, allant du cocciforme aux coccobacilles à Gram négatif. Ces cellules sont immobiles (Khaldi, 2016).

L'enveloppe cellulaire des espèces d'*Acinetobacter* est composée d'une membrane externe et d'une membrane cytoplasmique interne séparée par l'espace périplasmique (Uwingabiye, 2018).

Malgré leur immobilité, certaines souches peuvent montrer une mobilité twitching, une sorte de mouvement causé par des fimbriae polaires défectueuses sur un substrat solide. Une capsule est présente dans trente pour cent des souches d'*A.baumannii*, que l'on peut identifier à la coloration de Gram grâce au halo clair qui entoure la bactérie (Azzam, 2018).

### 2.4.2 Caractères biochimiques

Les *Acinetobacter baumannii* sont exclusivement aérobies stricts, non fermentantes, prototrophes, catalase positive, oxydase négative, et sont facilement cultivables dans la

plupart des milieux ordinaire (**Uwingabiye, 2018**).

Ces bactéries ont la capacité d'utiliser différentes matières organiques pour générer du carbone. En milieu complexe, les souches d'*Acinetobacter* spp sont généralement incapables de convertir les nitrates en nitrites. Les sels d'ammonium et de nitrate sont utilisés pour obtenir de l'azote. Elles ne peuvent donc pas se développer en anaérobiose lorsqu'elles utilisent les nitrates comme accepteur final d'électrons. Les sucres, les acides gras, certains acides aminés, les chaînes hydrocarbonées non ramifiées et certains composés aromatiques (y compris les acides aminés aromatiques) sont des composés organiques qu'ils peuvent utiliser pour le métabolisme et la production d'énergie. Les sucres utilisés par *A. baumannii* comme source de carbone pour les voies métaboliques sont restreints au D-glucose, au D-ribose et au D-xylose et au L-arabinose (**Uwingabiye, 2018**).

La présence d'un glucose déshydrogénase membranaire est responsable de l'oxydation du glucose et d'autres sucres en acide gluconique. *A. baumannii* métabolise le D-glucose en utilisant la voie d'Etner-Doudoroff. Un aldose déshydrogénase dégrade les pentoses utilisés par *A. baumannii* dans son métabolisme. Ensuite, les acides pentoïques oxydés sont transformés en  $\alpha$ -cétoglutarate à travers différentes étapes, avec des processus de déshydratation et de déshydrogénation (**Uwingabiye, 2018**).

## 2.5 Caractères culturels

Les *Acinetobacter* se développent aisément dans des environnements courants à une température idéale de 30 à 32 °C. Les colonies ont un diamètre de 2-3 mm sur une gélose ordinaire en 24 heures ; elles sont convexes, avec des bords réguliers et souvent translucides. La seule espèce capable de se développer à 44 ou 45 °C est *A. baumannii*. Certaines d'*Acinetobacter baumannii* ont une odeur désagréable lors de la culture, tandis que quelques rares souches présentent une hémolyse sur gélose au sang (**Flandrois, 1997 ; Avril et al., 2000**).

## 2.6 Caractères génotypiques

Le chromosome circulaire d'*A.baumannii* est unique, comprenant 3.976.747 paires de base, dont 3454 sont codées en protéines. Une recherche a été menée sur une souche appelée AYE d'*A.baumannii* qui présente une île de résistance à 86 KO appelée AbaR1, qui comprend 45 gènes de résistance, dont 25 spécifiques aux antibiotiques.

Il s'agit de la plus grande île connue aujourd'hui. Ces gènes ne sont pas seulement résistants aux divers antibiotiques, mais aussi aux métaux, à l'arsenic et au mercure. 14 gènes de résistance codant pour les intégrons de classe I sont également présents, qui sont des sections

de chromosomes capables de se recombinaison, d'exprimer et d'intégrer (Fournier PE, et al, 2006).

### 2.7 Caractères épidémiologiques

Ces dernières années, les *Acinetobacter baumannii* ont suscité une grande attention médiatique en raison des épidémies de grande envergure dont il a été à l'origine. Les souches de cette bactérie présentent une résistance à plusieurs antibiotiques et peuvent persister pendant plusieurs mois chez les patients colonisés (Khaldi, 2016).

Les bactéries *Acinetobacter* sont présentes partout dans la nature, qu'il s'agisse du sol, de l'eau ou des déchets. Elles peuvent également être découvertes chez les animaux, la volaille, les viandes fraîches, les laits contaminés ou encore les aliments surgelés. Il y en a aussi dans la flore cutanée de l'homme, dans la salive, ainsi que dans le système respiratoire (Khaldi, 2016).

### 2.8 Habitat

Les bactéries de la famille des *Acinetobacter* sont perçues comme des microorganismes présents partout et peuvent être identifiées à partir d'échantillons humains, animaux et environnementaux. La flore cutanée normale de l'homme est constituée d'*Acinetobacter* spp. Selon certaines études, le taux de colonisation cutanée par les souches d'*Acinetobacter* spp est de 43 % chez les sujets non hospitalisés, tandis qu'il est de 75 % chez les patients hospitalisés (Uwingabiye, 2018). Ces bactéries sont également présentes dans la salive et le système respiratoire (Khaldi, 2016).

*A. Iwoffii*, *A. johnsonii*, *A. guillouiae*, *A. junii*, *A. pittii* et *A. radioresistens* sont les espèces les plus couramment observées sur la peau humaine saine. Paradoxalement, *A. baumannii*, la plus commune espèce d'*Acinetobacter* responsable des infections nosocomiales, a été très rarement observée sur la peau et dans les selles humaines (Uwingabiye, 2018).

### 2.9 Pouvoir pathogène de l'*Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* est une bactérie pathogène qui pose un problème croissant dans les hôpitaux du monde entier. Bien qu'elle ne provoque rarement des infections chez les personnes en bonne santé, elle peut entraîner des infections graves chez les patients critiques ou immunodéprimés, en particulier dans les unités de soins intensifs (Sieniawski et al. 2013). Les infections les plus fréquemment observées chez *A. baumannii* sont des infections respiratoires, urinaires ou cutanées, qui sont généralement nosocomiales (Howard et al. 2012).

Son pouvoir pathogène est attribuable à sa capacité à coloniser efficacement les surfaces, à sa résistance aux antibiotiques et à sa capacité de former des biofilms, ce qui lui permet de survivre et de se propager dans les environnements hospitaliers

### 2.10 Facteurs de pathogénicité de l'*Acinetobacter baumannii*

Cette bactérie est pathogène en raison de l'expression de ses facteurs de virulence et de sa capacité à créer un biofilm. Les facteurs de la virulence restent mal expliqués. Les souris ont montré le pouvoir pathogène expérimental en utilisant un modèle de pneumopathie obtenu après administration intra-trachéale d'*A.baumannii*.

Cependant certains de ces facteurs sont connus tels que :

- **Le lipopolysaccharide** : *Acinetobacter*, tout comme les autres bacilles à gram négatif, possède des caractéristiques d'endotoxine liées au lipopolysaccharide.
- **La capsule** : Il est probable que la capsule joue un rôle essentiel dans la virulence, en préservant la bactérie de la phagocytose.
- **Le slime** : Certaines souches génèrent des polysaccharides de surface (slime) qui empêchent la migration des polynucléaires neutrophiles (Denis *et al.*, 2007).
- **L'OmpA** : qui fait partie des protéines de la membrane externe (OMP), joue un rôle important dans la maladie. Elle est vascularisée par l'épithélial de l'hôte et par les mitochondries. Dès qu'elle est associée à ces derniers, elle entraîne un dysfonctionnement des mitochondries et leur gonflement. On observe ensuite la libération de cytochrome C, une protéine hème, qui entraîne la création de l'apoptosome. Toutes ces réactions participent à la mort cellulaire.

La plus importante protéine de surface de l'agent pathogène, l'OmpA, joue également un rôle dans la résistance au complément et la formation de biofilm, deux stratégies essentielles de survie au stress et probablement de facteurs de virulence associés qui favorisent la survie des bactéries à l'intérieur et à l'extérieur de l'hôte (Howard *et al*, 2012).

- **Les protéines D et C de la phospholipase** : Si la phospholipase D joue un rôle essentiel dans la résistance au sérum humain, l'évasion des cellules épithéliales et la pathogénèse, la phospholipase C accroît la toxicité pour les cellules épithéliales.

### 2.11 Mode de transmission

Le personnel hospitalier est principalement responsable de la transmission de l'*Acinetobacter* en contact avec des sujets porteurs. De cette manière, la multiplication des soins et l'utilisation de dispositifs invasifs sont des éléments qui augmentent le risque de propagation de cette bactérie.

Il convient de souligner qu'une étude expérimentale a révélé que ce germe peut survivre pendant une durée de 60 minutes sur les doigts d'une main (**Khaldi, 2016**).

### 2.12 Persistance dans le milieu hospitalier

Plusieurs épidémies ont démontré la contamination de l'environnement et plusieurs expériences ont démontré que l'*A. baumannii* peut survivre sur diverses surfaces abiotiques, telles que le plastique, l'inox, la céramique, le caoutchouc et le verre. Il a même été possible d'isoler certaines souches épidémiques à partir d'un support de lit 9 jours après que le patient infecté ait été déclaré sorti (**Khaldi, 2016**).

### 2.13 La résistance aux antibiotiques

De nos jours, le genre *Acinetobacter* est considéré comme un modèle d'adaptation extrêmement efficace en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques. Au cours des 40 dernières années, *Acinetobacter*, principalement représenté par l'espèce *A.baumannii*, est passé d'une bactérie peu importante en infectiologie en raison de sa faible Pathogénicité et de sa sensibilité à la plupart des antibiotiques disponibles à l'époque à une bactérie multi-résistante aux antibiotiques (**Figueiredo, 2011**). Elle a réussi à exploiter différents mécanismes liés aux mutations ou par transfert de gènes de résistance à partir d'espèces plus ou moins proches, que ce soit sous la forme de plasmides, de transposons ou de cassettes d'intégrons (**Uwingabiye 2018**).

#### 2.13.1 Résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux $\beta$ -lactamines

##### 2.13.1.1 Résistance naturelle

*A.baumannii* présente une résistance naturelle à certaines  $\beta$ -lactamines notamment aux carbapénèmes en raison de la diminution de la taille des protéines de la membrane externe, d'une production restreinte de porines (**Perez, 2007**) et des pompes à efflux qui sont actives naturellement face à un large éventail d'antibiotiques (**Poirel et al., 2006 ; Damier-Piolle et al., 2008**). De plus, cette espèce est productrice d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique de type céphalosporinase (AmpC) qui hydrolyse les aminopénicillines et les céphalosporines de première et de deuxième génération, mais n'a pas d'activité pour les carboxypénicillines et la pipéracilline.

*A. baumannii* possède également une enzyme de classe D ou oxacillinase chromosomique naturelle (OXA-51) utilisée comme marqueur d'identification de l'espèce et confèrent une diminution de sensibilité aux carbapénèmes (**Héritier et al., 2005 ; Poirel et Nordmann, 2006**).

### 2.13.1.2 Résistance acquise

#### A. Pénicillinases

Différentes pénicillinases plasmidiques ont été caractérisées chez *A.baumannii*. Il s'agit principalement de l'enzyme TEM-1, les autres types moins fréquents étant TEM-2, CARB-5 et SCO-1. Ces enzymes confèrent la résistance aux pénicillines à large spectre (ticarcilline, pipéracilline) (Carbonne et al., 2005 ; Poirel et Nordmann, 2006).

#### B. Céphalosporinase de classe C

*A.baumannii* produit naturellement une Céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (céphalotine) ou des carbapénèmes. L'insertion d'une séquence spécifique ISAbal en amont du gène bla AmpC favorise l'expression de cette  $\beta$ -lactamase de type AmpC en fournissant des séquences promotrices ce qui entraîne la résistance à la ceftazidime et d'autres céphalosporines à large spectre (Hujer et al., 2006 ; Nordmann et al., 2009).

#### C. Oxacillinase de classe D

La plupart des  $\beta$ -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les céphalosporines de troisième génération et de quatrième génération mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV (Cattoir, 2008). Les  $\beta$ -lactamases de type OXA-51/69 pourrait contribuer à la résistance aux carbapénèmes par l'insertion d'ISAbal dans la région promotrice du gène bla OXA-51/69 (Poirel et al., 2009). Ces enzymes sont de trois grands types résistants à l'acide clavulanique: OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58 qui peuvent être codées soit par des gènes chromosomiques soit plasmidiques. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression (Héritier et al., 2009).

#### D. Métallo- $\beta$ -lactamases de classe B

Les  $\beta$ -lactamases de classe B ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les  $\beta$ -lactamines(Clavilier et al., 2001), elles sont inhibées par l'EDTA (Ruppé, 2010).

Trois groupes ont été identifiés chez *A. baumannii* (IMP-like, VIM-like et SIM-1)(Poirel et Nordmann, 2006), cette classe d'enzyme confère une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception des monobactames(Conly et al., 2011 ; Decré, 2012).

### E. $\beta$ -lactamases à spectre élargi

Chez *A.baumannii*, les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques (Sinha et al., 2007). Les enzymes du type GES, PER, VEB et IBC-2 ont été largement retrouvées chez *A.baumannii*. Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam (Rodriguez-Villalobos et al., 2006). Les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégrons comme gènes cassettes (VEB-1, IBC-1, GES-1, GES-3) (Philippon et al., 2006).

#### 2.13.2 Résistance aux aminosides

L'acquisition d'éléments génétiquement mobiles (plasmides, intégrons ou transposons) responsables de la production d'enzymes modificateurs inactivant les aminosides est responsable de la résistance aux aminosides. L'expression de systèmes d'efflux actifs a également été liée à la résistance aux aminosides. La méthylation de l'ARNr 16S a récemment été rapportée à travers le monde en acquérant des gènes codant des méthylases par l'*A. baumannii*. Ce processus rend inactif tous les aminosides, à l'exception de la streptomycine, de la spectinomycine et de la néomycine (Khaldi, 2016).

#### 2.13.3 Résistance aux quinolones

L'apparition de la résistance aux fluoroquinolones a été causée par la généralisation de leur utilisation en thérapeutique, et les mécanismes de résistance décrits sont associés à des mutations dans la cible des quinolones, à savoir les topo-isomérases de type II. Les systèmes d'efflux jouent également un rôle dans la résistance aux fluoroquinolones (Khaldi 2016).

#### 2.13.4 Résistance aux autres antibiotiques

- **La colistine de la classe des polymyxines** : est un peptide cationique qui agit perturbant les membranes chargées négativement des bactéries gram négatif, reste parfois le seul antibiotique disponible dans le cas des infections à *A. baumannii* multirésistantes. La résistance à la colistine reste rare, cependant un système de régulation à deux composantes PmrAB est impliqué dans la résistance à la colistine chez *A. baumannii* (Adams et al., 2009).

- **La rifampicine** : possède une activité intéressante sur *A. baumannii*, mais les risques de mutations vers la résistance sont élevés. Par ailleurs, un gène de résistance *arr-2* codant pour une ADP-ribosyl-transférase a été identifié au sein d'un intégron de classe 1, la rifampicine est également sensible au système d'efflux de type RND AdeIJK (Decré, 2012).

• **Tétracycline** : deux mécanismes de résistance ont été largement décrit dans *A. baumannii* : un système d'efflux Tet ; tetA et tetB médiées par des transposons, TetB détermine à la fois l'efflux à la tétracycline et la minocycline, tandis que T et A ne pilote que l'efflux de tétracycline. Le deuxième mécanisme est le système de protection ribosomique, une protéine codée par le gène tetM protège le ribosome de l'action de tétracycline, la doxycycline et la minocycline (**Perez et al., 2007**). La résistance intrinsèque à la tétracycline a été également associée à la surexpression des systèmes d'efflux de type RND AdeABC (**Gordon et Wareham, 2010**).

# **Partie II**

*Etude Expérimentale*

## **Chapitre I**

*Matériel et Méthodes*

## 1. Matériel et méthode

### 1.1 Introduction

Dans le cadre d'étudier l'activité antimicrobienne des extraits et fractions des feuilles de *C. sativus L* contre des souches d'*Acinetobacter baumannii* d'origine clinique, le laboratoire de recherche LAPRONA laboratoire des produits naturels, 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.

### 1.2 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 matériel végétal a été fourni par Pr. LOUKIDI Bouchra. Les extractions ont été réalisées par le doctorant du Pr. LOUKIDI Bouchra, M. Kamal CHOUARI.

### 1.3 Préparation des extraits et des fractions de safran

Pour effectuer cette étude on a utilisé les extraits suivants avec une concentration correspondante à 0.1mg/10µL.

#### 1.3.1 Préparation de l'extrait aqueux :

- 5g de la poudre végétale (les feuilles de safran) a été mise a une extraction par macération à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans 50 ml de l'eau distillée pendant 72h.

- Après macération, on a été utilisé le papier Whatman pour filtrés les mélanges.
- Puis on a été évaporé les solutions aqueuses obtenues à 50°C par un évaporateur rotatif.

#### 1.3.2 Préparation des fractions méthanoliques et aqueuses par succession des solvants

- **Obtention de la fraction méthanoïque et la fraction aqueuse**

Pour arriver à la fraction aqueuse, différentes extractions des feuilles ont été réalisées dans différents solvants de polarité croissante.

- **Délipidation pour extraction des huiles fixes**

Par La méthode Soxhlet, une cartouche est remplie de 10 mg de la poudres des feuilles *C. sativus* est bouchée avec du coton puis placée dans un siphon qui est relié à un ballon

contenant 150 ml d'hexane. Après 4 heures d'extraction à température comprise entre 40 à 45°C les huiles fixées sont récupérées dans un ballon. Les huiles fixées sont concentrées à l'aide du rotavapor qui permet l'évaporation de l'hexane à une température de 45°C.

Le cartouche a été placé dans un four pendant 16 heures à une de température 30 à 35°C pour une évaporation complète de l'hexane.

Le résidu sec a subi des extractions par macération pendant 72 heures par utilisation successives des solvants du moins polaire au plus polaire jusqu' à l'arrivage aux fractions méthanolique puis la fraction aqueuse.

- Fraction de dichlorométhane
- Fraction d'acétylacétate
- Fraction Acétone
- Fraction Butanol
- Fraction Méthanol
- Fraction Aqueuse

### 1.3.3 Préparation de la d'acétate d'éthyle

- Macération hydro/Méthanol 70/30 (48h).
- Filtration.
- Evaporation à sec.
- Ajouter 100 ml de HCL 2N pendant 1h sous reflux.
- Lavage par acétate d'éthyle V/V (la répéter 3 fois).
- Evaporation de la phase aqueuse.

### 1.4 Souches testées

Les souches étudiées ont été fournies par Dr Ayad Amel.

Initialement, l'objectif de notre étude était de tester l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles de *crocus sativus* contre une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et 13 souches cliniques d'*A. baumannii* multirésistantes aux antibiotiques isolées de différents services de CHU de Tlemcen. Cependant en raison des quantités limitées des extraits de safran disponibles, nous avons dû restreindre notre travail à seulement 4 souches (tableau 3).

**Tableau 3:** Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

Microorganisme	Code	Gram	Source	Service
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram négative	Laboratoire de bactériologie médicale CHU de Montpellier	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	A12		Aspiration trachéale	UMC
<i>Acinetobacter baumannii</i>	A24		Poignée de porte de salle de déchocage	UMC
<i>Acinetobacter baumannii</i>	A30		Chariot de matériel de salle de soin	Réanimation

### UMC: Urgences Médicales et Chirurgicales

#### 1.5 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 indiqués dans le **tableau 4**.

**Tableau 4 :** Milieux de culture

Milieu de culture	Utilisation
Bouillon BHIB	pour enrichissement des bactéries
Gélose MacConkey	pour purification des bactéries
Bouillon Mueller Hinton	pour la pré-culture des bactéries
Gélose Mueller Hinton	Pour l'évaluation d'activité antimicrobienne des bactéries

#### 1.6 Enrichissement des bactéries

- Une pré-culture des souches microbiennes est préparée dans le Bouillon BHIB afin d'obtenir une croissance bactérienne.

- Incubation est faite à 37°C pendant 24 h.

#### 1.7 Purification des bactéries

- Les boîtes Pétri sont coulées avec gélose MacConkey à une épaisseur de 4 mm.
- Ensuite, les boîtes sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant

l'ensemencement afin d'éliminer l'humidité.

- Tremper une l'anse de platine stérile dans la suspension bactérienne.
- Déposer une goutte de la suspension bactérienne au bord de la boîte de Pétrie sur le 1<sup>er</sup> cadran.
- Tracer à l'aide de l'anneau de l'anse des stries serrées sur le 1<sup>er</sup> cadran.
- Flamber l'anse de platine et laisser refroidir.
- On retourne la boîte vers le 2<sup>ème</sup> cadran et on le trace de la même façon du premier.
- On retourne la boîte vers le 3<sup>ème</sup> cadran, on l'ensemence cette fois-ci par des stries non serrées mais éloignées ne recoupant pas le dépôt précédent (**Rahmani, 2019**).

### 1.9 Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre du papier filtre sont découpés et stérilisés dans une autoclave pendant 20 min à 120°C.

### 1.9 Préparation d'antibiotiques

#### 1.9.1 Ampicilline

On prépare une solution d'ampicilline (Biocare, Algérie, **Figure 4**) dans l'eau distillée stérile correspondante à une charge de 10 µg pour un volume 10µL.



**Figure 3** : ampicilline (Biocare)

#### 1.9.2 Acide nalidixique

On dissolvait 30 µg d'acide nalédixique dans 10 µl de méthanol.

### 1.10 Étapes préliminaires à l'étude

#### 1.10.1 Préparation de l'inoculum

- Une pré-culture des souches microbiennes est préparée dans le Bouillon B.M.H afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance.
- Après 18-24 h d'incubation à 37°C la turbidité est ensuite ajustée au standard Mc Farland 0.5 avec un colorimètre, ce qui correspond à 10<sup>8</sup> UFC/ml (D.O= **0.08 à 0.1/625** nm).

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien le milieu (B.M.H) 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).

### 1.10.2 Ensemencement

- Les boîtes Pétrie sont coulées avec G.M.H à une épaisseur de 4 mm (20 mL), 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).

## 1.11 Méthodes d'analyses

### 1.11.1 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, d'extrait méthanoïque, d'acétate d'éthyle et de fraction aqueuse du feuilles de safran avec des charges respectives de **0.01, 0.5** et **1mg/disque**. Ces disques sont déposés à la surface de la gélose préalablement ensemencée en surface avec la suspension microbienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits.
- Des disques d'ampicilline (**10 µg**), d'acide nalidixique (**30µg**) et de DMSO ont été utilisés comme des contrôles positifs pour les bactéries.
- Deux répétitions sont effectuées pour chaque charge.
- L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24 h.

- La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition.

### 1.11.2 Méthode de Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

#### A. 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 (microdilution en bouillon) selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (**NCCLS, 2001**).

#### B. Mode opératoire

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.

- Tout d'abord, nous mettons **100 µL** de bouillon B.M.H dans les puits. Ensuite, nous déposons 100 µl d'extrait 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 dans les puits 1 (comme témoin) puis 3 à 22 pour obtenir un volume final de **200 µL** avec une concentration finale de microorganismes de **5 × 10<sup>5</sup> 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 mêmes étapes sont répétées pour les autres extraits sauf pour AE nous déposons **50 µL** de B.M.H, d'extrait et de la suspension bactérienne.
- Les microplaques ont été incubées pendant 24 h à 37°C.
- La lecture est faite 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.

• Pour déterminer la CMB, on prélève **10µL** des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (G.M.H) 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 et al., 2021).

**Tableau 5:** Concentrations des extraits des feuilles de *Crocus sativus* dans les puits

Numéro	Extrait aqueux	Fraction méthanolique	Acétate d'éthyle	Fraction aqueuse
1	TC	TC	TC	TC
2	TE	TE	TE	TE
3	8.5 mg/mL	37.5 mg/mL	5 mg/mL	2.9mg/mL
4	4.25 mg/mL	18.75 mg/mL	2.5 mg/mL	1.45 mg/mL
5	2.125 mg/mL	9.375 mg/mL	1.25 mg/mL	0.725mg/mL
6	1.0625 mg/mL	4.6875 mg/mL	0.625 mg/mL	0.36 mg/mL

**TC** : témoin de culture microbienne.

**TE** : témoin de l'extrait étudié.

### 1.11.3 Bioautographie

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

#### 1.11.3.1 Mode opératoire

• **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).

• **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.
- Les plaques sont placées dans une cuve qui renferme l'éluant.
- On dépose les plaques dans une cuve contient l'éluant.
- Les diverses composantes de l'extrait sont séparées et se développent par capillarité jusqu'à la ligne d'arrivée, où la plaque peut être retirée de la cuve.

Le rapport frontal : est calculé en divisant la distance parcourue par le composé par la distance parcourue par le solvant de migration.



**Figure 4 :** Extraits et fractions de safran sur couche mince dans l'éluant

#### 1.11.3.2 L'activité antimicrobienne

- Les plaques de migration sont déposées sur des boîtes pétries déjàensemencé par les souches bactériennes.
- Après une diffusion des molécules bioactifs de plaque dans les géloses (à 4°C durant environ 4h), on les incube à l'étuve pendant 24 h à 37°C.
- La lecture visuelle nous a permet de vérifié l'inhibition ou la croissance microbienne par mesure de la zone d'inhibition.

# **Chapitre II**

## ***Résultats et Discussions***

## 2. Résultats et Discussions

### 2.1 Purification des souches

La purification permet d'obtenir des cultures plus homogènes et plus pures, réduisant ainsi le risque de contamination croisée et améliorant la reproductibilité des expériences. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 5.



**Figure 5** : Souches bactériennes purifiées sur le milieu MacConkey.

### 2.2 Activité antimicrobienne

La résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes pathogènes est devenue un problème de santé publique de plus en plus important dans le monde, rendant les infections plus difficiles à traiter. Les *Acinetobacter* particulièrement l'espèce *A.baumannii*, sont souvent responsables d'infections associées aux soins de santé. (World Health Organization, 2020).

Il est essentiel de chercher de nouvelles molécules biologiquement actives telles que le safran, qu'il pourrait être utilisé dans la lutte contre ces infections.

Les solvants utilisés lors de l'extraction du safran peuvent influencer la composition chimique des extraits obtenus et par conséquent leur activité antimicrobienne.

Certains solvants peuvent extraire des composés spécifiques du safran qui ont des propriétés antimicrobiennes plus puissantes que d'autres. Par exemple, l'utilisation d'acétate d'éthyle et de méthanol peut conduire à des extraits contenant différents types et concentrations de composés actifs ce qui influence la capacité à inhiber la croissance microbienne (Russell, 2003).

#### 2.2.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé

Nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques pour mettre en évidence le pouvoir antimicrobienne des extraits des feuilles de Safran (*C. sativus*) vis-à-vis de 4 souches bactériennes. Les charges ont été prises dans l'ordre 0.01, 0.5 et 1 mg/disque. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par les extraits des feuilles de *Crocus sativus*.

Extraits/ antibiotiques	Charges (mg/disque)	Bactéries			
		<i>A.baumannii</i> 12	<i>A.baumannii</i> 24	<i>A.baumannii</i> 30	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Extrait aqueux	0.01mg	7±0	0±0	6.75±0.35	0±0
	0.5mg	0±0	0±0	7±0	0±0
	1mg	0±0	0±0	0±0	7±0
Extrait acétate d'éthyle	0.5mg	0±0	0±0	7±0	0±0
	1mg	0±0	0±0	0±0	7±0
Fraction méthanolique	1mg	0±0	0±0	0±0	0±0
Fraction aqueuse	1mg	0±0	0±0	0±0	7±0
Ampicilline	10 µg	0±0 (R)	0±0 (R)	6.5± 0.70 (R)	0±0 (R)
Acide nalidixique	30 µg	0±0 (R)	0±0 (R)	6.25± 0.35 (R)	6.5±0.70 (R)
DMSO	5 %	0±0	0±0	0±0	0±0

**R** : résistant

D'après le **tableau6**, l'extrait aqueux présente un effet antibactérien sur les souches *A. baumannii*12 à la charge 0.01 mg, *A. baumannii*30 à la charge 0.01 et 0.5 mg, et *P.aeruginosa* à la charge 1 mg sauf *A. baumannii*24 qui ne montre aucune zone d'inhibition.

L'acétate d'éthyle ne montre aucune zone d'inhibition pour les germes *A. baumannii*12, *A. baumannii*24 sauf *A. baumannii*30 et *P. aeruginosa* on a obtenu des zones d'inhibition de 7 mm avec la charge 0.5 mg et 1 mg, respectivement.

La fraction méthanolique ne démontre aucune activité pour toutes les souches.

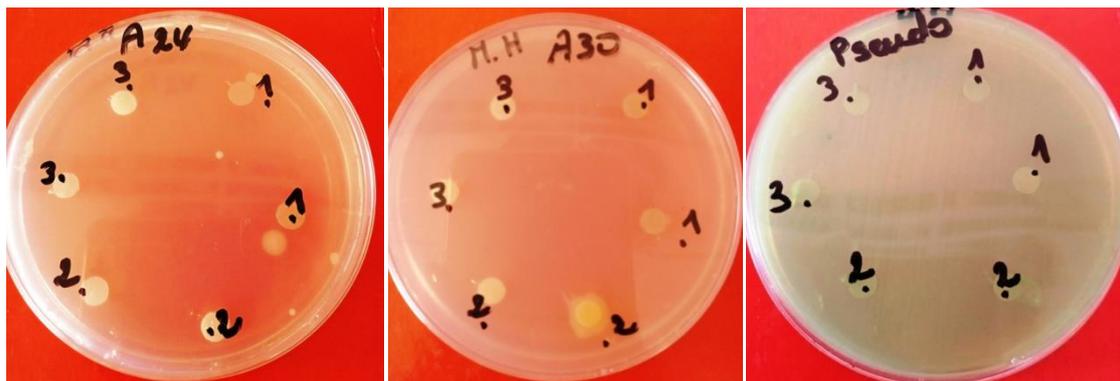
La fraction aqueuse ne présente aucun effet antibactérien sur tous les souches sauf pour *P. aeruginosa* il y a une activité avec la charge 1 mg.

Toutes les souches ont une résistance à l'Acide nalidixique (30 µg).

DMSO 5% n'a aucun effet antibactérien sur toutes les souches car elles sont résistantes à ce solvant.

L'ampicilline n'a aucun effet antibactérien sur *A. baumannii*12 et *P. aeruginosa* car elles sont résistantes à cet antibiotique. Pour *A. baumannii*30 on a obtenu une zone d'inhibition de  $6.5 \pm 0.70$  à la charge  $10 \mu\text{g}$ .

D'après **Jafari-Sales et Pashazadeh (2020)**, l'extrait méthanolique avait des zones d'inhibition de  $7.8 \pm 1.14$  mm à une concentration de 50 mg/ml et  $14.5 \pm 0.83$  mm à 400 mg/ml sur *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 6:** Résultats de méthode de diffusion sur gélose  
(*A. baumannii*24, *A. baumannii*30, *P. aeruginosa*)

### 2.2.2 Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

**Tableau 7 :** CMI et CMB des extraits des feuilles de *Crocus sativus* sur les souches testées.

Extraits/ fractions		<i>Acinetobacter baumannii 12</i>	<i>Acinetobacter baumannii 24</i>	<i>Acinetobacter baumannii 30</i>	<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>
<b>Extrait aqueux</b>	<b>CMI</b>	>8.5 mg/mL	8.5 mg/mL	>8.5 mg/mL	>8.5 mg/mL
	<b>CMB</b>	>8.5 mg/mL	>8.5 mg/mL	>8.5 mg/mL	>8.5 mg/mL
<b>Fraction méthanolique</b>	<b>CMI</b>	>37.5 mg/mL	>37.5 mg/mL	37.5 mg/mL	>37.5 mg/mL
	<b>CMB</b>	>37.5 mg/mL	>37.5 mg/mL	>37.5 mg/mL	>37.5 mg/mL
<b>Extrait acetate d'éthyle</b>	<b>CMI</b>	2.5 mg/mL	2.5 mg/mL	2.5 mg/mL	>5 mg/mL
	<b>CMB</b>	5 mg/mL	>5 mg/mL	5 mg/mL	>5 mg/mL
<b>Fraction aqueuse</b>	<b>CMI</b>	>2.9 mg/mL	2.9 mg/mL	>2.9 mg/mL	<b>0.36 mg/mL</b>
	<b>CMB</b>	>2.9 mg/mL	2.9 mg/mL	>2.9 mg/mL	<b>1.45 mg/mL</b>

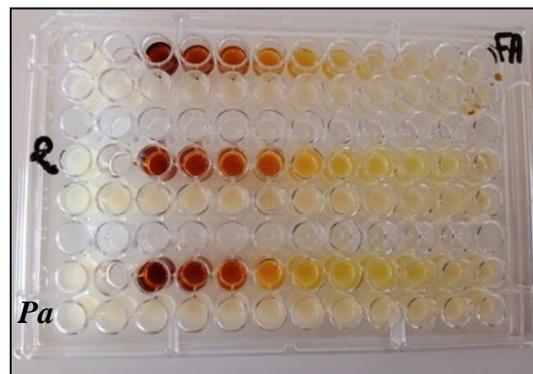
D'après les résultats mentionnés dans le tableau 7 les valeurs de la CMI sont comprises entre 0.36 mg/mL et 8.5 mg/mL. Les valeurs de la CMB sont comprises entre >1.45 mg/mL et 37.5 mg/mL.

Les valeurs de la CMI pour l'extrait aqueux étaient supérieures à 8.5 mg/mL avec *A. baumannii*12, *A. baumannii*30 et *P.aeruginosa*, tandis que avec *A. baumannii*24 étaient 8.5 mg/mL. Pour la CMB les valeurs sont >8.5 mg/mL avec toutes les souches.

La fraction méthanolique inhibe la croissance des souches *A.baumannii* 12, *A. baumannii* 24 et *P.aeruginosa* avec une concentration supérieure à 37.5 mg/mL. Elle inhibe aussi la croissance d'*A. baumannii* 30 avec une concentration de 37.5 mg/mL. Pour la CMB les valeurs sont >37.5 mg/mL avec toutes les souches.

L'acétate d'éthyle a montré un effet inhibiteur sur *A. baumannii*12, *A. baumannii*24 et *A. baumannii*30 avec une concentration de 2.5 mg/mL. La concentration inhibitrice obtenue avec *P.aeruginosa* était supérieure à 5 mg/mL. Pour la CMB les concentrations étaient 5 mg/mL avec *A. baumannii*12, *A. baumannii*30 et >5 mg/mL avec *A. baumannii* 24 et *P. aeruginosa*.

La fraction aqueuse inhibe la croissance des souches *A.baumannii* 12 et *A. baumannii* 30 à des concentrations supérieures à 2.9 mg/mL pour la CMI et la CMB. Elle inhibe aussi la croissance d'*A. baumannii* 24 à des concentrations de 2.9 mg/mL pour la CMI et la CMB, tandis que avec *P.aeruginosa* elle montre un effet inhibiteur à des concentrations de 0.36 mg/mL et 1.45 mg/mL pour la CMI et la CMB respectivement.



**Figure 7** : Microplaques après incubation (fraction aqueuse sur *P. aeruginosa*)



**Figure 8:** Résultat de CMB pour l'extrait d'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse  
(A : *Pseudomonas aeruginosa*, B : *Acinetobacter baumannii* 24)

Les travaux de **Zaazaa et al. (2021)**, sur l'extrait aqueux de *C. sativus*, ont montré que l'extrait donne une activité contre la souche *E. coli* avec des valeurs de CMI et CMB de 15.62mg/mL et 31.25 mg/mL pour l'extrait Marocain et l'extrait Italien, respectivement. Concernant la souche *K. pneumoniae* les valeurs sont 30.25mg/mL pour la CMI et la CMB de l'extrait Marocain, et 31.25mg/mL pour la CMI et 62.5 mg/mL pour la CMB pour l'extrait Italien. La souche *P. aeruginosa* a présenté des valeurs de 65.5 mg/mL pour la CMI et 125mg/mL pour la CMB pour l'extrait Marocain et pour l'extrait Italien 125 mg/mL pour la CMI et la CMB.

D'après l'étude réalisée par **Bai et Chabane(2023)**, l'extrait aqueux inhibe la croissance d'*E. coli* et *P.aeruginosa* avec une concentration inhibitrice de 25 mg/mL.

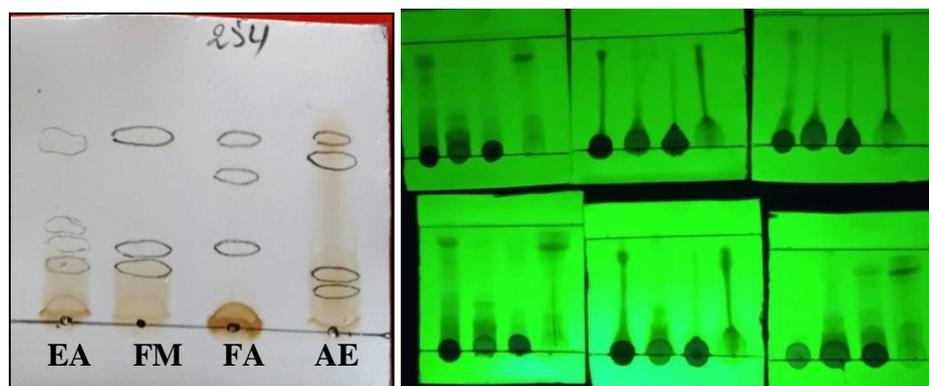
D'après l'étude de **Jadouali et al. (2018)**, l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques (4.5 µg/puits, 9 µg/puits et 13.5 µg/puits) contre six bactéries testées *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *Proteus mirabilis* et *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* a révélé que 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*.

Dans l'étude réalisée par **Bagherzade** en 2017, il a également constaté que l'extrait aqueux de déchets de safran avait une activité antibactérienne insignifiante sur la souche de *P. aeruginosa*.

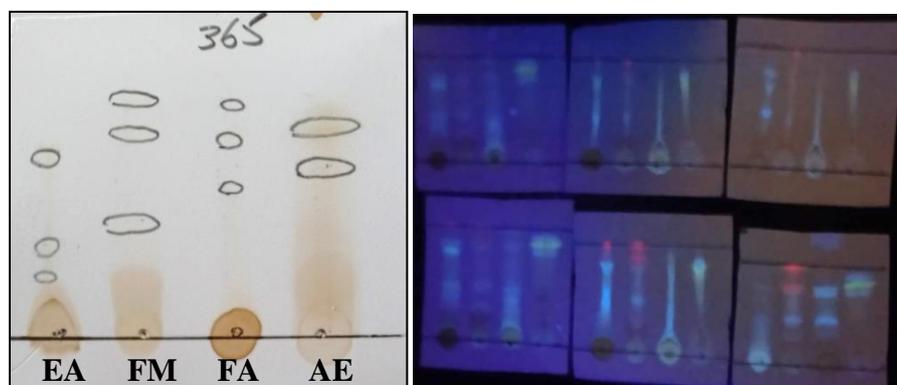
### 2.2.3 Bioautographie

Les résultats de CMI et CMB obtenus précédemment nous ont amené à approfondir pour révéler l'activité des molécules des 4 extraits par une bioautographie.

Après migration on peut constater les composants des extraits (**figure 9 et 10**) qui représente la révélation des molécules contenant dans les 4 extraits et le rapport frontal de chaque composant dans le **tableau 8**.



**Figure 9 :** Révélation des molécules contenant dans les extraits et fractions avec 254 nm (EA : Extrait aqueux, FM : Fraction méthanolique, FA : Fraction aqueuse, AE : Acétate d'éthyle)



**Figure 10:** Révélation des molécules contenant dans les extraits et fractions avec 365 nm (EA : Extrait aqueux, FM : Fraction méthanolique, FA : Fraction aqueuse, AE : Acétate d'éthyle)

Tableau 8 : Rapport frontal du composant des extraits de safran

Rapport frontal avec 254 nm				
	Extrait aqueux	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse	Acétate d'éthyle
Tache 1	$0.9/3.5= 0.25$	$0.8/3.5= 0.22$	$1.2/3.5= 0.34$	$0.6/3.5= 0.17$
Tache 2	$1.2/3.5= 0.34$	$1.2/3.5= 0.34$	$2.3/3.5= 0.65$	$0.8/3.5= 0.22$
Tache 3	$1.5/3.5= 0.42$	$2.8/3.5= 0.8$	$2.8/3.5= 0.8$	$2.5/3.5= 0.71$
Tache 4	$2.7/3.5= 0.77$			$2.8/3.5= 0.8$
Rapport frontal avec 365 nm				
	Extrait aqueux	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse	Acétate d'éthyle
Tache 1	$0.9/3.5= 0.25$	$1.6/3.5= 0.45$	$2.1/3.5= 0.6$	$2.3/3.5= 0.65$
Tache 2	$1.3/3.5= 0.37$	$2.9/3.5= 0.82$	$2.8/3.5= 0.8$	$2.9/3.5= 0.82$
Tache 3	$2.6/3.5= 0.74$	$3.4/3.5= 0.97$	$3.2/3.5= 0.91$	
Tache 4				

Après l'incubation et croissance bactérienne on a constaté une petite zone d'inhibition parallèle uniquement de *P. aeruginosa* pour l'extrait acétate d'éthyle qui a le  $R_{f1}=0.65$  et  $R_{f2}=0.82$  (figure 11).



Figure 11: Résultat de la bioautographie du *P. aeruginosa* (EA : Extrait aqueux, FM : Fraction méthanolique, FA : Fraction aqueuse, AE : Acétate d'éthyle)

*Conclusion*  
*et*  
*Perspectives*

A l'heure actuelle, la découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

L'objectif de notre étude est non seulement d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *C. sativus* contre les bactéries pathogènes responsables des infections mais aussi pour mettre en évidence l'intérêt des déchets floraux de safran pour une valorisation.

Dans cette étude, il a été prouvé que les feuilles de safran *C. sativus* de Tlemcen présentent des propriétés antimicrobiennes intéressantes contre les quatre souches pathogènes.

Pour confirmer le pouvoir antimicrobien des extraits de feuilles de safran, plusieurs méthodes ont été abordées par la méthode de diffusion sur gélose pour déterminer quel extrait avait un effet d'inhibition sur les trois souches d'*Acinetobacter baumannii* et une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa*. Après, nous avons passé à la méthode CMI pour trouver la concentration minimale qui est capable d'inhiber la croissance de ses souches et ensuite la méthode CMB pour rechercher la plus faible concentration capable de tuer complètement ces micro-organismes. Et nous avons fini par la méthode de bioautographie pour séparer les composés des extraits et de tester l'activité biologique des molécules.

Selon les résultats, la fraction aqueuse de feuilles de *C. sativus* a un effet antimicrobien sur *Pseudomonas aeruginosa* avec des valeurs de 0.36 mg/ml pour la CMI et de 1.45 mg/mL pour la CMB. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé la présence d'une inhibition des germes utilisés, et montrent des effets bactéricides et bactériostatiques. Ce qui contribue à confirmer l'existence d'une activité contre les microorganismes sélectionnés pour effectuer cette expérience.

Ces résultats confirment que *Crocus sativus* est une plante médicinale élaborant une importance non négligeable en médecine. En effet, cette plante possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. Ces résultats restent cependant initiaux partiels. Il serait donc judicieux à l'avenir de :

- Identifier des composés bioactifs présents dans les extraits.
- Préparer des produits et des formulations pharmaceutiques à base de substances naturelles extraites à partir des feuilles du safran.
- Évaluer la sécurité et la tolérance des produits dérivés du safran.

- Développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les mécanismes d'action du safran.
- Evaluer d'autres activités biologiques : Antioxydante, Anti-inflammatoire, Antitumorale.

# *Références bibliographiques*

A

- **Abdullaev, F. I. (1993).** Biological effects of saffron. *BioFactors* (Oxford, England), 4(2), 83-86.
- **Abdullaev, F. I. (2002).** Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L). *Experimental biology and medicine*, 227 (1), 20-25.
- **Avril, JL., Dabernat, H., Denis, F. et Monteil, H. (2000).** *Bactériologie clinique*. Paris : Ellipses, 602p.
- **Adams, MD., Nickel, GC., Bajaksouzian, S. et al.(2009).** Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrA13 two-component system. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; Volume 53, N. 9, P. 3628-36-Î4.
- **Arvy, M et Gallouin, F.(2003).** *Epices, aromates et condiments*, édition Eyrolles, Paris, pp: 216-219.
- **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.
- **Aucante, P. (2000).** Le safran chroniques du potager. *Actes sud Ed*, P 101.
- **Azzam, A. (2018).** Evolution phylogénique de l'espèce *Acinetobacter baumannii* au CHU de Tizi-Ouzou et étude de sa résistance aux  $\beta$ -lactamines, aminosides et quinolones. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Université Mouloud MAMMERI, faculté de Médecine. Tizi- Ouzou. 27, 29, 30p.

B

- **Bagherzade, G., Tavakoli, M. M., & Namaei, M. H. (2017).** Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 227-233.

- **BAI, FZ et Chabane, A (2023).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits du pétale du Safran *Crocus sativus L.* contre les microorganismes responsables des infections alimentaires, Mémoire de Master. Université ABOU-BEKR BELKAID-Tlemcen. 24p.
- **Belyagoubi,L., Loukidi,B., Belyagoubi-Benhammou,N., Gismondi,A., Marco, GD., AD'Agostino, A., Canini,A., Benmahieddine,A., Rouigueb,K., BenMenni1,D., Atik-Bekkara1,F. (2021).** Saffron Stigmas and Flowers as Source of Bioactive Compounds, 14p.
- **Ben Mostefa, I et Guellil, Z. (2017).** Dosage des polyphénols de la fleur de *Crocus sativus L.*, mémoire de Master université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, 62 p.
- **Bhargava, V. (2011).** Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus Linn* (Saffron). *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Science*, 3(3), 22-26p.
- **Boudjouref, M.(2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* Thèse de Magister en Biochimie, Université Ferhat Abbes, Sétif, Algérie, 99 p.

C

- **Carbonne, A., Naas, T., Blanckaert, K., Cattoen, C., et al. (2005).** Investigation of nosocomial outbreak of extended-spectrum betalactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *Journal of Hospital Infection*. 60: 14-18.
- **Cardon, D.(2003).** Le monde des teintures naturelles. Belin Ed, 234-239p.
- **Carle, S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel*; 42: 7-21.

- **CASFM, (2023).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris: Société Française de Microbiologie. Disponible sur le lien: <http://www.sfm-microbiologie.org>.
  - **Cattoir, V. (2008).** Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Pathologie infectieuse en réanimation. MAPAR. P: 208.
  - **Chahine, N. (2014).** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique. Thèse de doctorat, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, 231p.
  - **Chahmout, S. (2011).** Pneumopathie nosocomiale à *Acinetobacter baumannii* en Réanimation à propos de 155 prélèvements distaux protégés à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat, Thèse du Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V, Faculté De Médecine et de Pharmacie. Rabat. 19p.
  - **Clavilier, L., Hervieu, F., Letodé, O.(2001).** Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques. Edition INRA. P35.
  - **Cohen, ML.(2000).** Changing patterns of infectious disease, Nature 17: 762-767.
  - **Conly, J., Pitout, J., Dalton, B., Sabuta, D.(2011).** La NDM-1 : summum de la résistance aux antimicrobiens. Centre de collaboration nationale des maladies infectieuses, 33(1).
  - **Crozet, A., Durfort, S.,et Sus-Rousset, H. (2012).** *Crocus sativus L.* (Iridaceae), le safran. Journal of Phytothérapie, 10 (2).
- D**
- **Denis, F., PloyMarie, C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2007).** «Bactériologie médicale, techniques usuelles», Elsevier Masson.

- **Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S.(2008).** AdeIJK, a resistance nodulation- cell division pump exffluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 52 (2):557-62.
- **Decré Dominique. (2012).** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Revue francophone des laboratoires*.441 : 43-52.
- **Delaveau, P. (2006).** Expliquez-moi les épices ; aromates ou médicaments ? *Pharmathèmes* Ed, P 140-153.
- **Dupont, G.(2007).** *Abrégé de botanique systématique moléculaire*. Edition 14. Paris. 285 p.

#### E

- **Eloff, JN. (1998).** Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60: 1-8p.
- **El-Rhaffari, L et Zaid, A. (2004).** *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet):Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes*, 293- 318p.

#### F

- **Favre, E. (2008).** *Le safran l'anti kilo l'anti déprime*. *Terre d'hommes* Ed, P 177.
- **Flandrois, JP. (1997).** *Bactériologie Médicale*. Presses Universitaires de Lyon. 309p.
- **Figueiredo, S. (2011).** *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases, *Médecine humaine et Pathologie*. Thèse de Doctorat. Université Paris Sud – Paris XI. 31, 36,48p.
- **Fomba, M. (2006).** *Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des Acinetobacter et des Staphylococcus à coagulase négative à l'hôpital du point g*. Thèse du Doctorat en Pharmacie, Université De Bamako. Mali. 21p.

- **Fournier, PE., et al.(2006).** Génomique comparative de la multi-résistance aux médicaments chez *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Génétique*. 2(1) :7.

### G

- **Gutheil, WG., Reed, G., Ray, A., Anant, S., et Dhar, A. (2012).** Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curry Pharma Biotechnology*. 13(1), P 173-9.
- **Gordon, NC., et Wareham, DW. (2010).** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents* 35,219-226.

### H

- **Héritier, C., Poirel, L., Fournier, PE., Claverie, JM., Raoult, D., Nordmann, P. (2005).** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 49(10):4174–4179.
- **Hill, T. (2004).** The Contemporary Encyclopedia of Herbs and spices : Seasonings for The Global Kitchen, Wiley, P 272, ISBN 0-471-21423-X.M
- **Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012).***Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243-250.
- **Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R. (2006).** Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(12), 4114-4123.

### J

- **Jadouali, S.M ., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat,K., Gharby, S., Achemchem,F., Elmoslih, A., Lagnifli, 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.

- **Jafari, S.A., et Pashazadeh, M. (2020)** Effet antibactérien du méthanolique extrait de pétale de safran (*Crocus sativus L.*) sur certains standards gram positif et gram négatif bactéries pathogènes in vitro. Perspectives actuelles sur les plantes médicinales et aromatiques (CUPMAP), 3(1), 1-7.

**K**

- **Khaldi, H. (2016).** Epidémiologie de l'infection à *Acinetobacter baumannii* au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat en Médecine. Université CADI AYYAD, Faculté de Médecine Et de Pharmacie. Marrakech.

**M**

- **Medic-Šaric, M., Jasprica, I., Mornar, A., Maleš, Z. (2008).** Application of TLC in the Isolation and Analysis of Flavonoids. Chromatography Science Series99: p 405-407.
- **Melnyk, J., Marccone, M., Wang, S. (2010).** Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International, 43 (8), P 1981-1989.
- **Moghadasi, M. S. (2010).** Journal of medicinal plants research, 4(6), P 427-430.

**N**

- **NCCLS,(2001).** Comité National des Normes du Laboratoire Clinique. Procédure de détermination des paramètres d'inhibitions de la croissance microbienne par les extraits en milieu liquide.
- **Nordmann, P., Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.M., Plésiat, P. (2009).** Naturally Occurring Class A  $\beta$ -Lactamases from the Burkholderia cepacia Complex. Antimicrob Agents Chemother. 53(3): 876–882.

**P**

- **Palomares C ,2015 .** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament .Doctoral dissertation, Université de Lorraine, 89-96p.

- **Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007).**Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51:3471–3484.
- **Philippon, A., Arlet, G.(2006).**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique*. 64 (1): 37-51.
- **Poirel, L., & Nordmann, P. (2006).** Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii*: évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*, 8(2), 100-107.
- **Poirel, L., Figueiredo, S., Papa, A., Koulourida, V., & Nordmann, P. (2009).**Over expression of the Naturally Occurring blaOXA-51 Gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by Novel Insertion Sequence ISAb9.*Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 4045-4047.

#### **R**

- **Rahimi, M.(2015).** Chemical and Medicinal Properties of Saffron. *Bull, Environ. Pharmacology, Life Sciences*, 4, 69-81p.81.
- **Rahmani, S.(2019).** Polycopié de cours Microbiologie générale. Université Hassiba Ben Bouali Chlef.
- **Rau, S. R. (1969).** The Cooking of India, Time Life Education, P 53.ISBN0-8094-0069-3.
- **Rodriguez-Villalobos, H., Struelens, M.-J., (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*. Edition Masson. 15 (3) : 205-213.
- **Ruppé, E. (2010).** Epidémiologie des béta lactamase-à spectre élargie : l'avènement des CTX-M. *Infections bactériennes-Antibiotiques*.12 (1) :5.

- **Russell, A. D. (2003).** Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750-763. Doi: 10. 1093/jac/dkg444

**S**

- **Small, E.(2016).** Saffron (*Crocus sativus*)-the eco-friendly spice .*Biodiversity*, 17(4), 162-170 p.
- **Saxena, R.(2010).** Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus sativus* series, *Journal of Pharmacognosy Review*, 31(3), 7 p.
- **Schmidt, M., Betti, G.,etHensel, A. (2007).** Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13), P 315-319.
- **Sinha, M., Srinivasa, H., & Macaden, R. (2007).** Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian journal of medical research*, 126(1), 63-67.
- **Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R.(2010).** *Crocus sativus* L: a comprehensive review. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 200p.
- **Sylvie-Carle,(2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*. 42: 6-21.

**T**

- **Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., & Polissiou, M. (1995).**Determination of saffron (*Crocus sativus* L.)Components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699(1-2), P 107-118.

**U**

- **Uwingabiye, J. (2018).** *Acinetobacter baumannii* : comparaison phénotypique et moléculaire des isolats colonisant et/ou infectant les patients et ceux contaminant l'environnement hospitalier. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Rabat. 16, 28, 50, 129p.

**W**

- **Winterhalter, P et Straubinger, M. (2000).** Saffron-renewed interest in an ancient spice, *Journal of Food Reviews International*, 16(1), 21 p.

**Y**

- **Yehouenou, C., Da, L., Somé, D., Somé, C., Zoungrana, J., Ouédraogo, A. S., ... & Poda, A. (2023).** État des lieux de la résistance aux antibiotiques en Afrique subsaharienne. *Médecine et Maladies Infectieuses Formation*, 2(1), 3-12.

**Z**

- Zaazaa, L., Naceiri Mrabti, H., Ed-Dra, A., Bendahbia, K., Hami, H., Soulaymani, A., & Ibriz, M. (2021). Determination of mineral composition and phenolic content and investigation of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of crocus sativus L. aqueous stigmas extracts. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2021(1), 7533938.

**Webographie :**

- **Abbara, A. (2017).**  
<https://www.alyabbara.com/museum/photographie/Iridaceae/Crocus/Safran-Crocus-sativus-02.html>. (consulté le 12/03/2024)

# *Annexes*

### 1. BHIB (Brain Heart Infusion Broth)

**Tableau 1** : Composition de Bouillon BHIB

Infusion de Cerveille de Veau déshydratée	12.5 g
Infusion de Cœur de Bœuf déshydraté	5 g
Peptone	10 g
Dextrose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2.5 g
Eau distillé	1000 mL
pH	7.4

### 2. Bouillon Mueller -Hinton

**Tableau2** : Composition de Bouillon Mueller -Hinton

Infusion de Viande de Bœuf	4 g
Peptone de Caséine	17.5 g
Amidon de Maïs	1.5 g
Eau distillé	1000 mL
pH	7.4

### 3. Gélose MacConkey

**Tableau 3** : Composition de Gélose MacConkey

Peptone	20 g
Lactose	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Sels biliaires	1.5 g
Agar	13.5 g
Rouge neutre	0.03 g
Violet de gentiane	0.03 g
Eau distillé	1 mL
pH	7.1

#### 4. Gélose Mueller –Hinton

**Tableau 4** : Composition de la gélose Mueller – Hinton

Infusion de Viande de Bœuf	4 g
Peptone de Caséine	17.5 g
Amidon de Maïs	1.5 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 mL
pH	7.4

**Tableau 5** : Concentrations des extraits utilisés dans la méthode de diffusion sur gélose.

Extraits et fractions	Concentrations	Solvant de solubilisation
Extrait aqueux	0,505 g	505 mL d'eau distillé stérile
Extrait d'acétate d'éthyle	0,60 g	1 mL de DMSO
Fraction méthanolique	0,1013 g	1013 mL de méthanol
Fraction aqueuse	0,0032 g	300 µL de DMSO

**Tableau 6** : Concentrations des extraits utilisés dans la méthode de CMI et CMB.

Extraits et fractions	Concentrations	Solvant de solubilisation
Extrait aqueux	0,034 g	1 mL d'eau distillé stérile
Extrait d'acétate d'éthyle	0,020 g	1 mL de DMSO
Fraction méthanolique	0,150 g	1 mL de méthanol
Fraction aqueuse	0,01160 g	1mL de DMSO

**Tableau 7** : Diamètres des zones d'inhibition des extraits et fractions de safran en mm.

Extraits / antibiotiques	Charge (mg/disque)								
		A12		A24		A30		P.aeruginosa	
<b>EA</b>	0.01 mg	7	7	6	6	6.5	7	6	6
	0.5 mg	6	6	6	6	7	7	6	6
	1 mg	6	6	6	6	6	6	8	8
<b>AE</b>	0.5 mg	6	6	6	6	7	7	6	6
	1 mg	6	6	6	6	6	6	7	7
<b>FM</b>	1 mg	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>FA</b>	1 mg	6	6	6	6	6	6	7	7
<b>AMP</b>	10 µg	6	6	6	6	6	7	6	6
<b>ANX</b>	30 µg	6	6	6	6	6	6,5	6	7
<b>DMSO</b>	5%	6	6	6	6	6	6	6	6