



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen

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

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Présenté par :

Tikhmarine Ikhlass & Djedid Fatiha

Thème :

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

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

Présidente	Mme. LOUKIDI Bouchra	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Mr. BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Co-encadrante	Mme. AYAD Amel	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023 – 2024



Remerciement

Je rends grâce à Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé , le courage et la force la patience d'accomplir ce modeste travail , c'est un devoir agréable d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance que je dois à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail .

Nous tenons à remercier notre encadrant **Mr Belyagoubi Larbi** qui à assurer la planification de ce travail et de son travaille dur avec nous et de l'encourager à obtenir un résultat.

Et A Madame la Professeure **Ayad Amel**, notre co-encadrante pour son soutien accompagnement durant la préparation de nos expériences et pour les souches microbiennes de la référence .

A Madame la Professeure **LOUKIDI - BOUCHENAK KHELLADI BOUCHRA** pour le matériel végétal du Safran et pour son aide précieuse en matériel et en produits et d'avoir accepté de juger ce travail. A madame **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila** merci d'avoir accepté de juger ce travail. Au doctorant Monsieur **CHOUARI Kamel**, pour la fourniture des extraits testés du Safran et leur aide.

Merci pour tous les enseignants de notre université **ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN** et département de Biologie pour toutes ces années d'études .Ainsi, A tous les collègues de notre promotion pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribué de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail :

A mon cher mari Abdelillah

Ta présence à mes côtés a tout moments, ton indéfectible soutien, ta patience infini, tes précieux conseils, ton amour, ta tendresse, tu m'a chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours et tu as toujours été là pour moi. Aucun mot ne saurait exprimer ma reconnaissance, que dieu te protège et te garde pour moi.

A mes très chers parents

Quoi que je fasse ou que je dise je ne saurai point vous remercier comme il se doit, vous m'avez doté d'une éducation digne, vous n'avez jamais dit non à mes exigences et vous n'avez épargné aucun effort pour me rendre heureuse, votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force, votre amour, votre affection, votre soutien, votre encouragement, vos conseils et vos prières à mon égard ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vous devez ma vie, ma réussite et tout mon respect.

A ma sœur et mes frères et leurs femmes

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A ma chère binôme

Pour sa entente et sa sympathie

A toutes ma famille et sans oublier ma deuxième famille

Et A tous mes amies

Ikhlassse

Dédicace

Du fond du cœur, je dédie ce travail à mes parents Tous les mots de gratitude et d'amour ne suffisent pas pour vous exprimer combien j'aime et combien je suis fier que vous soyez mes parents.

À mon père décédé trop tôt, merci pour tous vos efforts et votre soutien tout au long de mon parcours universitaire et dans ma vie personnelle en tant que père. Je tiens à vous dire que vous me manquez beaucoup et j'espère que vous soyez fier de moi et que la miséricorde de Dieu se renouvelle sur vous dans les jardins de la félicité.

A ma chère mère, merci de m'avoir accompagné et soutenu en tout. J'espère que je t'ai rendu heureuse de cette réussite et que Dieu me aide de trouver un travail afin de te récompenser, ne serait-ce qu'un peu de ta peine. Que Dieu prolonge ta vie, ma plus douce rose, et t'accorde de santé et bonheur, afin que tu restes la flamme qui illumine nos chemins.

A mes frères et sœurs pour leur soutien moral, spirituel, leur chaleur et leur amour.

À ma tante et à sa fille, merci d'être la meilleure famille que Dieu nous ait donnée.

A ma binôme et mes amis Merci pour tous les bons moments que nous avons passés et pour votre soutien.

Fatiha

Liste des abréviations

BMH : Bouillon Mueller Hinton

GMH : Gélose Mueller Hinton

GMC : Gélose Mac-conkey

AMP : Ampicilline

NA : Acide nalidixique

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EA : Extrait aqueux

AE : Acétate d'éthyle

FM : Fraction methanolique

FA : Fraction aqueuse

R_f : Rapport frontale

Liste des figures

Figure 01 : <i>Crocus sativus</i>	4
Figure 02 : Structures chimiques de Crocine , Crocétine , Picrocrocine et Safranal	5
Figure 03 : fraction aqueuse.....	27
Figure 04 : La culture des souches sur BHIB.....	27
Figure 05 : Ensemencement sur Mac- conkey	27
Figure 06 : Manipulation de conservation des souches.....	27
Figure 07 : Méthode de diffusion sur gélose	29
Figure 08 : Dessin explicite de la méthode des dilutions sur plaque.....	29
Figure 09 : Confirmation des CMB.....	30
Figure 10 : Bioautographie sur les biotes pétris	31
Figure 11 : Zone d'inhibition de l'acide nalidixique sur <i>E.coli TEM-1</i>	32
Figure 12 : Résultats de méthode de diffusion en milieu gélosé <i>E.coli</i> (A:Extraits ;B :contrôle).....	34
Figure 13 : Resultat de CMI de la fraction aqueuse (1 : <i>k. pneumonie</i> , 2 : <i>E.coli</i> , 3 : <i>E.cloacae</i>) (fraction aqueuse)	36
Figure 14 : Résultats de CMB (3 : <i>E.cloacae</i> ; 7 : <i>E. coliTEM-1</i> (fraction aqueuse).....	36
Figure 15 : Révélation de la CCM par UV après migration	38
Figure 16 : Résultats de Bioautographie	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification et taxonomie du safran	4
Tableau 02 : Les principaux composants du safran	5
Tableau 03 : La taxonomie des entérobactéries	13
Tableau 04 : Principaux genres et espèces	14
Tableau 05 : Les tests biochimiques spécifiques des entérobactéries	16
Tableau 06 : Souches testées	25
Tableau 07 : Zones d'inhibitions moyennes de contrôle positif et négatif	32
Tableau 08 : Zones d'inhibitions des trois charges	33
Tableau 09 : Zones d'inhibitions des deux charges	34
Tableau 10 : Zones d'inhibitions des deux fractions avec une charge de 1 mg	35
Tableau 11 : Les résultats de CMI et CMB	37
Tableau 12 : Les résultats obtenus après la migration des extraits	37
Tableau 13 : Zones d'inhibitions après l'incubation	39
Tableau 14 : Diamètre des zones d'inhibitions de contrôle positif et négatif.....	51
Tableau 15 : Diamètre des zones d'inhibitions d'extrait aqueux	51
Tableau 16 : Diamètre des zones d'inhibitions d'extrait d'acétate d'éthyle.....	51
Tableau 17 : Diamètre des zones d'inhibition de la fraction aqueuse et méthanolique.....	51

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	3
Table des matières	4
المخلص	5
Résumé	6
Abstract	7
Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	
Chapitre 1 : Généralité sur le safran	
1.1 Historique	3
1.2 Définition.....	3
1.3 Classification	4
1.4 Composition chimique du safran.....	4
1.4.1 Composants généraux.....	4
1.4.2 Les composants biologiquement actifs.....	5
1.5 Usage du safran	5
1.5.1 Effets biologiques	5
1.5.1.1 Activité antioxydante	5
1.5.1.2 Activité antimicrobienne	6
1.5.1.3 Anti-Alzheimer.....	7
1.5.1.4 Anti-Dépression.....	7
1.5.1.5 Sclérose en plaques	8
1.5.1.6 Anti-diabétique	8
1.5.1.7 Anticancéreuse	9
1.5.1.8 Anti-inflammatoire	9
1.5.1.9 Maladies génitales urinaires	9
1.5.1.9.1 Troubles sexuels	9
1.5.1.9.2 Troubles menstruels	9
1.5.1.9.3 Absence/faiblesse de la fertilité.....	10
1.5.2 Effets cosmétologiques.....	10
1.5.2.1 Utilisation du safran pour la production de crème hydratante	10
1.5.2.2 Utilisation du safran pour la production des huiles essentielle et la protection contre UV	10
1.5.3 Utilisation du safran dans le domaine médical.....	10
1.5.4 Application du safran dans le domaine alimentaire	10
1.5.5 Toxicité.....	11
Chapitre 2 : Entérobactéries	
2.1 Définition.....	13
2.2 Classification	13
2.3 Habitat	14
2.4 Caractères bactériologiques	14
2.4.1 Caractère morphologiques	14
2.4.2 Caractère culturaux	15
2.4.3 Caractère biochimiques	15
2.4.4 Caractère antigéniques	15

2.5 Pouvoir pathogène	16
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	16
2.5.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.5.3 <i>Enterobacter cloacae</i>	17
2.5.4 <i>Proteus mirabilis</i>	17
2.5.5 <i>Morganella morgani</i>	18
2.5.6 <i>Providencia stuartii</i>	18
2.5.7 <i>Serratia marcescens</i>	18
2.5.8 <i>Salmonella</i>	18
2.5.9 <i>Citrobacter</i>	18
2.6 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	19
2.6.1 Définition de la résistance bactérienne	19
2.6.2 Mécanisme de résistance des entérobactéries	19
2.6.2.1 Résistance aux β -lactamines.....	19
2.6.2.2 Résistance aux aminosides	20
2.6.2.3 Résistances aux fluoroquinolones	21
Matériel et méthodes	
1. Matériel	25
1.1 Matériel végétale	25
1.2 Les souches testées	25
1.3 Milieux de culture	25
1.4 Les antibiotiques utilisés	25
2. Méthodes expérimentales	26
2.1 Préparation des extraits	26
2.2 Contrôle de la pureté des souches	27
2.3 Conservation des souches	27
2.4 Préparation de l'inoculum	28
2.5 Ensemencement.....	28
3. Méthodes d'analyse.....	28
3.1 Méthode de diffusion sur gélose	28
3.2 Détermination des concentrations d'inhibitrices (CMI et CMB).....	29
3.3 Bioautographie	30
Résultats et discussion	
1. Résultats des antibiotiques (contrôles positif et négatif).....	32
2. Résultats de méthode de diffusion sur gélose	33
2.1 Extrait aqueux.....	33
2.2 Extrait d'acétate d'éthyle.....	33
2.3 Fraction méthanolique et fraction aqueuse.....	33
3. Résultats de la CMI et CMB	35
4. Résultats de la Bioautographie	37
Conclusion	42
Références bibliographiques	43
Annexe	51

المخلص

يؤدي العلاج طويل الأمد بالمضادات الحيوية إلى اكتساب البكتيريا المقاومة، مما يشكل خطرًا كبيرًا على صحة الإنسان. ولذلك أصبح استخدام النباتات الطبية أفضل بكثير. ومن بينها الزعفران وهو نبات غني جدًا بالمكونات التي لها تأثير مفيد على صحة الإنسان.

النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات وأجزاء مختلفة من أوراق نبات الزعفران (مستخلص مائي، مستخلص خلاص الايثيل، الجزء المائي والجزء الميثانولي) ضد البكتيريا المعوية (كلبسيلا، القلونييات، الاشريكية القولونية وسلالة مرجعية الاشريكية القولونية) بطريقة الانتشار على الاجار، وطريقة تحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة والقاتلة الجراثيم والتصوير الحيوي.

وفقا للنتائج التي تم الحصول عليها، أعطى المستخلص المائي وخلاص الايثيل نشاطا مضادا ضعيفا ضد بكتيريا الاشريكية القولونية ذات القطر 7ملم و8ملم، كما أدى الجزء المائي إلى تثبيط نمو جميع السلالات المختبرة بتركيز فعال 0.3625 ملجم/مل وبنسبة أمامية (0,34 و0,45) عند 365 نانومتر ضد الاشريكية القولونية.

يمكن استخدام أوراق الزعفران كمصدر للمواد الطبيعية ذات الأنشطة المضادة للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: الزعفران، الأوراق، المستخلصات والاجزاء، البكتيريا المعوية، نشاط مضادات الميكروبات

Résumé

Un traitement à long terme aux antibiotiques conduit à l'acquisition de résistances par les bactéries, ce qui présente un risque majeur pour la santé humaine. Par conséquent, l'utilisation des plantes médicinales est devenue bien meilleure. Parmi eux se trouve le safran (*Crocus sativus*), qui est une plante très riche en composants ayant un effet bénéfique sur la santé humaine.

Cette étude se concentre sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits et des fractions des feuilles du *C. sativus* (extrait aqueux, extrait acétate d'éthyle, fraction aqueuse et fraction méthanolique) contre les entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et une souche de référence : *Escherichia coli TEM-1*) par la méthode de diffusion sur gélose, la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) et la Bioautographie.

Selon les résultats obtenus, les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux donnent une faible activité antimicrobienne contre *E. coli* (E4) avec un diamètre de 7mm et 8 mm, respectivement. De plus la fraction aqueuse inhibe la croissance de toutes les souches testées avec une concentration inhibitrice de 0,3625mg/mL et un rapport frontale ($R_f=0,34$ et $0,45$) à 365nm contre *E. coli* (E4).

Les feuilles de *Crocus sativus* peuvent être utilisées comme une source de substance naturelle à activités antimicrobiennes.

Mots clés : *Crocus sativus*, Feuilles, Extraits et Fractions, Entérobactéries, Activité antimicrobienne.

Abstract

Long-term treatment with antibiotics leads to the acquisition of resistance by bacteria, which poses a major risk to human health. Therefore, the use of medicinal plants has become much better. Among them is saffron (*Crocus sativus*), which is a plant very rich in components that have a beneficial effect on human health.

This study focuses on the evaluation of the antimicrobial activity of different extracts and fractions of *C. sativus* leaves (aqueous extract, ethyl acetate extract, aqueous fraction and methanolic fraction) against enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and a reference strain: *Escherichia coli* TEM-1) by the agar diffusion method, the method for determining minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) and Bioautography.

According to the results obtained, ethyl acetate and aqueous extracts give low antimicrobial activity against *E. coli* (E4) with a diameter of 7mm and 8mm, respectively. In addition, the aqueous fraction inhibits the growth of all strains tested with an inhibitory concentration of 0.3625 mg/mL and a frontal ratio (Rf=0.34 and 0.45) at 365nm against *E. coli* (E4).

Crocus sativus leaves can be used as a source of natural substance with antimicrobial activities.

Keywords: *Crocus sativus*, Leaves, Extracts and Fractions, Enterobacteria, Antimicrobial activity.

Introduction

Les infections nosocomiales sont un problème de santé publique majeur pour les établissements de soins et parmi les bactéries incriminées dans ces infections plusieurs présentant des résistances à des antibiotiques sont inclus les entérobactéries résistant aux β -lactamines par la production de β -lactammases à spectre élargie, qui est souvent associés à la résistance à certaines familles d'antibiotiques comme les aminosides et les fluoroquinolones. Alors que l'émergence de la résistance aux antibiotiques est devenue un grand problème (Labadene et al., 2010), c'est pour sa les scientifiques développent de nouveaux médicaments à partir de sources naturelles telles que les plantes médicinales, qui sont souvent utilisées comme traitements alternatifs contre les maladies depuis un longtemps (Muzaffar et al., 2016).

Dans ce contexte, le *Crocus sativus* est une plante vivace bulbeuse et fleurie sans tige de la famille des iridacées, elle est connue sous le nom de safran (Nasab, 2019).

Le safran est couramment utilisé pour la fabrication de l'épice la plus chère au monde et a été nommé (Or rouge) (Christodoulou et al., 2014), utilisée pour aromatiser, colorer et conserver les aliments. L'épice de safran est utilisée depuis plusieurs décennies en médecine traditionnelle et grâce à des études thérapeutiques nouveaux ont été démontré que le safran avec ses composés bioactives notamment le safranal (responsable de l'arôme), le crocine (responsable de la coloration) et la picrocrocine (responsable de la saveur amer) ont montrent plusieurs propriétés médicinales (antidépessives, anti diabétique, anti-cancéreux...etc) et biologiques (antioxydante, antimicrobienne) (Zara et al., 2021). De plus, l'utilisation des doses fortes du safran peut provoquer des effets secondaires tel que une diminution de l'appétit, des vomissements, une hématurie... etc (Palomares, 2015).

Donc la question qui se pose : est-ce que les extraits de feuilles de safran ont une activité antimicrobienne contre les entérobactéries ? Pour répondre à cette question de recherche l'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobien de différents extraits de feuilles du safran sur les entérobactéries notamment *Klebsiella pneumoniae* (Kp₁₄), *Escherichia coli* TEM-1, *Escherichia coli* (E₄) et *Enterobacter cloacea* (EC₁₁) isolées de service de réanimation au CHU de Tlemcen.

Ce manuscrit s'articule autour de cinq parties : la première partie porte principalement l'historique et la définition de safran, classification et la composition chimique de safran ainsi que son usage dans différents domaines. La deuxième partie présente la description des entérobactéries et les mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques. La

Introduction

troisième partie contient le matériel et les méthodes expérimentales utilisées, une quatrième partie consacre sur l'ensemble des résultats obtenus et la discussion qui en déroule, la cinquième partie concernant la conclusion et perspectives de recherche à venir et aux recommandations.



Chapitre 1 : Généralités sur le Safran

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

1.1 Historique

Certains scientifiques accordent le nom « safran » au mot arabe « zafaran » pour la jaunâtre, leur origine provient du moyen orient, mais elle est plus répandus à l'Asie ou les îles grecques du sud-ouest **(Dai et al., 2021)**.

Une plante diploïde du *Crocus Cartwright anus*, donne une forme mutante (*Crocus sativus* : c'est une plante triploïde) grâce à la solidité de croisement **(Zbiri et al., 2021)**.

Les premières utilisations du safran comme colorante textile ont été trouvées en Castille Manche, en Espagne, Grèce, Inde. Par contre en Iran le safran était machine pour la production des tapis et des suaires pour les rois. Alors que le safran avait été utilisé comme un médicament pour le traitement des maladies gastro intestinales et la néphropathie depuis l'époque gréco romaine. Et à plus tard, les perses prennent une douche au safran pour remédier la fatigue **(Dai et al., 2021)**.

La médecine moderne a redécouvert le safran grâce à leurs effets thérapeutiques et usages pharmaceutiques. Le safran semble entraîner une prévention des mutations anti-cancérogènes, propriétés immun-modulatrices et antioxydants, D'autres études ont également prouvé les effets bénéfiques du safran en cas de dépression, de syndrome prémenstruel et de maladie d'Alzheimer **(Christodoulou et al., 2015)**.

1.2 Définition

Le safran (*Crocus sativus*) renommé sous le nom de roi des épices dans le monde, elle est onéreuse et utilisée depuis plusieurs années **(Belyagoubi et al., 2021)**.

Le *Crocus sativus* est une magnifique plante vivace et bulbeuse son extrait compose la célèbre épice jaune. La fleur de *C. sativus* est composée de 6 tépales violets, de 3 étamines jaunes et d'un style filiforme blanc se terminant par un stigmate divisé de 3 filaments **(figure01) (Belyagoubi -Benhammou et al., 2023)**. Elle est hermaphrodite (ont des gamètes mâles et femelles) et est pollinisée par les abeilles et les papillons **(Djenouhat et Rais, 2020)**.

Il contient des Feuilles au limbe étroit et linéaire, terminées en pointe, de 20 à 50 cm de long, vertes, brillantes, caduques, apparaissant avec ou après la fleur sur les bulbes florifères, ou seules sur les bulbilles. En croissance d'octobre à mai **(Dai et al., 2021)**.

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

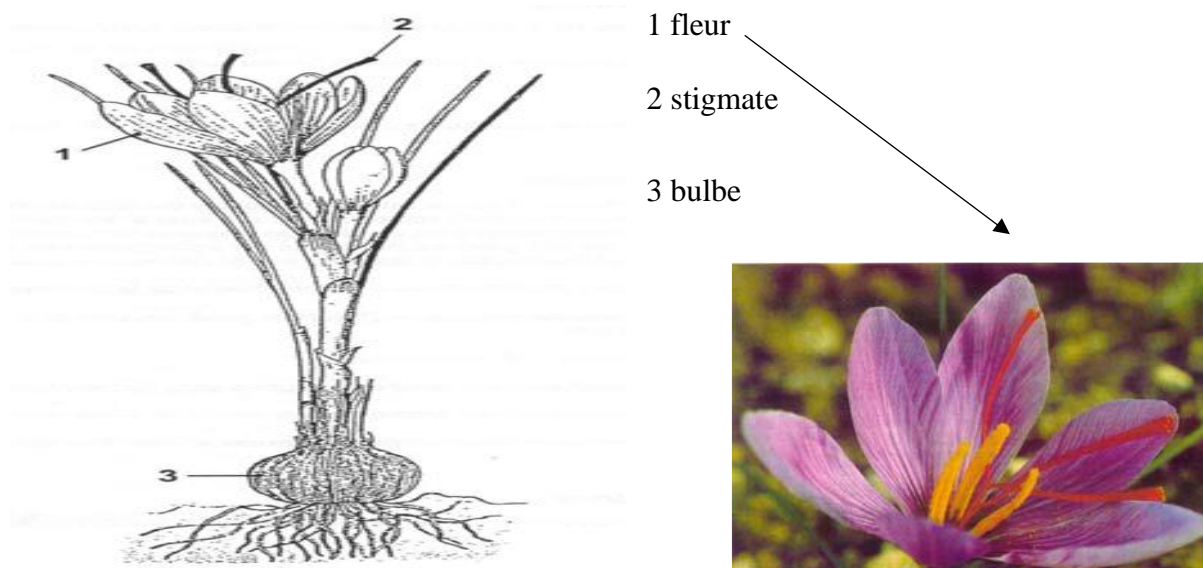


Figure 01. *Crocus sativus* (Bergoin, 2005)

1.3 Classification

D'après la classification botanique de **Cronquist** de 1981, qui repose sur des critères anatomiques, morphologiques et chimiques pour distinguer les angiospermes, *Crocus sativus*. L appartient à la famille des *Iridaceae* (Tableau 01) (Djenouhat et Rais, 2020)

Tableau 01 : Classification et taxonomie du safran (Zbiri et al., 2021).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyte</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Monocotylédones</i>
Ordre	<i>Liliales</i>
Famille	<i>Iridaceae</i>
Sous famille	<i>Crocoideae</i>
Genre	<i>Crocus</i>
Espèce	<i>Crocus sativus L</i>

1.4 Composition phytochimique du safran

1.4.1 Composants généraux

Le safran a une composition phytochimique très complexe, cette épice se caractérise par des métabolites primaires omniprésents dans la nature, comme les glucides, les minéraux, les graisses, les vitamines, les acides aminés et les protéines.

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

Ainsi que des métabolites secondaires tels que les terpènes, les flavonoïdes, les anthocyanes et les caroténoïdes. Elles sont également importantes pour le développement de l'organisme (Maggi et al., 2020).

1.4.2 Les composants biologiquement actifs

Différentes analyses ont été réalisées afin de déterminer de nombreux composés biologiquement actifs présents dans le safran. Les quatre composés biologiquement actifs (figure 02) principaux sont mentionnés dans le tableau suivante : (Palomares, 2015).

Tableau 02 : les principaux composants du safran (Bhargava, 2011).

Composant	Rôle
Crocine et crocétine	Responsable de la coloration du safran, aussi aux activités pharmacologiques
Picrocrocine	Responsable de la saveur amère
Safranale	Responsable de l'arôme du safran

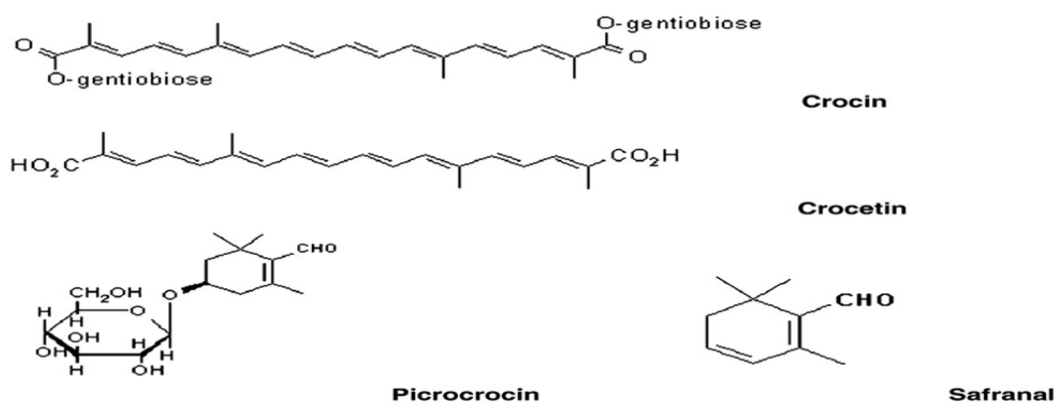


Figure 2 : Structures chimiques de la crocine, de la crocétine, de la picrocrocine et Safranale (Samarghandian et Borji, 2014)

Alors que, les principaux composés bioactifs présents dans les feuilles sont les polyphénols, les flavonoïdes et les acides carboxyliques, ainsi que les acides aminés, (ILE, LEU, LYS, MET, PHE, THR, TRP, VAL) (Mykhailenko et al., 2021).

1.5 Usages du safran

1.5.1 Effets biologiques

1.5.1.1 Activité antioxydante

La majorité des plantes médicinales comportent des composés antioxydants qui sont capables de ralentir ou d'inhiber l'initiation ou la diffusion d'une réaction oxydative en chaîne

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

et aussi de prévenir ou de réparer les endommagements oxydatifs causés aux cellules de l'organisme par l'oxygène (**Hosseini et al., 2018**).

Les stigmates de *C. sativus* possèdent une propriété antioxydante qui peut être attribuée à sa teneur phénolique ainsi qu'à ses composants actifs tels que le safranal, la crocine et la crocétine (**Bensaid et Belarbi, 2022**). Cependant, la crocine est considéré comme le composant le plus intense contre l'oxydation (**Christodoulou et al., 2014**).

L'augmentation du niveau d'antioxydants est maintenue par les propriétés antioxydants des dérivés de la plante notamment les extraits de *Crocus sativus* ont diminuent considérablement la peroxydation lipidique et augmentent l'activité de la superoxyde dismutase (**Rahmani et al., 2017**).

Une étude a montré que les extraits bruts de feuilles et de pétales n'était pas égal. Le pouvoir réducteur des pétales présentait une légère diminution de Fe^{3+} , et les extraits de feuilles ont donné une capacité antioxydant plus élevée qu'a été présentée une plus grande activité de piégeage des radicaux libre selon le test DPPH (**Jadouali et al., 2018**).

Alors qu'une autre étude a montré que le test DPPH présente son activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait de fleurs était inférieure à l'acide ascorbique, utilisé comme contrôle positif, alors qu'aucune activité n'a été obtenue par les stigmates. Au contraire, le pouvoir réducteur des stigmates apparaît supérieur à celle montrée par les fleurs. Les propriétés antioxydantes des fleurs sont directement liées avec la présence d'ingrédients biologiquement actifs tels que les anthocyanes, tanins hydrolysables et tanins condensés (**Belyagoubi et al., 2021**).

(**Lachgur et al., 2022**), ont démontré que les polyphénols, les flavonoïdes et les caroténoïdes contenus dans les extraits contribuent aux activités antioxydants, De plus l'acétate d'éthyle possède une plus grande capacité de piégeage du DPPH et de FRAP et aussi une inhibition du blanchement du β -carotène, ces activités antioxydants varient en fonction des conditions de préparation des extraits, et le type d'extraction.

1.5.1.2 Activité antimicrobienne

Un traitement à long terme aux antibiotiques conduit à l'acquisition d'une résistance aux microorganismes ce qui constitue une menace majeure pour la santé humaine. Par conséquent, le recours à l'utilisation de plantes médicinales est devenu bien meilleur car elles ne présentent aucun effet secondaire, y compris les extraits de *Crocus sativus* comme les extraits aqueux, éthanoliques et méthanoliques qui ont une propriété notable contre les bactéries et les champignons (**Rahmani et al., 2017**).

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

Parray et al. (2015), ont étudié les effets inhibiteurs des extraits méthanoliques de tissus et de stigmates de *Crocus sativus*, démontrant ainsi leur efficacité dans l'inhibition de toutes les souches bactériennes pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Shigella flexneri*.

D'après **Cenci-Goga et al. (2018)**, il est possible que les extraits aqueux de stigmates de safran (Iran) présentent une activité antimicrobienne modérée et peuvent être utilisés comme agent antimicrobien dans différents produits alimentaires.

Lachgur et al. (2022), ont démontré que l'extrait d'acétate d'éthyle était plus riche en composés de phénols et de flavonoïdes. De plus, cette extrait est la seul qui présent une activité antimicrobien contre *Staphylococcus aureus*, responsable de maladies humaines virulentes, et une activité antifongique contre *Botrytis cinerea*, responsable d'énormes pertes de récoltes de moisissure gris.

Selon **Belyagoubi L. et al. (2021)**, l'extrait hydroalcoolique de stigmates et de fleurs à deux concentrations a été évalué contre sept espèces bactériennes et deux souches de *Candida*, par méthode de diffusion sur puits de gélose 1 mg/disque, 3 mg/disque et a montré une réelle activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives (*M.luteus*, *B.cereus*, *B. subtilis*). les valeurs de CMI étaient de 781,25 et 6250 µg/mL pour les fleurs et de 1406,25 et 22500 µg/mL pour les stigmates contre *B. subtilis* et *M. luteus*, respectivement.

En revanche, le CMB de l'extrait de fleur était $\geq 100\ 000$ µg/mL contre *M. luteus* et $\geq 200\ 000$ µg/mL contre *B. cereus* et *B. subtilis*. D'après leurs résultats, *M. luteus* et *B. subtilis* il était résistant à l'extraction du stigmate et la meilleure valeur de CMB était de 45 000 µg/mL.

1.5.1.3 Anti -Alzheimer

La maladie d'Alzheimer c'est l'une des maladies neurodégénératives qui entrainer la destruction des neurones ce qui conduit à la ruine progressive de la mémoire (**El khoudri et al., 2021**).

Le principe composant caroténoïde, la transe-4, le digentibiosyl ester de crocétine, inhibe la fibrillogénèse Ab-beta formée par oxydation des fibrilles bêta- peptides amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Les stigmates de *C.sativus* bloquent la fibrillogénèse A-beta dans une concentration et une période de vie constante à des concentrations inférieures à celles d'une autre diméthylcrocétine constitutive (**Bhargava, 2011**).

1.5.1.4 Anti-dépression

La dépression est une perturbation psychologique qui affecté l'intelligence, le comportement et l'humeur. Les humaines souffrant de dépression perdant l'espoir et

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

d'énergie pour mener à bien leurs activités, c'est pour sa le traitement de la dépression est importante, car elle peut conduire au suicide (**Hosseini et al., 2018**).

Il existe plusieurs méthodes de traitement notamment l'utilisation des médicaments comme la protéine de molécule d'adhésion des cellules neurales (NACM), ou bien le traitement de la dépression par la stimulation magnétique Trans crânienne répétitive mais l'utilisation de ces méthodes pendant une long terme peuvent provoquer des effets secondaires sur le patient tel que sécheresse de la bouche et la constipation. C'est pour cela l'utilisation des médicaments à base de plante restant donc le meilleur traitement de cette maladie car il est plus tolérable et mieux accepté par les malades (**Razak et al., 2017**).

Parmi ces végétaux médicinaux il y'a la plante de safran surtout par ses composants (crocine et safranal) qui augmentent la dopamine et sérotonine, ce qui retracer leur effet préventif sur la dépression (**El khoudri et al., 2021**).

1.5.1.5 Sclérose en plaques

Il s'agit d'une maladie neurodégénérative du système nerveux central. Elle se caractérise par la disparition myéline, c'est une maladie auto-immune, le safran aide à prévenir la sclérose en plaque grâce à son ingrédient actif la crocine. Cela aide à empêcher les cellules cérébrales qui produisent de la myéline. La crocine et la crocétine jouent un rôle important dans l'efficacité de la conduction électrique dans la neurostimulation des systèmes nerveux central et périphérique. Alors que la crocétine, augmente énormément la résistance des LDL à l'oxydation induite par les ions cuivre, probablement en raison de la capacité antioxydante accrue du plasma, inhibant ainsi l'oxydation des LDL. Cela peut également réduire l'artériosclérose (**El khoudri et al., 2021**).

1.5.1.6 Anti -diabétique

Le diabète est un trouble métabolique détermine par un déficit relatif de sécrétion du l'insuline ou de résistance à l'insuline ce qui créer une hyperglycémie chronique et une détérioration du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (**Farkhondeh et Samarghandian, 2014**).

En augmentant la sensibilité à l'insuline et en améliorant la fonction des cellules B (îlot de Langerhans), le safran a la capacité de diminuer le taux de sucre dans le sang (**Yaribeygi et al., 2019**).

Dans un modèle expérimental de diabète, les éléments du safran influencent la régulation et l'expression des gènes antioxydants mitochondriaux, ce qui entraîne la production de radicaux oxygène mitochondriaux. Ces radicaux peuvent être marginalement responsables de

Chapitre 1 : Généralité sur le safran

l'amélioration de la réponse hyperglycémique et du stress oxydatif (**Farkhondeh et Samarkandi, 2014**).

1.5.1.7 Anticancéreuse

Les plantes médicinales jouent un rôle thérapeutique dans la gestion de nombreuses maladies, dont les tumeurs. Le safran et ses composants actifs jouent un rôle efficace dans la lutte contre les tumeurs (**Rahmani et al., 2017**). Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, isoflavones, di-terpènes et coumarines sont conquérant dans la prévention du cancer grâce à leur fonction dans l'inhibition de la production de tumeurs.

La crocine et la crocétine ont très soluble dans l'eau ce qui le rend utilisable chimiquement, ce sont des formes déglycosylées qui inhibent le cancer sensible aux tout acide Trans rétinolique et réduisent la toxicité des agents cancérigènes (**Fernández, 2006**).

1.5.1.8 Anti inflammatoire et anti nociceptive

L'inflammation produit par la libération de la réactives de l'oxygène (ROS) de même que des molécules pro-inflammatoires tel que la cytokine et les enzymes lytiques sécrété par les macrophages, cellules inflammatoires et neutrophiles (**Poma et al ., 2012**).

Les dérivées du safran (le crocine et le corcétine) assurent la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires.

L'extrait hydroéthanolique de safran réduire le nombre des globules blancs et les neutrophiles. Alors que les extraits aqueux et éthanoïques de stigmatate et de pétale de safran ont une propriété anti nociceptive (**Boskabady et al ., 2020**).

1.5.1.9 Maladies génitales urinaires

1.5.1.9.1 Trouble sexuels

C'est un dysfonctionnement sexuel chez les hommes et les femmes produit par des difficultés de désir, des difficultés d'orgasme et des douleurs sexuelles. Le safran possède des propriétés anti-nociceptifs, qui pourrait à l'arrêt périphérique de la détection de la douleur (**Kashani et al., 2022**).

1.5.1.9.2 Trouble menstruels

C'est un problème manifeste par différents symptômes tels que des règles anormales, des douleurs menstruelles et des problèmes psychologiques, Ces symptômes provoquent une anémie. Les stigmates du safran contient la thiamine qui améliorer la circulation sanguine et réduire les crampes musculaires squelettiques, elle contient aussi la pyridoxine qui diminue les concentrations de noradrénaline et de sérotonine (**Safitri et Rahayu, 2022**).

1.5.1.9.3 Absence/ faiblesse de la fertilité

La fertilité masculine dépend le nombre, la qualité et la morphologie des spermatozoïdes, et une carence de l'un de ces facteurs conduit à l'infertilité (**Roozbeh et al, 2021**). Le crocine et la crocetine ont amélioré la fertilité par augmentation des hormones sexuelles (LH, FSH, Testostérone) (**Mykhailenko et al., 2019**).

1.5.2 Effets cosmétologiques

Des nouvelles utilisations du safran ont été découvertes dans le domaine cosmétique grâce à leurs compositions en crocine et en kaempférol, représentant ainsi un centre important des composés bioactifs, en plus des propriétés antioxydants qui possèdent plusieurs intérêts pour des applications cosmétiques (**Mzabri et al., 2019**).

1.5.2.1 Utilisation du safran pour la production de crème hydratante

La sécheresse cutanée de la peau est due aux changements chimique et morphologique (**Damayanti et Riyanto., 2023**). Par conséquent, la peau doit être hydratée avec des crèmes hydratantes contient du safran, car il contient des kaempférol qui augmentent la teneur en humidité de la peau et réduisent la perte d'eau Trans épidermique (**Akhtar et al., 2014**).

1.5.2.2 Utilisation du safran pour la production des huiles essentielle et la protection contre UV

Les huiles essentielles du safran sont obtenus grâce à l'hydrodistillation des stigmates (**Zbiri et al., 2021**). Le safranal c'est un composé volatile du safran possède des propriétés protectrices contre les UV, il protéger les couches épidermiques et dermiques de la peau grâce à leur activité anti-collagénase et anti-hyaluronidase, ainsi que la détermination du facteur de protection solaire (Spf) (**Madan, 2018**).

1.5.3 Utilisation du safran dans le domaine médicale

Le safran a une longue période d'application dans le médecin chinoise, en raison de sa vertu de stimuler la circulation sanguine, refroidir le sang, et éliminer les toxines thermiques (**Asgari et al., 2022**).

Alors que, le safran est l'un des médicaments les plus importants utilisé en médecine persane grâce à leurs propriétés stimulantes, toniques et amères.

Il porte une action biologique (convoyage) ce qui signifie que le safran peut améliorer la biodisponibilité et l'absorption d'autres médicaments (**Yousefi et Shafaghi, 2020**).

1.5.4 Application du safran dans le domaine alimentaire

Le safran est un ingrédient sacré en tant qu'épice incorporé dans des varié plats. Il est ainsi utilisé comme épice pour aromatiser les plats strictement en tant que colorant dans sa composition, est riche en pigments caroténoïdes (**Palomares, 2015**).

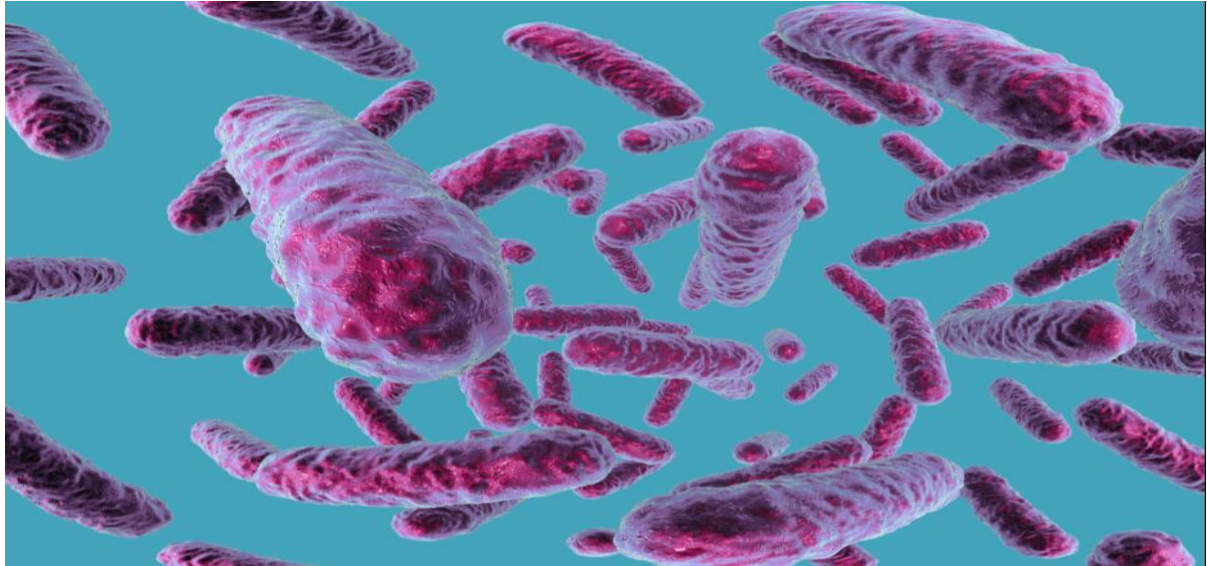
Chapitre 1 : Généralité sur le safran

Selon **Gaglio et al. (2018)**, la teneur en matière grasse est plus faible dans le yaourt au safran, de plus le safran augmente le nombre des bactéries lactiques, la teneur en polyphénols et l'activité antioxydant, ce qui donne un produit fermenté innovante utile pour compléter l'apport alimentaire en antioxydants.

1.5.5 Toxicité

Le safran est utilisé comme épice depuis des milliers d'années pour sa valeur nutritionnelle importante et ses propriétés curatives. Il est nécessaire d'étudier les effets toxicologiques du safran et de ses composants pour déterminer son dosage et sa sécurité. « Un dosage correct du safran est essentiel pour garantir son efficacité et sa sécurité » (**Wani et al., 2022**).

Ainsi que des doses supérieures à 10 grammes du safran peut provoquer une fausse couche et des effets secondaires, notamment une diminution de l'appétit, une somnolence, des nausées et des vomissements, des saignements utérins, une hématurie....etc. On considère qu'une prise allant jusqu'à 1,5 g/jour ne présente pas de danger (**Palomares, 2015**).



Chapitre 2 :

Entérobactéries

Chapitre 2 : Entérobactéries

2.1 Définition

La famille des entérobactéries comprend plusieurs genres bactériens, qui répondent à la définition suivante : ce sont des bacilles à Gram négatif ; aéro-anaérobie facultatifs, mobile grâce à une ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés, dépourvues d'oxydase, possédant la catalase à l'exception de *Shigella dysenterie*, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz et réduisant les nitrates en nitrites (Bennani, 2014).

Ces microorganismes sont responsables de la pathologie infectieuse humaine et colonisent principalement le tube digestif (Zitouni, 2022), pouvant aussi se développer dans l'environnement (sols et eaux) et conduire à la dégradation des matières organiques (Bennani, 2014).

2.2 Classification

Plus de 1700 espèces et plus de 40 genres différents sont décrits au sein de cette famille et la systématique des entérobactéries (Tableau 03) est basée sur l'étude de leur caractère génotypique (Ribotypage, Hybridation ADN /ADN) (Moussa et Moussaoui, 2016).

Tableau 03 : La taxonomie des entérobactéries (Messai, 2018).

Domaine	<i>Bacteria (Eubacteria)</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Gammaproteobacteria</i>
Classe	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

En bactériologie clinique , les espèces les plus couramment isolées appartiennent à 12 genres : *Citrobacter* , *Enterobacter* , *Escherichia* , *Klebsiella* , *Erwinia* , *Edwardsiella* , *Proteus* , *Providencia* , *Salmonella* , *Serratia* , *Shigella* et *Yersinia* (Tableau 04) (Bennani, 2014).

Chapitre 2 : Entérobactéries

Tableau 04 : Principaux genres et espèces (Moussa et Moussaoui, 2016)

Genres	Espèce	Genres	Espèce	Nouveau genres
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>	<i>Kluyvera</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enteridis</i>	<i>Erwinia</i>		<i>Cedecea</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>E.tarda</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Providencia</i>	<i>P.stuartii</i> <i>P.rettgeri</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia Pseudo tuberculosis</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C.freundii</i> <i>C.amalonaticus</i> <i>C.diversus</i>	

2.3 Habitat

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires de l'eau douce, le sol, les végétaux, et les animaux et peuvent causer des contaminations d'origine alimentaire se sont des hôtes normaux ou pathogène du tube digestif de l'homme et des animaux tel que *E.coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Providencia* et *enterobacter* (Salah, 2018).

2.4 Caractères bactériologiques

2.4.1 Caractères morphologiques

Les entérobactéries ont une morphologie typique : bacille à Gram négatif avec une longueur de 2-3 sur 0,6 de large, ainsi que plusieurs espèces enterobactériennes sont mobile grâce à la ciliature péritriche et certaines sont immobiles *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis* (Aniambossou, 2016).

De plus, les espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs (Zrardi, 2020).

Chapitre 2 : Entérobactéries

2.4.2 Caractères cultureux

Les entérobactéries se développent facilement sur des milieux ordinaires pendant 24 h à 37 °C en aérobie et en anaérobie après l'incubation sur les milieux gélosés, on observe des colonies lisse brillantes, de structure homogène type S : Smooth, et après une culture successive de cet aspect on obtient des colonies à surfaces sèche rugueuse type R : Rough (Mendaci et Mihoubi, 2015). La culture des entérobactéries dans un bouillon donnent un trouble homogène avec des ondes moirées (Aniambossou, 2016).

2.4.3 Caractères biochimiques

Les entérobactéries sont caractérisées par l'utilisation du citrate de simmon comme seule source de carbone, la production d'uréase, la capacité à fermenter le glucose, la capacité à réduire les nitrates en nitrite, la fermentation du lactose, la production d'indole, la production d'acétone, la désamination du tryptophane. En outre, La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude de plusieurs caractères biochimiques (tableau 05) (Gadou, 2019).

Tableau 05 : Les tests biochimiques spécifiques : (Boulaiche et al., 2023)

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Prpteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lac	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Cit	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mob	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

Glu : Glucose ; **Lac** : Lactose ; **ONPG** : Orthonitrophénol-bêta-galactosidase ; **VP** : Voges-Proskauer ; **Cit** : Citrate ; **Mob** : Mobilité ; **H₂S** : Sulfure d'hydrogène.

2.4.4 Caractères antigéniques

L'étude des caractères antigéniques permet de distinguer les espèces au sein de chaque genre, les principaux types d'antigène sont : (Mendaci et Mihoubi, 2015).

Chapitre 2 : Entérobactéries

Antigènes O : constitué de lipopolysaccharide LPS, thermostable, appelé aussi antigène de paroi, absent chez les souches R (colonies rugueuses).

Antigènes H : présente chez les entérobactéries mobiles, constituées de flagelline thermolabile, de nature protéique.

Antigènes K : composé de couche externe de polysaccharides qui peuvent couvrir l'antigène O (antigène capsulaire). Il est présent chez *Klebsiella* et certaines souches d'*E.coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Salmonella*)

Antigène de kunin ou enterobacteriaceae common antigène (ECA) : Composé d'un glycophospholipide spécifique.

Antigène d'adhésines : appelé aussi antigène d'enveloppe comme pili, fimbriae (**Ploy et al, 2016**).

2.5 Pouvoir pathogène

Chez l'homme, certaines entérobactéries sont toujours pathogènes, telles que *Salmonella*, agent des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, et un grand nombre de sérotypes responsables d'infections intestinales moins graves ; *Yersinia pestis*, agent de la peste et *Yersinia enterocolitica*, agent d'adénite mésentérique et d'entérocolite.

D'autres espèces agissent comme des bactéries opportunistes pathogènes qui causent des infections chez des malades fragilisés. Les plus couramment rencontrées en médecine de ville et hospitalière sont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* et *Serratia spp*. Ces organismes sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales (**Ayad, 2010**).

2.5.1-*Escherichia coli*

Est une espèce bactérienne très hétérogène incluant des souches commensales et des souches pathogène extra intestinales et intestinales par des facteurs de la virulence notamment les fimbriae, auto-transporteurs, hémolysine, sidérophore. Elle est plus fréquemment impliquée dans plusieurs infections urinaires acquises en ville et aussi responsable d'infection nosocomiale comme les infections des plaies chirurgicales et des bactériémies. On trouve deux grands groupes majeurs d'*Escherichia coli* séparés en fonction du type d'infection (**Gadou, 2019**).

Le premier groupe, c'est le groupe d'*Escherichia coli* pathogène intestinaux (INTEC) responsable de syndrome diarrhéiques et comprend les pathovars suivants :

EHEC : *E. coli* producteurs de Shiga toxines ou *E. coli* entérohémorragiques responsables de la diarrhée aqueuse et la colite hémorragique et pouvant provoquer un syndrome hémolytique

et urémique chez l'enfant ou une micro-angiopathie thrombotique chez l'adulte (**Marioni-Kurkdjian et Bingen , 2012**).

ETEC : *E. coli* entéroagréguées responsables de la diarrhée dysentérique identique à celui présenté au cours de shigellose, ciblant l'enfant ou l'adulte.

ETEC : *E. coli* enterotoxinogènes responsables de la diarrhée liquide, elles touchent les enfants et les voyageurs.

EPEC : *E. coli* entéropathogènes responsables de la diarrhée aiguë, atteint les enfants de moins de deux ans (**Benamira et al., 2007**).

Le deuxième groupe, connu sous le nom d'*Escherichia coli* pathogène extra intestinaux comprend les *E. Coli* responsable d'infection du tractus urinaire et les *E. Coli* qui provoquent la méningite et la septicémie (**Gadou, 2019**).

2.5.2 *Klebsiella pneumoniae*

Est une bactérie pathogène opportuniste responsable de nombreux infections nosocomiales et communautaires, sa pathogénicité est régulée par des facteurs de virulence telle que les adhésines, la capsule polysaccharidique, le lipopolysaccharide et les sidérophores.

Cette souche attaque principalement les personnes immunodéprimées qui sont hospitalisés, elle est responsable de la pneumonie communautaire présent notamment chez les alcooliques chronique qui montrent des anomalies radiographiques caractéristiques due à une infection pyogénique sévère.

Klebsiella pneumoniae provoque d'environ 5 à 10% d'infection nosocomiale (infection suppuratives, infection urinaire, infection respiratoire, infection biliaire, infection hépatique, bactériémies, septicémies..... Etc) (**Atmani et al., 2013**).

2.5.3 *Enterobacter cloacae*

Enterobacter spp est une bactérie environnementale que l'on trouve dans l'eau, le sol et les plantes (**Cao et al .,2020**).

Enterobacter cloacae c'est l'espèce la plus fréquemment isolée des *Enterobacter spp*, elle est opportuniste et provoque des infections nosocomiales en particulier chez les patients immunodéprimés dans les services d'urgence ou les services d'infections cutanées, et aussi chez les nouveaux nés. Elle peut former des biofilms et conduire à la sécrétion de plusieurs toxines cellulaires (**Salimiyani et al., 2019**).

2.5.4 *Proteus mirabilis*

La présence naturelle des *Proteus* dans l'environnement facilitent la contamination opportuniste qui entraîne un phénomène infectieux souvent , les espèces de *Proteus* (*Proteus mirabilis* à 90 %) sont responsables d'infections des voies urinaires hautes peuvent entraîner

des symptômes tels que des urolithiases (formation de cailloux dans les reins ou la vessie), des cystites et des pyélonéphrites aiguës. En outre, ces infections peuvent également provoquer des bactériuries asymptomatiques, notamment chez les personnes âgées et les patients diabétiques de type 2 (Schultz, 2018).

2.5.5 *Morganella morganii*

C'est une bactérie qui se trouve dans l'environnement et dans le tractus intestinal des humains, des mammifères et des reptiles, dans le cadre de la flore normale, elle est plus rencontrée chez les patients post opératoires et est principalement responsable des infections urinaires, bactériémie, infection de la peau et des tissus mous et la méningite (Falagas et al., 2006).

2.5.6 *Providencia stuartii*

La bactérie *Providencia* se compose de cinq espèces : *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* et *P. stuartii* (Chady, 2014).

En tant qu'agent pathogène opportuniste, *P. stuartii* peut potentiellement provoquer des infections graves chez l'homme, telles que des infections des voies urinaires ou des voies respiratoires supérieures, une méningite ou une bactériémie (qui se propage par le sang) (Dong et al., 2024).

2.5.7 *Serratia marcescens*

Ce genre extrêmement varié se développe dans différents milieux, tels que l'eau, le sol, les plantes et les êtres humains. Tandis que certaines espèces de *Serratia*, notamment *Serratia marcescens*, sont réputées pour être responsables d'infections opportunistes chez l'homme et de maladies des plantes (Kulkova et al., 2024).

2.5.8 *Salmonella*

Le genre *Salmonella* comporte plus de 2500 sérotypes qui peuvent entraîner différentes infections. L'infection par les sérovares typhoidaux de *salmonella typhi* et *paratyphi A* se limite aux êtres humains et entraîne des maladies systémiques. Les infections à *salmonella non typhoïdique* (NTS) mettent en évidence la relation entre les humains, les animaux et l'environnement (Cuypers et al., 2023).

2.5.9 *Citrobacter*

Les différentes souches de *Citrobacter* se trouvent habituellement dans l'intestin humain et animal, et elles se trouvent également dans l'environnement naturel tel que le sol, l'eau, les eaux usées et la nourriture. Ce sont des microorganismes opportunistes qui sont souvent

détectés à proximité des plaies et entraînent des affections gastro-intestinales, des infections des voies urinaires et des bactériémies, en particulier chez les personnes immunodéprimées (Knirel et al., 2002).

2.6 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

2.6.1 Définition de la résistance bactérienne

Une souche bactérienne est dite résistante lorsqu'elle est capable de supporter des concentrations d'antibiotiques bien supérieures à celles qui inhibent le développement de la plupart des autres souches de la même espèce, la progression de cette résistance bactérienne aux antibiotiques peut conduire à des infections nosocomiales difficiles à traiter, on distingue deux types de résistance bactérienne : la résistance naturelle et la résistance acquise (Meskine et Benabdelkader, 2016).

- **La résistance naturelle**

C'est une caractéristique spécifique d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle est portée par les chromosomes, stable et héréditaire.

- **La résistance acquise**

Se produit en réponse à la pression de sélection des bactéries résistantes aux médicaments après l'utilisation d'antibiotique et ne concerne que quelques souches de la même espèce (Aribi et Ghedban, 2021).

2.6.2 Mécanisme de résistance des entérobactéries

2.6.2.1 Résistance aux β -lactamines

Les entérobactéries peuvent résister aux β -lactamines selon quatre mécanismes :

- **Diminution de la perméabilité de la membrane externe**

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe composée de phospholipides, se fait à travers les porines, qui sont des canaux protéiques chez les bactéries à Gram négatif. La sensibilité aux β -lactamines est influencée par le nombre de porines actives. Les résistances acquises aux β -lactamines sont causées par l'altération des porines par des mutations, soit par une altération structurale des porines, ou bien une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus courante.

- **Modification de l'affinité des protéines liant les pénicillines (PLP) aux antibiotiques**

Ce type de résistance, plus courant chez les bactéries à Gram positif peut être dû soit à des mutations dans les gènes chromosomiques des PLP normales, soit à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLP ayant peu d'affinité pour les β -lactamines. Certaines bactéries peuvent modifier la structure du site de fixation de l'antibiotique de manière à ce que cette

cible garde son rôle cellulaire normal mais ne puisse plus fixer l'antibiotique. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les entérobactéries (**Eddair, 2021**).

- **Protéines d'efflux (pompes d'efflux)**

Les pompes d'efflux jouent un rôle dans la réduction de la concentration des substances toxiques telles que les médicaments ou les détergents, ce qui leur permet de contrôler la sensibilité aux antibiotiques. Les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites qui comprennent une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protéine) et une porine enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protéine) (**Blair et Piddock, 2009**). L'imperméabilité de la membrane externe et les pompes à efflux jouent un rôle essentiel dans la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatifs. Il est possible que les mutations ou les modifications inductibles de ces mécanismes entraînent une réduction de l'afflux et une augmentation de l'efflux des antibiotiques, ce qui empêche leur accès à leurs cibles. Cependant, ces mécanismes devraient avoir des niveaux de résistance faibles, mais ils sont renforcés par l'interaction entre les mécanismes non enzymatiques et les mécanismes enzymatiques (**Li et al., 2007**).

- **Résistance enzymatique par production β -lactamases :**

La production de β -lactamases est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries. Ces β -lactamases sont codées par le chromosome ou par les plasmides et inhibent les β -lactamines en hydrolysant le cycle β -lactame à quatre chaînes (**Li et al., 2007**). Il existe deux systèmes de classification courants acceptés et basés sur des principes fonctionnelles (de Bush) et moléculaires (d'Ambler) (**Ruppé, 2010**).

2.6.2.2 Résistance aux aminosides

La résistance aux aminosides chez les entérobactéries est due aux mécanismes suivants :

Inactivation enzymatique

Ce mécanisme est réalisé par trois enzymes d'origine plasmidique qui inactivent l'action des aminosides. Les phospho-transférases (APH) qui catalysent la phosphorylation des groupements hydroxyles ; les nucléotides-transférases (ANT) qui catalysent l'adénylation des groupements hydroxyles et les acétyl-transférases (ACC) qui catalysent l'acétylation des groupements aminés. Ces enzymes modifient les aminosides ce qui empêche leur fixation sur l'ARN ribosomal 16s et bloquent ainsi leur activité (**Ya Bi Foua Achille, 2006**).

Réduction de l'accumulation intra cytoplasmique

Les aminosides traversent la membrane externe par diffusion passive à travers les porines (**Dubos et al., 2020**). Chez les entérobactéries des mutations entraînant des modifications

quantitatives ou qualitatives de ces porines, ce qui conduit à une diminution de l'accumulation des aminosides à l'intérieur de la cellule (Allag, 2024).

Modification de la cible

La méthylation de l'ARN 16s est un mécanisme de résistance aux aminosides chez les entérobactéries. Ce processus s'effectue à l'aide d'une enzyme (méthylases d'ARN r16s) qui modifie le site A aux positions G1405(N7) et A 1408(N1).

Les gènes responsables de la méthylation sont situés sur des transposons au sein des plasmides transférables ce qui leur donne le potentiel de se propager horizontalement est de devenir un problème majeur de santé mondiale (Doi et Rakawa, 2007).

2.6.2.3 Résistances aux fluoroquinolones

La résistance aux quinolones chez les entérobactéries est soit chromosomique ou plasmidique

Résistance chromosomique

Les principales cibles des fluoroquinolone sont les enzymes bactériennes ADN gyrase et ADN topoisomérase IV, pour l'ADN gyrase il est constitué de deux paires de sous unités, la protéine de 97 kda gyrA, codée par le gène *gyr A* et la protéine de 90 kda gyrB codée par le gène *gyrB*.

Chez les entérobactéries, l'ADN gyrase est plus sensible à l'inhibition médiée par les fluoroquinolones. Les mutations responsables de la résistance aux quinolones se déroulant au niveau de gène *gyrA*. Ces mutations impliquent des substitutions en acides aminés qui apparaissent dans une région particulière de la sous unités *gyr* nommé QRDR (quinolone résistance déterminig region). L'apparition d'une mutation au niveau de *gyrA* réduit la sensibilité et augmentent ainsi le niveau de la résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones (Muylaert et Mainil, 2013).

Résistance plasmidique

- **Protéines Qnr**

Depuis la première description de *qnrA1*, de nombreux autres gènes *qnr* (quinolone résistance) ont été décrits, définissant les familles *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* *qnrVC* et *qnrD*, avec pour chacune plusieurs allèles (8*QnrA*, 88 *QnrB*, 7*QnrVC*, 2 *QnrD* et 9 *QnrS* (Guillard et cambau, 2013). Les protéines *Qnr* entrent en compétition avec les quinolones pour la fixation de l'ADN gyrase, bloquant ainsi leur activité.

Elles confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones, et un niveau de résistance plus élevé, lorsqu'elles sont associées à des mutations des topoisomérases (Lakbakbi Elyaagoubi, 2012).

- **Inactivation enzymatique par acétylation**

Il s'agit d'une inactivation des quinolones par acétylation. Elle est due à l'apparition de deux mutations (trp102arg et asp169 tyr) au niveau du gène AAC (6')-Ib qui code pour un aminoside N-acetyltransferase, responsable de la résistance aux aminosides, ce qui aboutit à la production d'un variant de ce gène AAC (6')-Ib-cr (**Lakbakbi Elyaagoubi, 2012**).

- **Pompes à efflux plasmidiques**

Chez les entérobactéries, le gène QepA code pour une pompe d'efflux à 14 segments transmembranaires appartenant à la superfamille majeure des facilitateurs, ce gène confère une résistance aux fluoroquinolones à bas niveau produisant ainsi une augmentation de la concertation minimale inhibitrice.

Le mécanisme de la résistance impliquée chez *Escherichia coli* c'est une pompe a efflux non spécifique nommé OqxAB codée par un gène appelé OqxA confère aussi une résistance aux fluoroquinolones a bas niveau, augmentait ainsi la CMI d'une souche d'*Escherichia coli* vis-à-vis de l'acide nalidixique et de la ciprofloxxine de 8 à 16 à la fois (**Cattoir et al., 2008**).

Matériel et Méthodes

1. Matériel :

1.1 Matériel végétal

Des feuilles de *Crocus sativus* de la région du Djebel Zaafran (safran) d'Ain Fezza, Tlemcen ont été fournies par **Pr. Loukidi Bouchra**

1.2 Les souches testées

Dans le but de tester l'effet antimicrobien in vitro des extraits du safran on a utilisé des souches cliniques d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques isolées de service de réanimation au CHU de Tlemcen et une souche de référence *E. coli* ATCC35218 (tableau 06).

Les souches étudiées ont été fournies par **Dr. Ayad Amel**.

Tableau 06 : Souches testées

Microorganismes	Gram	Code	Source	Service
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	E4	Aspiration trachéale	Réanimation
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif	EC11	Poignée de porte de salle de soins	Réanimation
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	KP14	Aspiration trachéale	Réanimation
<i>E. Coli TEM-1</i>	Négatif	ATCC35218	Laboratoire de bactériologie médicale CHU de Montpellier	/

1.3 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 :

Bouillon Mueller Hinton (BMH).

Gélose Mueller-Hinton (GMH)

Gélose Mac-conkey (GMC)

1.4 Les antibiotiques utilisés

Les disques d'antibiotiques utilisés comme des témoins positifs pour toutes les bactéries sont :

Ampicilline (AMP, 10 µg/disque) et acide nalidixique (NA, 30 µg/disque).

2. Méthodes expérimentales

2.1 Préparation des extraits

Pour effectuer cette étude on a utilisé les extraits suivants avec des concentrations de (0,01mg, 0,5mg et 1mg /mL). Les extractions ont été réalisées par le doctorant du **Pr. Loukidi Bouchra** Mr.Chouari Kamel

- **Extrait aqueux :**

L'extrait a été obtenu en faisant macérer 5g du matériel végétal (feuilles de *C. Sativus L*) dans 50 mL de l'eau distillée à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 72h.

Après macération, deux étapes ont été réalisées : filtration en utilisant le papier Whatman et évaporation à l'évaporateur rotatif à 50°C. L'extrait a été récupéré dans de l'eau distillée à une concentration définie. Il s'agit d'un tracé de l'extrait aqueux.

- **Extrait d'acétate d'éthyle :**

Cet extrait a été obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle comme suit : 5g de la matière végétale ont été immergés dans de l'eau, solvant méthanol (70/30 (v/v)) pendant 48 heures. Cette étape est suivie d'une filtration et d'une évaporation pour obtenir un extrait sec. Ensuite, l'extrait sec a été hydrolysé à l'acide en ajoutant 100 mL de HCl 2N pendant 1 heure sous reflux. Enfin, l'extrait a été obtenu par lavage à l'acétate d'éthyle (la répéter 3 fois).

- **Fractions méthanolique et aqueuse :**

Pour arriver à la fraction aqueuse (**figure 03**), 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 10g poudres des feuilles est bouchée avec du coton puis placée dans un siphon qui est relié à un ballon contenant 150ml 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 placées dans un four pendant 16 heures à une température de 30 à 35°C pour une évaporation complète de l'hexane. Le résidu sec a été subi a des extractions par macération pendant 72 heures par utilisation successives des solvants du moins polaire au plus polaire jusqu' à l'arrivée à la fraction méthanolique puis la fraction aqueuse.



Figure 03 : Fraction aqueuse

2.2 Contrôle de la pureté des souches

Après le pré-enrichissement des souches en BHIB (**figure04**), une purification des souches a été réalisée sur la gélose Mac-conkey (**figure 05**), suivie d'une incubation à 37°C pendant 24h.



Figure 04: la culture des souches sur le BHIB **Figure 05:** ensemencement sur Mac-conkey

2.3 Conservation des souches

Elle a été réalisée dans des tubes de gélose nutritive inclinée (**figure06**). Les souches pures sont conservées à +4°C jusqu'à utilisation.



Figure 06 : Manipulation de conservation des souches

2.4 Préparation de l'inoculum

La pré-culture des souches microbiennes dans le Bouillon Mueller Hinton pour les bactéries permet d'atteindre une phase de croissance exponentielle.

Une fois les bactéries incubées pendant 18-24 heures à une température de 37°C, la turbidité est ensuite ajustée selon le standard Mec Ferland 0.5 à l'aide d'un colorimètre, ce qui est équivalent à 10^8 UFC/mL pour les bactéries (D.O =0.08 à 0.1 / 625 nm).

2.5 Ensemencement

Devant un bec bunsen, on coule les boîtes Pétri à une épaisseur de 4 mm (20 mL), car une couche plus fine accroît la taille de la zone d'inhibition, ce qui peut entraîner des résultats incorrects. Après cela, les boîtes sont placées dans l'étuve à une température de 37°C pendant 30 minutes avant d'être ensemencées pour éliminer l'humidité.

Un écouvillon stérile doit être trempé dans la suspension bactérienne. Pour le décharger au maximum, il faut le presser fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube.

Appliquer de haut en bas l'écouvillon sur toute la surface gélosée séché, en stries serrées.

On doit recharger l'écouvillon à chaque fois quand on ensemence une boîte de Pétri (**Rahal et al., 2008**).

3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

3.1 Méthode de diffusion sur gélose

La diffusion sur gélose (**figure 07**) fait référence à la diffusion d'un agent antimicrobien à partir d'un disque contenant une concentration donnée de l'agent dans un milieu de culture solide (généralement une gélose de Müller - Hinton), qui été déjà inoculé précédemment avec une culture pure.

Tout d'abord, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave puis imprégnés de 10 µL pour chaque extrait du feuilles de safran avec des charges différents (0,01mg, 0,5mg et 1mg/disque) et des antibiotiques (des disques d'ampicilline (10µg) et acide nalidixique (30µg) ont été utilisés comme des contrôles positifs pour les bactéries. Ces disques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile suivi par une petite pression pour s'assurer de son application, alors que ces boites gélosé sont préalablement ensemencées en surface avec la suspension microbienne.

Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits (**Kitouni, 2007**), deux répétitions sont effectuées pour chaque charge d'extrait. L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24h.

La lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en (mm) de la zone d'inhibition dans les deux directions perpendiculaires autour des disques à l'aide d'une règle graduée sur le fond de la boîte (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2019**).

Ce diamètre étant proportionnel à la sensibilité de la bactérie à l'agent antimicrobien présent dans le disque. La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture se traduit par un gradient de concentration de l'antimicrobien. Lorsque la concentration de l'antimicrobien devient si faible qu'il ne parvient plus à inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition se démarque.

Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque d'antimicrobien est lié à la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour cette combinaison spécifique bactérie / antimicrobien ; la zone d'inhibition est en corrélation inverse avec la CMI de la bactérie testée.

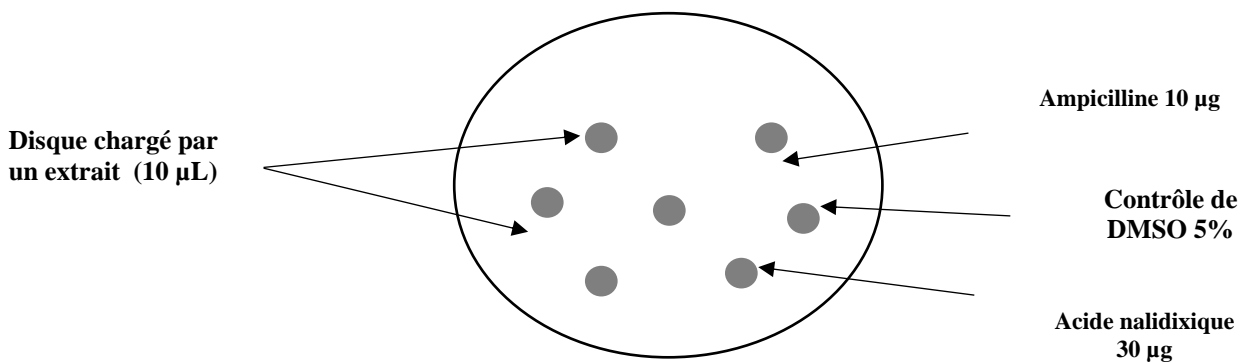


Figure 07 : Méthode de diffusion sur gélose

3.2 Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI et CMB) d'inhibition de la croissance microbienne par les extraits et les fractions. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait qui tué totalement les microorganismes survivantes de l'inoculum, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) c'est la concentration minimale d'extrait qui bloqué la croissance bactérienne après l'incubation à 37°C pendant 18 à 24h. Des dilutions en série sont préparées dans une microplaque de 96 puits dans la gamme de concentration choisie (**figure08**). Tout d'abord, nous mettons 100 µL de bouillon B.M.H dans les puits.

Ensuite, nous déposons 100 µL des extraits 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 jusqu'à le 24eme puits ou le 100 microlitres rester est jeté). De plus, on met 100 µL de la suspension bactérienne dans les puits 1 et puis 3 à 24 pour obtenir un volume final de 200 µL avec une

charge finale des micro-organismes de 5×10^5 UFC /mL. Les microplaques ont été incubées pendant 24 h à 37 °C.

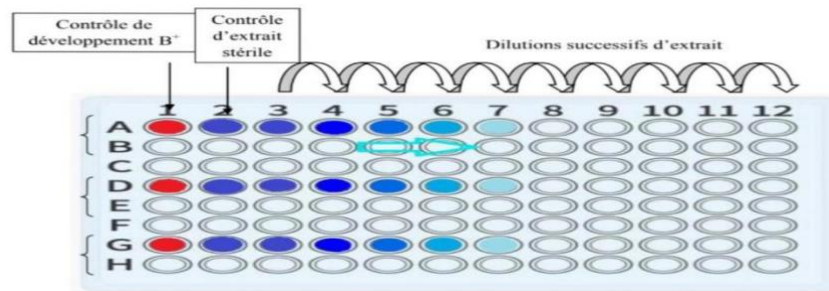


Figure 08: Dessin explicite de la méthode des dilutions sur plaque

- **Lecture**

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 10 μ L des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI (**figure 09**), 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.

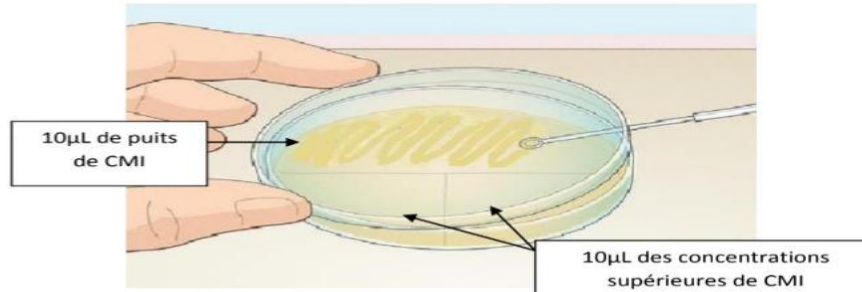


Figure 09: Confirmation des CMB

3.3 Bioautographie

- **Définition**

Les extraits de plantes sont constitués d'un mélange de molécules aux propriétés différentes. Cette technologie d'imagerie biologique permet de séparer les composés extraits et de tester l'activité biologique des molécules.

Analyse des molécules provenant de l'extrait

- Les molécules extraites sont séparées par chromatographie sur couche mince.
- Un mélange de solvant (100mL d'acétate d'éthyle, 11mL d'acide acétique, 27mL d'eau distillée et 11mL d'acide formique) est utilisé pour préparer un éluant, ce qui favorise la migration des flavonoïdes tout au long de la plaque CCM.

Matériel et Méthodes

- Les différents composés d'extrait sont séparés par la méthode de chromatographie sur couche mince pour préparer les plaques CCM. En utilisant un capillaire, on dépose l'extrait sur la ligne de dépôt sur la plaque contenant un gel de silice.
- Les plaques sont placées dans une cuve qui renferme l'éluant.
- La séparation des différentes molécules d'extrait se fait par capillarité jusqu'au le front de solvant où la plaque peut être retirée de la cuve.
- La révélation se fait par UV à 365nm et à 254nm, et on calcule le Rapport frontale R_f .

L'analyse d'activité biologique (antimicrobienne)

Les plaques de migration sont déposées sur des boîtes Pétrie déjà ensemencé par les souches microbiennes (**figure10**). Après une diffusion des molécules bioactifs de plaque dans les géloses (à 4°C durant environ 4h), puis on incube à l'étuve pendant 24 h à 37°C.

Les lectures visuelles nous permettent de vérifier l'inhibition ou la croissance microbienne en mesurant la zone d'inhibition (**Bai et Chaban, 2023**).



Figure 10: Bioautographie sur les boîtes Pétri

Résultat et discussion

1. Résultats des antibiotiques (contrôles positifs et négative) :

On utilise le contrôle positif afin de vérifier la précision de l'expérience et des résultats. Les antibiotiques ont été utilisés pour évaluer la résistance ou la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. On peut consulter les résultats d'inhibition dans le **tableau 07**

Tableau 07 : Zones d'inhibition moyenne des contrôles

Contrôle/microorganismes	<i>E.coli</i> (<i>E₄</i>)	<i>Enterobacter cloacae</i> (<i>Ec₁₁</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>Kp₁₄</i>)	<i>E.coli TEM-1</i> ATCC35218
Ampicilline (10µg)	6,75 ±0,35(R)	0 ±0 (R)	0 ±0(R)	0 ± 0 (R)
Acide nalidixique (30µg)	17,25 ±1,76 (S)	8,5 ±1,41 (R)	0 ±0(R)	19,75 ±0,35 (S)
DMSO 5%	0 ±0	0 ±0	0 ±0	0 ±0

R : Résistance ; S : Sensible

L'ampicilline et l'acide nalidixique n'ont eu aucunes activités sur *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonie* car ils sont résistants aux antibiotiques.

Concernant *E.coli* (*E₄*) aussi il n'y a aucun effet antimicrobienne pour l'ampicilline, par contre il y'a une activité pour l'acide nalidixique avec un diamètre d'inhibition de 17,5 mm.

Escherichia coli TEM-1 est sensible à l'acide nalidixique avec un diamètre d'inhibition de 19,75mm, donc d'après les résultats obtenus après une comparaison par le guide CASFM 2023 on conclure qu'*Escherichia coli TEM-1* porte la sensibilité la plus élevé avec acide nalidixique 19,75 mm. (Figure 11)

DMSO 5% (le solvant de solubilisation, contrôle négatif) n'est aucun effet antimicrobien contre tous les microorganismes testés.



Figure 11: Zone d'inhibition de l'acide nalidixique sur *E.coli TEM-1*

2. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose

2.1. Extrait aqueux

L'activité antimicrobienne d'extrait aqueux a été identifiée dans une gamme de charge : (0,01 mg, 0,5 mg ,1 mg), les zones d'inhibitions moyennes des trois charges d'extrait aqueux sont mentionné dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Zones d'inhibitions moyennes des trois charges.

Charge d'extrait / μorg	<i>E.coli (E₄)</i>	<i>Enterobacter cloacae (Ec₁₁)</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (Kp₁₄)</i>	<i>E.coli TEM-1 ATCC35218</i>
0,01 mg	0±0	0±0	0±0	0±0
0,5 mg	0±0	0±0	0±0	0±0
1 mg	6,5±0,70	0±0	0±0	0±0

Les charges utilisées d'extrait aqueux ne montrent aucune zone d'inhibition pour tous les microorganismes sauf *E.coli (E₄)* 6,5 mm à la charge de 1mg.

2.2 Extrait d'acétate d'éthyle

Le tableau 09 représente les diamètres d'inhibitions moyennes d'extrait d'acétate d'éthyle.

Tableau 09 : Zones d'inhibitions moyennes des deux charges.

Charge d'extrait / μorg	<i>E.coli (E₄)</i>	<i>Enterobacter cloacae (Ec₁₁)</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (Kp₁₄)</i>	<i>E.coli TEM-1 ATCC35218</i>
0,5 mg	6,5±0,70	0±0	0±0	0±0
1 mg	7±1,41	6,5±0,70	0±0	0±0

Pour la charge de 0,5 mg on observe une zone d'inhibition faible sur *E₄* avec un diamètre de 6,5 mm, par contre il n'y a aucune zone d'inhibition contre les autres germes, pour la charge de 1 mg ne montre aucune zone d'inhibition pour *Kp₁₄* et *E.coli-TEM-1* à l'exception de *E₄* et *Ec₁₁* avec un diamètre de 7 mm et 6,5 mm, respectivement.

2.3 Fraction méthanolique et fraction aqueuse

Les résultats de l'activité antimicrobienne des deux fractions aqueuse et méthanolique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10: Zones d'inhibitions moyennes des deux fractions avec une charge de 1 mg.

Charge d'extrait 1 mg / μ org	<i>E.coli</i> (<i>E₄</i>)	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> (<i>Ec₁₁</i>)	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> (<i>Kp₁₄</i>)	<i>E.coli</i> <i>TEM1</i> <i>ATCC35218</i>
FM	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
FA	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Les deux fractions ne montrent aucune réaction avec tous les germes.

Sur disque ont confirmé que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux portent une faible activité antimicrobienne contre *E.coli* (*E₄*) (figure 12), Alors que les fractions aqueuse et méthanolique ne montrent aucun activité antimicrobienne contre tous les entérobactéries étudiées.

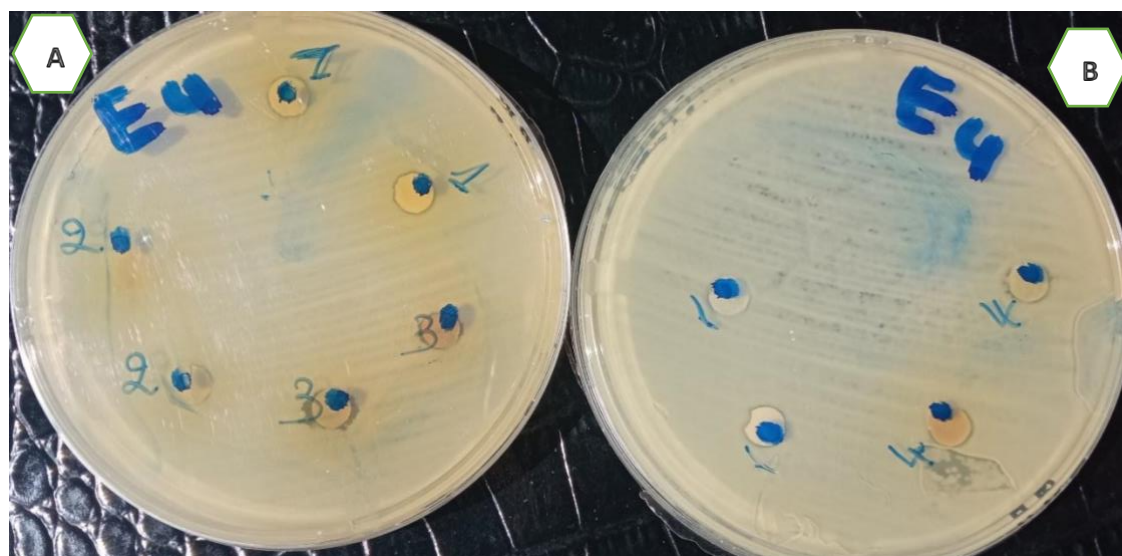


Figure 12 : Résultats de méthode de diffusion en milieu gélosé *E.coli* (*E₄*)(A :extraits ;B :contrôles)

Selon l'étude menée par **Asgarpanah et al.(2013)**, qui a montré que l'extrait méthanolique de pétales de *C. sativus* à une concentration égale à 1000 mg/disque indique un effet antibactérien contre *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi*, *E. coli* et *S. dysenteriae* avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 13 à 22 mm tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré la meilleure activité contre *B. cereus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm. La meilleure efficacité contre la *S. dysenterie* a été observée avec l'extrait de pétales de méthanol avec un diamètre de zone d'inhibition de 18 mm.

Résultats et Discussion

D'après l'étude de **Nouioua et Sofiane (2019)**, la fraction méthanolique à une activité antibactérienne à une concentration égale à 800 mg /disque contre *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi* avec des diamètres d'inhibition de 13 à 22 mm.

En règle générale, plus la zone d'inhibition est large, plus la concentration d'antimicrobien requise pour inhiber la croissance des microorganismes est faible. Cela dépend toutefois de la concentration d'agent antimicrobien dans le disque et de sa diffusibilité. Les agents antimicrobiens dont la taille moléculaire est très élevée diffusent mal dans la gélose, ce qui rend les méthodes de diffusion en disque peu fiables pour ces composés (**Nouioua et Sofiane, 2019**).

3. Résultats de la CMI et CMB

La microdilution a été effectuée pour voir s'il y a une activité inhibitrice entre les extraits et les entérobactéries (Tableau 11).

Tableau 11 : Les résultats de CMI et CMB

μorg /extrait	Extrait aqueux (34 mg)		Extrait d'acétate d'éthyle (20 mg)		Fraction aqueuse (11,6 mg)		Fraction méthanolique (150 mg)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E4</i>	2,125	>8,5	>5	/	0,3625	2,9	>37,5	>37,5
<i>Ec11</i>	8,5	>8,5	>5	/	0,3625	1,45	>37,5	>37,5
<i>Kp14</i>	1,0625	>8,5	>2,5	>5	0,3625	0,725	>37,5	>37,5
<i>E.coliTEM-1</i>	8,5	>8,5	>2,5	>5	0,3625	1,45	>37,5	>37,5

E₄ : *E.coli* 4 ; **Ec₁₁** : *Entérobactérie cloacae* 11 ;

Kp₁₄ : *Klebsiella pneumoniae* 14 ; **E.coli TEM-1** : *Escherichia coli TEM-1*

D'après les résultats du tableau, les concentrations minimales inhibitrices étaient comprises entre 0,3625 mg à 37,5 mg.

Le meilleur résultat de CMI pour l'extrait aqueux était de 1,0625 mg /mL obtenu avec *Klebsiella pneumoniae*, les concentrations 2,125mg/mL; 8,5 mg/mL; 8,5mg/mL sont obtenus contre *E. coli*, *Entérobactérie cloacae*, *E.coli TEM-1*, respectivement, et pour l'extrait d'acétate d'éthyle, le meilleur résultat de CMI était de 2,5 mg/mL obtenu avec *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli TEM-1*, la concentration de 5 mg/mL est obtenue contre *E.coli (E₄)* et *Enterobacter cloacae*. La fraction aqueuse (figure 13) inhibe la croissance d'*E. coli*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *E.coliTEM-1* avec une concentration active de 0,3625 mg/mL. Le plus intéressant résultat de CMI pour la fraction méthanolique était de 37,5 mg/mL est obtenu contre toutes les souches étudiées.

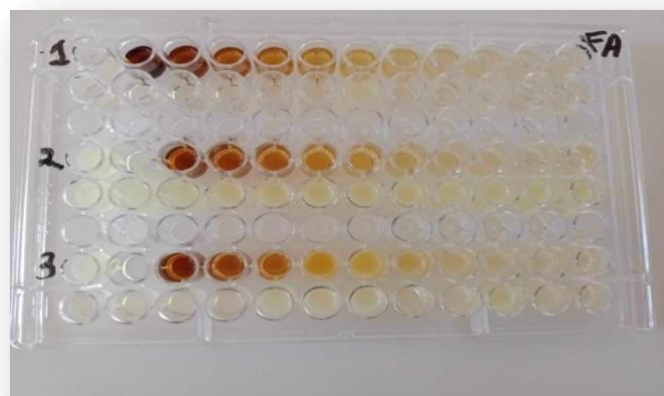


Figure 13 : Résultats de CMI de la fraction aqueuse (1 : *K. pneumoniae* / 2 : *E.coli* / 3:*E. cloacae*)

Les résultats de CMB ont été nettement plus élevés que les valeurs de CMI correspondantes, sauf les résultats de la fraction méthanolique étaient similaires. Les valeurs de la CMB est variées de 0,725 mg/mL à >37,5 mg/mL. La CMB d'extrait aqueux des espèces : *E.coli* , *E. cloacae* , *K. pneumoniae* ,*EcoliTEM-1* était de >8 ,5 mg/mL .L'extrait d'acétate d'éthyle a un CMB >5 mg/mL pour *K. pneumoniae* et *EcoliTEM-1* , et CMB >37,5 mg/ml pour toutes les souches étudiées dans la fraction méthanolique .La CMB intéressante pour la fraction aqueuse est 0,725 mg/mL sur *K.pneumoniae* , les concentrations 2,9 mg/mL ; 1,45 mg/mL ;1,45 mg/mL sont obtenus contre *E.coli*, *E.cloacea*, *EcoliTEM-1*, respectivement (figure14).



Figure 14 : Résultat de CMB (3 : *E.cloacae*, 7 : *E.coliTEM-1*)(extrait aqueux)

Selon l'étude d'**Asgarpanah (2013)**, l'extrait brut de méthanol, l'acétate d'éthyle et les sous-fractions aqueuses de pétales de *C. sativus* avaient respectivement des effets antimicrobiens maximaux contre la *S.dysenterie* avec des valeurs de CMI égales à 15,6 ; 31,2 et 31,2 mg/mL. L'extrait méthanolique de l'étamine et la fraction aqueuse ont montré des activités inhibitrices égales contre *Staphylococcus aureus* avec une valeur CMI de 62,5 mg/mL. La

Résultats et Discussion

sous-fraction d'acétate d'éthyle des étamines avait un effet antibactérien maximal contre *S. typhi* et *S. dysenteriae* avec des valeurs de CMI les plus basses de 31,25 et 15,6 mg/mL, respectivement. L'extrait brut de méthanol et les fractions d'acétate d'éthyle de pétales et d'étamines de *C. sativus* avaient des effets bactéricides maximaux contre *S. aureus* avec un CMB minimum de 125 mg /mL.

Selon une étude de **Jadouali** (2018), sur l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques à différentes concentrations (4500 µg/puits, 9000 µg/puits, 13500 µg/puits) contre les six bactéries étudiées, les résultats ont montré que seules les feuilles de *C.sativus* ,l'extrait était une source d'une substance ayant une activité antimicrobienne, et avec l'augmentation de la concentration des extraits, aucune activité antimicrobienne n'a été observée pour *S.aureus*, *B. subtilis*, *P.aeruginosa* et *Proteus mirabilis*, qui ont découvert que les *staphylocoques* sont résistants aux extraits méthanoliques .De plus, aucune activité antibactérienne de l'extrait de safran n'a été trouvée lors de tests contre *Proteus* ou *Staphylococcus*.

Zeggai (2023), a été démontré que l'extrait aqueux et la fraction aqueuse sans ultrasons ont un effet antimicrobien sur *Enterococcus faecalis* avec des valeurs de CMI de l'ordre de 68,181mg/mL et 13,363mg/mL, respectivement une valeur de CMB supérieur à 136,363 mg/mL.

4. Résultats de la Bioautographie

Après la migration on peut constater 3 taches des extraites via la figure 15 qui représente la migration des molécules contenant dans la fraction aqueuse et le rapport frontale de chaque tache.

Tableau 12 : les résultats obtenus après la migration des extraits

RF 254 nm	EA	FM	FA	AE
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 =0,65
Tache 4	2.7/3.5= 0,77	/	/	2.8/3.5=0,8

RF 365 nm	EA	FM	FA	AE
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	1.5/3.5 =0,42	2.9/3.5= 0,82	2.8/3.5 =0,8	2.9/3.5 =0,82

Résultats et Discussion

Tache 3	$2.6/3.5 = 0,74$	$3.4/3.5 = 0,97$	$3.2/3.5 = 0,91$	/
Tache 4	/	/	/	/

EA : extrait aqueux ; **FM** : fraction méthanolique ; **FA** : fraction aqueuse ; **AE** : extrait d'acétate d'éthyle.

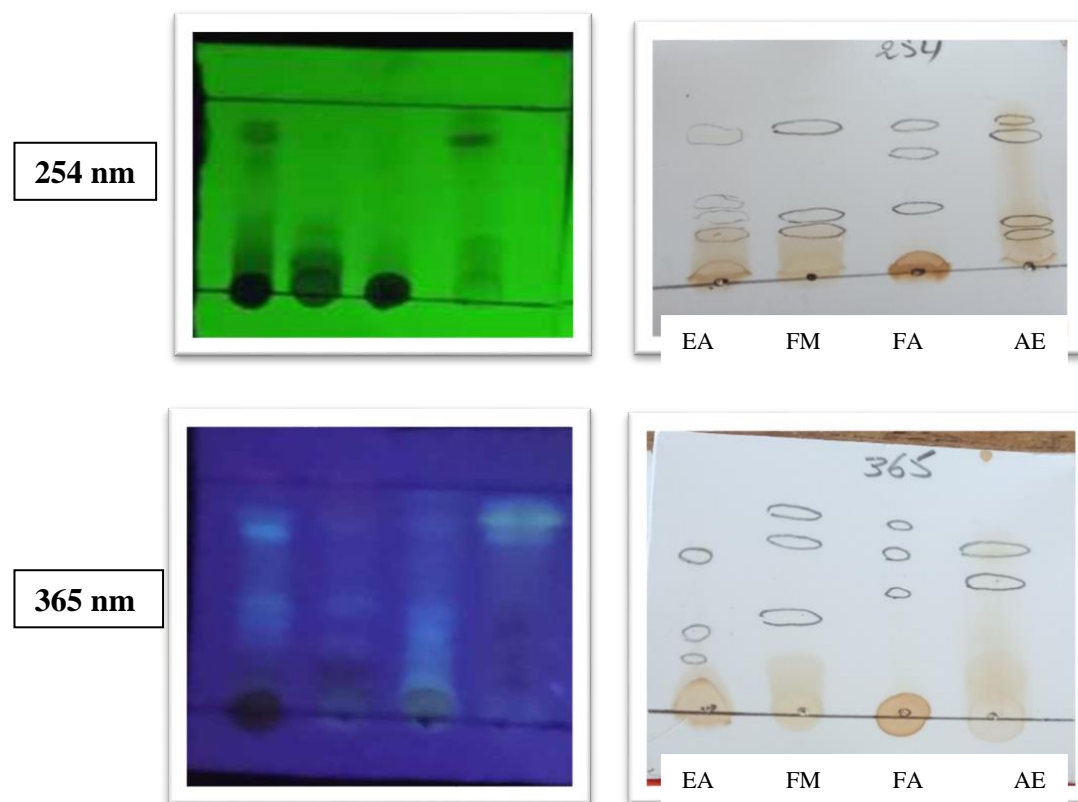


Figure 15: Révélation de la CCM par UV après migration par Ultra-violet à 245nm et à 365nm

Après incubation la présence des zones d'inhibition est négative pour *Ec11* et *Kp14* et *E.coli TEM1*. Concernent *E4* on a constaté quatre zones d'inhibition pour trois extraits (extrait aqueux, fraction aqueuse et extrait d'acétate d'éthyle) (figure16) avec différent rapport frontale représenté dans le tableau **13**:

Tableau 13 : les zones d'inhibitions après l'incubation

μ org+/extrait	EA	FA	AE
E4	Tache1: $3/3.5=0,65$ Avec un diamètre de 7mm.	Tache1: $1.2/3.5=0,34$ avec un diamètre de 6mm. Tache2 : $1.6/3.5=0,45$ avec un diamètre de 7mm.	Tache1 : $1.3/3.5=0,37$ Avec un diamètre de 7mm.

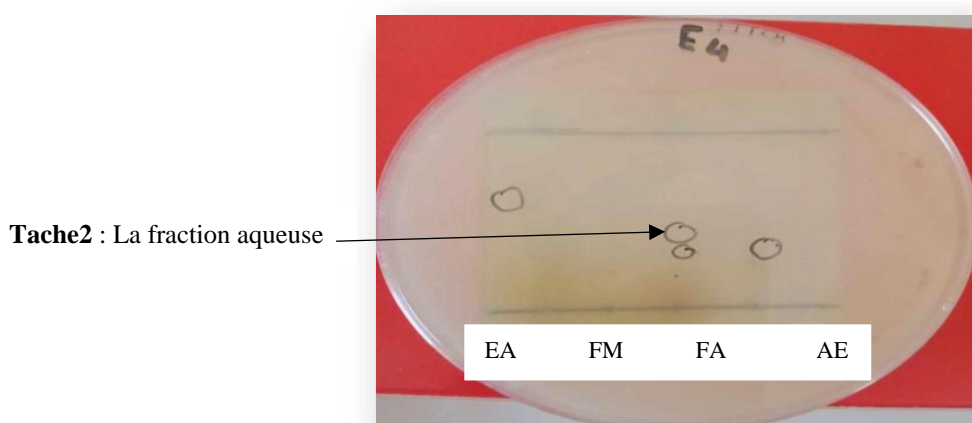


Figure 16 : Résultat de Bioautographie

Selon une étude de **Bai et Chabane** en **2023**, il a été constaté que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus actif, ce qui donne des résultats négatifs. Pour *C.albicans* ils ont observé une petite zone d'inhibition parallèle au composé avec un R_f 0,45 à 365nm.

Conclusion

Conclusion

En raison des multiples utilisations du safran *Crocus sativus* dans les domaines alimentaire et pharmacosmétique dans le passé, les chercheurs ont l'intention de réaliser des expériences par l'utilisation des composants du safran contre les bactéries pathogènes pour voir si il y'a une activité contre ses dernier, à cause de leurs résistances aux antibiotiques, qui est devenue un problème majeur menaçant la santé humaine dans le monde. Nous incitée aussi à étudier l'activité antimicrobienne du safran sur les entérobactéries notamment *Klebsiella pneumoniae* (Kp₁₄), *Escherichia coli* TEM-1, *Escherichia coli* (E₄) et *Enterobacter cloacea* (EC₁₁) isolées de service de réanimation au CHU de Tlemcen.

Pour évaluer le pouvoir antimicrobiennes (extrait aqueux, extrait acétate d'éthyle, fraction méthanolique et fraction aqueuse) sur ses souches pathogènes, nous avons abordés plusieurs méthodes scientifiques (méthodes de diffusion sur gélose, détermination des concentrations de CMI et CMB et la Bioautographie)

Selon les résultats obtenus les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux donnent une faible activité antimicrobienne contre *E. coli* (E₄) avec un diamètre de 7mm et 8 mm, respectivement. De plus la fraction aqueuse inhibe la croissance de toutes les souches testées avec une concentration inhibitrice de 0,3625mg/mL et un rapport frontale ($R_f=0,34$ et $0,45$) à 365nm contre *E. coli* (E₄).

Nous résultats peuvent plus importante si nous avons utilisé des concentrations plus importante des extraits ou des fractions (safran).

Nous envisagions comme perspective :

- Evaluation d'autre activité biologique (activité antioxydante, antidiabétique et antidépresseur).
- Etude de la composition phytochimique des extraits et identifier les composants actifs responsables des activités biologiques.
- Préparation des produits à base de substances naturelles extrait à partir des feuilles du safran.

Références

Akhtar, N., Khan, H. M., Ashraf, S., Mohammad, I. S., Saqib, N. U., et Bashir, K. (2014). Moisturizing effect of stable cream containing *Crocus sativus* extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(6), 1881-1884.

Aniambossou, V. A. S. (2016). Nécessité d'utiliser les tests biochimiques pour identifier les entérobactéries. Mémoire de Licence Professionnelle, Option Analyses Biomédicales. Université d'abomey-Calavi (UAC), Ecole Polytechnique d'abomey-Calavi (EPAC).30p.

Asgari, M., Yu, Q., Abdi, M., Du, G. L., et Shen, Y. H. (2022). Survey of the History and Applications of Saffron. *Chinese Medicine and Culture*, 5(1):31-38.

<https://doi:10.1097/MC9.000000000000006>

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*, 69-82.

Aribi, Y. et Ghedbane, N. (2021). Les bactéries multirésistantes en milieu hospitalier (en service de Néonatalogie). Mémoire de Master, Microbiologie et hygiène hospitalière. Université des Frères Mentouri Constantine. 95p.

Atmani, S., Messai Yamina, Y., Aissani, R., Alouache, S., et Bakour, R. (2013). Virulence potentielle de souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des effluents d'un hôpital à Alger, 1.

Ayad, A. (2010). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au CHU de Tlemcen .Mémoire de Magister, Option Biochimie Appliquées. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Département de Biologie .91p.

Allag, H. (2024). Mécanisme de résistance (cour antibiotique 2).Faculté Mohammed pharmacie. Université de Constantine 3 Salah boubnider.13p. <https://facmed.univ-constantine3.dz>.

Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Loukidi, B., Mir, M. A., Assadpour, E., Boudghene-Stambouli, M., ... et Jafari, S. M. (2023). Bioactivity and applications of saffron floral bio-residues (tepals): a natural by-product for the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.

Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Gismondi, A., Di Marco, G., Canini, A et Atik-Bekkra, F. (2019). GC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of alkaloids extracted by polar and a polar solvents from the stems of *Anabasis articulata*. *Medicinal Chemistry Research* 28, 754–767. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02332-6>.

Références bibliographiques

- Belyagoubi, L., Loukidi, B., Belyagoubi-Benhammou, N., Gismondi, A., Di Marco, G., D'Agostino, A., ... et Atik-Bekkara, F. (2021).** Valorization of Algerian saffron: Stigmas and flowers as source of bioactive compounds. *Waste and Biomass Valorization*, 12(12), 6671-6683.
- Bennani, M. (2014).** Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles. Mémoire de Licence. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah de Fès, Faculté des Sciences et Techniques. 38p.
- Benamira, D., Boufehta, K., Benslama, S., et Roula, S. E. (2007).** Les infections à *E. coli*. Thèse de doctorat, Microbiologie. Université de Jijel. 51p.
- Bensaid, A., et Belarbi, A. (2022).** Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of saffron petals (*Crocus sativus*). Mémoire de Master, option Microbiologie et Contrôle de Qualité. Université Abou bekr Belkaid – Tlemcen, Département des sciences de la nature et de la vie. 77p.
- Bergoin, M. (2005).** Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Thèse Doctorat. Spécialité Sciences des Agroressources. Ecole Doctorale : Sciences Des Procédés. 370p.
- Bhargava, V. (2011).** Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* Linn (Saffron). *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(3), 22-26.
- Blair, J. M., et Piddock, L. J. (2009).** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current opinion in microbiology*, 12(5), 512-519.
- Boskabady, M. H., Gholamnezhad, Z., Khazdair, M. R., et Tavakol-Afshari, J. (2020).** Antiinflammatory and immunomodulatory effects of saffron and its derivatives. In *Saffron* (pp. 405-421). Woodhead Publishing.
- Boulaiche, C., et Guendouz, S. N. (2023).** Profil De Résistance Des Entérobactéries Uropathogènes. Thèse de doctorat, Biochimie Appliquée. Université center d'Abdalhafid Boussouf-Mila. 124p.
- Bai, F et Chabane, A. (2023).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits du pétale du safran *Crocus sativus* contre les microorganismes responsables des infections alimentaires. Mémoire de Master. Option Sécurité Agroalimentaire et Assurance de Qualité. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 49p.
- CASF, (2023).** Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris : Société Française De Microbiologie. Disponible sur le lien www.sfm-microbiologie.org .

Références bibliographiques

- Cao, P., Li, C., Tan, K., Liu, C., Xu, X., Zhang, S., ... et Xiang, W. (2020).** Characterization, phylogenetic analyses, and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on rice seedlings in Heilongjiang Province, China. *Plant disease*, 104(6), 1601-1609.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2557-RE>.
- Cattoir, V., Poirel, L., et Nordmann, P. (2008).** Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(10), 3801-3804. <https://doi.org/10.1128/aac.00638-08>.
- Cenci-Goga, B. T., Torricelli, R., Gonabad, Y. H., Ferradini, N., Venanzoni, R., Sechi, P., ... et Albertini, E. (2018).** In vitro bactericidal activities of various extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas from Torbat-e Heydarieh, Gonabad and Khorasan, Iran. *Microbiology research*, 9(1), 7583.
- Christodoulou, E., Kadoglou, N. P., Kostomitsopoulos, N., et Valsami, G. (2015).** Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(12), 1634-1649. [https://doi: 10.1111/jphp.12456](https://doi:10.1111/jphp.12456).
- Cuyper, W. L., Meysman, P., Weill, F. X., Hendriksen, R. S., Beyene, G., Wain, J., ... et Van Puyvelde, S. (2023).** A global genomic analysis of *Salmonella* Concord reveals lineages with high antimicrobial resistance in Ethiopia. *Nature communications*, 14(1), 3517.
- Dai, R. C., Nabil, W. N. N., et Xu, H. X. (2021).** The history of saffron in China: From its origin to applications. *Chinese Medicine and Culture*, 4(4), 228-234.
[https://doi: 10.4103/CMAC.CMAC_38_21](https://doi:10.4103/CMAC.CMAC_38_21).
- Damayanti, G. S., et Riyanto, P. (2023).** Literature Review: The Role of Saffron (*Crocus sativus* L) in Cosmetic Dermatology. *Jurnal Kedokteran Diponegoro (Diponegoro Medical Journal)*, 12(6), 375-382. [https://doi:10.14710/dmj.v12i6.40711JKD\(DMJ\)](https://doi:10.14710/dmj.v12i6.40711JKD(DMJ)).
- Djenouhet, A., et Rias, S. (2020).** Étude bibliographique du potentiel biologique du Safran. Thèse de doctorat, Biochimie Appliquée. Université Laarbi Tebessi Tebessa. 66p.
- Doi, Y., et Arakawa, Y. (2007).** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88-94.
[https://doi 10.1086 / 519005](https://doi:10.1086/519005).
- Dong, X., Jia, H., Yu, Y., Xiang, Y., et Zhang, Y. (2024).** Genomic revisitation and reclassification of the genus *Providencia*. *Msphere*, e00731-23.
<https://doi.org/10.1128/msphere.00731-23>.
- Dubost, C., Nau, A., et Velly, L. (2020).** Infectiologie en réanimation et soins critiques: Plus de 75 fiches pratiques pour la prise en charge des infections virales, bactériennes et fongiques (Vol.1). Arnette.

Références bibliographiques

Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., et Falagas, M. E. (2009). Do we still need the aminoglycosides?. *International journal of antimicrobial agents*, 33(3), 201-205.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>.

Eddair, Y. (2021). La Résistance aux Bêta-Lactamines par Production de Bêta-Lactamase à Spectre Élargi chez les Entérobactéries: Caractérisation Phénotypique et Génotypique. Thèse Doctorat. Université Mohammed V de Rabat, Faculté De Médecine Et de Pharmacie Rabat. 148p.

EL khoudri, M., Ouahhoud, S., Lahmasse, M., KHOULATI, A., BENYOUSSEF, S., MAMRI, S., ... et Saalaoui, E. (2021). Biological effects and pharmacological activities of saffron of *Crocus sativus*. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 7(2), 254-268.

Falagas, M. E., Kavvadia, P. K., Mantadakis, E., Kofteridis, D. P., Bliziotis, I. A., Saloustros, E., ... et Samonis, G. (2006). *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. *Infection*, 34, 315-321. <https://doi.org/10.1007/s15010-006-6682-3>.

Farkhondeh, T., et Samarghandian, S. (2014). The effect of saffron (*Crocus sativus* L). And its ingredients on the management of diabetes mellitus and dislipidemia. *Afr J Pharm Pharmacol*, 8(20), 541-9. <https://doi.org/10.5897/AJPPX2013.0006>.

Fernández, J. A. (2006). Anticancer properties of saffron, *Crocus sativus* Linn. *Advances in phytomedicine*, 2, 313-330.

Gadou, V. (2019). Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan, Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix Houphouët Boigny. 123.

Gaglio, R., Gentile, C., Bonanno, A., Vintaloro, L., Perrone, A., Mazza, F., ... et Di Grigoli, A. (2019). Effect of saffron addition on the microbiological, physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 208-217. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.125>.

Guillard, T., et Cambau, E. (2012). Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones. *Journal des Anti-infectieux*, 15(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2013.02.0027>.

Iabadene, H., Messai, Y., Alouache, S., Arlet, G., et Bakour, R. (2010). Mécanismes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones d'*Enterobacter* dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, 4, 24.

Jadouali, S. M., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., ... et Mamouni, R. (2018). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of

Références bibliographiques

Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves. J. Mater. Environ. Sci, 9(1), 113-118. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.1.14>.

Kashani, L., Aslzadeh, S., Shokraee, K., Shamabadi, A., Najafabadi, B. T., Jafarinia, M., ... et Akhondzadeh, S. (2022). *Crocus sativus* (saffron) in the treatment of female sexual dysfunction: a three-center, double-blind, randomized, and placebo-controlled clinical trial. Avicenna Journal of Phytomedicine, 12(3), 257.

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse doctorat .Option Microbiologie. Université Mentouri- Constantine.67p.

Knirel, Y. A., Kocharova, N. A., Bystrova, O. V., Katzenellenbogen, E., et Gamian, A. (2002). Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus Citrobacter. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis-English Edition-, 50(6), 379-392.

Kulkova, I., Wróbel, B., et Dobrzyński, J. (2024). *Serratia spp.* as plant growth-promoting bacteria alleviating salinity, drought, and nutrient imbalance stresses. Frontiers in Microbiology, 15, 1342331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342331>.

Lachguer, K., El Merzougui, S., Boudadi, I., Laktib, A., Ben El Caid, M., Ramdan, B., ... et Serghini, M. A. (2023). Major phytochemical compounds, in vitro antioxidant, antibacterial, and antifungal activities of six aqueous and organic extracts of *Crocus sativus* L. flower waste. Waste and Biomass Valorization, 14(5), 1571-1587.

Lakbakbi El yaagoubi, F. (2012). Les entérobactéries productrices des bétalactamines à étendu en milieu communautaire clinique : étude dans la ville de Taza .Mémoire de Master, Biotechnologie Microbienne. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.94p.

Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., et Adewoye, L. (2007). β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary microbiology, 121(3-4), 197-214.

Madan, K., et Nanda, S. (2018). In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. Bioorganic Chemistry, 77, 159-167.

Maggi, M. A., Bisti, S., et Picco, C. (2020). Saffron: Chemical composition and neuroprotective activity. Molecules, 25(23), 561.

Mariani-Kurkdjian, P., et Bingen, É. (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. Médecine Intensive Réanimation, 21(3), 268-279.

<https://doi.org/10.1007/s13546-012-0481-x>

Références bibliographiques

- Menard, R., Molinas, C., Arthur, M., Duval, J., Courvalin, P., et Leclercq, R. (1993).** Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(1), 78-83.
- Mendaci, A., et Mihoubi, S. (2015).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*). Mémoire de Master, option Microbiologie Générale et biologies Moléculaire des microorganismes, Département de Microbiologie. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.88p.
- Meskine, A. et Benabdelkader, L. (2020).** . Etude De La Résistance Et La Multirésistance Aux Antibiotique de Souches Isolées du Milieu Hospitalier. Mémoire de Master, Spécialité : Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine, Département de Microbiologie. 67p.
- Messai, K. (2018).** Identification des Enterobacteriaceae multi-résistantes isolées des effluents hospitaliers. Mémoire de Master, Microbiologie Appliquée. Université laarbi tebessi tebessa.83p.
- Moussa, N., et Moussaoui, F. Z. (2016).** Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille .Mémoire de Master, Microbiologie appliquée à la sante et à l'environnement. Universite laarbi tebessi tebessa .94p.
- Muylaert, A., et Mainil, J. (2013).** Résistances aux fluoroquinolones: la situation actuelle. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 157). ULG-Université de Liège, Liège, Belgium.
- Muzaffar, S., Rather, S. A., et Khan, K. Z. (2016).** In vitro bactericidal and fungicidal activities of various extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas from Jammu & Kashmir, India. *Cogent food & agriculture*, 2(1), 1158999.
- Mykhailenko, O., Kovalyov, V., Goryacha, O., Ivanauskas, L., et Georgiyants, V. (2019).** Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry*, 162, 56-89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem>.
- Mykhailenko, O., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Sidorenko, L., Lesyk, R., & Georgiyants, V. (2021).** Characterization of phytochemical components of *Crocus sativus* leaves: a new attractive by-product. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2), 28. <https://doi.org/10.3390/scipharm89020028>
- Mzabri, I., Addi, M., et Berrichi, A. (2019).** Traditional and modern uses of saffron (*Crocus sativus*). *Cosmetics*, 6(4), 63. <https://doi:10.3390/cosmetics6040063>.
- Nasab, B. F. (2019).** Evaluation of antibacterial activities of hydroalcoholic extract of saffron petals on some bacterial pathogens. *Journal of medical bacteriology*, 8(5-6), 8-20.

Références bibliographiques

- Nasrallah, C. (2014).** Étude du rôle joué par les porines dans la persistance des infections par *Providencia stuartii*. Thèse de doctorat, Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant. Université de Grenoble. 223p.
- Nouioua, W. et Sofiane, G. (2019).** Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities development of methanol extract of *Saxifraga veronicifolia* Pers. *PhytoChem & BioSub Journal*.
- Palomares, C. (2015).** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament ? Thèse de doctorat, Sciences pharmaceutiques. Université de Lorraine. 143p.
- Parray, J. A., Kamili, A. N., Hamid, R., Reshi, Z. A., et Qadri, R. A. (2015).** Antibacterial and antioxidant activity of methanol extracts of *Crocus sativus* L. cv. Kashmirianus. *Frontiers in Life Science*, 8(1), 40-46.
- Ploy, M. C., Poyart, C., Cattoir, V., Denis, F., et Martin, C. (2016).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. 3^{ème} Edition Elsevier Health Sciences. 571p.
- Poma, A., Fontecchio, G., Carlucci, G., et Chichirico, G. (2012).** Anti-inflammatory properties of drugs from saffron *Crocus*. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 11(1), 37-51.
- Rahal, K. (2008).** Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 5^{ème} édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie. 100p.
- Rahayu, D. (2022).** Benefits of Saffron (*Crocus sativus*) in the Management of Menstrual Disorders: A Review. <https://doi:10-5220-0010758400003235>.
- Rahmani, A. H., Khan, A. A., et Aldebasi, Y. H. (2017).** Saffron (*Crocus sativus*) and its active ingredients: Role in the prevention and treatment of disease. *Pharmacognosy Journal*, 9(6).
- Razak, S. I. A., Anwar Hamzah, M. S., Yee, F. C., Kadir, M. R. A., et Nayan, N. H. M. (2017).** A review on medicinal properties of saffron toward major diseases. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 23(2), 98-116.
- Roosbeh, N., Amirian, A., Abdi, F., et Haghdooost, S. (2021).** A systematic review on use of medicinal plants for male infertility treatment. *Journal of Family & Reproductive Health*, 15(2), 74. <https://doi:10.18502/jfrh.v15i2.6447>.
- Ruppé, E. (2010).** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*, 12(1), 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2010.01.003>.

Références bibliographiques

- Salah, H. (2018).** Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse de doctorat, option Microbiologie. Université "Ferhat ABBAS" - Sétif, Département de Biologie .156p.
- Salimiyan Rizi, K., Ghazvini, K., et Farsiani, H. (2020).** Clinical and pathogenesis overview of *Enterobacter* infections. *Reviews in Clinical Medicine*, 6(4), 146-154
- Samarghandian, S., et Borji, A. (2014).** Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L). And its ingredients. *Pharmacognosy research*, 6(2), 99. [https://doi: 10.4103/0974-8490.128963](https://doi.org/10.4103/0974-8490.128963).
- Schultz-Ascensio, E. (2018).** Diffusion d'îlots génomiques de multirésistance aux antibiotiques chez *Proteus mirabilis*. Thèse de doctorat, Sciences Économiques. Ecole doctorale. Economie gestion de montpellier.Tours.
- Wani, A. K., Singh, J., et Shukla, S. (2022).** Therapeutic application and toxicity associated with *Crocus sativus* (saffron) and its phytochemicals. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 4, 100136.
- Ya bi foua, A. (2006).** Antibiotypique Des Bacteries Responsables D'infection Urinaire Communautaire. (Thèse Doctorat En Pharmacie). Université de Bamako.131p.
- Zara, S., Petretto, G. L., Mannu, A., Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., ... et Fancello, F. (2021).** Antimicrobial activity and chemical characterization of a non-polar extract of saffron stamens in food matrix. *Foods*, 10(4), 703.
- Zbiri, R. et zarmene, R, F.(2021).** Evaluation de l'activité biologique et antimicrobienne de *Crocus sativus* L. Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université des Frères Mantouri Constantine. 65p.
- Zeggai, Z.(2023).** Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles du safran « *Crocus sativus* » contre les bactéries responsables des infections alimentaires .Mémoire de Master, Spécialité Sécurité Agroalimentaire et Contrôle de Qualité. Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen, Département de Biologie .36p.
- Zitouni, S. (2022).** *Enterobacterie* (cours de microbiologie). Faculté de Médecine de Constantine.38p. <https://facmed.univ-constantine3.dz>.
- Zrardi, M. (2020).** Les Entérobactéries : Épidémiologie Et Résistance Aux Antibiotiques. Mémoire de Master, Biologie Moléculaire de Microorganisme. Université des Frères Mentouri Constantine.87p.

Annexe

Tableau 14 : Diamètre des zones d'inhibitions de contrôle positif et négatif

Contrôle Positif et négatif /μorg	<i>E.coli 4</i>		<i>Enterobacter cloacae 11</i>		<i>Klebsiella pneumoniae 14</i>		<i>E.coli TEM1 ATCC35218</i>	
Ampicilline	7	6,5	6	6	6	6	6	6
Acide nalidixique	18,5	16	7,5	9,5	6	6	20	19,5
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6

Tableau 15 : Diamètre des zones d'inhibitions d'extrait aqueux

Charge d'extrait aqueux /μorg	<i>E.coli 4</i>		<i>Enterobacter cloacae 11</i>		<i>Klebsiella pneumoniae 14</i>		<i>E coli TEM-1 ATCC35218</i>	
0,01 mg	6	6	6	6	6	6	6	6
0,5 mg	6	6	6	6	6	6	6	6
1 mg	7	6	6	6	6	6	6	6

Tableau 16 : Diamètre des zones d'inhibitions d'extrait d'acétate d'éthyle

Charge d'extrait d'acétate d'éthyle /μorg	<i>E.coli 4</i>		<i>Enterobacter cloacae 11</i>		<i>Klebsiella pneumoniae 14</i>		<i>E.coli TEM-1 ATCC35218</i>	
0,5 mg	7	6	6	6	6	6	6	6
1 mg	8	6	7	6	6	6	6	6

Tableau 17 : Diamètre des zones d'inhibitions de la fraction aqueuse at méthanolique

Charge d'extrait 1 mg /μorg	<i>E.coli 4</i>		<i>Enterobacter cloacae 11</i>		<i>Klebsiella pneumoniae 14</i>		<i>E.coli TEM1 ATCC35218</i>	
FM	6	6	6	6	6	6	6	6
FA	6	6	6	6	6	6	6	6