



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 - TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

MÉMOIRE

Présenté par

**CHAIBI Kawther**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER en Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Fondamentale**

**Thème**

Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles du safran «*Crocus sativus* » contre des souches «*Pseudomonas aeruginosa* » d'origine hospitalière

**Soutenu le 30/06/2025 devant le jury composé de :**

<b>Présidente : Mme. AYED Amel</b>	<b>MCA</b>	<b>Université Tlemcen</b>
<b>Encadrants : Mr BELYAGOUBI Larbi</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Tlemcen</b>
<b>Mme. LOUKIDI Bouchra</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Tlemcen</b>
<b>Examinatrice : Mme. ZERHOUNI Khdidja</b>	<b>MCA</b>	<b>Université Tlemcen</b>
<b>Invitée d'honneur : Dr. BOUSSELHAM Ammara</b>		<b>CHU de Tlemcen</b>

**Année universitaire 2024/2025**



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

C'est avec plaisir que je réserve cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui m'a aidé tout au long de ce travail.

Tout d'abord je remercie **ALLAH** le tout puissant de la bonne santé, la puissance et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je remercie infiniment mon encadrant, Monsieur **BELYAGOUBI Larbi**, pour son aide, son conseil, les renseignements, la documentation et le soutien qu'il n'a pas hésité à me apporter, pour me permettre de maintenir la bonne démarche du mémoire.

Je remercie mon Co-encadrante, La professeure **LOUKIDI Bouchra** pour son aide, sa compréhension et ses conseils tout au long de ce travail dans son laboratoire et pour la matière végétale et son aide précieuse en matériel et en produits.

Je remercie la Professeure fortement **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila** pour ces conseils, son aide et son soutien qui m'a donné.

Je dois également exprimer ma gratitude à Madame **AYED Amel** pour avoir accepté de présider ce jury.

Nos remerciements vont également à Madame **ZERHOUNI Khadidja** Qui nous a honorés par sa participation au jury de notre soutenance et accepté d'examiner notre travail.

Je remercie le doctorant Monsieur **CHAOURI Kamel**, pour son aide sur le plan pratique au laboratoire et pour la matière végétale

Je remercie **Dr. BOUSSELHAM Ammara**. Chef de service de Microbiologie du CHU Tlemcen/faculté de médecine de Tlemcen pour les souches bactériennes et leur antibiogramme.

Je tiens surtout à exprimer mes vifs remerciements à tous mes amis et collègues

De mon part, j'espère que mon conduite et mon apprentissage a laissé une bonne impression du département de la science de la nature et de la vie.





## Je dédie ce travail à

Mes chères mamans, **Mama** ma vie et mon bonheur et **ma Grand-Mère** la lumière de mes jours je les remercie pour tous les sacrifices qu'ils m'ont faits tout au long de ma vie et pour leur soutien et encouragement.

Mon chère **Papa**, la flamme de mon cœur, que dieu lui accorde sa miséricorde.

Mes chère frère **Mouhemed, Khalil, Nassim Abdo basset** et **Youcef** et mes chère sœurs **Samira, Ilham** et surtout **Zakia** qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir dans mes études tout au long de ma carrière académique.

Mes chères amis **Imane ; Fatima** et **Ikram** mes vrai sœurs et mes belle souvenir.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études, amis, collègues d'étude.

تركز دراستنا على نبات الزعفران (*Crocus sativus L.*) ، وهو نبات طبي عشبي معمر يُعرف باسم الزعفران ويُلقب بـ "الذهب الأحمر" نظرًا لقيمته الاستثنائية، وهي الأعلى قيمةً في العالم. ويُقدَّر هذا النبات تقديرًا عاليًا لرائحته ومذاقه ولونه وخصائصه الطبية. في هذا العمل، ركزنا على جزء من النبات لم يُستكشف جيدًا ولم يُقدَّر حق قدره: أوراق الزعفران. يهدف هذا البحث بشكل رئيسي إلى تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا لأجزاء ومستخلصات مختلفة من أوراق الزعفران ضد سلالات الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*)، وهي بكتيريا مُمرضة متعددة المقاومة، مع تسليط الضوء على إمكانية الاستفادة من مخلفات أزهار الزعفران.

تكشف النتائج المُحصَل عليها أن الجزء الميثانولي من أوراق الزعفران يُمارس نشاطًا مضادًا للبكتيريا بشكل ملحوظ ضد الزائفة الزنجارية، مع مناطق تثبيط من 6.5 إلى 12 مم. علاوة على ذلك، أظهر هذا الجزء تركيزًا مثبطًا أدنى (CMI) وتركيزًا مبيدًا للجراثيم أدنى (CMB) ، يقدر بحوالي 75 ملغ/مل. علاوة على ذلك، كشف التصوير الذاتي الحيوي عن أنشطة مضادة للبكتيريا مثيرة للاهتمام بشكل خاص، وخاصةً لجزء البيوتانول، الذي وأد مناطق تثبيط تتراوح بين 10 و12 ملم. تؤكد هذه النتائج أهمية أوراق الزعفران في البحث عن بدائل علاجية جديدة لمكافحة الالتهابات البكتيرية، مسلطةً الضوء على إمكاناتها الواعدة.

**الكلمات المفتاحية:** الزعفران *Crocus sativus*، الأوراق، الالتهابات السريرية، الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*)، النشاط المضاد للبكتيريا، التصوير الذاتي الحيوي، المواد النشطة بيولوجيًا.

## Abstract

Our study focuses on *Crocus sativus* L., a perennial herbaceous medicinal plant commonly known as saffron and nicknamed "red gold" due to its exceptional value, the highest in the world. It is highly valued for its aroma, taste, color, and medicinal properties. In this work, we focused on a little-explored and undervalued part of the plant: *Crocus sativus* leaves.

The main objective of this research is to evaluate the antibacterial efficacy of different fractions and extracts of *C. sativus* leaves against hospital-acquired pathogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa*, a multi-resistant pathogenic bacterium, while highlighting the potential for valorization of saffron flower waste.

The results obtained reveal that the methanolic fraction of *C. sativus* leaves exerts significant antibacterial activity against *P. aeruginosa*, with inhibition zones ranging from 6.5 to 12 mm. Furthermore, this fraction exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) and a minimum bactericidal concentration (MBC), of approximately 75 mg/mL. Furthermore, bioautography revealed particularly interesting antibacterial activities, particularly for the butanol fraction, which generated inhibition zones between 10 and 12 mm.

These results confirm the importance of *Crocus sativus* leaves in the search for new therapeutic alternatives to combat bacterial infections, highlighting their promising potential.

**Keywords:** *Crocus sativus*, leaves, clinical infections, *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial activity, bioautography, bioactive substances.

## Résumé

Notre étude porte sur *Crocus sativus* L., une plante médicinale vivace herbacée communément appelée safran et surnommée « or rouge » en raison de sa valeur exceptionnelle, la plus élevée au monde. Très appréciée pour son arôme, son goût, sa couleur et ses propriétés médicinales. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une partie peu explorée et valorisée : les feuilles de *Crocus sativus*.

L'objectif principal de cette recherche est d'évaluer l'efficacité antibactérienne des différentes fractions et extrait des feuilles de *C. sativus* sur des souches pathogènes d'origine Hospitalière de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène multi-résistante, tout en soulignant le potentiel de valorisation des déchets floraux de safran.

Les résultats obtenus révèlent que la fraction méthanolique des feuilles de *C. sativus* exerce une activité antibactérienne significative contre *P. aeruginosa*, avec des zones d'inhibition allant de 6.5 à 12 mm. De plus, cette fraction présente une concentration minimale inhibitrice (CMI) et une concentration minimale bactéricide (CMB) de l'ordre 75 mg/mL. Par ailleurs, la bioautographie a mis en évidence des activités antibactériennes particulièrement intéressantes, notamment pour la fraction butanol, qui a généré des zones d'inhibition comprises entre 10 et 12 mm.

Ces résultats confirment l'importance des feuilles de *Crocus sativus* dans la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques pour lutter contre les infections bactériennes, soulignant ainsi leur potentiel prometteur.

**Mots clés :** *Crocus sativus*, feuilles, Infections cliniques, *Pseudomonas aeruginosa*, Activité antibactérienne, Bio autographie, Substances bioactives.

# Liste des abréviations

**FD** : Fraction de dichlorométhane

**FAe** : Fraction d'acétate étylé

**FAc** : Fraction d'acétone

**FBu** : Fraction de butanol

**FM** : Fraction de méthanol

**FA**: Fraction aqueuse

**EB**: Extrait brute

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**UV** : Ultra-Violet

**Rf** : Rapport frontal

## Liste des Figures

Figure 1: <i>Crocus sativus</i> L (Patin, 2023).....	1
Figure 2 : Feuilles de crocus sativus (Gitenay Eliane, s.d.) .....	2
Figure 3 : Feuilles de <i>Crocus sativus</i> récoltées (photos originale, 2025) .....	5
Figure 4 : Poudre des feuilles de safran (photo originale, 2025) .....	5
Figure 5 : Etape d'Ultrason (A) et macération (B) (photos originales, 2025).....	7
Figure 6 : Etape de filtration (C) et évaporation (D) (photos originales, 2025).....	7
Figure 7: Chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions. ....	12
Figure 8: Exemples de l'effet des extraits de feuilles de <i>Crocus sativus</i> sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
Figure 9: résultats de CMB d'extrait aqueux brute et fraction de méthanol .....	16
Figure 10 : Résultats de la bioautographie du <i>P. aeruginosa</i> .....	19
Figure 11 : Révélation de CCM des fractions FAe ; FAc ; FBu ; FM ; FA et l'extrait EB sous UV365. ....	19

## Liste des Tableaux

Tableau 1: Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne. ....	8
Tableau 2: Rendement en extrait sec de différents solvants de solubilité.....	13
Tableau 3 : Activité antimicrobienne des fractions FAe ; FA et FM et l'extrait EB des plantes de l'étude (diamètre d'inhibition en mm).....	14
Tableau 4 : CMI et CMB de l'extrait aqueux brut et fraction méthanolique du safran sur les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> testés. ....	15
Tableau 5 : Résultats de bioautographie du <i>P. aeruginosa</i> des différentes fractions FAe ; FAc ; FBU ; FM ; FA ; EB.....	17
Tableau 6: Résultats de RF des fractions d'acétate éthyle.....	25
Tableau 7: Résultats de RF des fractions d'acétone .....	25
Tableau 8: Résultats de RF des fractions de butanol .....	26
Tableau 9: CCM des fractions : de méthanol (EM) ; fraction aqueux (EA) et l'extrait aqueux brute EB sous UV 365.....	26

# **Sommaire**

ملخص

Abstract

Résumé

Partie I : Introduction générale .....01

Partie II : matériel et méthodes

1. Introduction ..... 5

2. Matière végétale ..... 5

2.1. Préparation de la matière végétale ..... 5

2.2. Délipidation à froid ..... 6

2.3. Préparation de l'extrait brut aqueux des feuilles du safran ..... 6

2.4. Préparation des fractions des feuilles du safran ..... 6

3. Activité antimicrobienne ..... 8

3.1. Préparation de l'inoculum ..... 8

3.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne ..... 8

3.2.1. Méthode des disques..... 9

3.2.2. Technique de microdilution : détermination de la CMI/CMB ..... 9

3.2.3. Bio autographie..... 10

3.2.3.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)..... 11

3.2.3.2. Test antibactérien en utilisant la bioautographie par immersion ..... 11

Résultats et discussion

1. Rendement du safran..... 13

2. Evaluation de l'activité antibactérienne ..... 13

1. Méthode de diffusion sur gélose ..... 13

2. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)..... 15

3. Bioautographie ..... 16

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexe

**Partie I**  
**Introduction générale**

L'usage des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique millénaire qui suscite aujourd'hui un renouveau d'intérêt parmi la population, et ce, malgré les avancées de la médecine moderne. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale recourent encore à la médecine traditionnelle pour traiter leurs problèmes de santé **(Bohui et al., 2018)**. Pour cela, la phytothérapie représente une discipline très exploitée dans le monde vue l'émergence des maladies de civilisation telles que le diabète, l'hypertension et le cancer d'un côté et les effets secondaires des antibiotiques et la résistance croissante des agents pathogènes d'un autre côté. Dans ce domaine, l'intérêt s'est récemment porté sur les extraits et composés bioactifs issus de plantes aromatiques et médicinales. Ces dernières sont employées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales **(Essawi & Srour, 2000)**.

Parmi ces plantes, le safran, *Crocus sativus* L. **(Figure 1)**, était traditionnellement utilisé comme remède par les anciennes civilisations arabes, indiennes et chinoises **(Bhandari, 2015)**. Cette plante herbacée vivace de la famille des Iridacées est largement cultivée en Iran, en Espagne, en Italie, au Maroc, en Azerbaïdjan, en France, en Grèce, en Chine, en Turquie, en Égypte, en Inde et en Algérie **(Lahmass et al., 2017 ; Belyagoubi-Benhammou et al., 2024)**.



**Figure 1:** *Crocus sativus* L **(Patin, 2023)**

Le safran est composé de plusieurs parties. Le bulbe (cormes) ovoïdes globuleux ; aplatis à la base jusqu' à diamètre d'environ 10–20 (25) mm, protégé par des tuniques brunes fibreuses réticulées. Les fleurs de cette plante sont automnales, au nombre de 1 à 6, lilas rosé pâle à bleu lilas profond ou bleu violacé, généralement légèrement veinées de plus foncé ; gorge blanche ou lilas, pubescente, possèdent 6 pétales de couleur mauve, 3 étamines (organe mâle) de couleur jaune. Le pistil (organe femelle), formé d'un style et de 3 stigmates rouges de 20 à 35 mm de longueur, qui constitue le safran comestible et utilisable dans le commerce (Saxena, 2010 ; Palomares, 2015). Pour les feuilles qui sont au nombre de 6 à 10 par corme, émergent verticalement. Elles apparaissent lors de la floraison, entre octobre et novembre. Ces feuilles présentent une couleur vert grisâtre, mesurent entre 0.5 et 1.5 mm de largeur, et peuvent être glabres ou légèrement rugueuses, avec des papilles présentes sur les bords de la carène et du limbe (Saxena, 2010 ; Palomares, 2015) (Figure 2).



**Figure 2 :** Feuilles de *crocus sativus* (Gitenay Eliane, s.d.)

L'étude de la composition chimique des feuilles de *C. sativus* est très limitée. Des études récentes ont montré la composition phytochimique des feuilles qui révèle la présence des composés phénoliques tels que les dérivés glycosylés de luteoline (luteoline-C-(O-cafféoyl-héxosyl)-O-héxoside) et de kaempferol (kaempférol 3,7-di-O-glucoside), flavonoïdes (comme myricétine, du kaempférol et de la quercétine),

tanins, xanthones, acides hydroxycinnamiques, triterpénoïdes, saponines, polysaccharides, des acides aminés tels que L-glutamine, isoleucine et L-phénylalanin, des acides carboxyliques ou organiques (l'acide citrique, l'acide fumarique, et l'acide malique), acides gras comme acide myristique, acide palmitique et acide linoléique, et des composées minérale tels que calcium, potassium, sodium, azote, fer et zinc, ainsi qu'une concentration élevée de fer (**Smolskaite et al., 2011 ; Lahmass et al., 2017 ; Jadouli et al., 2018 ; Mykhailenko et al., 2021**). Par ailleurs, un ensemble des auteurs ont souligné que les différents échantillons de feuilles de Crocus présentaient une composition chimique similaire, mais que la concentration de chaque composant variait. Ces variations de concentration au sein de chaque plante peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que les différences physiologiques, les conditions environnementales, les disparités géographiques, les facteurs génétiques ainsi que l'évolution (**Smolskaite et al., 2011 ; Mykhailenko et al., 2021**).

Les feuilles ont ainsi montré une excellente capacité antioxydante. Les teneurs en phénols et en flavonoïdes des matières végétales contribuent à prévenir les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, responsables de la dégradation des lipides alimentaires, et donc de leur valeur nutritionnelle, et de diverses maladies humaines (**Lahmass et al., 2017**). Les propriétés antioxydantes, en particulier la capacité anti-radicalaire libre, sont très importantes en raison de l'effet néfaste des radicaux libres provenant des aliments et des systèmes biologiques, exacerbant les dommages cellulaires et le vieillissement (**Ouahhoud et al., 2022**). Ces composés phénoliques jouent un rôle clé dans la capture des radicaux libres, l'inhibition des enzymes hydrolytiques et oxydatives et présentent des effets anti-inflammatoires (**Mykhailenko et al., 2021**). Un autre travail a montré que plusieurs activités des extraits hydroéthanoliques des feuilles. En effet, ces extraits présentent une activité antiradicalaire avec une concentration inhibitrice (CI<sub>50</sub>) de 101,5 µg/mL. Ils démontrent également une capacité de chélation du fer avec un pourcentage de 33,88% à dose de 500 µg/mL, ainsi qu'un pouvoir chélateur du cuivre de 71,50% à une dose de 500 µg/mL. Ces métaux, impliqués dans des réactions redox, génèrent des radicaux libres à l'origine du stress oxydatif, lequel cause des dommages cellulaires et favorise le développement de diverses pathologies telles que le cancer,

les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles neurodégénératifs et l'inflammation chronique.

La chélation de ces métaux permet de limiter leur activité redox et ainsi de réduire les dommages oxydatifs (**Ouahhoud et al., 2022**). Par ailleurs, les flavonoïdes contenus dans ces extraits, notamment le kaempférol, possèdent des effets génoprotecteurs naturels, susceptibles de diminuer le risque de cancer et d'autres maladies liées à l'exposition quotidienne aux xénobiotiques génotoxiques (**Garcia et al., 2019 ; Ouahhoud et al., 2022**). Une activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et aqueux des feuilles de *crocus sativus* a été mise en évidence in vitro contre plusieurs microorganismes, notamment *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus aureus* ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, soulignant ainsi leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens naturels. Les résultats actuels identifient et soulignent le potentiel des produits naturels issus des feuilles de *C. sativus* qui peuvent ajouter de la valeur à la production de safran.

Ce travail a pour objectif d'évaluer l'efficacité antibactérienne des extraits de feuilles de *Crocus sativus* sur des souches pathogènes d'origine clinique de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène multi-résistante, tout en soulignant le potentiel de valorisation des feuilles de safran.

Ce mémoire se compose principalement de trois parties. La première constitue une introduction générale portant sur les feuilles de *C. sativus*. La deuxième partie est consacrée à l'aspect expérimental, où seront détaillés le matériel et les méthodes employées pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de safran, ainsi que les résultats obtenus accompagnés de leur discussion. Enfin, ce travail se conclut par une conclusion générale qui synthétise l'ensemble de l'étude et met en lumière les perspectives ouvertes par cette recherche.

## **Partie II**

### **Matériel et Méthodes**

### 1. Introduction

L'ensemble des manipulations ont été réalisés dans le laboratoire de recherche des Produits naturels LAPRONA et le laboratoire physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition PPABIONUT, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen.

### 2. Matière végétale

*C. sativus* a été collecté durant le mois d'avril en 2025 dans le Djebel Zaafran de la Commune d'Ain Fezza (Tlemcen en Algérie). Le matériel végétal a été fourni par Pr. LOUKIDI Bouchra et M. Kamal CHOuari (**Figure 3**).



**Figure 3** : Feuilles de *Crocus sativus* récoltées (**photos originale, 2025**)

#### 2.1. Préparation de la matière végétale

Après la récolte, les feuilles de safran ont été séchées à température ambiante dans un endroit bien aéré. Une fois sèches, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine pour faciliter l'extraction (**Figure 4**).



**Figure 4** : Poudre des feuilles de safran (**photo originale, 2025**)

### 2.2. Délipidation à froid

80g de la poudre des feuilles de *C. sativus* a été délipidé par 800 mL d'hexane pendant 24h à la température ambiante. Après filtration et séchage, le marc a subi des lavages successifs par des solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétate éthyle, Acétone, butanol, méthanol, et l'eau).

### 2.3. Préparation de l'extrait brut aqueux des feuilles du safran

Après délipidation à froid de 30g de poudre des feuilles de safran avec l'hexane, le résidu sec est mélangé avec 300ml de l'eau distillé. L'ensemble est porté à l'ultrason à 20kHz et la température 35° C pendant 30 min. La macération se fait à 4°C pendant 48h. Après, la filtration et l'évaporation à sec par l'évaporateur rotatif à 50°, puis laisser dans l'étuve jusqu'à le séchage, l'extrait brut aqueux (EB) pesé est repuis dans l'eau.

### 2.4. Préparation des fractions des feuilles du safran

Le résidu sec a subi des extractions successives par les solvants : dichlorométhane, acétate d'éthyle, Acétone, butanol, méthanol, et l'eau en utilisant l'ultrason à 20kHz et la température 35° C pendant 30 min. Après macération de 48h, le mélange est filtré puis évaporé sous vide par un évaporateur rotatif à 50° puis dans étuve pour obtenir les fractions de dichlorométhane (FD), acétate éthyle (FAe), acétone (FAc), butanol (FBu), méthanol (FM), et l'eau (FA) (**Figures 5 et 6**).

#### ➤ Calcule du rendement

Les rendements en extrait brut ont été calculés par la formule suivante

(Drosou *et al.*, 2015) :

$$R (\%) = (\text{Masse en gramme de l'extrait sec après évaporation} / \text{Masse en gramme du matériel végétal à traiter}) * 100$$

R : Rendement exprimé en %.

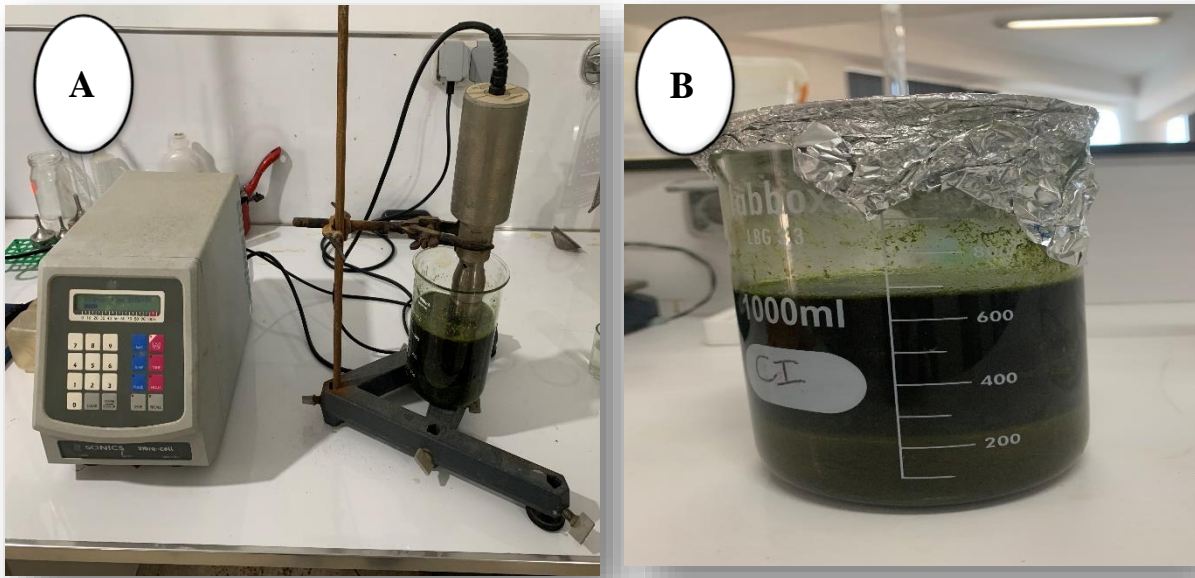


Figure 5 : Etape d'Ultrason (A) et macération (B) (photos originales, 2025)

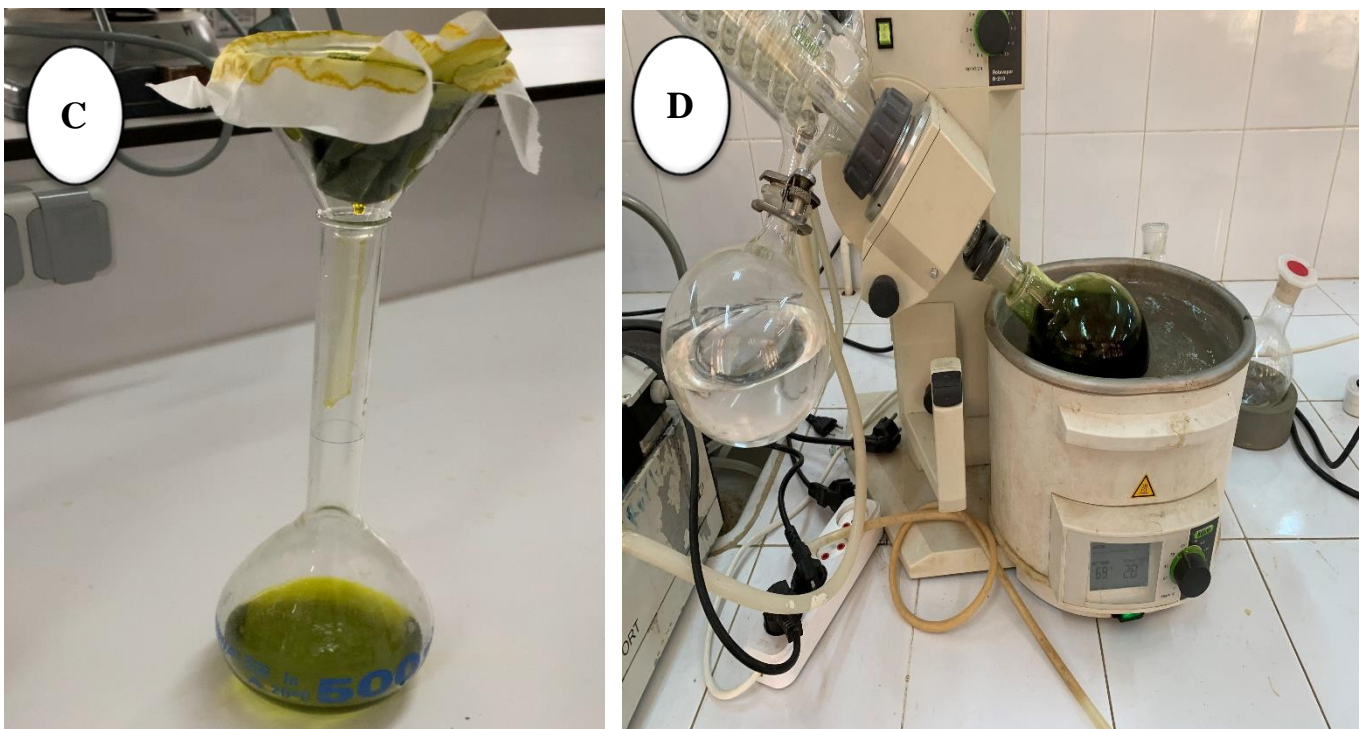


Figure 6 : Etape de filtration (C) et évaporation (D) (photos originales, 2025)

### 3. Activité antimicrobienne

#### 3.1. Souches testées

Dans le but de tester l'effet antimicrobien *in vitro* des extraits des feuilles du safran, des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolés des services au CHU de Tlemcen ont été testés (Tableau 1). Ces souches ont été fournies par Dr. BOUSSELHAM Ammara. Chef de service de Microbiologie du CHU Tlemcen/faculté de médecine de Tlemcen.

Les résultats de l'antibiogramme sont en Annexe 02

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

Souches bactériennes	Origine	Date d'isolement clinique
<i>P. aeruginosa</i> 1	crachats	06/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 2	Pus d'otorrhée	10/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 3	Pus d'infection de membres inferieur	11/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 4	Pus d'infection de membres inferieur	11/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 5	Pus de péritonite appendiculaire	12/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 6	Pus de plaie opératoire	17/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 7	Pus d'infection de fixateur externe	17/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 8	Pus de péritonite appendiculaire	20/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 9	Pus de péritonite appendiculaire	23/03/2025
<i>P. aeruginosa</i> 10	Urine	27/03/2025

#### 3.2. Préparation de l'inoculum

Les souches pathogènes ont étéensemencées dans des tubes de 10 mL du bouillon MH et incubées à 37°C pendant 24h, Afin d'obtenir une culture jeune permet d'atteindre une phase de croissance exponentielle. Après l'incubation la turbidité est ajustée selon le standard Mac Farland 0.5 à l'aide d'un colorimètre, ce qui est équivalent à  $\approx 10^8$  UFC/mL pour les bactéries (D.O =0.08 à 0.1 / 625 nm) (Wayne, 2002).

#### 3.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Trois méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits de feuilles de *C. sativus* :

- La méthode de diffusion à partir d'un disque de papier, qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents extraits.

- La méthode des microdilutions, qui a pour objectif la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture et des concentrations minimales bactéricides (CMB).
- La bioautographie par immersion, qui permet de tester l'activité antimicrobienne de différentes molécules actives des extraits.

### 3.2.1. Méthode des disques

Le teste est réalisé sur 3 différents fractions (**FAe** fraction d'acétate éthylye ; **FM** fraction méthanolique ; **FA** fraction aqueuse) et extrait aqueux brut (**EB**) de feuilles de plante. Pour cela, la gélose Mueller Hinton (MH) est coulée dans des boîtes de Pétri à une épaisseur de 4 mm (20 mL) etensemencée en surface par écouvillonnage (stries serrées recouvre la surface totalement sous forme tapie bactérienne) avec la suspension bactérienne préalablement ajustée à  $\approx 0.08-0.1$  de DO.

Un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre est imbibé de 10  $\mu$ L d'extrait (5 mg/disque). Deux disques pour chaque extrait, de plus un contrôle négatif de méthanol pour FM. Puis déposé à la surface de la géloseensemencée, l'ensemble est déposé à 4°C pendant environ 1h, puis incubé pendant 24h à 37 °C. Dès l'application des disques imprégnés, l'extrait se diffuse de façon homogène dans le milieu. Après 24h d'incubation, l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition autour des disques, où aucune croissance microbienne n'est observée, indique que les micro-organismes sont sensibles à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande plus le germe est sensible (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2019**).

### 3.2.2. Technique de microdilution : détermination de la CMI/CMB

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres d'inhibition de la croissance microbienne, à savoir la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), pour les extraits et leurs fractions.

La CMB correspond à la plus faible concentration d'extrait capable de tuer complètement les micro-organismes présents dans l'inoculum, tandis que la CMI est la concentration minimale d'extrait nécessaire pour empêcher la croissance bactérienne après une incubation à 37 °C durant 18 à 24 heures.

Pour cela, des dilutions en série sont réalisées dans une microplaque de 96 puits, couvrant une plage de concentrations définie. Dans un premier temps, 100µL de bouillon MH sont ajoutés dans chaque puits (remplissage de 12 puits des deux lignes de plaque).

Une solution mère des extraits (FM et EB) a été préparée en solubilisant 0.6g d'extrait dans 1mL DMSO 10% dilué. Puis une série de dilutions de raison géométrique 2 est réalisée extemporanément en DMSO à partir de la solution mère.

Nous ajoutons ensuite 100µL d'extrait dans le puits 3, puis dans le puits 4, avant de réaliser des dilutions en série successives en transférant 100µL du contenu du puits 4 dans le puits 5, et ainsi de suite jusqu'au 24<sup>ème</sup> puits, où les 100µL restants sont éliminés. 100 µL de suspension bactérienne sont ajoutés dans le puits 1 ainsi que dans les puits 3 à 24, afin d'obtenir un volume final de 200µL par puits et une concentration finale de micro-organismes de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Les microplaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24h. Après incubation à 37 °C pendant 24h, la croissance est comparée à celle du témoin.

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait. Pour déterminer la CMB, un volume de 10µL des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI a été prélevé etensemencé sur des milieux de culture gélose MH, puis incubé les boîtes à 37°C pendant 24h (**Belyagoubi *et al.*, 2021**).

### 3.2.3. Bio autographie

Cette méthode englobe l'ensemble des essais biologiques réalisés sur une matrice ayant d'abord subi une séparation par chromatographie planaire, telle que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPLC) ou encore la chromatographie planaire à pression optimisée (OPLC). Les tests biologiques utilisés peuvent être variés : ils incluent notamment des essais antibactériens, antifongiques, enzymatiques ou antioxydants, parmi lesquels les tests antibactériens et antifongiques sont les plus fréquemment employés. Intérêt de la bioautographie comparée aux autres techniques de réalisation de tests biologiques lors du screening de molécules actives contenues dans des mélanges complexes comme les extraits naturels. En effet, l'étape de chromatographie analytique va permettre de séparer les composés du mélange, chacun d'entre eux va donc pouvoir être testé séparément des autres (**Hilaire, 2021**).

### a. La chromatographie sur couche mince (CCM)

Les différents composés de l'extrait sont séparés à l'aide de CCM sur une plaque recouverte de gel de silice. Les extraits sont déposés sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve contenant l'éluant. Par capillarité, les composants de l'extrait migrent et se séparent le long de la plaque jusqu'à atteindre la ligne d'arrivée, moment où la plaque est retirée de la cuve (**Figure 7**). Les éluants utilisés sont :

- Acétate d'éthyle/acide formique/eau distillée/acide acétique : (100 /11 /11 /27) (V/V/V/V) pour les fractions FAe ; FAc ; FBu.

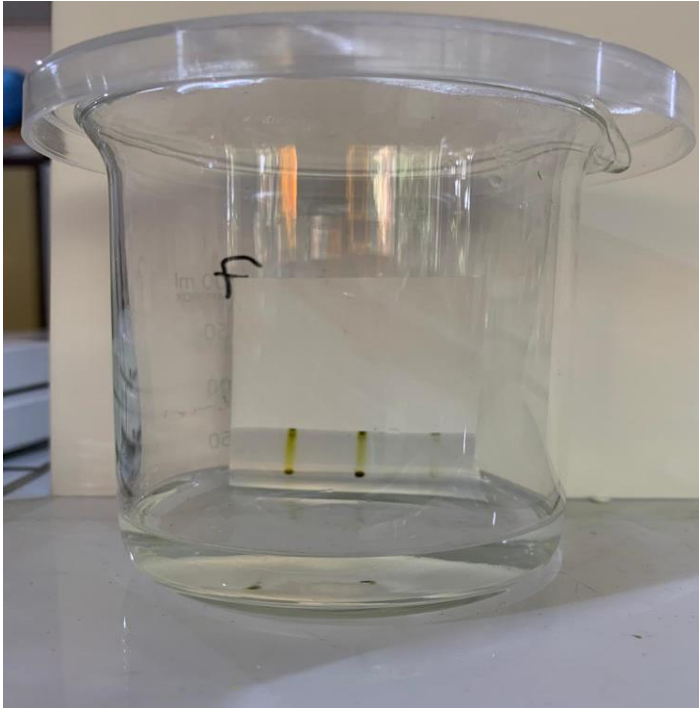
- n-butanol/acide acétique/eau distillée : (10/2/8) (V/V/V) pour FA, EB et EM.

Après le développement, le rapport frontal (Rf) est calculé en divisant la distance parcourue par un composé par la distance totale parcourue par le solvant.

### b. Test antibactérien en utilisant la bioautographie par immersion

Les plaques développées sont placées en contact avec une gélose préalablementensemencée de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui permet aux composés séparés de l'extrait de diffuser dans l'agar. Cette couche d'agar fournit les nutriments nécessaires à la bactérie tout en la protégeant de la dessiccation, garantissant ainsi des conditions optimales pour sa survie. La plaque reste en contact avec la gélose pendant toute la durée de l'incubation, réalisée à 37 °C pendant 24 heures, afin de permettre l'apparition des zones d'inhibition.

Après ce temps de contact, la zone d'inhibition se manifeste, ce qui permet de déterminer le coefficient de rétention (Rf) des molécules actives. Ces dernières peuvent ensuite être purifiées (**Hilaire, 2021**).



**Figure 5:** Chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions.

## **Résultats et discussion**

### 1. Rendement du safran

Après évaporation à sec sous pression réduite, on a obtenu un extrait verdâtre, d'un aspect pâteux et d'une odeur caractéristique de chaque plante. Le rendement est déterminé par rapport à 80 g de matériel végétal sec pour les fractions et 30 g pour l'extrait aqueux brute. Il est exprimé en pourcentage. Les résultats du rendement des différents extraits pour les plantes étudiées sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Rendement en extrait sec de différents solvants de solubilité

Fraction ou extrait	Rendement %
Fraction de dichlorométhane	0.50
Fraction d'acétate éthyle	1.11
Fraction d'acétone	0.52
Fraction de butanol	0.15
Fraction de méthanol	7.78
Fraction aqueuse	ND
Extrait aqueux brut	<b>73.87</b>

**ND :** non déterminé

Le rendement en extrait varie considérablement selon le solvant utilisé, reflétant à la fois leur capacité d'extraction et la polarité des composés extraits. L'extrait brut aqueux présente le rendement le plus élevé avec 73.87 %, ce qui montre qu'une grande partie des composés solubles dans l'eau est extraite. Vient ensuite la fraction méthanolique, avec un rendement de 7.78%, démontrant son efficacité pour extraire les composés polaires. Les autres fractions affichent des rendements très faibles, compris entre 0.5% et 1.11%. Le rendement de la fraction aqueuse obtenue après séparation n'est pas déterminé (ND), ce qui pourrait s'expliquer par des pertes lors de la manipulation.

### 2. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 1. Méthode de diffusion sur gélose

L'étude de l'activité antibactérienne des différentes fractions et l'extrait aqueux brute vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné. Les diamètres des zones d'inhibition

obtenus avec les souches suscitée (**Tableau 3**) varient de 0 mm à 12mm selon la souche et l'extrait testé (**Figure 8**).

**Tableau 3** : Activité anti-*Pseudomonas* des fractions et de l'extrait du Safran

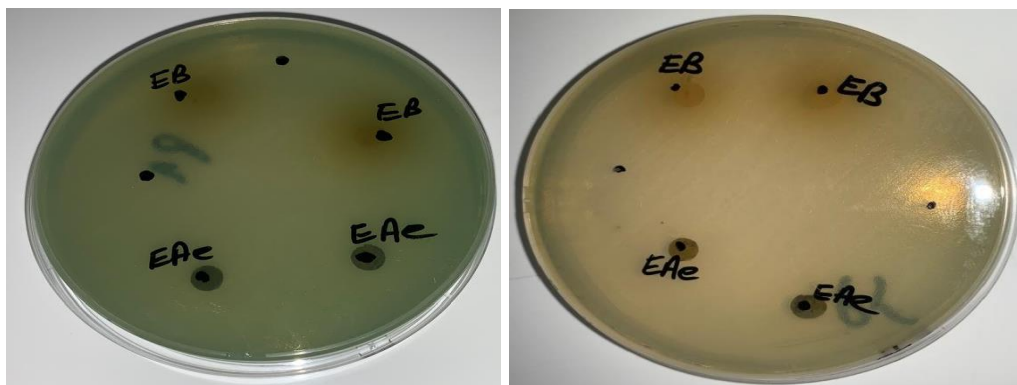
Extraits 5(mg/Disque)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<b>FAe</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>EB</b>	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
<b>FA</b>	6.5	6.5	<b>8</b>	6.5	6.5	<b>8</b>	6.5	6.5	6.5	6.5
<b>FM</b>	<b>7</b>	0	<b>8</b>	<b>12</b>	0	3	5	0	0	0

Les valeurs des zones d'inhibition : demi-diamètre du zone + disque.

P : *P. aeruginosa* ; FAe : Fraction d'acétate éthyle ; FA : Fraction aqueuse ; FM : Fraction méthanolique ; EB : Extrait brut aqueux.

La fraction méthanolique (FM) s'est distinguée par une activité antibactérienne très variable, avec un diamètre d'inhibition maximal de 12 mm observé sur la souche P4. D'autres souches ont présenté des zones d'inhibition plus modestes, comprises entre 3 et 8 mm, tandis que certaines sont restées totalement résistantes, sans aucune inhibition (0 mm).

La fraction aqueuse (FA) et l'extrait aqueux brut (EB) a montré une activité faible, les diamètres d'inhibition varie de de 6,5 à 8 mm sur l'ensemble des isolats testés. la fraction d'acétate d'éthyle (FAe) n'a présenté aucune activité antibactérienne, avec un diamètre d'inhibition nul (0 mm) pour toutes les souches, indiquant une résistance totale.



**Figure 6**: Exemples de l'effet des extraits de feuilles de *Crocus sativus* sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats (Mykhailenko *et al.*, 2021) de la méthode de diffusion en puits d'agar d'extrait aqueux (10 mg/mL), ont montré une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition  $15.40 \pm 0.27$  mm.

### 2. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB)

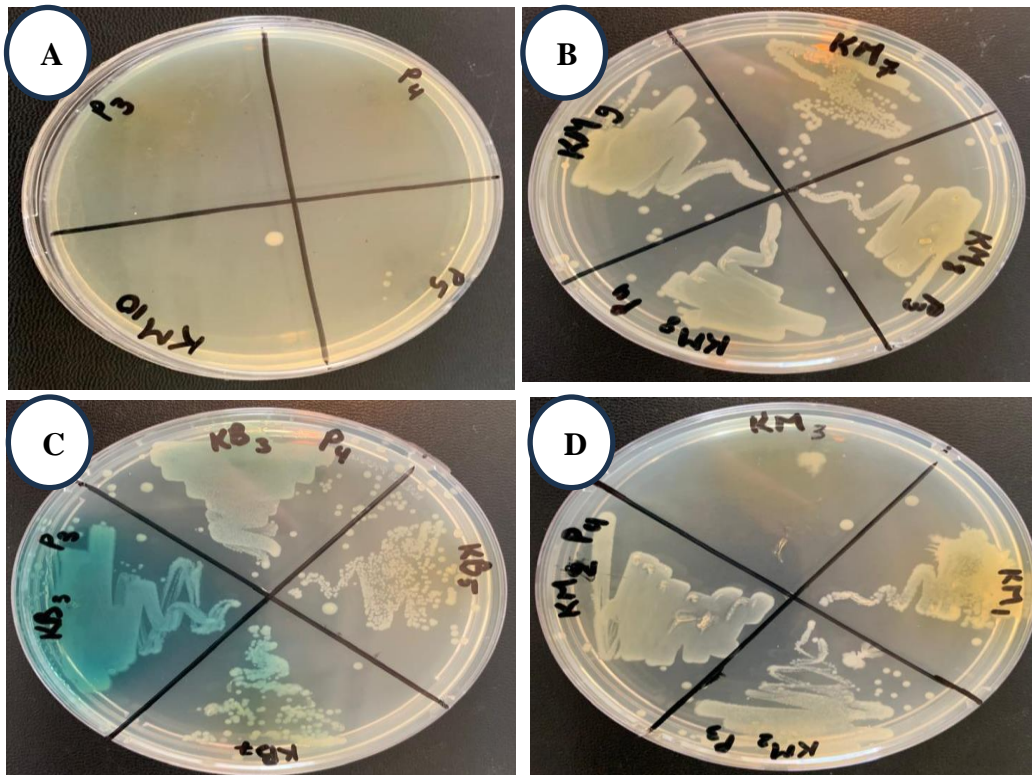
D'après les résultats de **tableau 4** les valeurs de la CMI et la CMB sont comprises entre 75 mg/mL et >300 mg/mL et (**Figure 9**).

**Tableau 4 :** CMI et CMB de l'extrait aqueux brut et fraction méthanolique du safran sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* testés.

	Extrait aqueux brute		Fraction méthanolique	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<b>P1</b>	100	>100	300	>300
<b>P2</b>	<b>50</b>	>100	150	>300
<b>P3</b>	<b>50</b>	>100	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>P4</b>	100	>100	300	>300
<b>P5</b>	100	>100	150	>300
<b>P6</b>	>100	>100	300	>300
<b>P7</b>	100	>100	300	>300
<b>P8</b>	<b>50</b>	>100	150	>300
<b>P9</b>	>100	>100	300	>300
<b>P10</b>	100	>100	<b>75</b>	<b>75</b>

Pour activité de l'extrait brut aqueux: la CMI varie entre 50 et >100 mg/mL. Les meilleures activités (CMI = 50 mg/mL) sont observées contre P2, P3 et P8, indiquant une inhibition modérée. Cependant, pour les autres souches, la CMI atteint 100 mg/mL voire >100 mg/mL (P6, P9), montrant une faible activité inhibitrice. La CMB est >100 mg/mL pour toutes les souches, ce qui signifie que l'extrait brut n'est pas bactéricide aux concentrations testées.

Quant à la fraction méthanolique, elle montre une activité encore plus faible, avec des CMI comprises entre 75 et 300 mg/mL. Une meilleure inhibition pour P10 (75 mg/mL). Pour les autres souches, la CMI varie 150 et 300 mg/mL, indiquant une activité très faible. CMB est >300 mg/mL sauf pour P10 (75 mg/mL), ce qui indique seule la fraction méthanolique est bactéricide contre la souche P10.



**Figure 7:** Résultats de CMB d'extrait aqueux brute et fraction de méthanol (A :Souche 10 ; B souche 7 ;8 ;9 ; C souche 3 ;5 ;7 ;D souche 1 ;2 ;3 )

Selon (Mykhailenko *et al.*, 2021) l'extrait aqueux des feuilles de *C. sativus* montré une activité inhibitrice contre *P. aeruginosa* avec un CMI de 500µg/mL.

D'après (Zaazaa *et al.*, 2021). Les résultats de la méthode de dilution du bouillon ont montré que l'extrait aqueux marocain de *C. sativus* avait une valeur de CMI de 62,5 mg/mL et CMB de 125 mg/mL. Cependant que l'extrait aqueux italien de *C. sativus* avait une valeur de CMI 125mg/ml et CMB de 125 mg/mL, dans lesquelles ont confirmée l'effet bactéricide de cette plante.

### 3. Bioautographie

Cette partie du travail vise à montrer la présence ou l'absence d'une activité antibactérienne, des 5 différentes fractions FAe ; FAc ; FBu ; FM ; FA et l'extrait EB. Après incubation de la bioautographie par immersion. Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont présentés dans le tableau 5. Une variation notable a été observée, avec des diamètres allant de 1 mm à 12 mm (Figure 10 et 11).

## Résultats et discussion

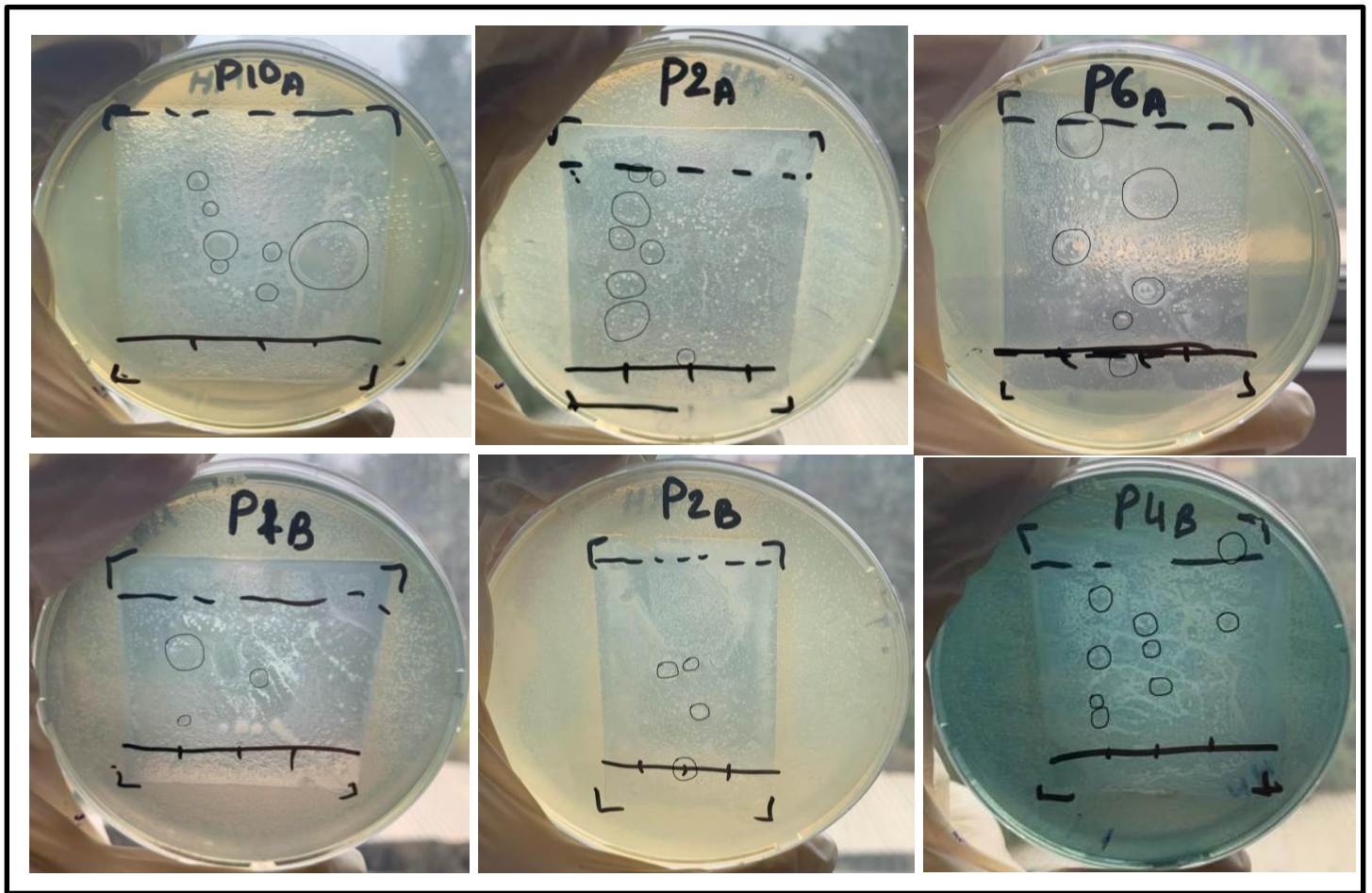
**Tableau 5** : Résultats de bioautographie du *P. aeruginosa* des différentes fractions FAe ; FAc ; FBu ; FM ; FA ; EB.

Fraction de butanol (FBu)				Fraction aqueuse (FA)				Extrait brute (EB)			
Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition/Souche	Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition/Souche	Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition/Souche
Tache 1	0	rose	2 mm(P5)	Tache 1	0	bleu	2 mm (P3; P5 ; P2) 6 mm (P9)	Tache 1	0	bleu	2 mm (P3) <b>8 mm (P9)</b>
Tache 2	0.48	bleu	<b>12 mm (P10)</b>	Tache 2	0.45	bleu foncé	4 mm (P6)	Tache 2	0.56	bleu clair	2 mm (P9)
Tache 3	0.59	bleu	<b>12 mm (P8)</b>	Tache 3	0.55	bleu jaune	2 mm(P4)	Tache 3	1	jaune	6 mm (P4)
Tache 4	1	rose	<b>10 mm (P9)</b>	Tache 4	0.66	bleu foncé	2 mm (P1) 4 mm (P4)	Tache 4			
				Tache 5	0.82	bleu	6 mm (P5)				
Fraction d'acétate éthyle (FAe)				Fraction d'acétone (FAc)				Fraction méthanolique (FM)			
Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition/Souche	Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition/Souche	Taches	Rf	Couleur	Zone d'inhibition /Souche
Tache 1	0	rose	2 mm (P7) 4mm (P7)	Tache 1	0	rose rouge	2 mm (P2; P3; p5) 4 mm (P6)	tache1	0	bleu	2 mm(P5) 6 mm (P9)
Tache 2	0.24	rose bleu	6 mm (P2) 2 mm (P4)	Tache 2	0.2	rose	2 mm (P10)	tache2	0.17	rose	1 mm (P3) 2 mm (P5; P4)
Tache 3	0.27	rose bleu	2 mm (P7)	Tache 3	3	rose bleu	2 mm (P1 ; P5)	tache3	0.4	marron	6 mm (P9)
Tache 4	0.45	rose bleu	4 mm (P2; P10)	Tache 4	0.42	rose	1 mm (P10)	tache4	0.47	marron	6 mm (P2)
Tache 5	0.47	rose bleu	6 mm (P6)	Tache 5	0.5	rose clair	2 mm (P1)	tache5	0.53	rose	2 mm (P4)
Tache 6	0.56	rose clair	4 mm (P2)	Tache 6	0.66	rose	6 mm (P6)	tache6	0.63	bleu	6 mm (P1)
Tache 7	0.68	rose clair	1 mm (P10)	Tache 7	0.82	rose foncé	4 mm (P8)2	tache7	0.81	rose clair	2 mm (P4)
Tache 8	0.84	rose clair	4 mm (P2)	Tache 8	0.9	rose clair	2 mm (P1 ; P3)				
Tache 9	0.94	rose clair	2 mm (P1) 8 mm (P6)	Tache 9	1	couleur complexe	2 mm (P9)				
Tache 10	1	couleur complexe	2 mm (P2;P3) 8 mm (P9)								

La fraction butanolique (FBu) est la plus active contre *P. aeruginosa*, notamment aux taches 2 (Rf = 0,48 ; couleur bleue) et tache 3 (Rf = 0,59, bleu), avec des zones d'inhibition importantes de 12 mm, indiquant une activité très marquée (respectivement notées P10 et P8). La tache 4 (Rf = 1, rose) présente également une inhibition significative de 10 mm (P9).

L'extrait brut (EB) suit en termes d'efficacité, avec une inhibition de 8 mm pour la tache 2 (Rf = 0,56, bleu clair) et de 6 mm pour la tache 3 (Rf = 1, jaune), notée P9 et P4 respectivement. Par ailleurs, certaines taches issues de la fraction acétate d'éthyle (FAe) montrent une activité modérée, avec des zones d'inhibition de 6 mm pour les taches 2 (Rf = 0,24) ; 4 (Rf = 0,45) et 8 (Rf = 0,86), toutes notées P2. Enfin, les autres fractions (FM, FAc, FAq) présentent une activité antibactérienne plus modérée à faible contre *P. aeruginosa*.

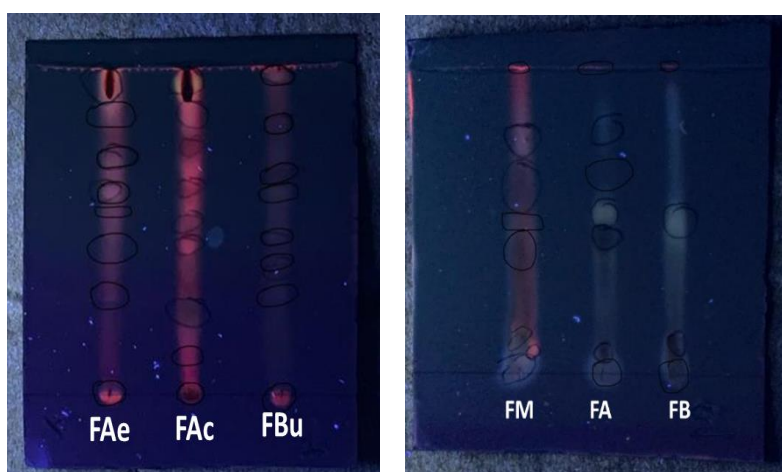
Les résultats (**Situmorang et al., 2022**) d'une étude sur l'inhibition de la croissance bactérienne ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Morinda citrifolia L.* produisait des zones d'inhibition contre la bactérie *Propionibacterium acnes*, avec des diamètres moyens variant de 8,36 mm à 11,1 mm. En comparaison avec nos résultats, nos résultats des diamètres de zones d'inhibition apparaissent particulièrement intéressants.



**Figure 8** : Résultats de la bioautographie du *P. aeruginosa*

A : fraction d'acetate éthyl (EAe) ; fraction d'acétone (EAc) ; fraction de butanol (EBu)

B : fraction de méthanol (EM) ; fraction aqueuse (EA) ; extrait aqueux brute (EB)



**Figure 9** : Révélation de CCM des fractions FAe ; FAc ; FBu ; FM ; FA et l'extrait EB sous UV365.

## **Conclusion et perspectives**

L'objectif de cette étude est non seulement d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de *Crocus sativus* contre la bactérie pathogène responsable des infections mortelles *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi pour mettre en évidence l'intérêt des déchets floraux de safran pour une valorisation.

Les résultats de ce présent travail démontrent que la fraction méthanolique des feuilles *C. sativus* présente un effet antibactérien considérable sur *P.aeruginosa* avec une zone d'inhibition allant de 6.5 à 12 mm, de plus un effet inhibiteur avec CMI de 75 mg/mL et effet bactéricide avec 75 mg/mL. Cependant les résultats de la bioautographie ont montré des activités antibactériennes très intéressantes, surtout la fraction de butanol (zone d'inhibition 10 à 12 mm).

Cette recherche suggère que les feuilles de *Crocus* peuvent également être utilisées comme une source végétale précieuse de molécules bioactives naturelles pour développer de nouveaux ingrédients alimentaires et pharmaceutiques fonctionnels, avec le potentiel non seulement de promouvoir la santé humaine mais aussi d'améliorer la biovalorisation du safran.

Comme perspective, il serait intéressant d'étendre l'éventail de ce travail et de réaliser les points suivants:

- Etudier la composition phytochimique des extraits actifs et identifier les principes actifs responsables des activités biologiques pour mieux comprendre leur mode d'action.
- Etudier d'autres propriétés biologiques telles que l'activité antimicrobienne contre d'autres souches pathogènes et les virus, anti-inflammatoires et antidiabétiques.
- Elargir la gamme des souches microbiennes en se basant sur d'autres souches cliniques.
- Faire des tests *in vivo* afin de confirmer ou d'infirmer les activités biologiques attribuées à cette plante.
- Utiliser d'autres techniques d'extraction et de purification de molécules bioactives.

# Références bibliographique

- Belyagoubi , L., Loukidi, B., Belyagoubi-Benhammou , N., Gismondi, A., Di Marco, G., D'Agostino, A., & Atik-Bekkara, F. (2021).** Valorization of Algerian saffron: Stigmas and flowers as source of bioactive compounds. *Waste and Biomass Valorization*, 12(12), 6671-6683.
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Gismondi, A., Di Marco, G., Canini, A., & Atik Bekkara, F. (2019).** GC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of alkaloids extracted by polar and apolar solvents from the stems of *Anabasis articulata*. *Medicinal Chemistry Research*, 28, 754–767.
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Loukidi, B., Mir, M. A., Assadpour, E., Boudghene-Stambouli, M., & Jafari, S. M. (2024).** 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*, 64(23), 8399-8413.
- Bhandari, P. R. (2015).** *Crocus sativus* L.(saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 5(2), 81-87.
- Bohui, P. G., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46, 50-58.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015).** A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 343-349
- Garcia Forero, A., Villamizar Mantilla, D. A., Nunez, L. A., Ocazonez, R. E., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2019).** Photoprotective and antigenotoxic effects of the flavonoids apigenin, naringenin and pinocembrin. *Photochemistry and photobiology*, 95(4), 1010-1018.
- Gitenay Eliane. (s.d).** Le safran de Ferrat. Récupéré sur ferme en ville: <https://www.fermeenville.fr/les-d%C3%A9pots-vendeurs/le-safran/>
- Hilaire, V. (2021).** L'HPTLC-Bioautographie dans la recherche de composés actifs dans les extraits
- Jadouali, S. M., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., ... & Mamouni, R. (2018).** Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves. *J. Mater. Environ. Sci*, 9(1), 113-118.
- Lahmass, I., Lamkami, T., Delporte, C., Sikdar, S., Van Antwerpen, P., Saalaoui, E., & Megalizzi, V. (2017).** The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds. *Journal of Functional Foods*, 35, 341-351.

- Mykhailenko, O., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Sidorenko, L., Lesyk, R., et Georgiyants, V. (2021).** Caractérisation des composants phytochimiques des feuilles de *Crocus sativus* : un nouveau sous-produit attractif. *Scientia Pharmaceutica*, 89 (2), 28. <https://doi.org/10.3390/scipharm89020028>
- Ouahhoud, S., Khoulati, A., Kadda, S., Bencheikh, N., Mamri, S., Ziani, A., Baddaoui, S., Eddabbeh, F.-E., Lahmass, I., Benabbes, R., Addi, M., Hano, C., Asehrou, A., & Saalaoui, E. (2022).** Antioxidant Activity, Metal Chelating Ability and DNA Protective Effect of the Hydroethanolic Extracts of *Crocus sativus* Stigmas, Tepals and Leaves. *Antioxidants*, 11(5), 932. <https://doi.org/10.3390/antiox11050932>
- Palomares, C. (2015).** Le safran, précieuse épice ou précieux médicament. (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Patin, J. (2023).** *Le safran, origine, histoire, qualité, cuisine*. Récupéré sur <https://safrandesaulnes.fr/le-safran-origine-qualite-cuisine/#prettyPhoto>
- Saxena, R. B. (2010).** Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus sativus* series. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 31(3), 374-381.
- Situmorang, R. S., Nasution, H. M., Lubis, M. S., & Rahayu, Y. P. (2022).** Bioautographic Analysis And Antibacterial Activity Test Of Mengkudu Leaf (*Morinda Citrifolia* L.) Ethanol Extract On The Bacteria *Propionibacterium Acnes*. *International Journal of Health and Pharmaceutical*, 3(1), 173–177. <https://doi.org/10.51601/ijhp.v3i1.129>
- Smolskaite, L., Talou, T., Fabre, N., & Venskutonis, P. R. (2011, May).** Valorization of saffron industry by-products: Bioactive compounds from leaves. In *Innovations for Food Science and Production, Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2011, Jelgava, Latvia* (pp. 5-6).
- Wayne, P. A. (2002).** National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing*, 12, 01-53.
- Zaazaa, L., Naceiri Mrabti, H., Ed-Dra, A., Bendahbia, K., Hami, H., Soulaymani, A., & Ibriz, M. (2021).** Determination of mineral composition and phenolic content and investigation of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Crocus sativus* L. aqueous stigmas extracts. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2021(1), 7533938.

# Annexe

## Annexe 01 : Préparation de milieu de culture Mueller Hinton (MH)

### ➤ Le bouillon

- Poudre de bouillon Mueller Hinton ..... 6.3g
- Eau distillé ..... 300 ml

### ➤ La gélose

- Poudre de bouillon Mueller Hinton ..... 21g
- Agar ..... 15g
- Eau distillé ..... 1L

## Annexe 02 : Antibiogramme des souches testées

souche/antibiotique	Tic	Tcc	Caz	Amk	Ipm	Gen	Tob	P.P	Cip	Lvx
<i>P. aeruginosa 1</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
<i>P. aeruginosa 2</i>	I	R	S	S	/	S	S	/	S	S
<i>P. aeruginosa 3</i>	I	I	S	S	/	R	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa 4</i>	I	I	S	S	/	R	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa 5</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa 6</i>	I	I	S	S	S	S	S	S	S	/
<i>P. aeruginosa 7</i>	R	R	S	S	/	S	/	S	S	S
<i>P. aeruginosa 8</i>	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa 9</i>	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>P. aeruginosa 10</i>	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R

**R** : résistante ; **S** : sensible ; **I** : intermédiaire

**Tic** : Ticarcilline ; **Tcc** : Ticarcilline+ acide clorulonique ; **P.P** : Pipérouline ; **Caz** : Ceftazidime ; **Ipm** : Imipénème ; **Amk** : Amikacine ; **Gen** : Gentamycine ; **Tob** : Tobramycine ; **Cip** : Ciprofloxacine ; **Lvx** : Levofloxacine.

Annexe 03 :

**Tableau 6:** Résultats de RF des fractions d'acétate éthyle

RF365	FAe1	FAe2	FAe3
Tache 1	$1,9/3,6 = 0,53$	$0,1/4,4 = 0,02$	$0,1/3,9 = 0,02$
Tache 2	$3,1/3,6 = 0,86$	$2,7/4,4 = 0,61$	$0,7/3,9 = 0,18$
Tache 3	$3,3/3,6 = 0,92$	$3,2/4,4 = 0,73$	$1,9/3,9 = 0,49$
Tache 4	$3,5/3,6 = 0,97$	$4,2/4,4 = 0,95$	$2,4/3,9 = 0,62$
Tache 5	-----	----	$3,4/3,9 = 0,87$
Tache 6	-----	----	$3,5/3,9 = 0,89$
Tache 7	-----	----	$3,8/3,9 = 0,97$

**Tableau 7:** Résultats de RF des fractions d'acétone

RF365	FAc1	FAc2	FAc3
Tache 1	$0,1/3,6 = 0,03$	$0,1/4,4 = 0,02$	$0,1/3,9 = 0,02$
Tache 2	$0,3/3,6 = 0,08$	$1,1/4,4 = 0,25$	$0,6/3,9 = 0,15$
Tache 3	$0,5/3,6 = 0,14$	$2/4,4 = 0,45$	$2/3,9 = 0,51$
Tache 4	$1,3/3,6 = 0,36$	$2,3/4,4 = 0,52$	$3,2/3,9 = 0,82$
Tache 5	$2/3,6 = 0,55$	$2,8/4,4 = 0,64$	$3,4/3,9 = 0,87$
Tache 6	$2,6/3,6 = 0,72$	$3,3/4,4 = 0,75$	$3,7/3,9 = 0,94$
Tache 7	$3,2/3,6 = 0,88$	$3,7/4,4 = 0,84$	-----
Tache 8	$3,5/3,6 = 0,97$	$4,1/4,4 = 0,93$	-----

**Tableau 8:** Résultats de RF des fractions de butanol

RF365	FBu1	FBu2	FBu3
Tache 1	1,5/3,6=0,42	0,1/4,4=0,02	0,9/3,9=0,23
Tache 2	2,1/3,6=0,58	1,6/4,4=0,36	1,9/3,9=0,49
Tache 3	2,5/3,6=0,69	2,1/4,4=0,47	3,1/3,9=0,79
Tache 4	3,2/3,6=0,88	2,9/4,4=0,65	3,7/3,9=0,95
Tache 5	3,5/3,6=0,97	3,7/4,4=0,84	-----
Tache 6	-----	-----	-----

**Tableau 9:** CCM des fractions : de méthanol (EM) ; fraction aqueux (EA) et l'extrait aqueux brute EB sous UV 365.

RF 365	EM	EA	EB
Tache01	0/3,8= 0	0/3,8= 0	0/3,8= 0
Tache02	0,3/3,8= 0,08	0,03/3,8= 0,07	0,4/3,8= 0,11
Tache03	0,5/3,8= 0,13	1,7/3,8=0,45	1,9/3,8=0,5
Tache04	1,7/3,8= 0,45	2,1/3,8= 0,55	3,8/3,8= 1
Tache05	2,4/3,8= 0,63	3,1/3,8= 0,81	-----
Tache06	3/3,8= 0,79	3,8/3,8= 1	-----
Tache07	3,8/3,8= 1	-----	-----