

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Spécialité : Microbiologie Fondamentale.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

Recherche de nouvelles molécules actives vis-à-vis des bactéries multi-résistantes.

Présenté par :

**ATROUN Yasmine & GHERBI Yasmine**

Soutenu le : 15 septembre 2021

Devant le jury composé de :

Mme GHAROUT A.

Mr. DJOUDI F.

Mme BOUCHERBA N.

MCA

MCA

Prof.

Présidente

Encadreur

Examinatrice

**Année universitaire : 2020/2021**

## **Remerciements**

*Ce* manuscrit, est le fruit des efforts conjoints de plusieurs personnes autour de nous qui nous ont formés et nous ont apporté leur aide et leur soutien.

On voudrait remercier en premier lieu notre promoteur Monsieur Djoudi F. pour tout ce qu'il nous a appris. Au-delà de l'apprentissage, on le remercie pour l'ambiance dans laquelle nous avons travaillé, pour son élan communicatif et son humour. On le remercie également pour sa disponibilité, sa gentillesse et son soutien.

*Veillez recevoir le témoignage de notre profond respect.*

Madame GHAROUT A, on vous remercie de nous avoir fait honneur par votre présence en qualité de présidente du jury. Nos remerciements ne s'arrêtent pas au cadre de ce mémoire et remontent le temps, à l'époque où nous étions vos étudiantes, on découvrirait enfin des cours qui nous intéressaient. On vous remercie d'avoir fait naître cet intérêt et de l'avoir nourrit.

*Recevez l'assurance de notre reconnaissance et de notre profond respect.*

Madame BOUCHERBA N, nous tenons à vous remercier pour le temps consacré à la lecture de notre travail et pour le plus que vous apportez en l'examinant.

*Veillez trouver ici, le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.*

Monsieur Madaoui M, notre co-promoteur, nous tenons à vous écrire un « Merci » sincère pour votre soutien et vos conseils tout au long de cette année qu'on a partagé avec vous...

*« Un encadrement exceptionnel » nous serons toujours reconnaissantes envers vous.*

On voudrait également remercier les responsables des laboratoires du Campus ABOUDAOU pour leur accueil au sein du laboratoire de Microbiologie.

Nos remerciements les plus sincères au personnel du musée du Parc National de Gouraya, au sein duquel nous avons effectué notre échantillonnage, pour leur accueil et leur aide.

## *Dédicaces*

*À nos chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de nos études,*

*À nos frères et sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*À tous nos amis,*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*« Il n'y a rien de plus précieux que de voir la fierté dans les yeux des gens qu'on aime. »*

*Jasmine.*

## Liste des abréviations

**A.baumannii** : *Acinetobacter baumannii*.

**BMR** : Bactérie multi-résistante.

**BCG** : Vaccin de Calmette-Guérin.

**BMR** : Bactérie multi-résistante.

**BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi.

**ECDC** : European Centre for Disease Prevention and Control

**ED** : Eau distillée.

**EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragiques.

**ERG** : Entérocoque résistant aux glycopeptides.

**ERV** : Entérocoque résistant à la vancomycine.

**FB** : Fraction au butanol.

**FCH** : Fraction au chloroforme.

**FEA** : Fraction à l'éthylacétate.

**FED** : Fraction à l'eau distillée.

**FH** : Fraction à l'hexane.

**FMA** : Macération à l'acétone des feuilles.

**FME** : Macération éthanolique des feuilles.

**FMH** : Macération à l'hexane des feuilles

**FMM** : Macération méthanolique des feuilles.

**GMA** : Macération à l'acétone des graines.

**GME** : Macération éthanolique des graines.

**E. citriodora** : *Eucalyptus citriodora*.

**E. coli** : *Escherichia coli*.

**EAggEC** : *Escherichia coli* enteroaggregative.

**EBLSE** : Entérobactérie productrice de Bétalactamase à spectre élargi.

**GMH** : Macération à l'hexane des graines.

**GMM** : Macération méthanolique des graines.

**MH**: Mueller Hinton

**mPAM** : peptidomimétique.

**Pays du groupe BRICS** : Les pays regroupant le Brésil, la Russie, l'Inde, la Chine et l'Afrique du Sud.

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

**PAM** : Peptide antimicrobien.

**S. aureus** : *Staphylococcus aureus*.

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

**SARM-C** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline d'origine communautaire.

**SARM-H** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline d'origine hospitalière.

**SHU** : Le syndrome hémolytique et urémique.

**STEC** : *Escherichia coli* producteur de shigatoxines.

**stx** : Shiga toxine.

**TMF** : Transplantation du microbiote fécal.



## Liste des tableaux

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|----------------|--|-------------|
| <b>I</b>       | Propriétés des solvants d'extraction.  | <b>19</b>   |
| <b>II</b>      | Poids des graines et des feuilles fraîches et après séchage.   | <b>26</b>   |
| <b>III</b>     | Rendement obtenu après extraction par macération.  | <b>26</b>   |
| <b>IV</b>      | Rendement du fractionnement réalisé sur l'extrait méthanolique de la graine d' <i>Eucalyptus citriodora</i> .        | <b>27</b>   |
| <b>V</b>       | Résultats des tests d'activité de l'extrait méthanolique des feuilles et des graines d' <i>Eucalyptus citriodora</i> | <b>28</b>   |
| <b>VI</b>      | Résultats des tests d'activité de l'extrait éthanolique des feuilles et des graines d' <i>Eucalyptus citriodora</i>  | <b>29</b>   |
| <b>VII</b>     | Résultats des tests d'activité de l'extrait à l'acétone des feuilles et des graines d' <i>Eucalyptus citriodora</i>  | <b>30</b>   |
| <b>VIII</b>    | Résultats des tests d'activité de l'extrait à l'héxane des feuilles et des graines d' <i>Eucalyptus citriodora</i> . | <b>31</b>   |
| <b>IX</b>      | Résultats des tests d'activité des fractions de l'extrait méthanolique de la graine d' <i>Eucalyptus citriodora</i>  | <b>33</b>   |
| <b>X</b>       | Diamètre des zones d'inhibition données par la fraction eau distillée sur différentes concentration de SARM.         | <b>34</b>   |

## Liste des figures

| <b>Figure</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|---------------|--|-------------|
| <b>I</b>      | Localisation du site de récolte d' <i>Eucalyptus citriodora</i> .  | <b>17</b>   |
| <b>II</b>     | Schéma représentant le Protocole d'extraction.   | <b>21</b>   |
| <b>III</b>    | Schéma représentant les principales étapes des tests d'activités.  | <b>25</b>   |
| <b>IV</b>     | Zones d'activité obtenues par l'extrait methanolique (A) et éthanolique (B) de la graine d' <i>Eucalyptus citriodora</i> sur les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> .     | <b>28</b>   |
| <b>V</b>      | Zones d'activité obtenues par l'extrait à l'acétone de la graine (A) et des autres extraits de la feuille (B) d' <i>Eucalyptus citriodora</i> sur différentes souches testées. | <b>30</b>   |
| <b>VI</b>     | Zones d'activités obtenues par les extraits : Ethylacétate, butanol et eau distillée, issues du fractionnement.  | <b>32</b>   |
| <b>VII</b>    | Zones d'activité obtenues par la fraction eau distillée sur différentes concentrations de SARM.  | <b>34</b>   |

## *Table des matières*

*Liste des abréviations*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Introduction* .....1

### *Synthèse bibliographique*

|         |  |    |
|---------|--|----|
| I.      | Les maladies infectieuses  | 3  |
| I.1.    | Les principaux agents infectieux                                     | 3  |
| I.1.1.  | <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline             | 3  |
| I.1.2.  | <i>Escherichia coli</i>  | 3  |
| I.1.3.  | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                    | 4  |
| I.1.4.  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                                      | 4  |
| I.1.5.  | <i>Acinetobacter baumannii</i>                                       | 5  |
| I.2.    | Antibiothérapie et antibiorésistance                                 | 5  |
| I.2.1.  | L'antibiothérapie  | 5  |
| I.2.2.  | L'antibiorésistance  | 5  |
| I.2.3.  | Relation entre la résistance bactérienne et la consommation des ATBs | 6  |
| I.2.4.  | Emergence et la propagation de la résistance                         | 6  |
| I.3.    | Prévalence de la multi-résistance bactérienne                        | 7  |
| I.3.1.  | Situation mondiale   | 7  |
| I.3.2.  | Prévalence des souches bactériennes multi-résistantes en Algérie     | 8  |
| II.     | Alternatives de lutte contre la résistance aux antibiotiques         | 8  |
| II.1.   | Alternatives traditionnelles   | 8  |
| II.1.1. | La phytothérapie   | 8  |
| II.1.2. | L'apithérapie  | 9  |
| II.2.   | Alternatives innovatrices  | 9  |
| II.2.1. | La phagothérapie   | 9  |
| II.2.2. | Les peptides antimicrobiens et les peptidomimétiques                 | 10 |
| II.2.3. | Transplantation du microbiote fécal                                  | 10 |

|   |    |
|---|----|
| III. Qu'en est-t-il de la recherche de nouvelles molécules d'antibiotiques ?! | 10 |
| III.1. Les étapes du développement pharmaceutique                             | 11 |
| III.2. Substance d'origine végétale comme médicaments                         | 12 |
| III.2.1. Les composés phénoliques   | 12 |
| III.2.2. Les terpènes   | 12 |
| III.2.3. Les alcaloïdes   | 13 |
| IV. Eucalyptus  | 13 |
| IV.1. Description botanique   | 13 |
| IV.2. Composition de la plante  | 14 |
| IV.3. Caractéristiques des molécules de la plante                             | 14 |
| IV.3.1. Propriétés médicinales  | 14 |
| IV.3.2. Activité antibactérienne et antifongique                              | 15 |
| IV.3.3. Activité antituberculeuse et anti-quorum sensing                      | 15 |
| IV.3.4. Activité anti-inflammatoire et antioxydante                           | 16 |

### *Matériel et méthodes*

|   |    |
|---|----|
| I. Matériel végétal                                   | 17 |
| I.1. Récolte et échantillonnage                       | 17 |
| I.2. Séchage et broyage                               | 17 |
| II. Matériel bactérien                                | 17 |
| III. Extraction                                       | 18 |
| III.1. Macération                                     | 19 |
| III.2. Détermination du rendement R%                  | 22 |
| III.3. Fractionnement                                 | 22 |
| III.3.1. Extraction méthanolique par macération       | 22 |
| III.3.2. Protocole                                    | 22 |
| III.3.4. Détermination du rendement du fractionnement | 23 |
| IV. Evaluation de l'activité antibactérienne          | 23 |
| IV.1. Standardisation des inocula bactériens          | 23 |
| IV.2. Préparation des extraits                        | 23 |



|  |    |
|--|----|
| IV.3. Tests d'activité antibactérienne ..... | 24 |
|--|----|

### ***Résultats***

|  |           |
|--|-----------|
| I. Séchage des feuilles et des graines d'Eucalyptus citriodora ..... | 26        |
| II. Rendement .....  | 26        |
| II.1. Rendement des extraits de la macération.....                   | 26        |
| II.2. Rendement des extraits du fractionnement .....                 | 27        |
| III. Résultats de l'activité antibactérienne .....                   | 27        |
| III.1. Activité antibactérienne des extraits de la macération .....  | 27        |
| III.2. Activité antibactérienne des extraits du fractionnement ..... | 32        |
| <b><i>Discussion générale</i></b> .....                              | <b>35</b> |
| <b><i>Conclusion</i></b> .....                                       | <b>39</b> |

### ***Références bibliographiques***

### ***Annexes***

### ***Résumé***

# *Introduction*

Dans les sociétés modernes, améliorer l'état de santé de la population est une priorité. La recherche de nouveaux traitements pour les pathologies dont les incidences et les taux de mortalité sont les plus élevés est une contribution importante à l'atteinte de cet objectif. Historiquement, les infections microbiennes ont toujours demeuré parmi les causes de mortalité les plus importantes. Au début des années 1900, les trois plus grandes causes de décès aux États-Unis étaient trois maladies infectieuses : la pneumonie, la tuberculose et les gastro-entérites. Au cours du vingtième siècle, l'apparition des vaccins ont amplement permis de réduire la transmission des maladies infectieuses. Les taux de mortalité associés à plusieurs de ces maladies ont aussi constamment diminués jusqu'à la fin des années 1970 et ce, grâce à l'apparition de nouveaux traitements efficaces (**Hughes, 2001**).

L'avènement de ces nouvelles molécules au lendemain de la seconde guerre mondiale fut un avantage important pour l'homme en permettant de sauver de nombreuses vies et de faire progresser l'espérance de vie, sans doute plus qu'aucun autre traitement médical (**McDermott et Rogers, 1982**). Suite à cette période faste dans le développement des antibiotiques, l'arsenal disponible semblait suffire pour traiter la majorité des infections problématiques pour la santé humaine, hélas, le début des années 1980, une recrudescence du taux de mortalité associé aux maladies infectieuses a été observée et plusieurs pathologies ont re-émergé suite à l'acquisition des résistances aux traitements utilisés (**Hughes, 2001**). Le phénomène de la résistance microbienne prend rapidement de l'ampleur et vient rappeler que la lutte contre les maladies infectieuses n'est pas terminée. La résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections bactériennes est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la menace la plus importante pour le succès des traitements antimicrobiens (**Abreu et al, 2012**).

La surconsommation des antibiotiques a aidé ces bactéries à prendre progressivement le dessus sur les ces derniers, par ailleurs, cette situation pourrait aussi s'expliquer par la réduction de la recherche en antibiothérapie depuis les années 1980. La mise sur le marché de nouvelles molécules antimicrobiennes par les firmes pharmaceutiques s'est appauvrie progressivement depuis cette période (**Bush, 2004**).

L'OMS en 2011 a signalé que cette menace de santé publique n'est plus une prévention mais une réalité dans chaque région du monde. En effet, le phénomène d'antibiorésistance survient dans tous les pays du monde, avec des disparités selon les régions. En France, 3,6 % des infections urinaires communautaires sont dues à une E-

BLSE. Leur prévalence était significativement plus élevée en Île-de-France (7,4 %) par rapport aux autres régions (5,9 %) (**Guillard et al, 2019**).

Les estimations de l'OMS en 2012 ont rapporté que plus de 60% des patients porteurs de forme MDR de la tuberculose sont concentrés dans les pays du groupe BRICS. Près de 170 000 décès auraient été causés par cette dernière. En France, les formes MDR représentent 1,9% des nouveaux cas de tuberculose (**Ancellin, 2014**). Ces dernières années ont aussi été témoins d'une prévalence croissante des souches MDR et XDR de *Pseudomonas aeruginosa*, avec des taux compris entre 15 % et 30 % dans certaines zones géographiques. La plupart des pays européens signalent des taux de résistance de plus de 10 % pour tous les groupes d'antimicrobiens sous surveillance (**Horcajada et al, 2019**).

La dissémination des BMR et l'absence de nouveaux ATB font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent (**Brunbuisson, 2005**). Dès lors, en plus des mesures de surveillance des résistances bactériennes, le renouvellement de l'arsenal des molécules anti-infectieuses est devenu une des priorités pour faire face à ce problème de santé publique émergent. Encore aujourd'hui, dans certains pays d'Asie et d'Afrique, 80% des populations ont recours aux plantes médicinales pour traiter divers problèmes de santé (**Farnsworth et Kaas, 1981 ; OMS 2002**). La nature et sa diversité chimique gigantesque constituent donc un réservoir immense de molécules bioactives au potentiel thérapeutique vaste. Un « coffre à trésors » de molécules à identifier, produire et appliquer aux pathologies qui nous touchent (**Silva et Meijer, 2012**). Le chemin qui conduit d'une substance naturelle produite par un organisme vivant y compris les végétaux jusqu'à l'arrivée sur le marché d'un médicament efficace n'est pas un long fleuve tranquille ! Ce long parcours, où le succès fait figure d'exception, s'étend sur de nombreuses années de travail et requiert des dépenses importantes (**Silva et Meijer, 2012**).

De ce fait, notre étude s'est orientée vers ces plantes pour contribuer à la quête de nouveaux antimicrobiens. Parmi, les nombreuses espèces de plantes abondante en Algérie, dont la Wilaya de Béjaia, *Eucalyptus citriodora* a retenu notre attention. : Des décoctions aqueuses ou des macérations de différents organes de cette *Myrtaceae* sont utilisées dans le traitement du diabète, comme antiseptique et même comme traitement contre la grippe ou même la tuberculose pulmonaire... (**Arma, 2012**).

Ce mémoire est présenté en trois parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique présentant le problème de la résistance bactérienne, quelques alternatives à l'utilisation des ATBs et l'intérêt des plantes notamment l'Eucalyptus dans la

quête de nouvelles substances bioactives. La deuxième partie comprend la partie expérimentale illustrant le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction, et l'évaluation de l'activité antibactérienne des feuilles et des graines extraite d'*Eucalyptus citriodora* sur un panel de souches de bactéries pathogènes multirésistantes. La troisième partie expose les résultats obtenus suivis de leur interprétation. Enfin, nous avons terminé par une conclusion générale avec quelques perspectives.

# *Synthèse bibliographique*

## **I. Les maladies infectieuses**

Une maladie infectieuse est considérée comme la rupture de l'équilibre d'un organisme vivant, équipé de mécanismes de défences immunitaires, suite à son envahissement par des agents infectieux (bactéries, virus, champignons et parasites) dotés de capacités d'adaptation complexes et responsables de maladies dont les manifestations cliniques varient (**Flanon, 2007 ; Whitman et al, 1998**).

Elles sont responsables de 17 millions de décès dans le monde dont 43% de décès dans les pays en développement (**Flanon, 2007**). Plusieurs travaux ont été consacrés aux microorganismes responsables d'infections bactériennes invasives aussi bien dans le domaine thérapeutique que préventif. Par exemple, on estime que chaque année, aux Etats-Unis, *Streptococcus pneumoniae* est responsable de 6 millions d'otites moyennes, 500 000 cas de pneumonies, 6000 cas de méningites (**Schreiber et Jacobs, 1995**). L'annexe 2 illustre les principales infections associées à divers bactéries pathogènes.

### **I.1. Les principaux agents infectieux**

**I.1.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline :** *S. aureus* domine la liste des microorganismes responsables des infections nosocomiales. Au contact des ATB, cette bactérie a acquis progressivement des résistances multiples, dont celle à la méthicilline (SARM-H) et ce, sans perdre de sa virulence. La littérature des dernières années rapporte des infections à SARM acquises dans la communauté (SARM-C) chez des patients qui n'ont aucun lien avec les milieux de soins (**Djoudi et al, 2014**). Ce germe cause un large éventail de syndromes, allant d'infections mineures de la peau et des tissus mous à la septicémie et au syndrome du choc toxique staphylococcique (**Djoudi et al, 2015**). Les choix de traitement des infections au SARM s'élargissent, mais aucun des nouveaux traitements n'offre encore assez d'avantages pour surpasser les molécules, comme la vancomycine. L'identification adéquate des souches selon le milieu de propagation de l'infection et selon la présence de résistance est importante pour l'application d'un traitement adéquat à l'infection (**Tremblay, 2008**).

**I.1.2. *Escherichia coli* :** *E. coli* a été mis en cause pour la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich l'isola lors de cas de diarrhée de nourrissons. Cependant, chez l'homme comme chez l'animal, les souches pathogènes de ce germe sont responsables d'infections variées, allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (**Diallo, 2013**). Une étude épidémiologique sur les souches d'*E. coli* à l'origine de diarrhée, au sein d'une population rurale en Equateur, a montré que la prévalence

des souches antibiorésistantes était significativement plus élevée chez les *E. coli* responsables de diarrhée que chez les *E. coli* commensales (Zhang et al, 2015). L'antibiothérapie associée aux pathologies causées par ce germe n'est pas précise, en effet, l'azithromycine est utilisée pour le traitement des patients atteints de la diarrhée du voyageur dont EAggEC est responsable (Cabada et al, 2011 ; Hill et Beeching, 2010), cet ATB a d'ailleurs été utilisé lors de l'épidémie à la souche EHEC O104:H4 et a significativement réduit le portage de cette dernière chez les patients (Nitschke et al, 2012). Par contre, vu le risque de lyse bactérienne et le relargage accru des stx, provoquant probablement un SHU chez le patient, suite à une infection à STEC ou de son portage chronique, un traitement ATB avec des inhibiteurs de la synthèse protéique et de la paroi cellulaire est utilisé (Agger et al, 2015 ; Wong et al, 2000).

**I.1.3. *Mycobacterium tuberculosis* :** La tuberculose est la maladie infectieuse la plus meurtrière au monde classée en deuxième position, après l'infection par le VIH (OMS 2012). Toutes les mycobactéries, capables de causer cette maladie sont regroupées sous la dénomination « Complexe *Mycobacterium tuberculosis* » (Koecket al, 2005). Le traitement préventif repose sur la vaccination par le BCG. Ce vaccin confère, dans 80 % des cas, une protection chez le nouveau-né et l'enfant de moins de 15 ans, contre les formes les plus graves telles que la méningée et la miliaire (Soysal et al, 2005 ; Trunz et al, 2006). Le traitement curatif de la tuberculose repose sur l'administration quotidienne pendant 6 mois, d'une association d'antibiotiques. Cette association est indispensable pour éviter la sélection de résistants et la prolongation du traitement (Tattevin, 2007).

**I.1.4. *Streptococcus pneumoniae* :** Le pneumocoque est aujourd'hui un des principaux pathogènes responsables de maladies infectieuses, essentiellement communautaire. Il est impliqué dans de nombreuses maladies, telles que les pneumonies, méningites, bactériémies et infections des voies respiratoires supérieures... Il peut être aussi à l'origine d'autres types de maladies infectieuses comme les conjonctivites, et les arthrites purulentes. Ce germe est une cause importante de morbidité et de mortalité chez les jeunes enfants et les personnes âgées (Gharailoo et al, 2016). En 2005, l'OMS, estime que 1,6 millions de personnes meurent chaque année d'infections pneumococciques dont un million d'enfants de moins de cinq ans (OMS, 2007). La meilleure stratégie pour diminuer l'incidence des infections aux pneumocoques et de diminuer la diffusion de l'antibiorésistance serait l'administration d'un vaccin anti-pneumococcique (Caymaris, 2010). L'antibiotique de choix est l'amoxicilline administré par voie orale (OMS, 2019).



**I.1.5. *Acinetobacter baumannii*** : Le site le plus fréquent d'infection par *Acinetobacter baumannii* est le système respiratoire, mais *Acinetobacter spp.* peut aussi causer des infections purulentes de tout système d'organe. Les infections graves à *Acinetobacter baumannii* sont traitées par une association, typiquement des carbapénèmes (imipénème ou méropénème) ou ampicilline-sulbactam plus un aminoside. Lorsque la pharmacorésistance est extrême, la tigécycline ou l'association de colistine-minocycline peuvent être les seules options disponibles (**Munier et al, 2017**).

## **I.2. Antibiothérapie et antibiorésistance**

**I.2.1. L'antibiothérapie** : Depuis les années 30, un troisième agent vient rompre la relation entre l'organisme vivant et l'agent infectieux : c'est l'antibiotique. Il s'agit de l'une des découvertes ayant fait reculer considérablement la mortalité associée aux maladies infectieuses (**Andersson et Hughes, 2010**). Les antibiotiques ont été utilisés pour prévenir et traiter les maladies infectieuses pouvant entraîner une morbidité considérable et même, être associées à des mortalités (**Veysièrè, 2019**). Ainsi, l'introduction de l'antibiothérapie, a complètement révolutionné le domaine médical en empêchant la prolifération d'un grand nombre de germes pathogènes et en évitant les complications des infections (**OMS, 2001**). Malheureusement, la résistance bactérienne aux ATB traditionnels a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**Dali, 2015**). Au cours des dernières années, la fréquence et l'ampleur des infections causées par des bactéries résistantes ont augmenté autant en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (**Conly, 2002**).

**I.2.2. L'antibiorésistance** : La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique (**Carle, 2009**). Au cours des dernières années, l'ampleur causés par les pathologies liées aux pathogènes multirésistants ont augmenté autant en milieu hospitalier : cas du SARM, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, notamment la souche 027. *Enterococcus*, les ERV et les EBLSE impliquées dans des infections nosocomiales (**Dulon et al, 2011 ; Boyce et al, 1994 ; Hocquet et al, 2010**). Ainsi qu'en milieu communautaire cas du *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline et d'*Escherichia coli* BLSE (**Coque, Baquero et Canton 2008 ; Dunais et al, 2015**). Certaines de ces bactéries évoluent soit sur un mode pandémique se propageant de façon certaine sur tous les continents : cas du SARM que l'on retrouve également en milieux communautaires depuis quelques années (**Frei et al, 2010**). D'autres, en revanche évoluent sur un mode plutôt épidémique : cas de *Clostridium difficile* (**Clements et**

*al, 2010*) des ERV (*Dekeyser et al, 2010*) et des entérobactéries BLSE KP OXA-48 (*Cuzon et al, 2010*).

### **I.2.3. Relation entre la résistance bactérienne et la consommation des ATB**

- **Le modèle biologique de la résistance bactérienne :** Il a été démontré dans un modèle animal l'émergence, la sélection et la propagation des souches d'*Escherichia coli* résistante à la tétracycline chez des poulets recevant une alimentation supplémentaire en oxytétracycline. Il a aussi été démontré qu'il y a une dissémination des souches résistantes de l'animal à l'homme (*Levy et al, 1976*).
- **Consommation des ATB et résistance bactérienne :** A l'échelon collectif, il a été démontré que les pourcentages de la résistance sont généralement plus élevés dans les hôpitaux qu'en communauté, et dans les services de réanimation plus que dans les autres services. Il existe ainsi un parallélisme entre les résistances bactériennes et le niveau de consommation d'ATB généralement observé dans ces différents secteurs (*Monnet, 2000*).
- **Relation dose-effet :** Au niveau individuel, une posologie élevée et une durée de traitement plus longue conduisent à une grande probabilité de colonisation par des germes bactériens résistants. Au niveau collectif, les services consommant le plus d'ATB sont ceux où le pourcentage de résistance est élevée (*Monnet et al, 1995*).

**I.2.4. Emergence et propagation de la résistance :** Fondamentalement, la résistance aux antibiotiques chez les bactéries peut se disséminer de deux manières : diffusion clonale des lignées résistantes et transfert horizontal des gènes de résistance (*Allen et al, 2010*). L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission de micro-organismes résistants. L'exposition à un antimicrobien favorise la survie des souches bactériennes résistantes présentes dans une population. La réduction de la pression sélective des antibiotiques est importante pour prévenir l'émergence d'une résistance microbienne et préserver le plus longtemps possible l'efficacité des médicaments disponibles. Lorsque les mesures de lutte contre les infections sont rompues, les clones résistants peuvent se propager d'un patient à l'autre en produisant une éclosion monoclonale c'est-à-dire que toutes les bactéries résistantes sont identiques à la souche originale mutante ou présentent un nombre restreint de clones. Par opposition, la pression de sélection aux antibiotiques favorise une épidémiologie polyclonale, c'est-à-dire la présence de clones multiples (*Carle, 2009*). **Annexe 1** montre une brève partie concernant l'historique de l'émergence et du développement de l'antibiorésistance.

### **I.3. Prévalence de la multi-résistance bactérienne**

**I.3.1. Situation mondiale :** Dans le monde la prévalence du SARM est très variable en fonction de la période d'étude, les régions et des conditions de vie des populations concernées par l'étude .En Asie, à Shanghai, 64% des isolats de *Staphylococcus aureus* étaient des SARM (Forestier et al, 2007). En Amérique du nord, une prévalence de 36 à 62,6%. L'étude réalisée, a rapporté que la prévalence des SARM est beaucoup plus élevée pour des populations à risque (Bader, 2006 ; Skiest et al, 2006). En Europe du Sud, une variabilité qui va de 5 à 50% a été observée. Le taux de SARM le plus élevé a été enregistré en Roumanie avec 50% (Decousser et al, 2003 ; Giudice et al, 2006). En Afrique, une forte prévalence est enregistrée en Afrique noire, tant dis que les pays du Maghreb enregistrent moins de 10% (Saïdani et al, 2006 ; Elouennass et al, 2008). La tuberculose multirésistante demeure une crise de santé publique et une menace pour la sécurité sanitaire. En 2019, 206 030 cas de tuberculose multirésistante ont été détectés et notifiés dans le monde, soit une augmentation de 10 % par rapport aux 186 883 cas enregistrés en 2018. Trois pays enregistrent à eux seuls près de la moitié des cas de tuberculose multirésistante dans le monde : l'Inde, la Chine et la Russie. Actuellement dans le monde, seuls 57 % des cas de tuberculose multirésistants sont traités avec succès. (OMS, 2020). Aux Etats Unis, le rapport national «Antibiotic Resistance Threats in the United States» de 2019 fait état de 30% de résistance à la vancomycine pour les entérocoques. Sur 54500 infections nosocomiales à entérocoque, 20000 sont dues à des ERV avec un taux de létalité de 9,9%. Depuis 2013 les USA ont connu une baisse de 41% de leur taux d'ERG grâce aux mesures d'hygiène et au bon usage des antibiotiques (Ion, 2020). Dans le rapport de « European antimicrobial resistance surveillance system » pour l'année 2008, les souches multirésistantes représentaient 17% des isolats décrits, toutes infections et origines confondues, la prévalence des souches multirésistantes atteignait 30 à 40 % dans certains pays d'Europe de l'Est (Barbier et Wolff, 2010). En Europe, la surveillance des EBLSE se base principalement sur *Klebsiella pneumoniae*. Le pourcentage des souches BLSE et résistantes aux C3G est de 85 à 100%. En Grèce, plus de 50% des souches résistent aux C3G, fluoroquinolones et aminosides, pendant que ça varie de 10 à 25% en France (ECDC, 2012). Sur les 102 souches d'*A. baumannii* isolées d'infections chez des militaires blessés en Afghanistan et dans la région Irak-Koweït, un degré élevé de résistance aux antimicrobiens a été découvert, y compris une résistance à tous les médicaments trouvée dans 4% des isolats (Scott et al, 2004). En France, une flambée d'infections nosocomiales est survenue de 2003 à 2004 causée par l'isolat AYE d'*A. baumannii* multirésistant , exprimant une *bla* VEB-1

sensible qu'à l'imipénème, la ticarcilline-clavulanate et la pipéracilline-tazobactam (**Poirel et al, 2003**).

**I.3.2. Prévalence des souches bactériennes multirésistantes en Algérie :** Le Réseau algérien sur la Résistance aux Antimicrobiens rapporte pour l'année 2016 des taux de BMR par espèce qui montrent que pratiquement plus d'un *Staphylococcus aureus* sur trois soit, 36,10 % est un SARM. Les entérobactéries productrices de carbapénémases quant à elles, sont retrouvées à un taux de 2,14 %, il a aussi été rapporté qu'une entérobactérie sur trois, soit 30,39% est productrice d'une BLSE (**AMR control : Algérie, 2016**). **Khorsi et al, (2015)** ont démontré que près d'un *Acinetobacter spp.* sur deux, est résistant à l'imipénème dont le taux a augmenté de façon exponentielle et dramatique de 2004 (3 %) à 2016 (55,24 %) avec un pic en 2015 à 65 %. Parmi 125 isolats testés, 93,6% étaient multirésistants, dont 75,2% étaient résistants à l'imipénème. Environ 21,42 % des *Enterococcus faecium* isolés sont résistants à la vancomycine. (**AMR control: Algérie, 2016**). *Pseudomonas aeruginosa* est résistant à l'imipénème avec un taux de 16,64 %, cette résistance est passée de 4 % en 2001 à 16,64 % en 2016 (**AMR control: Algérie, 2016**).

En ce qui concerne la tuberculose, la tuberculose multi-résistante représente 1,5 % de l'ensemble des cas de tuberculoses en Algérie, elle est due à des bacilles résistants au moins à l'isoniazide et rifampicine, les deux antituberculeux majeurs (**Berdous, Boukheris, et Nafti, 2015**). En Algérie le but est d'atteindre et de maintenir une prévalence à moins de 2% de la multi-résistance, pour cela, on doit faire face avec détermination à ce problème (**Keriu, Bellouz et Moumeni, 2015**).

## **II. Alternatives de lutte contre la résistance aux antibiotiques**

### **II.1. Alternatives traditionnelles**

**II.1.1. La phytothérapie :** La majorité de la population mondiale (75%), utilise les plantes pour subvenir aux besoins de santé primaire, malgré l'existence des médicaments synthétiques (**Duke, 1990**). Cette ruée vers la médecine par les plantes peut s'expliquer par le fait que les plantes sont accessibles et abondantes, rendant ainsi la médecine par le traitement des plantes, abordable surtout dans les pays en voie de développement (**OMS, 2002**). De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absents, au contraire des médicaments semi-synthétiques ou synthétiques (**Iwu, 1999 ; Cowan 1999**).

L'aromathérapie, fait partie de la phytothérapie depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie

et ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans les plantes (**Heath, 1981**). Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation (**Kalemba, 2003**). Elles sont obtenues à partir de différents organes de la plante (**Burt 2004**). L'activité antimicrobienne est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba, 2003 ; Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012**). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (**Oussou et al, 2009**). Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al, 2006 ; Oussou, 2009**). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action suite à la nature de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**).

**II.1.2. Apithérapie :** On utilise depuis longtemps les propriétés du miel pour traiter des plaies infectées. En 1894 le miel est reconnu pour ses propriétés anti infectieuse mais il a fallu attendre 50 ans après pour que des publications européennes et américaines reconnaissent son intérêt lors de son application sur les blessures infectées ou non. Lorsqu'il y a lésion cutanée, il y a une phase inflammatoire, une phase de prolifération et une phase de remaniement des cellules cutanées, le miel agit à chacun des niveaux, avec en plus des propriétés anti infectieuse, contre le *S. aureus* par exemple (y compris le SARM), *E. Coli* ou encore *P. aeruginosa* (**Lee et al, 2011**). Ses propriétés antibactériennes seraient dues à sa composition en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, méthylglyoxal et en défensine-1 (**Wahdan, 1998**).

## **II.2. Alternatives innovatrices**

**II.2.1. Phagothérapie :** La phagothérapie repose sur l'utilisation des bactériophages en thérapeutique humaine. Leur spécificité élevée pour l'hôte fait d'eux des candidats de choix pour le traitement d'infections associées à des bactéries multi-résistantes. Cette spécificité est telle que de nombreux phages ne sont actifs que sur un nombre restreint de souches au sein d'une espèce. Ils sont par ailleurs incapables d'infecter les cellules eucaryotes, limitant ainsi leur toxicité potentielle. Selon leur cycle biologique, on distingue 2 types de bactériophages : les phages tempérés et les phages lytiques. En effet ce sont précisément ces derniers et eux seuls qui sont utilisés à des fins thérapeutiques en phagothérapie, ils sont des thérapies prometteuses contre l'antibiorésistance. Les phages lytiques permettent la destruction de la bactérie en détournant la machinerie bactérienne à leur profit pour se multiplier. Ainsi, la bactérie éclate et plusieurs dizaines de nouveaux phages, identiques à l'original, sont libérés

dans le milieu et prêts à s'attaquer à d'autres bactéries de la même espèce. Les ATB et les bactériophages ne sont pas concurrents mais bien complémentaires et la phagothérapie doit être envisagée comme une arme supplémentaire dans l'arsenal de la lutte contre les infections bactériennes (**Ravat et al, 2015 ; Abedon et al, 2017**).

**II.2.2. Les peptides antimicrobiens et peptidomimétiques :** Les peptides antimicrobiens sont une source intéressante qui, jusqu'à récemment, a été relativement inexplorée. Les PAMs sont en général de petits peptides cationiques amphiphiles, qui jouent un rôle important dans la défense contre les infections bactériennes, virales, parasitaires, fongiques par la perturbation de leurs membranes suite aux interactions avec les phospholipides négativement chargés. Ils sont considérés comme de potentiels futurs antibiotiques, grâce à un ensemble remarquable de propriétés avantageuses. Cependant, les PAMs ont quelques inconvénients intrinsèques : une instabilité biologique liée à la dégradation enzymatique, une mauvaise absorption et une métabolisation rapide. Par conséquent, ils sont des cibles thérapeutiques très pauvres, et la plupart des recherches mettent l'accent sur les non-peptides, une nouvelle classe de PAMs appelée les peptidomimétiques antimicrobiens ou "mPAMs". Par définition, un mPAM est un composé synthétisé chimiquement comportant des acides aminés non naturels, destiné à mimer l'activité biologique d'un peptide naturel et à en améliorer les propriétés pharmacologiques. Ils peuvent ainsi imiter le mécanisme bactéricide des PAMs, tout en étant stable à la dégradation enzymatique et présentant une activité puissante contre les bactéries multi résistantes (BMR) (**Pham, 2017**).

**II.2.3. Transplantation du microbiote fécal :** Les traitements par antibiotiques ont un impact sur le microbiote intestinal qui peut être à l'origine de la sélection de pathogènes dont *Clostridium difficile*, responsable de colites pseudomembraneuses. Lorsque cela arrive, on met en place une nouvelle antibiothérapie en associant la vancomycine avec le métronidazole (**Cohen et al, 2010**). Mais des échecs et des récives ont déjà été constatés, c'est ainsi qu'on a envisagé le TMF. Il s'agit en effet, d'un procédé de transfert du microbiote d'une personne saine vers une personne malade. Ce type de thérapie a été instauré dès 1958 par Eiseman et les résultats sont concluants, le patient malade retrouve au bout de quelque jours une flore normale non pathogène. Ainsi cette thérapeutique est indéniablement efficace dans le traitement des colites pseudomembraneuses et dans la prévention de leur récive (**Eiseman et al, 1958 ; Khoruts et Sadowsky, 2011**).

**III. Qu'en est de la recherche de nouvelles molécules d'antibiotiques ?**

La fin des années 1970 constitue l'âge d'or de cette activité de recherche, ayant permis la mise sur le marché américain d'une vingtaine de nouveaux composés entre 1980 et 1984. Depuis, et malgré une prise de conscience collective de l'importance de ce problème, le développement de l'antibiothérapie n'attire plus l'industrie pharmaceutique, ainsi, le nombre de nouvelles molécules mises annuellement sur le marché américain n'a jamais été aussi bas. Les raisons du désinvestissement de l'industrie pharmaceutique dans la recherche de nouveaux antibiotiques sont multiples mais reflètent principalement la faible rentabilité de cette activité. Les antibiotiques ont en effet du mal à tenir la comparaison avec les molécules très onéreuses développées en oncologie, ou avec les médicaments développés pour les maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'état du « pipeline » de développement des antibiotiques suggère que la situation ne va pas s'améliorer au cours des années qui viennent. **(Mahieu et Dubée, 2020).**

Le pipeline clinique actuel contient environ 30 nouveaux médicaments antibactériens ayant une activité contre les agents pathogènes prioritaires et est dominé par des dérivés de classes établies. En septembre 2018, 42 nouveaux antibiotiques étaient en développement dont 15 en phase 1, 12 en phase 2 et 11 en phase 3 **(Theuretzbacher et al, 2019).**

### **III.1. Les étapes du développement pharmaceutique**

**Etapes de développement et de validation d'une nouvelle molécule :** Dans le but d'isoler le composant le plus prometteur, la molécule cible est soumise à l'action de différentes substances. Dans le jargon des scientifiques, cette étape est appelée le "screening ". À ce stade, il est nécessaire d'effectuer une série de tests chimiques et biologiques, dont le but est de prouver la sélectivité, la sécurité et l'efficacité de la molécule étudiée **(GlaxoSmithKline France, 2020).**

**Les phases de la recherche clinique :** Menées par des médecins ou des équipes hospitalières, les essais cliniques se déroulent en plusieurs phases :

**Phase préclinique:** consiste en l'étude de la molécule, sa structure, son effet in vitro, et son effet in vivo sur l'animal au niveau comportemental et biologique. À partir de ces études on détermine la dose maximale tolérée qui représente la dose maximale que l'animal de laboratoire peut tolérer, la dose sans effet observable et la dose sans effet toxique observable **(Inserm).**

- **Phase 1 :** Essais sur volontaires sains sur une courte période pour juger de la sécurité d'emploi du médicament **(Guillonnet et Jacqz-Aigrain, 1996).**

- **Phase 2** : Essais sur des petits groupes de malades pour analyser l'activité du futur médicament en termes d'effets dose-réponse. Ces études sont le plus souvent comparatives : l'un des 2 groupes de patients reçoit la molécule tandis que l'autre reçoit un placebo (**Sanofi**).
- **Phase 3** : Essais multicentriques qui permettent de confirmer l'efficacité thérapeutique de la molécule comparativement aux traitements existants ou à un placebo (**Guillonneau et Jacqz-Aigrain, 1996**).
- **Phase 4** : Essais effectués après la délivrance de l'autorisation de mise sur le marché, Elle permet de suivre l'utilisation du médicament à long terme dans des conditions réelles d'utilisation afin de repérer d'éventuels effets indésirables rares non détectés durant les phases précédentes (pharmacovigilance) (**Guillonneau et Jacqz-Aigrain, 1996**).

### **III.2. Substances d'origine végétales comme médicaments :**

Les métabolites primaires issus des végétaux sont exploités par l'homme et les animaux pour leur alimentation et apports énergétiques. Par ailleurs, l'homme les utilise également dans le domaine médical pour la fabrication d'excipients tels les oses édulcorants, les polysaccharides dans la fabrication des comprimés ou encore pour l'obtention d'émulsions... Certains de ces métabolites primaires servent aussi de molécules thérapeutiques. Aujourd'hui, plusieurs de ces phytomolécules ont déjà été décrites mais un grand nombre reste encore mal connu et non caractérisé. Ces composés constituent les principes actifs des plantes médicinales exploités dans la médecine traditionnelle (**Aboya, 2014**).

**III.2.1. Les composés phénoliques:** Les phytomolécules phénoliques ont des structures allant des plus simples (acide gallique) aux plus complexes (les tanins). Les composés phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques dont des activités antimicrobiennes (**Rath et al, 1995 ; Xiang et al, 2008 ; Jaiakittivong et al, 2009 ; Rivera et al, 2011; Basli et al, 2012**). On peut classer les polyphénols en fonction de leur voie de biosynthèse. On distingue ainsi les phénols simples, les coumarines, les stilbènes, les flavonoïdes, les saponines, les lignanes, les quinones... **Annexe 2** montre les différents groupes de composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne décrite.

**III.2.2. Les terpènes :** Sont des huiles essentielles de nombreuses plantes. Ils sont volatils et constituent la résine et les essences des plantes. C'est le cas de l'essence de térébenthine isolée à partir de la résine de pin. Sur le plan structural, les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Leur nomenclature et leur classification se font en fonction du nombre d'unités isopréniques qui constituent la molécule. Des activités antimicrobiennes des



terpénoïdes ont été mises en évidence (Oussou et al, 2004 ; Bourkhiss et al, 2007 ; Goetz et Ghedira, 2012), on les classe en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et caroténoïdes dont des exemples de structures antimicrobiennes isolées chez certaines plantes sont présentées en **Annexe 3**.

**III.2.3. Les alcaloïdes :** Ce sont des composés qui présentent plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme : Antitumoraux ; vincalécoblastine ; Antalgiques : morphine ; Pasmolytiques : tubocurarine ; Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine ; Antipaludiques : quinine, et Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine (Donatien, 2009).

#### **IV. Eucalyptus :**

*Eucalyptus citriodora*, appartenant à la famille des Myrtaceae, est une plante médicinale traditionnelle utilisée pour le traitement de la toux, du rhume, des maux de gorge et d'autres troubles. On pense qu'elle est originaire des régions tropicales et tempérées du monde. On a signalé que les extraits de feuilles d'*E. citriodora* présentaient une activité antimicrobienne (Wintachai et al, 2019).

##### **IV.1. Description botanique de la plante :**

Nom latin : *Corymbia citriodora* anciennement *Eucalyptus citriodora*.

Noms vernaculaires : Eucalyptus citronné, Eucalyptus blanc, Eucalyptus à odeur de citron.

Le genre *Eucalyptus* a été décrit et nommé pour la première fois par L'Héritier en 1778, et environ 800 espèces ont déjà été identifiées dans le monde entier (Salehi et al, 2019).

*Eucalyptus citriodora* ou *Corymbia citriodora* a d'abord été classé dans les *Eucalyptus* pendant des années. C'est en 1995 qu'un nouveau genre a été créé : le genre *Corymbia*. L'eucalyptus citronné est donc devenu *Corymbia citriodora* mais il a gardé son nom vernaculaire *Eucalyptus citriodora* (Hill et Johnson, 1995). La classification botanique de *Corymbia citriodora* est présentée en **Annexe 4**.

*Eucalyptus citriodora* est une plante vivace ligneuse, un grand arbre avec une croissance rapide, peut atteindre 20 à 50 mètres de hauteur. Son écorce est lisse et blanchâtre à rose ce qui lui vaut le nom vernaculaire d'*Eucalyptus* blanc. Son écorce se desquame par plaques, on pourra parfois même retrouver ces plaques d'écorce enroulées sur elles-mêmes. La longueur des fibres de l'écorce, la dureté, l'épaisseur varie avec l'âge de la plante (Koziol, 2015 ; Salehi et al, 2019 ;).

Les feuilles de l'eucalyptus présentent un dimorphisme foliaire, des feuilles juvéniles et des feuilles matures. Les feuilles au stade juvénile sont ovales à arrondies, parfois sessiles ou

glauques. Quant aux feuilles matures, elles sont vertes, aromatiques, oblongues, alternes, étroites et effilées aux extrémités. Elles sont de 12 à 30 cm. Le froissement de ces feuilles va libérer une odeur fortement citronnée due à la présence en grande quantité de citronellal (**Koziol, 2015 ; Salehi et al, 2019**).

Les fleurs, de couleur jaune à crème, ont une inflorescence en forme de corymbe. Elles sont regroupées par 10 à 20. Elles donnent naissance à des fruits sous forme de capsules glauques, dure qui s'ouvre pour libérer de nombreuses graines sombres et minuscules (**Koziol 2015**). On différencie essentiellement les *Corymbia* des *Eucalyptus* par leur feuilles plus larges et plus épaisses et aussi par leur inflorescence qui comme leur nom l'indique, est sous forme de corymbe (**Koziol, 2015**).

#### **IV.2. Composés chimiques de la plante :**

Les principaux composés d'*E.citriodora* sont : Citronellal (69,77 %) suivi de Citronellol (10,63 %) et Isopulegol (4,66%) (**Hadjer et al, 2018**).

##### **i. Composées phénoliques**

**Acides phénoliques :** caféïque, gallique, ferulique, protocatéchique, gentisique...

**Flavonoides :** Flavoneeucalyptine, 8 déméthyeucalyptine, sidéxylique, 8-déméthylsidéroxylène, dérivés de la quercétine, anthocyanosides...

**Tannins :** Tannins condensés, proanthocyanidines et gallotannins. (**Gbenou et al, 2013**)

##### **ii. Huiles essentielles**

**Hydrocarbures monoterpéniques :**  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, limonène.

**Monoterpènes oxygénés :** 1,8 cinéole (Eucalyptol), oxyde de rose, Citronellole, geraniol, acétate d'isopulégyle, p-Menthane-3,8-diol, acétate de citronellyle, jasmone...

**Hydrocarbure sesquiterpénique :**  $\beta$ -Caryophyllène,  $\alpha$ -Humulène, Bicyclogermacrène...

**Sesquiterpènes oxygénés :** Spathulenol, oxyde de caryophyllène...

**Autres composés :** 2,6-diméthyl-5-heptéanal... (**Hadjer et al, 2018**)

##### **iii. Divers**

Cires, stérols, saponines, polysaccharides, dicétone (n-triacontane 16,18-dione) dérivés du phloroglucinol, stéroïdes, macrocarpals, acides aminés et acides organiques. Acide bétulinique,  $\beta$ -sitostérol,  $\beta$ -sitostérol-3-O-glycopyranosyl, macrocarpals, et cypellocarpin C. (**Gbenou et al, 2013**)

#### **IV.3. Caractéristiques des molécules d'eucalyptus :**

##### **IV.3.1. Propriétés médicinales**

- Il a une action hypoglycémisante à forte dose. Les feuilles d'eucalyptus sont utilisées dans le traitement du diabète. Cet effet a été contrôlé chez l'animal, l'hyperglycémie est abaissée chez les souris traitées par la streptozotocine recevant de l'eucalyptus dans leur alimentation diluée dans de l'eau physiologique. Au Maroc, une décoction des feuilles et des fleurs est utilisée contre le diabète.
- Expectorant : stimule les cellules sécrétrices de la muqueuse bronchique, notamment par son action antitussive.
- Antiseptique : après absorption de l'HE par la peau ou après absorption intestinale, le cinéole est éliminé en partie par les poumons (d'où son activité) et par les reins. L'effet antiseptique bactéricide est lié à la présence de 1,8 cinéole. Une partie de cette huile est éliminée par les urines. Elle a une activité sur *Escherichia*, *Proteus*, staphylocoque doré.
- Sédatif : par décoction des feuilles adultes. De plus, l'HE d'eucalyptus est un sédatif du SNC, mais d'autre part favorise la respiration (eupnéique).
- Infusion des feuilles : contre la grippe, la tuberculose pulmonaire, la lymphangite, la polyarthrite rhumatoïde, la trachéobronchite, la stomatite ulcéreuse (bain de bouche).
- Fumigations : sinusites, rhumes, bronchites aiguës.
- Effet anti-inflammatoire a été comparé à celui de l'indométhacine. Il est lié en partie à son huile essentielle, ses acides-phénols et ses flavonoïdes. (Arma, 2012)

#### **IV.3.2. Activité antimicrobienne et antifongique**

L'activité antibactérienne de nombreuses espèces d'*Eucalyptus* est liée à la présence de certaines classes de composés tels que les alcools, aldéhydes, alcènes, et esters. En outre, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* pourrait être due aux deux composés majeurs : Citronellal et Citronellol (Hadjer et al, 2018). Des substances antibactériennes naturelles, notamment des huiles essentielles, peuvent être incorporées dans les bains de bouche pour lutter contre la plaque dentaire. Exemple de Listerine™ qui est largement utilisé depuis de nombreuses années, contenant du thymol, de l'eucalyptol, du menthol et du salicylate de méthyl (Harkat-Madouri et al, 2015).

Les extraits d'*E.citriodora* se sont révélés actifs contre les champignons pathogènes non filamenteux, filamenteux et dermatophytiques. Notamment les mutants résistants aux médicaments de *Candida albicans*, responsable de mycoses buccales et vaginales, son efficacité contre ce champignon en particulier est intéressante pour des traitements préventifs et curatifs. (Luqman et al, 2008).

#### **IV.3.3. Activité antituberculeuse et anti-quorum-sensing**

Des chercheurs de Chicago ont découvert qu'*Eucalyptus citriodora* pourrait être une solution, comme traitement par voie inhalée, aux formes multi résistantes de tuberculose. L'huile essentielle limiterait la contagion des personnes infectées et, utilisée chez la personne saine, elle limiterait le risque de contamination. Cette étude n'est pas suffisante pour déterminer le pouvoir antituberculeux de l'huile essentielle de cette plante mais elle permet d'ouvrir un nouveau champ de recherche dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques dans le traitement de la tuberculose (Alvarenga et al, 2014).

Les huiles essentielles d'eucalyptus étudiées aujourd'hui peuvent inhiber le phénomène de QS en inhibant la production de pigment violacéine régulé par ce dernier chez les bactéries sans interférer avec leur croissance (Ângelo et al, 2016).

#### **IV.3.4. Activité anti-inflammatoire et antioxydante**

Les huiles essentielles d'*E. citriodora* se sont révélées avoir des propriétés anti-inflammatoires selon l'étude de (Gbenou et al, 2013). Les huiles essentielles de cette plante pourraient être utilisées comme agents anti-inflammatoires prometteurs, on l'utilisera par exemple en cas d'arthrite, de polyarthrite rhumatoïde ou même de cystite. Le mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Corymbiacitriodora* va être similaire à celui des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Elle va inhiber la synthèse des prostaglandines qui sont à l'origine de la réaction inflammatoire. Ainsi, elle va calmer l'inflammation et les douleurs qui sont liées (Gbenou et al, 2013).

En neutralisant les radicaux libres, les *Eucalyptus* empêchent les réactions en chaîne initiées par ces derniers. Ils détruisent les hydro-péroxydes et réduisent ainsi la vitesse de formation des radicaux libres (Penchev, 2010). L'activité antioxydante de l'Eucalyptus dépend de plusieurs paramètres, on cite les facteurs génétiques, la présence de composés phénoliques la phase de développement du végétal et l'environnement dans lequel il se trouve, ajouté à cela la saison de récolte (Geethalakshmi et Sarada, 2013). L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques tel le Citronellal (Pionchon, 2008).

# *Matériel et méthodes*

## I. Matériel végétal

### I.1. Récolte et échantillonnage :

La récolte des feuilles et des graines fraîches d'*Eucalyptus citriodora* a été faite au niveau du Parc National de Gouraya, aux hauteurs de la ville de Bejaïa, le 3 mars 2021. La plante a été identifiée par les botanistes du musée.

L'échantillonnage a été fait sur cinq régions distinctes de cinq arbres différents.



Figure I : Localisation du site de la récolte d'*Eucalyptus citriodora*.

### I.2. Séchage et broyage :

Chacun des échantillons de graines et de feuilles a été nettoyé, débarrassé de ses tiges et divisé en lots de 200g. Les échantillons ont été séchés à l'étuve à 40°C.

Le matériel végétal a été broyé, chacun de son côté, à l'aide d'un broyeur électrique, pour obtenir une poudre fine. Le fait de broyer le matériel végétal plus finement augmente la surface d'extraction et donc le taux d'extraction (**Pandey et Tripathi, 2014**).

La poudre a été tamisée et stockée dans un endroit sec, à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation.

L'objectif de cette étape était de mettre au point une poudre végétale permettant l'extraction de taux élevés de composés bioactifs.

## II. Matériel bactérien

Les souches bactériennes étudiées ont été choisies pour leur haut pouvoir pathogène. Elles nous ont été fournies par le Département de Microbiologie de l'Université de Bejaia. Elles ont préalablement été identifiées et caractérisées comme MDRs.

Un panel de bactéries multirésistantes, 3 Gram-positif et 3 Gram-négatif, plusieurs souches chacune, ont été testées. Les souches ont été stockées à -18°C. Il a été nécessaire de procéder

d'abord à un enrichissement sur TSB 24h à 37°C, puis à un repiquage sur gélose nutritive 24h à 37°C à fin de tester les souches.

### **III. Extraction**

L'extraction à partir des plantes médicinales est un processus qui consiste à séparer les matières végétales actives ou les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes, les saponines, les stéroïdes et les glycosides des matières inertes ou inactives en utilisant un solvant approprié et une procédure d'extraction type. **(Abubakar et Haque, 2020)**

La sélection réussie des composés biologiquement actifs à partir d'un matériel végétal dépend largement du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction **(Pandey et Tripathi, 2014)**. Le choix du solvant dépend donc de ce que l'on veut faire de l'extrait. Si l'extraction est destinée à cribler les plantes pour les composants antimicrobiens, l'effet du solvant sur les procédures de séparation ultérieures n'est pas important, mais il ne doit en aucun cas inhiber la procédure du test biologique **(Eloff, 1998)**. En général, les solvants polaires comme l'eau, le méthanol et l'éthanol sont utilisés pour l'extraction des composés hydrophiles, tandis que les solvants non polaires comme l'hexane et le chloroforme sont utilisés pour l'extraction des composés non polaires **(Wallqvist et Covell, 1996)**.

Le **tableau I** illustre les différents solvants utilisés, la densité et les propriétés de chacun.

**Tableau I :** Propriétés des solvants d'extraction.  
(Eloff 1998; Pandey et Tripathi 2014; Belhaoues 2018 ; Abubakar et Haque 2020)

| Solvants                                  | Densité               | Propriétés  | Composés phytochimiques extraits   |
|---|-----------------------|---|--|
| Methanol<br>(SIGMA<br>ALDRICH®)           | 792 kg/m <sup>3</sup> | - Solvant polaire.<br>- Miscible dans l'eau.<br>- Extrait les métabolites secondaires polaires.   | Anthocyanes, Terpénoïdes, Saponines, Tanins, Xanthoxyllines, Totarol, Quassinoïdes, Lactones, Flavones, Phénones, Polyphénols. |
| Ethanol<br>(SIGMAALDRICH®)                | 789 kg/m <sup>3</sup> | - Solvant polaire.<br>- Extrait les composés hydrophile   | Tannins, Polyphénols, Polyacétylènes, Flavonols, Terpenoids, Stéroïdes, Alcaloïdes.  |
| Acetone<br>(BIOCHEM<br>Chemopharma®)      | 784 kg/m <sup>3</sup> | -Solvant polaire  | Phénols, Flavonols.  |
| Hexane<br>(BIOCHEM<br>Chemopharma®)       | 665kg/ml              | -Solvant apolaire   | Lipides.   |
| Chloroform<br>(BIOCHEM<br>Chemopharma®)   | 1.49kg/ml             | -Solvant polaire.<br>-Soluble dans l'alcool.  | Terpénoïdes, flavonoïdes.  |
| Ethylacetate<br>(BIOCHEM<br>Chemopharma®) | 902kg/ml              | -Solvant de faible polarité<br>-Extrait les composés hydrophobe   | Aglycones et composés de longues chaînes carbonées   |
| N-Butanol<br>(BIOCHEM<br>Chemopharma®)    | 810kg/ml              | -Solvant polaire.   | Large gamme de molécules dont les sucres et les composés glycolysés  |
| Eau distillée                             | 997kg/ml              | -Le solvant le plus polaire<br>-Utilisé pour l'extraction d'une large gamme de composés polaires.<br>-Dissout une large gamme de substances | Anthocyanes, amidons, tanins, saponines, terpénoïdes, polypeptides, lectines.  |

### III.1. Macération :

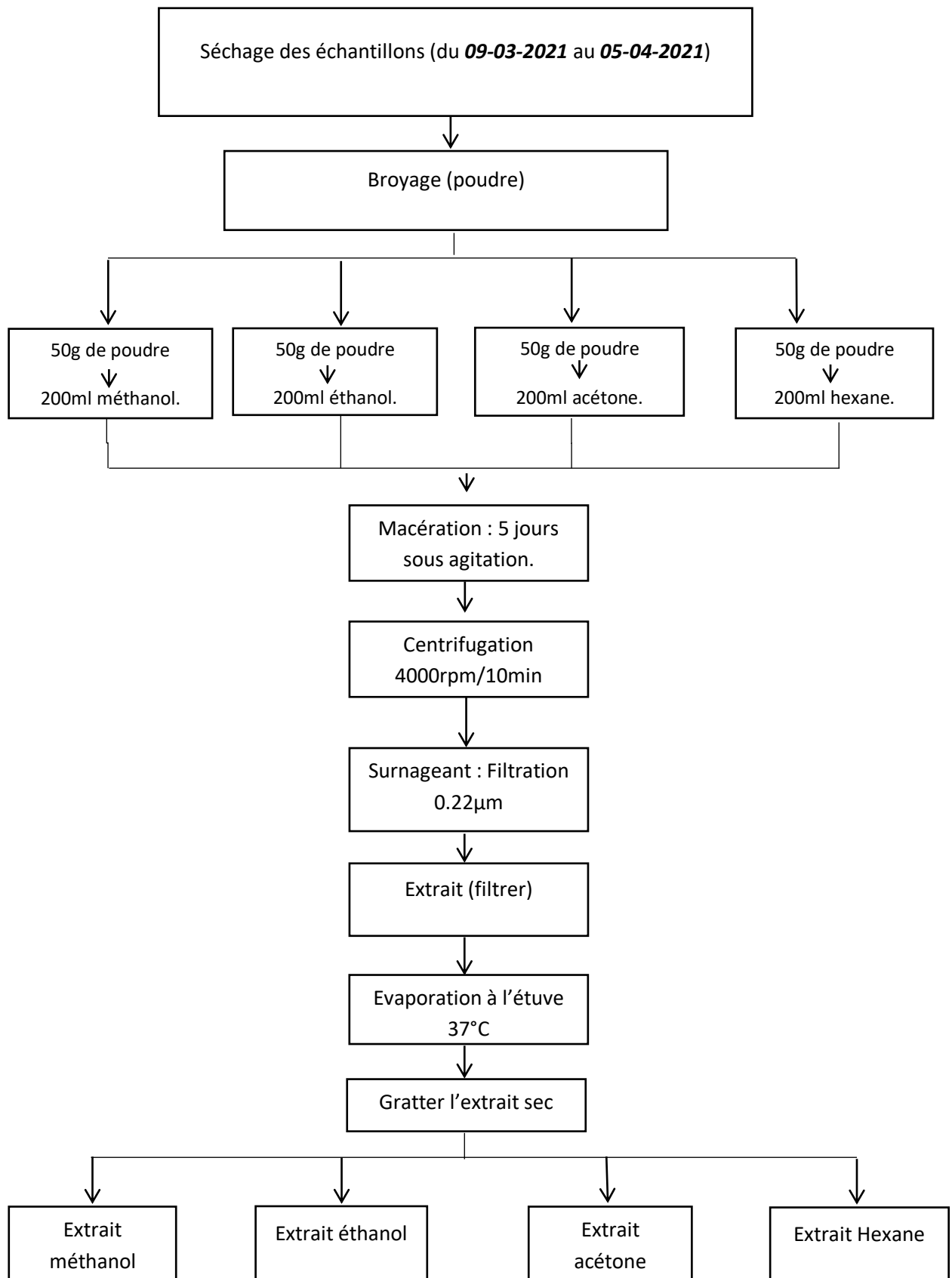
La macération est une procédure d'extraction dans laquelle du matériel végétal en poudre fine, qu'il s'agisse de feuilles, de tiges ou de graines, est placé à l'intérieur d'un récipient ; le solvant désiré est versé par-dessus jusqu'à recouvrir complètement la poudre. Le récipient est ensuite fermé et conservé pendant au moins trois jours. Le contenu est remué périodiquement, et s'il est placé dans une bouteille, il doit être secoué de temps en temps pour assurer une extraction complète. A la fin de l'extraction, la micelle (composés extraits avec le solvant) est séparée du marc (poudre insoluble restante) par filtration ou décantation. La micelle est ensuite séparée du solvant par évaporation dans une étuve ou sur un bain-marie à température moyenne. La chaleur peut entraîner la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est



pourquoi toutes les macérations sont réalisées sans chauffage. Cette méthode est donc pratique et très adaptée au matériel végétal thermolabile (**Abubakar et Haque, 2020**).

L'extraction a été réalisée avec quatre solvants différents de polarité variable. Méthanol, éthanol, acétone et hexane. La méthode d'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par (**Sasidharan et al, 2011 ; Abubakar et Haque 2020**) avec quelques modifications représentées sur la **figure II**.

50 g de poudre de feuilles et de graines séchées, individuellement, ont été soigneusement mélangés avec 200 ml d'une gamme de différents solvants dans des Erlenmeyers. Les flacons, contenant le mélange sont couverts d'aluminium et ont été placés sur une plaque d'agitation magnétique. Le tout est conservé à température ambiante pendant 5 jours sous agitation. Après le temps requis, l'extrait liquide a été transféré dans des tubes de Falcon, soumis à une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 minutes afin de se débarrasser du marc. Le surnageant clair des tubes Falcon a été filtré dans des verres de montre à l'aide des filtres 0,45 (afin d'éliminer les débris), et placés à l'étuve à 37°C. Cette étape a permis l'évaporation du solvant dans les verres de montre pour obtenir un extrait sec exempt de solvant des échantillons de graines et de feuilles *E. citriodora*. L'extrait sec a été gratté des verres de montre et récupéré comme poudre. Ainsi, 0,5g de chaque extrait en poudre obtenu, sont conservés dans des cryotubes et stockés à 4°C (**Wintachai et al, 2019**).



**Figure II :** Schéma représentant le protocole d'extraction

### **III.1.2. Détermination du rendement R%:**

Le rendement d'extraction est défini comme le rapport entre la masse de l'extrait sec et la masse de la matière végétale initiale. (Mohammedi, 2005).

$$R\% = \frac{\text{Masse de l'extrait sec}}{\text{Masse de la matière végétale initiale}} \times 100$$

### **III.2. Fractionnement :**

Le fractionnement est un processus de séparation d'extraits de plantes en diverses fractions, comprenant un certain nombre de composés. Le processus se poursuit jusqu'à ce que le composé pur soit isolé. Lorsque plusieurs solvants sont nécessaires pour le fractionnement, ils doivent être ajoutés dans l'ordre croissant de polarité et de densité. (Abubakar et Haque, 2020)

#### **III.2.1. Extraction méthanolique par macération**

Une autre extraction a été réalisée en suivant les mêmes étapes que la première (Figure II illustrant le protocole d'extraction) mais cette fois-ci 200g de poudre de graines ont été mélangés avec 800ml de méthanol. L'extrait méthanolique aqueux récupéré est concentré sous vide avec un évaporateur rotatif à 40°C (Penchev, 2010), filtré avec un filtre de 0,45µm et laissé sécher à l'étuve à 37°C jusqu'à évaporation complète du solvant.

Gratter l'extrait sec pour obtenir l'extrait brut méthanolique et conserver à 4°C.

#### **III.2.2. Protocole du fractionnement**

- 1) Lorsque quatre solvants différents (n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) sont sélectionnés, le fractionnement commence par l'humidification ou la dissolution complète de 10g d'extrait brut avec 100ml d'eau distillée stérile dans un bécher. Cette opération est suivie d'un transfert dans une ampoule à décanter.
- 2) Ajouter 100ml d'hexane, couvrir l'ampoule d'aluminium, bien agiter les deux phases et laisser décanter. Après séparation, laisser décanter la phase aqueuse dans un bécher. Récupérer le contenu restant dans un récipient propre pour obtenir la fraction à l'hexane.
- 3) La phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter, et est additionnée de 100ml de chloroforme, couvrir, mélanger les phases et laisser décanter. Après séparation, récupérer la fraction du chloroforme se trouvant au fond de l'ampoule puis la fraction aqueuse.

- 4) Remettre la fraction aqueuse dans l'ampoule, ajouter 100ml d'acétate d'éthyle, bien mélanger et laisser décanter. Laissez décanter la phase d'eau distillée dans un bécher propre une autre fois et ensuite la fraction d'acétate d'éthyle.
- 5) Reverser la solution d'eau distillée dans l'ampoule à décanter et ajouter le dernier solvant : 100ml de N-Butanol. L'ampoule est bien scellé avec de l'aluminium, bien mélanger. Laisser les deux phases se séparer. Récupérer la phase aqueuse restante puis récupérer la fraction N-butanol.
- 6) La partie restante après le fractionnement est appelée fraction aqueuse résiduelle car l'extrait brut a d'abord été dissous dans l'eau.
- 7) Filtrer chaque fraction à l'aide d'un filtre de 0,45µm dans des verres de montre et les mettre à l'étuve à 37°C jusqu'à évaporation complète des solvants.
- 8) Gratter l'extrait séché des verres de montre et récupérer l'extrait en poudre de chaque fraction. (Mokhnache, Meziane et Chabbah, 2019)

### **III.2.3. Détermination du rendement**

Nous avons déterminé le rendement en appliquant la même équation que celle mentionnée plus haut.

## **IV. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits des feuilles et des graines d'*E. citriodora* obtenus par les différents solvants.

### **IV.1. Standardisation des inocula bactériens**

La pureté des souches bactériennes, la taille de l'inoculum sont des facteurs qui peuvent influencer l'activité antibactérienne in vitro. En effet, un inoculum trop dense peut masquer l'effet antibactérien, et conduire à des résultats erronés et un inoculum trop faible peut être à l'origine des faux positifs. Afin d'obtenir un tapis homogène avec des colonies non-confluentes, un inoculum de  $10^8$  UFC/ml équivalent à 0,5 McFarland a été préparé. Les souches bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritive. La standardisation de l'inoculum bactérien a été réalisée en préparant une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune (18 à 24 heures) ; prélever 3 à 4 colonies bien isolées à l'aide d'un ose en plastique et les dissocier dans 2ml d'eau physiologique.

### **IV.2. Préparation des extraits**

Afin d'avoir une concentration de 0,25g/ml, nous avons mélangé 0,5g de poudre d'extrait de chaque solvant avec 2ml d'eau distillée stérile dans un tube stérile, bien homogénéiser au vortex jusqu'à dissolution totale de la poudre. Transférer la solution obtenue dans un autre

tube stérile en la filtrant avec un filtre de 0,22µm (permet d'éliminer tout autre microorganismes notamment les phages). Concernant l'extrait à l'hexane obtenu soit par macération ou par fractionnement, qui extrait les composés lipidiques, il nous a été difficile de le dissoudre directement dans de l'eau distillée stérile, nous avons donc d'abord procédé à une solubilisation en ajoutant 100µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0,5g d'extrait afin d'avoir 5% de DMSO seulement, bien mélangé au vortex. Ensuite, nous avons ajouté, progressivement, 1900µl d'eau distillée stérile pour avoir la concentration désirée, et puis bien homogénéisée. Le DMSO est un solvant polaire aprotique, il est connu pour sa capacité à solubiliser les composés organiques et certains composés inorganiques et il est soluble dans l'eau, c'est pourquoi nous l'avons utilisé pour solubiliser l'extrait à l'hexane (**Bégin et al, 2001**). Nous avons utilisé 5% de DMSO car cette concentration n'a pas d'effet toxique sur les bactéries.

#### **IV.3. Tests d'activité antimicrobienne :**

L'activité antimicrobienne des différents extraits a été déterminée par la méthode de diffusion des disques décrite par (**Bauer, 1966**), où les disques antibiotiques sont remplacés par des disques stériles vierges imprégnés des différents extraits. Des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre ont été coulé avec 10ml de MH, pour avoir une épaisseur de 4mm. La suspension bactérienne est étalée uniformément sur la surface de la gélose MH à l'aide d'un écouvillon stérile en utilisant la technique des quadrants ou par inondation. Des disques stériles de 6mm de diamètre ont été imprégnés de 30µl de chaque extrait d'une concentration de 0,25g/ml et ont été placés aseptiquement avec des pinces flambées sur la gélose préalablement ensemencé et appuyés légèrement pour assurer le contact. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 18-24h à 37°C. Les mêmes procédures ont été effectuées pour tester les extraits obtenus par macération et ceux du fractionnement.

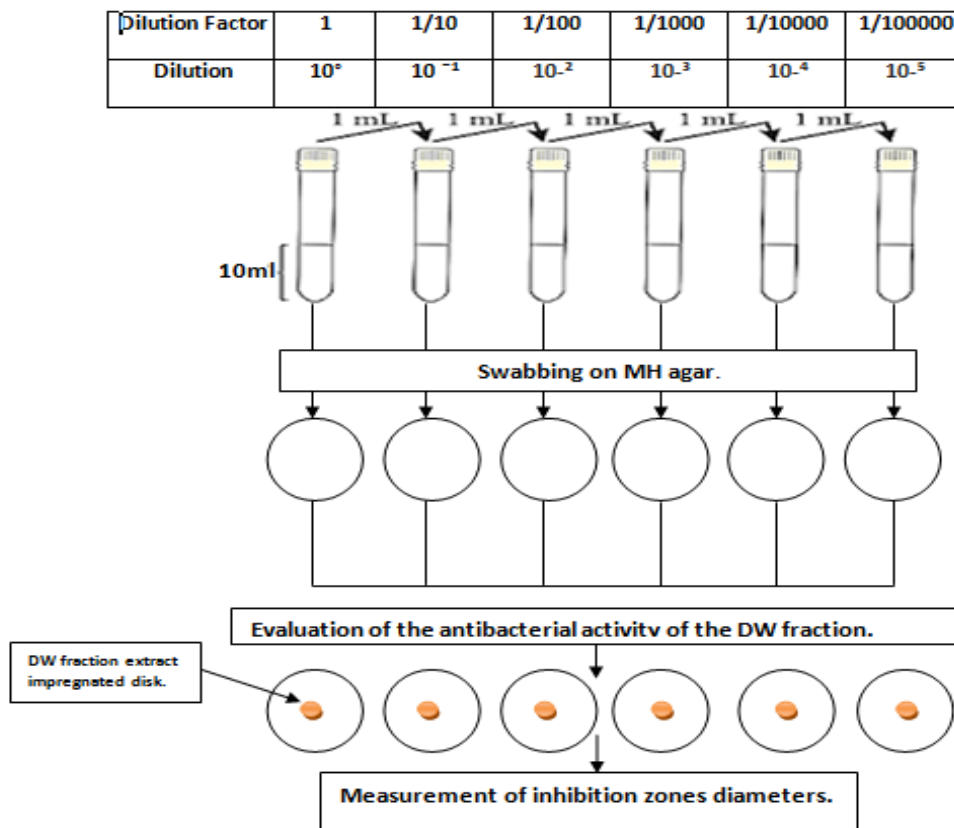
Des contrôles négatifs ont été réalisés en imprégnant le disque avec 30µl de DMSO pur et 5%.

- **Effet de la fraction ED à 0.25g/ml sur les SARM**

L'activité de l'un des extraits issus du fractionnement a également été testée sur 3 souches différentes de SARM en effectuant des dilutions décimales de l'inoculum en suivant le même protocole des tests d'activité décrit sur **la figure IV**.

L'activité antibactérienne de la fraction d'eau distillée sur le SARM : A partir d'une jeune culture de 18h, 3 colonies sont transférées dans 10 ml d'eau physiologique stérile, c'est la solution mère. 1 ml de cette solution mère est transféré dans 9ml d'eau physiologique stérile

pour avoir une suspension diluée au 1/10ème, c'est la suspension  $10^{-1}$ . Ainsi, 1ml est transféré à chaque fois d'un tube à l'autre pour obtenir des suspensions dont les concentrations sont respectivement de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ .- et  $10^{-5}$ . L'activité antibactérienne de l'extrait de la fraction ED à 0,25g/ml est évaluée sur toutes les dilutions réalisées, avec la méthode décrite par Kirby Bauer : ensemencement par écouvillonnage sur gélose MH, puis dépôt du disque stérile imprégné d'extrait d'eau distillée. Incubé par la suite pendant 18-24h à 37°C (Bauer, 1966).



**Figure IV :** Schéma résumant les principales étapes de l'activité antibactérienne de la fraction eau distillée sur les différentes concentrations bactériennes de SARM 304.

*Résultats*

## I. Séchage des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*

Les dix lots de 200g de feuilles et les trois lots (deux lots de 200g et, un lot de 77g) de graines récoltées, ont atteint le plateau de séchage après 28 jours (du 09 mars au 5 avril 2021) à l'étuve à 40°C .

On a remarqué que la différence entre le poids initial et le poids final après séchage des graines est beaucoup moins important par rapport aux feuilles, comme l'indique le **tableau II** qui montre la différence de poids observé de chaque organe avant et après séchage.

**Tableau II** : Poids des feuilles et des graines à la récolte et après séchage.

|                 | Poids initial | Poids après séchage | Différence de poids observée |
|-----------------|---------------|---------------------|------------------------------|
| <b>Feuilles</b> | 2000.841g     | 1201.449g           | 799.392g                     |
| <b>Graines</b>  | 478.724g      | 474.968g            | 3.756g                       |

## II. Rendement

### II.1. Rendement des extraits obtenus par macération

Le **tableau III** représente les rendements d'extraction obtenus par macération des deux organes d'*Eucalyptus citriodora* en utilisant comme solvant le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'hexane.

**Tableau III** : Rendements obtenus après extraction par macération

|                 | Méthanol | Ethanol | Acétone | Hexane |
|-----------------|----------|---------|---------|--------|
| <b>Graines</b>  | 14%      | 11%     | 7%      | 1.6%   |
| <b>Feuilles</b> | 9%       | 8%      | 3.8%    | 0.8%   |

Le rendement des extraits de solvants de la graine est plus important que celui de la feuille. Cette différence pourrait être attribuée à la sélectivité de l'extraction.

Il est noté que, quelque soit l'organe ou le solvant, les rendements d'extraction obtenus n'excèdent pas les 15%.

L'extraction au méthanol, donne le meilleur rendement avec 14% pour la graine et 9% pour les feuilles, suivi de l'extrait éthanolique, acétonique et enfin l'extrait à l'hexane.

### II.2. Rendement des extraits obtenus après fractionnement

Nous avons choisi l'extrait méthanolique pour effectuer le reste des expériences, il était l'extrait avec le rendement le plus importants et ayant des résultats favorables

A partir de 10g de poudre d'extrait méthanolique de la graine nous avons obtenu pour chaque fraction les rendements présentés dans le **tableau IV**.



La fraction à l'eau distillée montre un meilleur rendement par rapport aux autres fractions suivi par la fraction butanol. Tandis que les fractions hexane, chloroforme et éthyle acétate ont montré un faible rendement.

**Tableau IV** : Rendement du fractionnement réalisé sur l'extrait méthanolique de la graine d'*Eucalyptus citriodora*.

|                         | <b>Hexane</b> | <b>Chloroforme</b> | <b>Ethyle acétate</b> | <b>Butanol</b> | <b>Eau distillée</b> |
|-------------------------|---------------|--------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| <b>Fractionnement 1</b> | 3%            | 5,84%              | 2,73%                 | 6,19%          | 15,69%               |
| <b>Fractionnement 2</b> | 5.3%          | 3%                 | 6%                    | 15%            | 58%                  |

### **III. Résultats de l'activité antibactérienne**

Dans nos conditions expérimentales, **les tableaux V, VI, VII et VIII** révèlent l'activité antimicrobienne, les degrés de sensibilité de l'ensemble des souches testées selon l'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne de Ponce (**Ponce et al, 2003**) (Voire **annexe 5** pour l'échelle de l'estimation de Ponce).

L'activité antibactérienne des extraits de feuilles et de graines d'*Eucalyptus citriodora* est testée vis-à-vis de 6 espèces bactériennes, 3 Gram négatif : *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* *Enterobacter sp* et 3 Gram positif : *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp* et *S. aureus*.

3 souches sont testées pour chacune des espèces de *Klebsiella sp*, *Streptococcus sp*, *Enterobacter sp*, et *Escherichia coli*. Tandis que 6 souches sont testées pour *Staphylococcus aureus* dont 3 SARM et, *Enterococcus sp*.

#### **III.1. Activité antibactérienne des extraits de la macération**

Nous avons testé 24 souches bactériennes vis-à-vis de 8 extraits de la plante médicinale *Eucalyptus citriodora* : 4 extraits de la feuille et 4 extraits de la graine.

La détermination des diamètres de la zone d'inhibition est faite autour des disques contenant l'extrait testé à une concentration de 0,25g/ml.

**Tableau V:** Représente les résultats des tests d'activité de l'extrait méthanolique des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*.

| Espèce bactérienne           | GRAM    | Souche       | FMM    |                      |                          | GMM    |                      |                          |
|------------------------------|---------|--------------|--------|----------------------|--------------------------|--------|----------------------|--------------------------|
|                              |         |              | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | SARM 304     | 11     | +                    | S                        | 16     | ++                   | TS                       |
|                              |         | SARM 306     | 10     | +                    | S                        | 18     | ++                   | TS                       |
|                              |         | SARM36411    | 7      | -                    | R                        | 24     | +++                  | ES                       |
|                              |         | St D242      | NA     | -                    | R                        | 29     | +++                  | ES                       |
|                              |         | St D243      | 9      | +                    | S                        | 14     | +                    | S                        |
|                              |         | St 671       | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
| <i>Escherichia coli</i>      | Négatif | E. coli 856  | 7      | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | E. coli 591  | 7      | -                    | R                        | 11     | +                    | S                        |
|                              |         | E. coli 8787 | 7      | -                    | R                        | 11     | +                    | S                        |
| <i>Streptococcus Sp</i>      | Positif | Strep 4787   | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | Strep 1471   | NA     | -                    | R                        | 14     | +                    | S                        |
|                              |         | Strep 15964  | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
| <i>Klebsiella sp</i>         | Négatif | K 4541       | NA     | -                    | R                        | 8      | -                    | S                        |
|                              |         | K 15506      | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 17523      | NA     | -                    | R                        | NA     | +                    | R                        |
| <i>Enterobacter sp</i>       | Négatif | EB 4885      | NA     | -                    | R                        | 10     | +                    | S                        |
|                              |         | EB 22583     | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | EB13790      | NA     | -                    | R                        | 8      | +                    | S                        |
| <i>Enterococcus sp</i>       | Positif | Ent.C 7773   | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | Ent.C5959    | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | Ent. 15310   | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E104         | 7      | -                    | R                        | 8      | +                    | S                        |
|                              |         | E2585        | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | E5565        | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |

NA: Non activité, R : Résistant (-), S : Sensible (+), TS : Très sensible (++) , ES : Extrêmement sensible (+++).



**Figure V:** Zones d'activité obtenues par l'extrait méthanolique (A) et ethanolic (B) de la graine d'*Eucalyptus citriodora* sur les différentes souches de *Staphylococcus aureus*.

**Tableau VI :** Représente les résultats des tests d'activité de l'extrait éthanolique des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*.

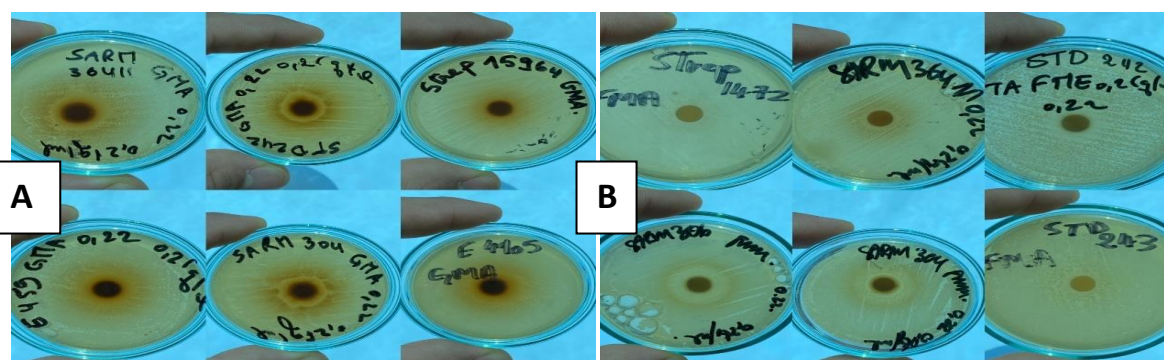
| Espèce bactérienne           | GRAM    | Souche              | FME    |                      |                          | GME    |                      |                          |
|------------------------------|---------|---------------------|--------|----------------------|--------------------------|--------|----------------------|--------------------------|
|                              |         |                     | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | SARM 304            | NA     | -                    | R                        | 18     | ++                   | TS                       |
|                              |         | SARM 306            | NA     | -                    | R                        | 13     | +                    | S                        |
|                              |         | SARM36411           | NA     | -                    | R                        | 14     | +                    | S                        |
|                              |         | St D242             | 14     | +                    | S                        | 12     | +                    | S                        |
|                              |         | St D243             | NA     | -                    | R                        | 14     | +                    | S                        |
|                              |         | St 671              | NA     | -                    | R                        | 11     | +                    | S                        |
| <i>Escherichia coli</i>      | Négatif | <i>E. coli</i> 856  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | <i>E. coli</i> 591  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | <i>E. coli</i> 8787 | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Streptococcus sp</i>      | Positif | Strep 4787          | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
|                              |         | Strep 1471          | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
|                              |         | Strep 15964         | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
| <i>Klebsiella sp</i>         | Négatif | K 4541              | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 15506             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 17523             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterobacter sp</i>       | Négatif | EB 4885             | NA     | -                    | R                        | 10     | +                    | S                        |
|                              |         | EB 22583            | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
|                              |         | EB13790             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterococcus sp</i>       | Positif | Ent.C 7773          | NA     | -                    | R                        | 7      | -                    | R                        |
|                              |         | Ent.C5959           | NA     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | Ent. 15310          | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E104                | NA     | -                    | R                        | 11     | +                    | S                        |
|                              |         | E2585               | NA     | -                    | R                        | 8      | +                    | S                        |
|                              |         | E5565               | NA     | -                    | R                        | 8      | +                    | S                        |

NA: Non activité, R : Résistant (-), S : Sensible (+), TS : Très sensible (++)  
 (+++).

**Tableau VII:** Représente les résultats des tests d'activité de l'extrait à l'acétone des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*.

| Espèce bactérienne           | GRAM    | Souche       | FMA    |                      |                          | GMA    |                      |                          |
|------------------------------|---------|--------------|--------|----------------------|--------------------------|--------|----------------------|--------------------------|
|                              |         |              | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | SARM 304     | NA     | -                    | R                        | 15     | ++                   | TS                       |
|                              |         | SARM 306     | NA     | -                    | R                        | 16     | ++                   | TS                       |
|                              |         | SARM36411    | NA     | -                    | R                        | 18     | ++                   | TS                       |
|                              |         | St D242      | NA     | -                    | R                        | 14     | +                    | S                        |
|                              |         | St D243      | 10     | +                    | S                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | St 671       | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Escherichia coli</i>      | Négatif | E. coli 856  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E. coli 591  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E. coli 8787 | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Streptococcus sp</i>      | Positif | Strep 4787   | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Strep 1471   | 10     | -                    | R                        | 9      | +                    | S                        |
|                              |         | Strep 15964  | NA     | -                    | R                        | 10     | +                    | S                        |
| <i>Klebsiellasp.</i>         | Négatif | K 4541       | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 15506      | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 17523      | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterobacter sp</i>       | Négatif | Eb 4885      | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | EB 22583     | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | EB13790      | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterococcus sp</i>       | Positif | Ent.C 7773   | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Ent.C5959    | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Ent. 15310   | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E459         | 9      | +                    | S                        | 15     | ++                   | TS                       |
|                              |         | E6822        | NA     | -                    | R                        | 8      | +                    | S                        |
|                              |         | E4905        | NA     | -                    | R                        | 15     | ++                   | TS                       |

NA: Non activité, R : Résistant (-), S : Sensible (+), TS : Très sensible (++)



**Figure VI :** Zones d'activité obtenues par l'extrait à l'acétone de la graine (A) et des autres extraits de la feuille(B) d'*Eucalyptus citriodora* sur différentes souches testées.

**Tableau VIII:** Représente les résultats des tests d'activité de l'extrait hexanal des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*.

| Espèce bactérienne           | GRAM    | Souche              | FMH    |                      |                          | GMH    |                      |                          |
|------------------------------|---------|---------------------|--------|----------------------|--------------------------|--------|----------------------|--------------------------|
|                              |         |                     | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne | Ø (mm) | Degré de sensibilité | Activité antibactérienne |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | SARM 304            | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | SARM 306            | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | SARM36411           | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | St D242             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | St D243             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | St 671              | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Escherichia coli</i>      | Négatif | <i>E. coli</i> 856  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | <i>E. coli</i> 591  | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | <i>E. coli</i> 8787 | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Streptococcus sp.</i>     | Positif | Strep 4787          | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Strep 1471          | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Strep 15964         | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Klebsiellasp.</i>         | Négatif | K 4541              | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 15506             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | K 17523             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterobactersp.</i>       | Négatif | EB 4885             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | EB 22583            | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | EB13790             | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
| <i>Enterococcus sp</i>       | Positif | Ent.C 7773          | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Ent.C5959           | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | Ent. 15310          | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E459                | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E6822               | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |
|                              |         | E4905               | NA     | -                    | R                        | NA     | -                    | R                        |

**NB :** Les control négatifs DMSO 5%, utilisé pour la dissolution de l'extrait à l'hexane, n'ont montré aucun effet anti bactérien sur les souches. NA: Non activité, R : Résistant (-), S : Sensible (+), TS : Très sensible (++) , ES : Extrêmement sensible(+++).

Nos résultats montrent que :

L'extrait méthanolique de la feuille (FMM), ne montre aucune activité significative vis-à-vis des souches testées sauf envers quelques unes de *Staphylococcus* qui se révèlent sensible à ce dernier : SARM 304 (11mm), SARM 306 (10mm) et St D243 (9mm). L'extrait éthanolique (FME) à une activité uniquement sur la souche St D242 de *Staphylococcus aureus* tandis que l'extrait à l'acétone (FMA) montre une très faible activité vis-à-vis des souches Strep1472, St D243 avec (10mm) et (9mm) pour la souche E104.

En revanche l'extrait à l'hexane ne semble avoir aucune activité que ce soit pour la feuille ou pour la graine.

En ce qui concerne les extraits de la graine :

L'extrait méthanolique (GMM), s'est avéré actif sur toutes les espèces qu'elles soit Gram positif ou négatif (exception faite pour *Klebsiella sp.* souche K17523). Chacune présente un degré de sensibilité différent de l'autre : *Staphylococcus aureus* souche St D242 et SARM 36411, avec des diamètres respectifs de 29mm et 24mm s'avèrent extrêmement sensibles, SARM 304, SARM 306, St D243 et Strep.1472 sont très sensible avec des diamètres respectives de 16mm, 18mm, 14mm et 14mm. *Enterococcus sp.*, *Enterobacte rsp* ainsi que les autres souches de *Streptococcus sp* ont également montré une faible activité vis-à-vis de cet extrait.

De son côté l'extrait éthanolique de la graine (GME), montre aussi des degrés de sensibilité diversifiés, allant de la très sensibilité du SARM 304 (18mm), vers la sensibilité des autres souches de *Staphylococcus aureus* et de *Enterococcus sp.* La plupart des Gram négatif testés semblent résister à cet extrait notamment les *E.coli* et les Klebsielles.

GMA, extrait à l'acétone de la graine, ne présente aucun effet antibactérien sur les Gram négatif *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.* En revanche, on remarque la sensibilité des Gram positif avec des diamètres allant de 8mm à 16mm.

➤ L'extrait de la graine obtenue avec le méthanol s'est avéré le plus performant vis-à-vis de la quasi-totalité des souches testées et présente les meilleures activités spécifiques. C'est pour cela que l'extrait méthanolique de la graine a été retenu pour la suite de toutes les expériences effectuées.

### III.2. Activité antibactérienne des extraits issus du fractionnement

L'analyse de l'activité antibactérienne des fractions de l'extrait méthanolique de la graines résumé dans le **Tableau IX** montre que la FED, la FB et la FEA sont les fractions les plus inhibitrices, notamment, contre Ent.C L826 BLSE, les *staphylocoques* : SARM 304, SARM 36411 et St staph320, les diamètres observés à une concentration de l'ordre de 0.25g/ml, étant de (24,30,10mm) , (22,22,23mm) , (18, 18,15mm) et (15,13,15mm) respectivement pour les trois extraits testées sur chacune des souche préalablement citées.

Les extraits de la fraction à l'hexane FH montrent une très faible activité sur quelques souches uniquement citant les entérocoques, souches Ent.C L826 BLSE, E2304 et staphylocoques : StStaph 320 avec des diamètres respectifs de 8mm, 13mm et 12mm. La fraction FCH ne montre, quant à elle, aucune activité significative sur la totalité des souches testées.

Quelques zones d'inhinition de quelques fractions sont illustrées sur la **figure VII**.

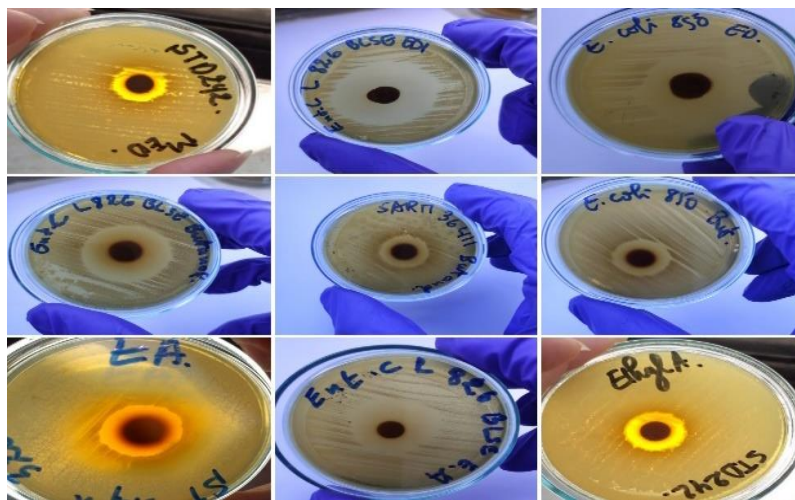


Figure VII : Zones d'activités obtenues par les extraits (Ethylacétate, Butanol et eau distillée) issus du fractionnement.

Tableau IX : Résultats des tests d'activité des fractions de l'extrait méthanolique de la graine d'*Eucalyptus citriodora*.

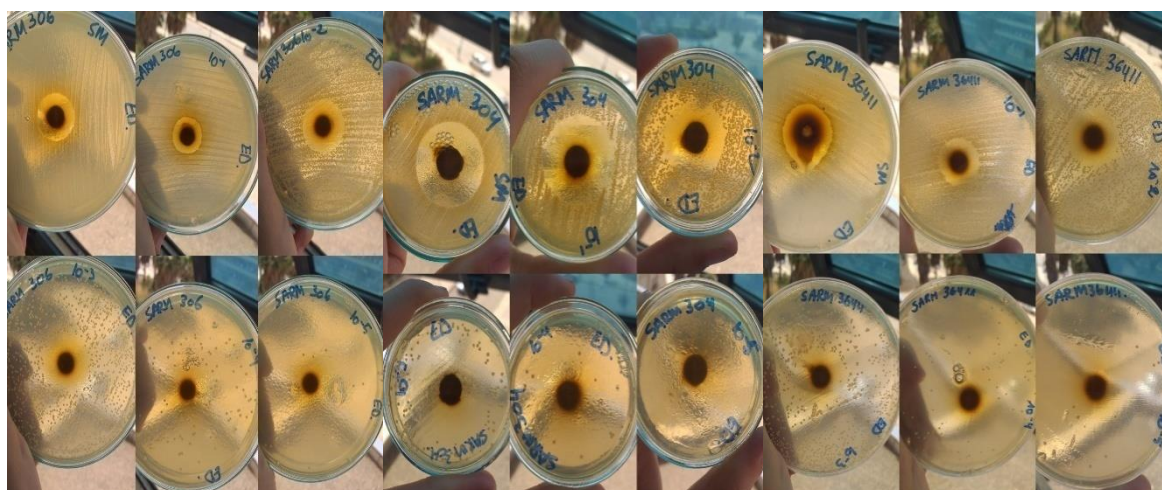
| Fraction        | Hexane |    |   | Chloroforme |    |   | Ethyl-acétate |    |    | Butanol |     |    | Eau distillée |     |    |
|-----------------|--------|----|---|-------------|----|---|---------------|----|----|---------|-----|----|---------------|-----|----|
|                 | Ø (mm) | DS | A | Ø (mm)      | DS | A | Ø (mm)        | DS | A  | Ø (mm)  | DS  |    | Ø (mm)        | DS  | A  |
| SARM 304        | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 23            | ++ | ES | 22      | +++ | ES | 22            | +++ | ES |
| SARM 306        | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 11            | +  | S  | 13      | +   | S  | 11            | +   | S  |
| SARM36411       | 9      | +  | S | 7           | -  | R | 15            | ++ | TS | 18      | +   | TS | 18            | ++  | TS |
| St D242         | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 14            | +  | S  | 12      | +   | S  | 14            | +   | S  |
| St D243         | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 11            | +  | S  | 13      | +   | S  | 11            | +   | S  |
| StStaph320      | 12     | +  | S | NA          | -  | R | 15            | ++ | TS | 13      | +   | S  | 15            | ++  | TS |
| E. coli 856     | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 11            | +  | S  | 15      | ++  | TS | 24            | +++ | ES |
| E. coli 591     | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| E. coli 8787    | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 19            | ++ | TS | 11      | +   | S  | 7             | -   | R  |
| Strep 4787      | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 10            | +  | S  | 8       | +   | S  | 9             | +   | S  |
| Strep 4353      | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| Strep 53099     | 10     | +  | S | NA          | -  | R | 12            | +  | S  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| K 1178          | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 6             | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| K 15506         | 6      | -  | R | NA          | -  | R | 11            | +  | S  | 10      | +   | S  | 9             | +   | S  |
| KL405BLSE       | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| EB 4885         | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| EB 22583        | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| EB 191          | NA     | -  | R | 7           | -  | R | 15            | ++ | TS | 13      | +   | S  | 7             | -   | R  |
| Ent.C 7773      | NA     | -  | R | 6           | -  | R | 7             | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| Ent.C L826 BLSE | 8      | +  | S | NA          | -  | R | 10            | R  | R  | 30      | +++ | ES | 24            | +++ | ES |
| Ent.C 15310     | 6      | -  | R | NA          | -  | R | 12            | +  | R  | 10      | +   | R  | 10            | +   | S  |
| E6822           | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| E2304           | 13     | -  | R | NA          | -  | R | 8             | +  | S  | 7       | -   | R  | NA            | -   | R  |
| E5556           | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 12            |    |    | 10      | +   | S  | 11            | +   | S  |
| BLSE 1903       | NA     | -  | R | NA          | -  | R | 12            | +  | S  | 12      | +   | S  | 12            | +   | S  |
| CS63 KPC        | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| 820 OXA-48 CS3  | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |
| 8739 CMY-4      | NA     | -  | R | NA          | -  | R | NA            | -  | R  | NA      | -   | R  | NA            | -   | R  |

• I.3.3.Effet de la fraction ED à 0.25g/ml sur les SARM

D’après le **tableau X** qui donne le diamètre des zones d’inhibition de la fraction ED sur les différents SARM testées, et la **figure VIII** qui représente des photos prises des zones d’inhibition de la fraction ED sur les SARM testés, on constate que plus la concentration bactérienne diminue, plus la zone d’inhibition s’élargit.

**Tableau X** : Diamètre des zones d’inhibition donnée par la fraction ED sur différentes dilutions de SARM.

|           | SM   | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ |
|-----------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SARM 306  | 19mm | 20mm      | 25mm      | 27mm      | 28mm      | /         |
| SARM 304  | 25mm | 26mm      | 24mm      | 34mm      | 26mm      | /         |
| SARM36411 | 23mm | 25mm      | 27mm      | 26mm      | 28mm      | /         |



**Figure VIII:**Zones d’activité donnée par l’extrait a l’eau distillée sur les différentes concentration de SARM, de la SM a la concentration 10-5



# *Discussion générale*

Dans ce travail, nous avons entamé une démarche pour rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes vis-à-vis de souches pathogènes sensibles et résistantes aux antibiotiques, par l'extraction avec des solvants. L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre des feuilles et des graines selon leur degré de solubilité. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Plusieurs chercheurs ont révélé que les plantes sèches donnent un meilleur rendement que les plantes fraîches. **Zrira et al, (1994)** ont rapporté que les feuilles d'*Eucalyptus globulus* donnaient un meilleur rendement à l'état sec (4,29%) qu'à l'état frais (3,91%). On déduit donc, qu'il y'a une relation entre le rendement et l'état de fraîcheur de la plante utilisée pour l'extraction, c'est pour cela que l'étude a été effectuée sur des échantillons secs. Dans l'étude sur la comparaison entre trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes de l'espèce *Thymelaea hirsuta (L)*, **Bouchelaghem (2020)**, a démontré que le meilleur rendement d'extraction est attribué à la macération avec une moyenne de 25.15% en comparaison avec la décoction et de l'infusion (20% et 13.1%). En effet, cette dernière est la méthode préconisée en médecine traditionnelle. Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres tels : le solvant, le pH, la température, et la composition de l'échantillon (**Quy et al, 2014**). Il y a également une autre raison qui pourrait avoir un impact sur le rendement d'extraction, c'est le temps d'extraction. Selon **Rhazi et al, (2015)** la progression du temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols. De ce fait, les rendements d'extraction varient d'un végétal à un autre et dépendent des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisées et notamment leur polarité ; ce qui suggère que les plantes contiennent des molécules couvrant une large gamme de polarité (**Hadjsalem, 2009**). Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et donc les activités biologique (**Lee et al, 2003**).

Nous avons mis en évidence la présence ou l'absence d'un pouvoir inhibiteur de chacun des extraits testés, le comportement des différentes souches étudiées varie selon la partie de la plante, le solvant utilisé et, d'une autre part les souches testées réagissent différemment. De telles observations sont rapportées par différents auteurs qui ont travaillé

sur diverses souches bactériennes en présence de divers extraits de plantes (**Pareima, 2007 ; Zaidi et al, 2007**). D'après les résultats obtenus, les extraits de la graine de l'*Eucalyptus citriodora* semble jouir d'une activité inhibitrice beaucoup plus importante que celle des extraits de feuilles sur une large gamme de bactéries. Ceci pourrait être dû à une différence de composition entre ces deux organes, puisqu'elle est dépendante de plusieurs facteurs environnementaux tels le climat, la température, les nutriments (**Akin et al, 2010**), l'incidence de la lumière ; la saison de la récolte et la période de germination (**Da-Silva et al, 2011**), et le processus d'extraction. La composition est dépendante également de l'état de fraîcheurs des feuilles et des graines utilisées (**Recoquillay et al, 2009**).

La méthode de diffusion des disques sur gélose a révélé que l'effet antibactérien des extraits de la plante médicinale d'*Eucalyptus citriodora* diffère d'une souche à une autre, d'un organe de la plante utilisé à un autre et d'un solvant à un autre. Les différents extraits testés montre que les extraits à base de graine de *Corymbia citriodora* notamment les extraits méthanolique, éthanolique et la fraction d'eau distillée, butanol et acétate d'éthyle ont une activité antibactérienne *vis-à-vis* de la grande majorité des bactéries testées. Cependant, Les staphylocoques, le SARM précisément semble être l'espèce la plus sensible ce qui est en accord avec les résultats des études antérieures menées sur *E. globulus* et celles menées par (**Traore et al, 2013**) sur l'espèce *E. houseana* et sur *E. odorata* menées par (**Elaiissi et al, 2011**).

Les bactéries Gram négatif testées se sont avérées les plus résistantes alors que les Gram positif, notamment le SARM, sont les plus sensibles. Ces résultats sont en accord avec plusieurs publications concernant les extraits de plantes médicinales où les bactéries à Gram négatif dévoilent une forte résistance aux extraits de plantes tels que les huiles essentielles, que les bactéries à Gram positif (**Ammer et al, 2016**). Cette différence est liée à la présence d'une enveloppe comprenant une membrane cellulaire riche en LPS et d'une paroi chez les bactéries Gram négatif ; la membrane externe constitue donc une barrière de perméabilité efficace ; le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophiles, et les porines excluent le passage des molécules hydrophobes de poids moléculaire élevés (**Nikaido, 2003**) cela empêche alors les agents antimicrobiens d'atteindre leur cible dans les cellules bactériennes. Contrairement aux bactéries Gram positif qui sont moins protégées contre les agents antimicrobiens ; le peptidoglycane qui les compose n'entrave que la diffusion des molécules de poids moléculaire supérieur à 50000 Da (**Hogar et Kolter, 2003**).

Les effets antimicrobiens des extraits de plantes ont été rapportés par de nombreux auteurs. Il a été montré que l'activité antibactérienne des extraits de plantes est attribuée à leurs composés phénoliques (**Van-der et Pretorius, 2001; Panizzi et al, 2002**).

Les extraits phénoliques de *Robus ulmifolius* L. et de *Satureja hortensis* L. ont montré une activité antimicrobienne à l'égard d'une large gamme de pathogènes (**Panizzi et al, 2002 ; Karaman et al, 2003**). **Cowan (1999)**, rapporte que plusieurs classes de polyphénols comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les terpènes servent de mécanismes de défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes. L'action inhibitrice des polyphénols sur la croissance bactérienne est rapportée dans plusieurs études récentes démontrant que ces molécules sont douées d'un pouvoir antibactérien important sur les différentes souches bactériennes à Gram positif et négatif. Il a également été rapporté que ces composés étaient capables, face à une infection bactérienne, de renforcer les défenses naturelles du corps par stimulation du système immunitaire (**Azzouzi et Brahmi, 2019**). **Chung et al, (1998)** ont également rapporté que l'acide tannique inhibait la croissance d'une quinzaine de bactéries testées, alors que l'acide gallique et l'acide ellagique n'inhibait aucun d'entre eux. Ils ont conclu que le lien ester entre l'acide gallique et le glucose (pour former l'acide tannique) était important pour le potentiel antimicrobien de ces composés. Selon **Satrani et al, (2007)**, les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car ils sont solubles dans les milieux aqueux et ils provoquent des dégâts importants sur leurs parois cellulaires ; les alcools possèdent une activité bactéricide plutôt que bactériostatique.

Les mécanismes antimicrobiens des composés phénoliques sont encore loin d'être entièrement compris. Il existe une disparité entre les différentes classes de composés : les phénols simples ont des mécanismes d'action relativement bien connus, au contraire des acides phénoliques et des flavonoïdes. La complexité des modes d'action de certaines molécules vient du fait qu'elles peuvent avoir plusieurs cibles cellulaires et que celles-ci ne sont pas indépendantes : ainsi, l'atteinte d'une cible peut avoir des conséquences sur d'autres fonctions physiologiques (**Burt, 2004 ; Cushnie et Lamb, 2005**).

On remarque que la plante *Eucalyptus citriodora* est douée de propriétés antimicrobiennes très appréciées et cela justifie son utilisation dans le traitement traditionnelle comme un remède antibactérien (Voire bibliographie). En effet, L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différentes drogues présentes au sein des extraits, aux huiles essentielles, les flavonoïde et les terpénoïdes ainsi qu'à d'autres composés de nature

phénolique présents également chez *Eucalyptus citriodora* (Voire la bibliographie) qui sont classés comme composés antibiotiques très actifs (**Rojas et al, 1992 ; Marjorie 1999**). Les variations données par l'activité antimicrobienne sont donc due à la variation de la composition chimique d'une même plante ou de plantes distinctes. En revanche, l'efficacité d'un extrait peut être due à une action combinée (synergie) entre les différents composés de l'extrait pas à un constituant actif en particulier (**Essawi et Srour, 2000**).

*Conclusion*

La propagation des bactéries multi-résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Pour faire face à cette situation, l'idée n'est pas de trouver une solution permettant d'éviter l'apparition des résistances, car les bactéries trouveront toujours un moyen de s'adapter, elle convient plutôt de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques disponibles et encourager la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques antibactériennes. Les plantes médicinales restent toujours la source fiable de principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail, nous a permis l'étude de l'activité antibactérienne des feuilles et des graines d'une plante, qui représente une source de substances naturelles bioactives, connue sous le nom d'*Eucalyptus citriodora*.

Les principes actifs des deux organes étudiés sont extraits par macération, une opération ancestrale employée en médecine traditionnelle. De ce fait 4 macérations pour chaque organe ont été réalisées : à l'éthanol, au méthanol, à l'hexane et à l'acétone. L'extraction méthanolique donnant le rendement le plus satisfaisant, et l'activité antibactérienne la plus performante, a subi un fractionnement sur un gradient de solvants de polarité croissante.

Au cours de cette étude nous avons réalisé des tests antibactériens vis-à-vis d'un panel de bactéries à Gram – et Gram + connues pour leur résistance, selon la méthode de diffusion sur gélose utilisant des disques, c'est le test de kirbybauer.

L'évaluation de l'effet antibactérien des graines d'*Eucalyptus citriodora* a permis d'affirmer que, effectivement, les extraits éthanolique et méthanolique de la graine ont manifesté une activité antibactérienne sur la majorité des souches testées, mais une activité importante est notée pour l'extrait méthanolique avec une zone de 29mm pour la souche *St D242*. En ce qui concerne les fractions, la fraction à l'eau distillée a donné la zone d'inhibition la plus remarquable avec un diamètre de 30mm pour *Ent c. L826*.

En perspectives, il serait captivant d'isoler en particulier les polyphénols et les métabolites secondaires en général et les tester sur des bactéries à véritables challenges thérapeutiques où aucun antibiotique ne leur est efficace. En outre, il serait opportun de réaliser des tests in vivo afin d'apprécier l'activité réelle de ces molécules et de comprendre leur mécanisme d'action.

Il serait même intéressant d'élargir le panel des activités biologiques à étudier, notamment en évaluant les activités anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antivirales de nos extraits. Nous envisageons également de mener une étude plus approfondie sur les feuilles et

les graine de l'Eucalyptus et pourquoi pas d'autres organes de la plante comme l'écorce, afin d'isoler, de purifier et d'identifier les principes actifs de l'organe étudié en utilisant des méthodes plus précises telles que l'HPLC et RMN et d'établir les études de la relation structure-activité des molécules actives. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il serait avantageux de définir le mécanisme d'action de ces substances végétale sur les microorganismes.

Le présent travail n'est que le commencement d'une longue investigation ; l'étude des plantes médicinales, en l'occurrence la plante étudiée ici, doit se poursuivre pour identifier et caractériser de nouvelles molécules ayant la capacité de combattre l'antibio-résistance.



# *Annexes*

## **Annexe 1 : Historique de l'émergence et développement de l'antibio-résistance.**

Les traces d'antibio-résistance ont d'abord été détectées dans les hôpitaux, lieux où les antibiotiques sont le plus utilisés (**Levy et Marshall, 2004**).

Dans les années 1930, des souches de *Streptococcus pyogenes* résistants aux sulfonamides furent isolés dans plusieurs hôpitaux militaires (**Levy et Marshall, 2004**). Une décennie plus tard, avant la mise en marché de la Penicilline, une pénicillinase bactérienne fut découverte : un exemple de la résistance naturelle aux ATB. La bactérie la plus impliquée dans ce phénomène était *Staphylococcus aureus*. C'est ainsi que dans les années 1960 fut commercialisée la méticilline. Peu de temps après, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline ont été mises en évidence. La vancomycine fut alors utilisée pour soigner les infections causées par ces bactéries résistantes. Cependant, dans les années 90, on découvrit, notamment au Japon et aux Etats-Unis, que certains *Staphylococcus aureus* avaient également développé une résistance envers ces antibiotiques (**Saga et Yamaguchi, 2009 ; Davies et Davies, 2010 ; Levy et Marshall, 2004**).

Dans les années 1940, peu après la découverte de la streptomycine et son utilisation pour soigner la tuberculose, des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistants à ce traitement furent isolées (**Levy et Marshall, 2004 ; Davies et Davies, 2010**).

En 1950, fut l'identification de gènes de résistances portés par des plasmides et disséminés par le phénomène de conjugaison bactérienne (**Davies et Davies, 2010**) : Bien que le germe *Streptococcus pneumoniae* soit initialement sensible à la pénicilline, des souches de sensibilité intermédiaires ont été trouvées dans les années 1960, puis des souches résistantes (PRSP) dans les années 70 (**Saga et Yamaguchi, 2009**).

On découvrit également des souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes à l'ampicilline, puis aux quinolones. Ce phénomène de multi-résistance est devenu un problème de grande ampleur en ce qui concerne la tuberculose, et le traitement contre cette pathologie nécessite maintenant l'utilisation d'au moins quatre ATB différents pour être efficace. Plus récemment, on peut citer l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa* (déjà naturellement résistants à beaucoup de molécules) résistants aux carbapénèmes, quinolones et aminosides (**Saga et Yamaguchi 2009 ; Davies et Davies, 2010 ; Levy et Marshall, 2004**)

De nombreuses souches d'*Escherichia coli*, germe très fréquemment impliqué lors d'infection urinaire notamment, sont devenues résistantes à l'amoxicilline, aux céphalosporines de 3ème génération, voire même aux carbapénèmes, molécules utilisées en dernier recours contre cette

infection. Enfin, *Mycobacterium tuberculosis*, cité plus haut, du fait de ses résistances multiples, est devenu un défi majeur de santé publique (Saga et Yamaguchi, 2009 ; Davies et Davies, 2010).

**Annexe 2 :** Tableau représentant les différents groupes de composés phénoliques ayant une activité biologique décrite.

| Groupe             | Sous-groupe  | Origine et référence   |
|--------------------|--------------|--|
| Phénols<br>simples |              | Antifongique, isolé de <i>Satureja hortensis</i> L. (Pauli, 2006)  |
| Coumarine          |              | Antiparasitaire et antibactérien, isolé de <i>Amburama cearensis</i> (Fleurentin, 2002; Hassan et al., 2008)   |
| Stilbènes          |              | Antifongique, isolé de <i>Polygonum cuspidatum</i> (Docherty et al., 2001; Kukrić et Topalić-Trivunović, 2006) |
| Flavonoïdes        | Flavone      | Antibactérien isolé de <i>Artocarpus heterophyllus</i> (Sato et al., 1996)                                     |
|                    | Flavonone    | Antiparasitaire, isolé de <i>Morinda morindoides</i> (Cimanga et al., 2006)                                    |
|                    | Flavononol   | Antibactérien isolé de <i>Mimusops elengi</i> L (Hazra et al., 2007)   |
|                    | Flavanone    | Antibactérien isolé de <i>Flemingia strobilifera</i> (Madan et al., 2008)                                      |
|                    | Aurone       | Antibactérien isolé de <i>Dunalia spinosa</i> (Erazoa et al., 2008)  |
| Saponines          |              | Antibactérien, isolé de <i>Avena sativa</i> L (Bahraminejad et al., 2008)                                      |
| Tanins             |              | Antibactérien, isolé de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L (Ho et al., 2001)                                       |
| Quinones           | Benzoquinone | Antibactérien, isolé de <i>Pyrus spp</i> (Jin et Sato, 2003)   |

**Annexe 3 :** Tableau représentant des groupes de terpènes ayant une activité biologique.

| <b>Sous-groupe</b> | <b>Origine et références</b>  |
|--------------------|---|
| Monoterpène        | Antifongique isolé de <i>Pinus sylvestris</i> L. ( <b>Pauli, 2006; Amarti et al., 2010</b> )      |
| Sesquiterpènes     | Antifongique, isolé de <i>Callitris intratropica</i> ( <b>Pauli, 2006</b> )                       |
| Diterpènes         | Antifongique, isolé de <i>Ballota saxalitiss</i> ( <b>Citoglu et al., 1998</b> )                  |
| Triterpènes        | Antibactérien et antifongique, isolé de <i>Combretum imberbe</i> ( <b>Katerere et al., 2003</b> ) |

**Annexe 4 :** Classification botanique de *Corymbia citriodora*.

**Domaine :** Biota

**Règne :** Plantae

**Sous-Règne :** Viridiaeplantae

**Infra-Règne :** Streptophyta

**Classe :** Equisetopsida

**Clade :** Tracheophyta

**Clade :** Spermatophyta

**Sous-Classe :** Magnoliidae

**Super-Ordre :** Rosanae

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Sous-Famille :** Myrtoideae

**Tribu :** Eucalypteae

**Genre :** *Corymbia*

**Espèce :** *Corymbia citriodora* (Hook.) (K.D.Hill et L.A.S.Johnson, 1995)

**Annexe 5:** Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne (**Ponce et al., 2003**).

| <b>Activité antimicrobienne</b> | <b>Degrés de sensibilité</b> | <b>Diamètre de la zone d'inhibition.</b> |
|---------------------------------|------------------------------|--|
| <b>Extrêmement sensible</b>     | +++                          | Plus de 20mm                             |
| <b>Très sensible</b>            | ++                           | 15 à 19mm                                |
| <b>sensible</b>                 | +                            | 8 à 14mm                                 |
| <b>Résistant</b>                | -                            | Moins de 8mm                             |

## *Références bibliographiques*

## A

1. Abedon ST, García P, Mullany P, Aminov R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology* 8 : 981 . 10.3389/fmicb.2017.00981.
2. Aboya JLM. (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Université de Bretagne occidentale.
3. Abreu AC, McBain AJ, and Simoes M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 29(9): 1007-1021.
4. Abubakar AR et Haque M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 12 (1): 1-10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19).
5. Agger M, Scheutz F, Villumsen S, Molbak K and Petersen AM. (2015). Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection : a systematic review and a proposal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(9), 2440-2446. doi: 10.1093/jac/dkv162.
6. Allen, Heather K, Justin Donato, Huimi HW, Karen A, Cloud-Hansen, Julian Davies and Handelsman J. (2010). Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments . *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 251 - 59. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>.
7. AMR control : Algérie : Programme de Prévention et de Contrôle des Infections à Bactéries Multi-Résistantes en milieu de soins, 2016.
8. Andersson DI, Hughes D. (2010). Antibiotic resistance and its cost : is it possible to reverse resistance ? *Nature Reviews Microbiology* 8(4):260-71.
9. Ancellin S. (2014). Problématiques relatives aux enquêtes autour de cas de tuberculose multirésistante issus d'Europe de l'Est. Université de Toulouse.
10. Ângelo L, Duarte A, Gominho J, Domingues F and Duarte AP. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-Quorum sensing activities of *Eucalyptus Globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products* 79 (January): 274–82. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>.
11. Arma R. (2012). Plantes médicinales. <http://www.robinarma.com>. P119.
12. Archie CA, Ricardo JS, Andrew JT, David LP et Thomas VR. (2010). *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027: Assessing the Risks of Further Worldwide Spread. *The Lancet. Infectious Diseases* 10 (6): 395 404. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70080-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70080-3).
13. Avlessi F, Alitonou GA, Djenontin TS, Tchobo F, Yèhouénou B, Menut C. and Sohounhloué D. (2012). Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
14. Azzouzi Z et Brahimi H. (2019). Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits du *Pistacia lentiscus*. Université Zian Achor, de Djelfa.

## B

15. Bader, Mazen S. (2006). *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Older Adults : Predictors of 7-Day Mortality and Infection With a Methicillin-Resistant Strain. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 27 (11): 1219-25. <https://doi.org/10.1086/507924>
16. Barbier, François and Michel W. (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, vers l'impasse thérapeutique? *médecine/sciences* 26 (11): 960 - 68. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611960>.
17. Basli A, Chibane M, Madani K. and Oukil N. (2012). Antibacterial activity of polyphenols extracts from a medicinal plant flora of Algeria: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10: 2-9.
18. Bauche CJ et Herbert LD. (2011). New Developments in Traveler's Diarrhea. *Gastroenterology and Hepatology* 7 (2): 88-95.
19. Belhaouas S. (2018). Étude phytochimique et activités biologiques des extraits de feuilles et de fruits de *Chamaerops humilis* L.. Université Badji Moktar de Annaba.
20. Berdous T, Boukheris CI and Nafti S. (2015). Tuberculose multi-résistante : à propos de 77 cas. *Revue des Maladies Respiratoires* 32 (janvier): A217. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.329>.
21. Bouchelaghem M and Bouchelaghem R. (2020). Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des Flavonoïdes de l'espèce *Thymelaea hirsuta* (L).. Université Saad Dahleb de Blida.
22. Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, and Chaouch A. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Sciences* 3: 232 - 242.
23. Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. (1994). Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (5):1148-53. 89.
24. Brunbuisson C. (2005). Risques et Maîtrise des Infections Nosocomiales en réanimation: Texte d'orientation SRLF/SFAR. *Réanimation* 14 (6): 463-71. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.09.003>.
25. Bush K. (2004). Why it is important to continue antibacterial drug discovery ? *ASM News* 70: 282–287.
26. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.

## C

27. Caymaris S. (2010). Implication du PpGpp et du régulateur global CodY dans le déclenchement de la compétence chez *Streptococcus Pneumoniae*. Université de Toulouse.
28. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC. (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults : 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology* 31(5):431–55.
29. Conly J. (2002). Antimicrobial resistance in Canada. *Canadian Medical Association Journal* 167:885-91.
30. Coque TM, Baquero F, Canton R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 13(47). pii: 19044. Review. Erratum in: *Eurosurveillance*. 2008 Nov 27; 13(48). 92.
31. Cowan MM. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582.
32. Cushnie T and Lamb AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5), 343–356.
33. Cuzon G, Thierry N, Michele G and Patrice N. (2010). In vivo selection of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum Beta-lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 Cephalosporinase. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (3): 265 68.

## D

34. Dali A. (2015). Infections nosocomiales à bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adulte à l'EHUO, profil épidémiologique, Facteurs de risques et facteurs pronostique. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella.
35. Da-Silva P and Meijer L. (2012). Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique -Pierre Potier (1934-2006) ». *médecine/sciences* 28 (5): 534-42. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012285020>.
36. Davies J and Davies D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3): 417-33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
37. Decousser, JW, Pina P, Picot F, Delalande C, Pangon B, Courvalin P, Allouch P and the ColBVH study group. (2003). Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections: a French



- prospective national survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (5): 1213-22.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg201>
38. Diallo A. (2013). *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Université de Toulouse.
  39. Djoudi F, Benallaoua S, Bonura C, Touati A, et Mammina C. (2014). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez des mères et des enfants hospitalisés à Alger : prédominance du clone virulent européen ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 44 (5): 232-33. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.03.001>.
  40. Djoudi F, Benallaoua S, Aurora A, Touati A, Challal M, Bonura C, et Mammina C. (2015). Descriptive Epidemiology of Nasal Carriage of *Staphylococcus Aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Among Patients Admitted to Two Healthcare Facilities in Algeria ». *Microbial Drug Resistance* 21 (2): 218 - 23. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0156>.
  41. Donatien K. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes : extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Université Paul Verlaine.
  42. Duke JA. (1990). Promosing phytochemicals. In: advances in new crops. *Timber press*, Portland.491-498.
  43. Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A and Nienhaus A. (2011). MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases*. May 20; 11(1):138. 91.
  44. Dunais B, Bruno BP, Carsenti DH, Touboul P and Pradier C. A decade-long surveillance of nasopharyngeal colonisation with *Streptococcus*.

## E

45. Eiseman B, Silen W, Bascom GS and Kauvar AJ. (1958). Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958 Nov;44(5):854-9.
46. Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T and Elhamzaoui S. (2008). Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002-2005) ». *Medecine et Maladies Infectieuses* 38 (janvier): 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.10.006>
47. Essawi T and Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70 :343-349.
48. European center for disease prevention and control (ECDC), Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Surveillance report, 2012: p.205 pages.

## F

49. Farnsworth NR and Kaas CJ. (1981). An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *Journal of Ethnopharmacology* 3: 85-99.

50. Flanon C. (2007). Infections bactériennes invasives dans le service de pédiatrie du CHU-Gabriel Toure. Université de Bamako.
51. Forestier E, Rémy V, Mohseni MZ, Lesens O, Jauhlac B, Christmann D and Hansmann Y. (2007). Bactériémies à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: aspects épidémiologiques et thérapeutiques récents. *La Revue de Médecine Interne* 28 (11): 746-55. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2006.11.014>.
52. Frei CR, Brittany RM, Kelly RD and Christine UO. (2010). Emergence of community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections as a common cause of hospitalization in United States Children. *Journal of Pediatric Surgery* 45 (10): 1967-74.

## G

53. Gbenou JD, Judith FA, Huguette BA, Anatole L, Eléonore Y, Fernand G and Lamine BM. (2013). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on wistar rats. *Molecular Biology Reports* 40 (2): 1127–34. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2155-1>.
54. Geethalakshmi R, and Sarada D. (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Trianthema decandra L.* *Journal of Pharmacy Research* 6 (1): 101–6. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.022>.
55. Gharailoo Z, Seyed FM, Niloofar H and Mohammad MF. (2016). Antimicrobial resistant pattern and capsular typing of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Sistan –Baluchestan ». *Mædica* 11 (3): 203-7.
56. Giudice P, Blanc V, Durupt F, Bes M, Martinez JP, Counillon E, Lina G, Vandenesch F, and Etienne J. (2006). Emergence of two populations of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. *British Journal of Dermatology* 154 (1): 118-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06910.x>.
57. Goetz P. and Ghedira K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer Paris: 193-208.
58. Guillonnet, M, et Jacqz AE. (1996). Méthodologie des essais cliniques thérapeutiques : Application pratique à l'analyse d'un essai évaluant l'effet de la dexaméthasone dans le traitement des méningites purulentes de l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 9 (8): 477-83. [https://doi.org/10.1016/S0987-7983\(96\)80069-7](https://doi.org/10.1016/S0987-7983(96)80069-7).

## H

59. Hadjsalem J. (2009). Extraction, identification et caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique.
60. Harkat-Madouri L, Boudria A, Madani K, Bey-Ould Z, Si Said, Rigou P, Grenier D, Allalou H, Remini H, Adjaoud A and Boulekbache-Makhlouf L. (2015). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products* 78 (December): 148–53. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.015>.
61. Heath HB. (1981). Source Book of Flavours. Westport: Avi, pp.890.
62. Hill KD and Johnson LAS. (1995). Systematic studies in the Eucalypts 7. A Revision of the Bloodwoods, Genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Telopea* 6 (2/3): 185–504.
63. Hill, David R, and Nick JB. (2010). Travelers' Diarrhea. *Current Opinion in Infectious Diseases* 23 (5): 481-87. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833dfca5>.
64. Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D and Bertrand X. (2010). Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidimeresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Aug; 54(8):3512-5. 90.
65. Hogan D, Kolter R. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials ? *Current Opinion in Microbiology* 5 : 272-4. Hughes, J. M. (2001). "Emerging Infectious Diseases: A CDC Perspective." *Emerging Infectious Diseases* 7(3): 494.

## I

66. Iwu MM, Duncan AR. and Okunji CO. (1999). New antimicrobials of plant origin. In: Perspectives on new crops and new uses. Ed.: Janick, J., ASHS Press, Alexandria, VA, 457-462.
67. Ion V. (2020). Prise en charge d'une épidémie d'entérocoques résistants aux glycopeptides. Université de Bordeaux.

## J

68. Jeyachandran R, Mahesh A, Cindrella L, Sudhakar S and Pazhanichamy K. (2009). Antibacterial activity of Plumbagin and root extracts of *Plumbago zeylanica* L.. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 17-22.

## K

69. Kalemba D. and Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
70. Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M and Adıgüzel A. (2003). Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 85 (2): 231–35. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00006-0).
71. Keriou F, Bellouz Y, and Moumeni A. (2015). Tuberculose à bacilles multi-résistants : état des lieux dans la Wilaya de Sétif. *Revue des Maladies Respiratoires*, 19e Congrès SPLF, 32 (janvier): A218-19. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.333>.
72. Khoruts A, Sadowsky MJ. (2011). Therapeutic transplantation of the distal gut microbiota. *Mucosal Immunology* 2011 Jan;4(1):4–7.
73. Koeck JL, Gutierrez MC, Fabre M, Bernatas JJ and Buisson Y. (2005). Emergence de cas de tuberculose dus à *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti* à Djibouti. Comptes Rendus de Séances. Séance de la Société de pathologie exotique. Communications libres du 16 février 2005. Institut Pasteur, Paris.
74. Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, Ammari H and Bakour R. (2015). High Prevalence of Multidrug-Resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes BlaOXA-23-like, BlaOXA-24-like and BlaNDM-1 in Algiers Hospitals. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 8 (6): 438-46. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.05.011>.
75. Koziol N. (2015). Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora* : qualité, efficacité et toxicité. Université de Lorraine.

## L

76. Lee DS, Sinno S, Khachemoune A. (2011). Honey and wound healing: an overview. *American Journal of Clinical Dermatology*, Jun 1;12(3):181–90. 155.
77. Lee ES, Shin HT, Hwang HJ and Kim JH. (2003). Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, 17, 1041-1047
78. Levy SB, Fitzgerald GB and Macone AB. (1976). Spread of Antibiotic-Resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260 (5546): 40-42. <https://doi.org/10.1038/260040a0>.
79. Levy SB and Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide : Causes, Challenges and Responses. *Nature Medicine* 10 (12 Suppl): S122-129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>.
80. Luqman S, Gaurav D, Mahendra D, Kalra A and Suman K. (2008). Antimicrobial Activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2 (January): 69–75.

## M

81. Mahieu R, et Dubée V. (2020). Nouveaux antibiotiques.

82. Marjorie MC. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582
83. McDermott W and Rogers DE. (1982). Social ramifications of control of microbial disease. *The Johns Hopkins Medical Journal* 151: 302-312.
84. Messous N, Chourar R. (2019). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Eucalyptus globulus*, études phytochimique. Université de Blida 1.
85. Mohammedi Z. (2005) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen.
86. Mokhnache M, Meziane N et Chabbah M. (2019). Isolement et caractérisation des principes actifs de certaines épices et leur activité biologique. Université d'Oum El-Bouaghi.
87. Monnet D. (1995). Ceftazimide-resiste *Pseudomonas aeruginosa* and ceftazimide usage in NNIS hospitals; preliminary results of Project ICARE Phase One. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 16 : ( 4-part 2 ) p . P19.
88. Monnet DL. (2000). Consommation d'antibiotiques et résistance bactérienne. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 5 (19): 409-17.
89. Munier AL, Biard L, Rousseau C, Legrand M, Lafaurie M, Lomont A and Donay JL. (2017). Incidence, risk factor and outcome of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* acquisition during an outbreak in a Burns Unit. *Journal of Hospital Infection* 97 (3): 226-33.

## N

90. Nikaido H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 593-656.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>.
91. Nitschke M, Sayk F, Hartel C, Roseland R.T, Hauswaldt S and Steinhoff J. (2012). Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *Journal of the American Medical Association* 307(10), 1046-1052. doi: 10.1001/jama.2012.264.

## O

92. OMS (2001) Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics.
93. OMS (2002) Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005." OMS, 74 pages.

94. OMS (2011) Premier rapport de l'oms sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale.
95. OMS (2019) centre des medias, pneumonies, 2019.
96. OMS (2020) centre des média, Tuberculose, 14 octobre 2020.
97. Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat JC and Koukoua G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie* 7: 1081-1086
98. Oussou KR. (2009). Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Université de Cocody-Abidjan, 241p.

## P

99. Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL and Morelli I. (2002). In vitro Antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2): 165-68. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00363-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00363-4).
100. Penchev PI. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Université de Toulouse. Phd. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001338/>.
101. Pham S. (2017). Développement de peptidomimétiques antimicrobiens et leurs perspectives dans l'industrie pharmaceutique. Université de Lorraine.
102. Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Thèse de doctorat en ressources renouvelables. Université du Québec.
103. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C and Nordmann P. (2003). Outbreak of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (8): 3542-47. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3542-3547.2003>.

## Q

104. Quy D, Artik E, Phuong LT, Lien H, Felycia ES, Suryadi I and Yi-Hsu J. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatica* . *Journal of Food and Drug Analysis* 22 (3): 296-302.

## R

105. Ramos A, René F, Baojie W, Taichi I, Scott GF, Guido FP and Birgit U. (2014). Airborne Antituberculosis Activity of *Eucalyptus citriodora* essential Oil. *Journal of Natural Products* 77 (3): 603–10. <https://doi.org/10.1021/np400872m>.

106. Rath G, Ndonzao M and Hostettmann K. (1995). Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*. *International journal of pharmacognosy*. 33: 107-114.
107. Ravat F, Jault P, et Gabard J. (2015). Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters* 28 (1): 13-20.
108. Rhazi N. (2015). Mise au point de mélanges collants écologiques à partir des écorces d'*Acacia mollissima* du Maroc. Université Hassan II (Casablanca)
109. Rivera A, Giono S, Gonzalez M, Rodríguez N and Cedillo L.(2011). Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. *Annals of Biological Research* 2: 491-497
110. Rojas A, Hernandez L, Pereda MR and Mata R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 35 : 275-283..

## S

111. Sanofi : Essais cliniques & résultats [En ligne]. Disponible sur : <https://www.sanofi.com/fr/science-et-innovation/essais-cliniques-et-resultats>
112. Sanofi : Essais cliniques & résultats: Phases [En ligne]. Disponible sur : <https://www.sanofi.com/fr/science-et-innovation/essais-cliniques-et-resultats/phases>.
113. Salehi B, Javad SR, Quispe C, Llaïque H, Villalobos M, Smeriglio A and Trombetta D. (2019). Insights into Eucalyptus genus chemical constituents, biological activities and Health-Promoting Effects. *Trends in Food Science & Technology* 91 (September): 609–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.003>.
114. Saïdani M, Boutiba I, Ghazzi R, Kammoun A and Ben-Redjeb S. (2006). Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36 (3): 163 - 66. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.06.010>.
115. Saga T and Yamaguchi K. (2009). History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria 52 (2): 6.
116. Satrani B, Ghanmi M, Farah A , Aafi A , Fougrach H, Bourkhiss B , Bousta D, Talbi M. (2007). Composition chimique Et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtu*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* 146, 85-96.
113. Schreiber JR and Jacobs MR. (1995). Antibiotic-Resistant Pneumococci. *Pediatric Clinics of North America* 42 (3): 519-37. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(16\)38977-5](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(16)38977-5).
114. Seidel V. (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker SD, Latif Z and Gray AI. *Natural products isolation*. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
115. Sipailiene A, Venskutonis PR, Baranauskiene R and Sarkinas A. (2006). Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*. 18: 698-703.
116. Skiest, DJ, Brown K, Hester J, Moore T, Crosby C, Mussa H, Hoffman H and Cooper T. (2006). Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an urban

- HIV clinic. *HIV medicine* 7 (octobre): 361-68. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00394.x>.
117. Soysal A, Millington AK, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, Efe S, Staveley I, Ewer K and Lalvani A. (2005). Effect of BCG Vaccination on Risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis Contact : A Prospective Community-Based Study. *The Lancet* 366 (9495): 1443-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67534-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67534-4).
118. Sylvie C. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel* 42. <https://pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/977>.

## T

119. Tattevin P. (2007). Le traitement de la tuberculose en 2007. *Médecine et Maladies Infectieuses* 37 (10): 617-28. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.02.009>.
120. Theuretzbacher U, Gottwalt S, Beyer P, Butler M, Czaplewski L, Lienhardt C and Moja L. Analysis of the Clinical Antibacterial and Antituberculosis Pipeline. *The Lancet Infectious Diseases* 19 (2): e40-50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30513-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30513-9).
121. Tolba H, Moghrani H, Aboun A and Maachi R. (2018). Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora* : Chemical composition, antioxidant and antimicrobial Activities.
122. Tremblay C. (2008). Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Pharmactuel* 41 (5). <https://pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/703>.
123. Trunz B, Fine PEM and Dye C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide : A Meta-Analysis and assessment of cost-Effectiveness. *The Lancet* 367 (9517): 1173-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68507-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68507-3).

## V

124. Van-deer W, Van-der E and Pretorius JC. (2001). Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (1): 87-91.
126. Viorel VI. (2020). Prise en charge d'une épidémie d'entérocoques résistants aux glycopeptides. Université de Bordeaux.
125. Veysiere A (2019). La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Université de Bordeaux.



## W

113. Wahdan HA. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*. 1998 Feb;26(1):26–31.
114. Wallqvist A and Covell DG. (1996). On the origins of the hydrophobic effect : Observations from simulations of n-Dodecane in model solvents . *Biophysical Journal* 71 (2): 600- 608.
126. Whitman WB, Coleman DC and Wiebe WJ. (1998). Prokaryotes : the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)* 1998;95(12):6578-83.
127. Wintachai P, Supakit P, Chutha TY and Supayang PV. (2019). Silver nanoparticles synthesized with *Eucalyptus critriodora* ethanol leaf extract stimulate antibacterial activity against clinically multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pneumonia patients. *Microbial Pathogenesis* 126 (January): 245–57. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.018>.
128. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL and Tarr PI. (2000). The risk of the hemolyticuremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine* 342(26), 1930-1936. doi: 10.1056/NEJM200006293422601.

## X

129. Xiang W, Song QS, Zhang HJ and Guo SP (2008). Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. *Fitoterapia* 79: 501-504.

## Z

130. Zhang L, Levy K, Trueba, G, Cevallos W, Trostle J, Foxman B. (2015). Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 59(11), 6733-6740. doi: 10.1128/AAC.01094-15.
131. Zrira S, El-khيران F and Benjllal B. (1994). Huiles essentielles de six espèces xérophyles d'Eucalyptus : effet du milieu sur les rendements et la composition-chimique. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* Vol. 14 (1): 5-9

**Résumé:** Cette étude, avait pour objectif la quête de nouvelles molécules antimicrobiennes à l'égard des bactéries pathogènes résistantes aux ATB, suite à l'épuisement de l'arsenal thérapeutique et l'apparition constante de nouvelles résistances. Comme la nature constitue un réservoir colossal de molécules bioactifs, une extraction a été effectuée par macération, utilisant divers solvants (L'éthanol, le méthanol, l'hexane et l'acétone), des principes actifs des feuilles et des graines d'*Eucalyptus citriodora*. L'extraction par macération au méthanol a donné le meilleur rendement (9% pour la feuille, 14% pour la graine). L'extrait méthanolique de la graine a été retenu pour subir un fractionnement. Selon le protocole de fractionnement réalisé, cinq fraction ont été obtenues : La fraction chloroforme, ethylacétate, butanol, hexasane et enfin eau distillée qui donne d'ailleurs le meilleur rendement. L'activité antibactérienne a révélé l'effet inhibiteur très variable des extraits de la plante vis-à-vis des souches testées. Les extraits à base de graine d'*E. citriodora* notamment les extraits méthanolique, éthanolique et les fractions eau distillée, butanol et éthyacétate, se sont avérées à effet antibactérien à l'égard de la grande majorité des souches testées. L'activité la plus remarquable est notée pour l'extrait méthanolique avec une zone de 29mm pour la souche *St D242*. En ce qui concerne les fractions, la fraction à l'eau distillée a donné la zone d'inhibition la plus performante avec un diamètre de 30mm pour *Ent c. L826*.

**Mots clés :** ATB, Bactéries multi-résistante, *Eucalyptus citriodora*, molécules bioactives Extraction.

**Abstract:** The main purpose of this study was the research of new antimicrobial molecules against pathogenic resistant bacteria to ATB, after the exhaustion of the therapeutic arsenal and the constant development of new resistances. Because nature is known as a huge tank of bioactive molecules, we have proceeded to the maceration extraction, using various solvents (Ethanol, methanol, hexane, and acetone), of these drugs from leaves and seeds of *Eucalyptus citriodora*. Methanol extraction gave the best yield (9% for the leaves, 14% for seeds). Seeds methanolic extract were selected for fractionation. According to the fractionation protocol, five fractions were obtained: chloroform, ethyl acetate, butanol, hexane, and finally distilled water which gives the best yield. The antibacterial activity showed variable inhibition zones of our plant extracts towards the different strains tested. Seeds extracts of *E. citriodora*, especially methanolic, ethanolic extracts and distilled water, butanol, and ethylacetate fractions, proved a great antibacterial effect on the majority of the tested strains. The most outstanding activities were noted by the methanolic extract with a zone of 29mm for *St D242* strain. Concerning the fractions, the distilled water fraction gave the most remarkable inhibitory zone with a diameter of 30mm for *Ent c. L826* strain.

**Keywords:** ATB, Multi-resistant bacteria, *Eucalyptus citriodora*, bioactive molecules Extraction.