

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



Réf :

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

MASTER

Thème

**Recherche de substances bioactives au sein des
fruits de *Eucalyptus citriodora***

Présenté par :

Moualek Saria Hind & Moulaoui Rania

Soutenu le : **14 Septembre 2022**

Devant le jury composé de :

Mme. BOUCHERBA N.

Mr. DJOUDI F.

Mme. BENSIDHOUM L.

Mr. MADAOU M.

Pr

MCA

MCB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Co-encadreur

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à : À mes très chers parents

Vous avez ménagé beaucoup d'efforts pour nous, pour nous donner une meilleure éducation, vous avez su créer en nous l'amour du travail bien fait, vous nous avez guidés avec rigueur mais aussi avec amour, sans vous nous ne serions pas devenu ce que nous sommes aujourd'hui. Vous êtes les être les plus chers à mon cœur, je t'aime maman, je t'aime papa. Que Dieu vous procure du bonheur, de la santé et vous accord une belle longue vie à mes cotes, si je suis arrivé là c'est grâce à vous.

À Mon Cher et unique frère Abdelmalek, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu à fait pour moi pendant toutes ses années, on a de la chance de t'avoir comme frère, je t'aime plus que tout.

À mes chères sœurs Salima, j'aurai tellement aimé que tu sois la parmi nous pour voir celle que je suis devenu, toi qui à guider mes premier pas, je ne t'oublierai jamais.

À vous mes sœurs 'Kenza, Kahina, katia et à mon adorable Cecilia', sans vous à mes côtés je n'aurai pas pu affronter plusieurs obstacles dans ma vie, Merci d'être toujours là quand j'en ai besoin, pour votre soutien moral durant mon parcours et votre aide. Que la solidarité fraternelle que nous cultivons depuis toujours ne s'estompe à jamais.

À mon beau-frère Rédha et à mes adorables nièces et neveux : Kami, Sarah, Adam et Djebriil que j'aime plus que tous merci pour le charme que vous avez ajouté à ma vie.

À Ma tante Dalila, mille mercis d'être toujours présente là pour nous.

À mes chères voisins tata Salima, tonton cherif, Aki, Lydia et Islem, qui ont toujours été là à me soutenir pendants tout mon parcours.

À Thileli et Lisa, ce stage à vos coté était une l'une des plus belles expériences de ma vie, merci pour tous les filles.

À ma chère binôme Saria, je te pardonne tous les retards que ta fait pendants ses 5 dernières années, merci d'avoir été la quand j'en avais besoin, pour les bons moments qu'on a vécu ensemble, je suis fière de tout ce qu'on a fait pendant ces années « on forme une équipe de choc ».

À mes deux meilleures amies Lydia et Dyna, j'ai de la chance de vous avoir dans ma vie. Enfin, un grand merci à toutes personnes qui a pu m'aide pendants tout mon parcours.

Rania



Dédicaces

À mes très chers parents

En témoignage de l'amour, du respect et de la gratitude que je leur porte pour leur soutien et leur Aide qu'ils m'ont apporté durant mes années d'études.

Jamais je ne vous remercierai assez de m'avoir donné le meilleur de vous-mêmes. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

*À mes deux frères **Fouzi** et **Farouk**, parce que nous sommes très unis malgré toutes nos chamailleries. Sachez que votre sœur vous adore et quoi que vous fassiez, elle sera pour toujours fière de vous.*

À ma très adorée grand'mère qui ne sait pas vraiment distinguer les lettres des chiffres cependant, elle a rêvé de faire de moi ce que je suis aujourd'hui.

*À **Lisa** et **Thileli**, pour tous les souvenirs que nous nous sommes construits ensemble aussi drôles les uns que les autres et pour tous ces moments de complicité passés à vos côtés au laboratoire.*

*Sans oublier ma binôme et mon amie **Rania**, qui sans elle ce travail n'aurait pu finir. Merci d'avoir eu la patience de me supporter durant toutes ces années passées ensemble, de m'avoir soutenu et encouragé.*

Je dédie également ce travail à tous ceux qui m'ont encouragée et aidée à réaliser ce travail de près ou de loin et qui ont participé à ma réussite.

Saria





Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

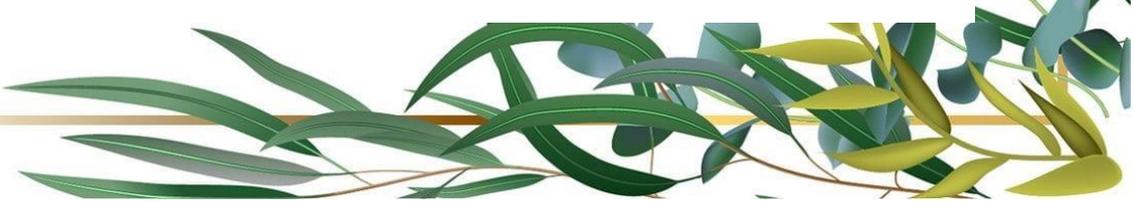
*On tient avant tout à exprimer nos plus chaleureux remerciements à monsieur **DJOUDI. F** qu'avant qu'il soit notre encadreur était notre enseignant qui a réussi à nous inspirer et nous donner confiance en soi et à nous donner l'envie d'apprendre. Merci pour tout ce que vous avez fait, ainsi vous nous avez inspiré ce thème et vous avez guidé nos premiers pas dans la recherche. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre efficacité et surtout votre rigueur.*

On tient aussi à exprimer nos plus chaleureux remerciements aux enseignants qui ont rendu possible ce travail par la transmission de leurs savoirs et leur enseignement.

*Par cette occasion nous remercions chaleureusement Madame **Boucherba**, de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de notre soutenance de master II. Que vous trouvez ici le témoignage de notre haute considération et de notre profond respect.*

*Nous remercions très sincèrement Madame **Bensidhoum**, d'avoir honoré aussi ce travail en acceptant de l'examiner, Soyez assurés de notre profonde reconnaissance.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à l'équipe du laboratoire de médecine de l'université de Bejaia, un grand merci pour les doctorants **Menad et Dalila**, Nous avons eu le plaisir de travailler avec vous. Nous vous remercions pour votre gentillesse et spontanéité avec lesquelles vous avez dirigé ce travail, ainsi que pour votre disponibilité et vos conseils que grâce à eux nous avons pu améliorer notre travail. Ainsi on vous remercie pour les bons moments qu'on a partagés ensemble, et qui ont participé à faire de ce stage de fin d'études, plus qu'une expérience professionnelle, une expérience humaine exceptionnelle et inoubliable.*



Liste des abréviations

E. citriodora: *Eucalyptus citriodora*

E. coli : *Escherichia coli*

EBLSE : Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu.

ERG : Entérocoques Résistant aux Glycopeptides.

ERV : Entérocoques Résistant à la Vancomycine.

ES : Extrêmement sensible.

GHz: Gigahertz.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

MAE : Microwave assisted extraction ou Extraction assisté par Micro-ondes.

MDR: Multidrug-resistant.

MH : Mueller Hinton.

MHz : Mégahertz.

MS : Matière sèche.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PEF : L'extraction par champs électrique pulsé

R : Résistante.

rpm : Tour par minute.

S : sensible.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline.

TS : Très sensible.

UAE : L'extraction assistée par ultrasons.

W : Watt

.

(V/MS) : volume du solvant/ Matière sèche.

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	6
Figure 2 : Photographie d' <i>E. Citriodora</i>	8
Figure 3 : Image représentante des fruits d' <i>E. Citriodora</i>	10
Figure 4 : Représentation schématique des différentes parties du Soxhlet	12
Figure 5 : Schéma du montage utilisé pour l'extraction par micro-ondes	13
Figure 6 : Localisation géographique du parc national Gouraya.....	14
Figure 7 : Photographie originale, A : Meule à grains "thassirth" ; B : Poudre des fruits d' <i>E. Citriodora</i>	15
Figure 8 : Photographie originale représentant notre collection de souches	16
Figure 9 : Photographie originale de l'extraction par Soxhlet	17
Figure 10 : Photographie originale de l'extraction par macération.....	18
Figure 11 : Photographie originale, A : Préparation des extraits secs ; B : Séchage des extraits à l'étuve ; C : Grattage et récupération des extraits secs	19
Figure 12 : Photographie originale de la filtration et de la préparation des extraits.....	20
Figure 13 : Photographie originale de la préparation du milieu de culture ainsi que le remplissage des boîtes pétri	21
Figure 14 : Photographie originale de la préparation des tests d'activité antibactérienne	22
Figure 15 : Photographie originale représentant les zones d'inhibitions des souches Gram positif induites par les extraits obtenus par l'extraction au soxhlet... ..	27
Figure 16 : Photographie originale représentant les zones d'inhibitions des souches Gram positif induites par les extraits obtenus par l'extraction par macération... ..	28
Figure 17 : Photographie originale représentant les zones d'inhibitions des souches Gram positif induites par les extraits obtenus par l'extraction par l'MAE.....	29

Liste des tableaux

Tableau I : Les souches bactériennes utilisées et leurs codes	16
Tableau II: Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne.....	21

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Emergence des résistantes bactériennes..... 3

I.1. Les principaux agents pathogènes multirésistant3

I.1.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline (SARM) 3

I.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants 4

I.1.3. Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu4

I.1.4. *Acinetobacter baumannii* multirésistant..... 5

I.1.5. Entérocoque résistant à la vancomycine..... 5

II.2. Quelques alternatives aux antibiotiques 7

II.2.1. Phytothérapie..... 7

II.2.2. Phagothérapie 7

II. Eucalyptus Citriodora8

II.1. Généralités sur la plante..... 8

II.1.1 Classification 9

II.1.2. Composition chimique de la plante 10

II.1.3. Utilisation et propriétés pharmacologique 10

II.1.4. Activité antimicrobienne 11

III. Méthodes d'extraction..... 11

III.1. Extraction par Soxhlet 11

III.2. Extraction par macération..... 13

III.3. Extraction par micro-onde 13

Matériel et Méthodes

I. Description de l'étude et Objectifs	14
II. Matière végétal et souches bactériennes	14
II.1. Matière végétal.....	14
II.1.1. Récolte et échantillonnage	14
II.1.2. Séchage et broyage	15
II.2. Les souches bactériennes	15
III. Les Extractions des substances Bioactives	17
III.1. Extraction par Soxhlet	17
III.2. Extraction par Macération.....	18
III.3. Extraction par Micro-onde.....	18
III.4. Détermination du rendement d'extraction	19
IV. Screening et tests d'activité	20
IV.1. Préparation des extraits	20
IV.2. Préparation des suspensions bactériennes	20
IV.3. Préparation du milieu de culture et ensemencement	21
IV.4. Test d'activité antimicrobienne.....	21

Résultats et discussions

I. Rendement des extractions	23
I.1. Rendement du Soxhlet	23
I.2. Rendement de la macération.....	24
I.3. Rendement du Micro-ondes	25
II. Activité des substances sur les souches bactériennes	26
II. 1. Evaluation de l'activité des extraits au soxhlet	26
II. 2. Evaluation de l'activité des extraits par macération.....	27
II. 2. Evaluation de l'activité des extraits par MAE	28
Conclusion	32

References bibliographiques



Introduction

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont l'une des plus grandes avancées de la médecine moderne. Ils sont à l'origine d'une forte réduction de la morbidité et de la mortalité au cours du siècle dernier. Cependant, une menace grandissante remet en cause leur efficacité. En l'occurrence, « L'émergence de la résistance aux antimicrobiens ». En effet, plusieurs études ont démontré un lien incontesté entre la consommation d'antibiotiques et l'émergence des résistances bactériennes et cela, par leur mésusage (doses sous-optimales, molécule inadaptée, spectre insuffisant ou trop large, durée incorrecte, absence d'indication) (**Thabet et al., 2021**).

Certaines bactéries arrivent à établir une multirésistance vis-à-vis de plusieurs familles d'antibiotiques grâce à leur flexibilité et plasticité génétique. Elles sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier donnant lieu à ce qu'on appelle des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Multidrug-resistant ou MDR) (**Bouyahia et al., 2017**). Au fur et à mesure que ce problème de santé publique progresse, il épuisera rapidement les options thérapeutiques. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), si rien n'est fait, le monde entrera dans une ère post-antibiotique, dans laquelle les infections actuelles et les blessures mineures pourront à nouveau devenir mortelles (**Shalk, 2018**).

Afin de cibler et d'orienter la recherche et le développement liés aux nouveaux antibiotiques, l'OMS a publié sa liste d'agents pathogènes pour lesquels la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est nécessaire de toute urgence. Au sein de cette vaste liste, ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter Specium*) ont été désignés "prioritaires" (**Oliveira et al., 2020**). Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistances bactériennes, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances bioactives (**Ouelhadj et al., 2017**).

Beaucoup d'attention a été accordée aux plantes médicinales en tant que nouveaux agents thérapeutiques alternatifs par rapport à leur aptitude à synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires. Ces métabolites constituent donc un immense

INTRODUCTION

réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques (Landoulsi et al., 2018 ; Erenler et al., 2019).

L'Algérie possède une des flores les plus diversifiées (méditerranéenne, saharienne et paléo tropicale) (Arab et al., 2014), parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Eucalyptus*. Sur le plan thérapeutique, ce genre est très convoité tant en médecine traditionnelle qu'en thérapeutique moderne où la phyto-aromathérapie lui vante de nombreux mérites. À savoir, de multiples propriétés exploitées en médecine préventive et curative. Le secret de la puissance thérapeutique de ce genre réside dans la grande richesse en familles de molécules phytochimiques présentes aussi bien dans ses feuilles, ses fruits, ses huiles essentielles et son écorce dont la nature et les proportions varient considérablement d'une espèce à une autre (El baraka, 2019).

Dans la littérature scientifique, peu de travaux se sont penchés sur les fruits d'*Eucalyptus citriodora*, ce qui a attisé notre curiosité et nous mène à poser la question « **Les fruits d'*Eucalyptus citriodora* sont-ils dotés de molécules douées d'activité antibactérienne ?** ».

Dans cette optique, notre étude consiste à rechercher une éventuelle activité antimicrobienne des fruits d'*Eucalyptus citriodora* contre les pathogènes émergeant, en utilisant différentes méthodes d'extractions ; tout en réalisant une optimisation des différents paramètres pouvant influencer cette extraction.

- ✓ La première partie de ce document constitue un rappel bibliographique global ;
- ✓ La seconde partie est consacrée à la méthodologie pratique suivie ;
- ✓ La troisième partie est un rapport des résultats obtenus et leur discussion ;
- ✓ Enfin, le travail est achevé par une conclusion générale et quelques perspectives.



*Synthèse
Bibliographique*

Synthèse Bibliographique

I. Emergence des résistances bactériennes

Depuis la découverte des antibiotiques dans les années 1920, chaque introduction d'une nouvelle classe d'antibiotiques a été suivie de l'émergence de la résistance. Cette résistance se produit lorsque les bactéries développent la capacité de contourner les mécanismes utilisés contre elles (**Klemm et al., 2018**). La majorité des bactéries sont concernées par l'émergence et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, ce qui la rend un problème de santé publique important (**Magiorakos et al., 2012**).

En effet, ce problème ne cesse de prendre de l'ampleur, dès la sortie d'une nouvelle molécule sur le marché, les bactéries s'adaptent et une nouvelle résistance émerge. Néanmoins, la prise de conscience s'accroît et les actions visant à lutter contre la résistance aux antibiotiques et remédier aux lacunes de financement et aux inefficacités du marché sont discutées au niveau international. En outre, des initiatives sont prises pour améliorer les diagnostics et promouvoir le développement de nouveaux antibiotiques qui ont une durée de vie clinique plus longue (**Morten et al., 2017**).

I.1. Les principaux agents pathogènes multirésistants

I.1.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Les staphylocoques dorés, où *Staphylococcus aureus*, sont des bactéries commensales Gram positif, pouvant devenir des pathogènes opportunistes majeurs de l'Homme et des mammifères (**Silva et al., 2021**). Le *S. aureus* a un fort pouvoir adaptatif et a développé différents mécanismes de multirésistances à plusieurs classes d'antibiotiques (**M., Brown et al., 2021**).

La résistance à la méthicilline, une B-lactamine, mais dont le noyau est résistant à l'action des pénicillinases, a été identifiée pour la première fois chez *Staphylococcus aureus* en 1961. Cette résistance est liée à la synthèse d'une protéine de liaison à la pénicilline, capable de poursuivre la synthèse de la paroi même en présence de l'antibiotique (**Kouatchet et al., 2012**).

Autre que les B-lactamines, les SARM ont montré plus récemment, une résistance aux glycopeptides, rendant plus complexe l'approche thérapeutique (**Kouatchet et al., 2012**). À l'origine d'une grande variété d'infections suppuratives et toxiques, les SARM constituent un enjeu majeur en santé publique. Le tableau clinique de ces infections a

Synthèse Bibliographique

considérablement évolué au cours des dix années. Par ailleurs, de nouveaux antibiotiques sont devenus disponibles et l'expérience de leur utilisation s'est accrue (**Brown et al., 2021**).

I.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants

Largement présent dans les environnements aquatiques, *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène humain opportuniste, à Gram négatif, généralement associé à des infections respiratoires sévères chez les patients dont l'immunité est affaiblie (**Oliveira et al., 2020**). Ce pathogène présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, mais aussi à une faible perméabilité membranaire due à la taille réduite de ses porines. Certaines souches peuvent également acquérir de la résistance suite à l'accumulation de mécanismes de résistance associés aux mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes exogènes (**Pang et al., 2018**).

Son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et sa capacité remarquable à développer ou à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance face aux antibiotiques contribue au développement de souches multirésistantes et rend les antibiotiques classiques inefficaces pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* (**Jurado-Martín et al., 2021**).

I.1.3. Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu

Les bêta-lactamases à spectre étendu (ESBL ou BLSE) sont des enzymes qui confèrent une résistance (ou une diminution de l'activité) à une vaste gamme de bêta-lactamines (**Doit et al., 2010**). Faisant partie de la famille des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* est un important pathogène opportuniste à Gram négatif, et à l'origine de diverses maladies. Notamment, des infections des voies urinaires, des bactériémies, des pneumonies et des abcès du foie (**Wang et al., 2022**).

La résistance aux divers antibiotiques du type B-lactamines a été découverte pour la première fois chez *K. pneumoniae* en 1983. Il a été démontré que cette résistance provenait de la production de bêta-lactamases à spectre étendu (**Ah et al., 2014**).

K. pneumoniae est connue également comme étant un "collecteur" notoire de plasmides à l'origine de multirésistances, ces derniers concernent les aminosides, les céphalosporines de troisième génération et plus récemment les carbapénèmes (**Wang et al., 2022**). L'acquisition de plus en plus fréquente de résistance aux antibiotiques par les souches de *K. pneumoniae* a donné lieu à une propagation mondiale de cet agent pathogène,

Synthèse Bibliographique

provoquant ainsi des infections pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées (**Riwu et al., 2020**).

I.1.4. *Acinetobacter baumannii* multirésistant

Acinetobacter baumannii est un coccobacille à Gram négatif, opportuniste, principalement responsable d'infections nosocomiales. Bien que la plupart des espèces d'*Acinetobacter* soient ubiquitaires (sol, eau, végétaux, hommes), *A. baumannii* n'a pas de réservoir naturel connu en dehors de l'hôpital (**Ibrahim et al., 2021**).

A. baumannii est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques dont les bêta-lactamines, les macrolides, le triméthoprime ou encore fosfomycine. En raison de l'existence de plusieurs mécanismes intrinsèques comme la production de céphalosporinase à large spectre de type AmpC et la production de pénicillinases plasmidiques (**Lupo et al., 2018**). Ce pathogène dispose également d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action antibiotique, la plupart de ces enzymes sont liées à la résistance aux fluoroquinolones (**Kyriakidis et al., 2021**).

Par ailleurs, l'intérêt pour cette espèce s'est intensifié en raison de sa capacité apparemment infinie à acquérir une résistance grâce à son impressionnante plasticité génétique qui facilite les mutations et les réarrangements de ses gènes (**Lupo et al., 2018**). Les infections dues à *Acinetobacter baumannii* sont devenues un défi important pour les systèmes de santé modernes car des souches résistantes à la quasi-totalité des antibiotiques disponibles sont maintenant isolées. Bien que des travaux supplémentaires sur l'utilisation de thérapies combinées soient efficaces, le développement de nouvelles stratégies, comme la phagothérapie reste nécessaire dans certains cas pour vaincre les infections causées par ces bactéries résistantes (**Gordon et al., 2010 ; Ibrahim et al., 2021**).

I.1.5. Entérocoque résistant à la vancomycine

Les entérocoques sont des Cocci à Gram positif qui colonisent principalement la flore du tube digestif, mais également la peau et les voies génito-urinaires. Elles sont responsables d'infections humaines principalement dues à *Enterococcus faecalis* et à *Enterococcus faecium* (**Miller et al., 2020**). Ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques mais particulièrement aux aminoglycosides et aux B-lactames. De ce fait, la vancomycine était le seul antibiotique faisant face aux infections dues aux entérocoques multirésistants (**Robert and Moellering, 1998**). Jusqu'à l'apparition des

Synthèse Bibliographique

ERV (Entérocoques Résistant à la Vancomycine), aussi appelés ERG (Entérocoques Résistant aux Glycopeptides).

L'émergence de la résistance à la vancomycine a été associée à son utilisation massive dans le traitement des infections à *Clostridium difficile* (Lesensa, 2009). Cette résistance est due à l'acquisition d'un opéron, permettant à la bactérie de synthétiser des précurseurs modifiés de la paroi (peptidoglycane), cible d'action des glycopeptides, ce qui aboutit à une perte d'action des glycopeptides (Ahmed and Baptiste, 2018).

Il est possible de traiter la plupart des infections à ERV à l'aide d'antibiotiques autres que la vancomycine, toutefois le choix reste limité, ce qui rend la mise en œuvre de mesures de contrôle des infections et de programmes de suivi est primordiale, en attendant de nouvelles stratégies (Contreras et al., 2019).

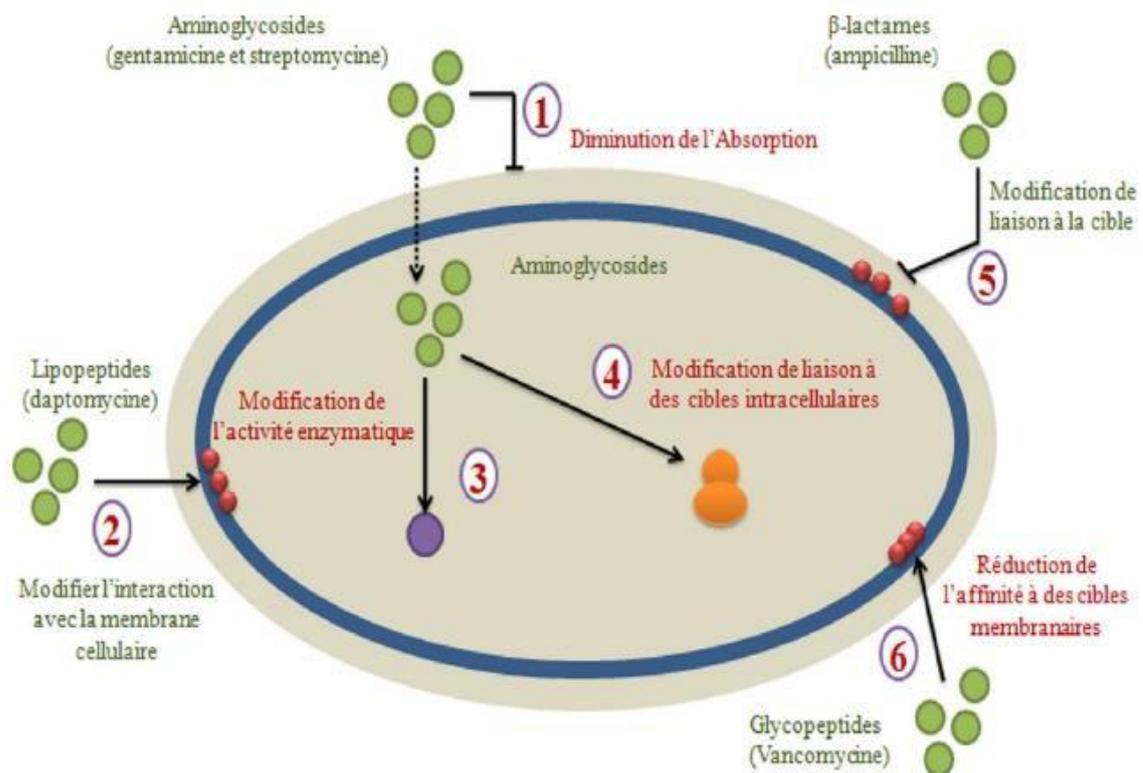


Figure 1 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahya et al., 2017).

Synthèse Bibliographique

I.2. Quelques alternatives aux antibiotiques

I.2.1. Phytothérapie

Ce mot vient du grec phyton qui signifie « plante » et therapeia qui signifie « traitement ». C'est donc une technique de soins qui utilise les plantes pour venir à bout des causes et symptômes de diverses maladies (**Gayet, 2014**).

C'est l'une des plus anciennes thérapeutiques à travers le monde qui connaît actuellement un regain d'intérêt auprès de la population et cela malgré les progrès de la médecine moderne. Elles doivent leur pouvoir thérapeutique aux substances, dites actives « métabolites secondaires » qu'elles renferment (**Bohui et al., 2018**). Elles sont utilisées dans leur intégralité, en partie (fleur, feuille, tige, racine) ou sous la forme d'extraits divers (décoctions, distillats, huiles essentielles) (**Laccourreye et al., 2017**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale a recours à la médecine dite traditionnelle pour faire face à ses problèmes de santé (**Bohui et al., 2018**). Des médicaments importants comme l'atropine, la scopolamine, la morphine, la codéine, la digoxine et la curare sont extraits de plantes (**Ferreira et al., 2014**).

I.2.2. Phagothérapie

En 1919, la phagothérapie (traitement d'une infection bactérienne par des phages) a été utilisée pour la première fois comme traitement pour les dysenteries bacillaires provoquées par *Shigella*. Présents dans l'ensemble des écosystèmes, les bactériophages (ou phages) sont des virus qui infectent naturellement et spécifiquement les bactéries. Ils sont de ce fait incapables d'infecter les cellules eucaryotes.

Deux types de bactériophages sont distingués selon leur cycle biologique : les phages lytiques et les phages tempérés. Seuls les phages présentant uniquement un cycle lytique sont utilisés en phagothérapie. Du fait de leur multiplication qui s'effectue in situ, les phages sont les seuls agents antibactériens dont la concentration augmente avec le temps au niveau du foyer infectieux. Une caractéristique pharmacocinétique de haut intérêt. Une autre propriété remarquable réside dans leur capacité à hydrolyser les polysaccharides bactériens qui composent les biofilms, ou les exo-polysaccharides de surface (capsules) produits par certaines bactéries. Ces enzymes (appelées dépolymérase) sont essentiellement portées par les fibres de queue de certains phages, leur conférant ainsi un avantage spécifique comparé aux antibiotiques, dont on connaît les limites en matière de pénétration dans les biofilms (**Dufour et Debarbieux, 2017**).

Synthèse Bibliographique

II. *Eucalyptus Citriodora*

II.1. Généralités sur la plante

Lors des expéditions de James Cook en Australie (1768-1779), les botanistes Joseph Banks, Daniel Solander et David Nelson ont pu observer et recueillir des spécimens d'eucalyptus. Le spécimen recueilli par David Nelson a été examiné par le botaniste français Charles Louis L'héritier de Brutelle, ou ce dernier, l'a utilisé comme type d'un nouveau genre qu'il a publié en 1788. Il a nommé le genre *Eucalyptus* du grec "eu" (bon, bien) et "calyptos" (couverts) en référence à la capsule qui recouvre le bourgeon florale (**Erau, 2019**).

Le genre *Eucalyptus* appartient à la famille des *Myrtaceae* et compte environ 900 à 1000 espèces, parmi elles, on retrouve l'*Eucalyptus Citriodora* (*E. citriodora*), communément appelé "eucalyptus citronné" ou "gomme citronnée". Aussi connu en Algérie sous le nom « kalitous ». Originaire d'Australie, celui-ci s'est répandu partout dans le monde entier où il a appris à s'acclimater dans les régions sèches aussi bien que dans les régions humides (**Hammiche, 2014 ; Likib et al., 2019**).



Figure 2 : Photographie d'*E. citriodora* (Anonyme 1).

Synthèse Bibliographique

II.1.1 Classification

La classification d'*E. citriodora* a connu plusieurs modifications au fil des années. Elle a été d'abord classée parmi les eucalyptus durant plusieurs années, c'est en 1995 que les botanistes australiens Kenneth D. Hill et Lawrence Alexander Sidney Johnson l'intégrèrent au nouveau genre *Corymbia*. Enfin, en 2000, MIH Brooker a publié une classification officielle du genre, basée sur le travail de Pryor et Johnson (**Brooker, 2000**).

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophytes*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Myrtales*

Famille : *Myrtaceae*

Genre : *Corymbia*

Espèce : *Corymbia citriodora*

- ◆ *E. citriodora* est un grand arbre qui peut atteindre de 20 à 50 mètres de hauteur, son écorce est lisse, caduque et son bois est clair et coriace.
- ◆ Ses feuilles sont persistantes dont la couleur varie selon l'âge.
- ◆ Ses fleurs sont blanches ou crèmes, elles ont une inflorescence en forme de corymbe, ombelles de 3 à 5 fleurs.
- ◆ Ses fruits sont urcéolés, pédonculé, de 10 mm de long que de large, effilé en un col court et épais (**Likib et al., 2019 ; Romero, 2020**).



Figure 3 : Image représentante des fruits d'*E. citriodora* (**Anonyme 2**).

Synthèse Bibliographique

II.1.2. Composition chimique de la plante

Le principal composé d'*E. citriodora* des diverses régions géographiques est le citronellal, avec des proportions supérieures à 60%. Elle est caractérisée par une large quantité de monoterpènes, dominés par les monoterpènes oxygénés dont les majeurs composés sont le citronellal avec un taux élevé suivi de citronellool ainsi que l'isopulégol (Likibi et al., 2019). Jusqu'à présent, il existe peu d'informations sur le fruit d'*E. citriodora* (Ololade et al., 2021). Selon l'étude effectuée par Su et ses collaborateurs (2017), vingt-huit composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des fruits d'*E. citriodora*. Parmi ces derniers, on retrouve les hydrocarbures monoterpènes qui sont les plus dominants (42,1 %) avec comme principaux composés le p-cymène et l'alpha-pinène, suivis par les sesquiterpènes oxygénés (28,7 %). Cependant les quantités peuvent différer selon les espèces et les variétés mais aussi au sein d'une même variété, la composition chimique peut changer en fonction de l'origine géographique (Miguel et al., 2018).

II.1.3. Utilisation et propriétés pharmacologique

Traditionnellement, les feuilles sont utilisées pour traiter les affections respiratoires telles que la grippe, le rhume et la pneumonie. Tant en infusion qu'en bain de vapeur (Romero, 2020). Quelques feuilles posées sur les braises d'un kanoun (Braséro) servent à la fois à faire des fumigations et à assainir l'atmosphère des pièces où séjournent les malades (Hammiche, 2014).

La plante entière, fraîche ou séchée, est utilisée pour traiter le diabète au Pérou (Bussmann et Glenn 2011). Son huile essentielle est utilisée pour traiter les douleurs articulaires : rhumatisme, arthrite, tendinite, sciatique; les douleurs musculaires : courbatures, crampes, contractures musculaires, douleurs dorsales; pour les dermatoses : piqures d'insectes, démangeaisons, zona, mycoses cutanées, pied d'athlète; antiseptique et antiviral atmosphérique (Gauriat, 2015).

En pharmacologie, les études antérieures sur l'*E. citriodora* ont montré qu'elle exerce plusieurs activités biologiques dont : anti-inflammatoire, analgésique, antioxydante et antibactérienne (Ololade et al., 2021), antidiabétique (Wang et al., 2014, Ansari et al., 2021), antifongique (Su et al., 2017), insecticides (Yao et al., 2021), antipyrétiques (Gbenou et al., 2013), antiparasitaires (Macedo ITF et al., 2011) et antituberculeuses (Alvarenga et al., 2014).

Synthèse Bibliographique

II.1.4. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des fruits d'*E. citriodora* a été bien décrite contre des bactéries à Gram positif et négatif, dont : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* (Su et al., 2017, Ololade et al., 2021). En réponse à une infection microbienne, l'eucalyptus synthétise des composés phénoliques (Doughari et al., 2008 ; Sengul et al., 2000), ces derniers peuvent agir au niveau de la membrane cellulaire et la paroi cellulaire des micro-organismes (Taguri et al., 2006). Ils interagissent avec les protéines membranaires des bactéries en établissant des liaisons hydrogène par l'intermédiaire de leurs groupes hydroxyle, ce qui entraîne des modifications de la perméabilité et provoque la destruction des cellules. Ils peuvent également pénétrer dans les cellules bactériennes et faire coaguler le contenu cellulaire (Tian et al., 2009).

III. Méthodes d'extraction

L'extraction, au sens pharmaceutique du terme, désigne la séparation des parties médicalement active des tissus végétaux à l'aide de solvants sélectifs et cela en utilisant des procédés d'extraction standard (Jain, 2020). Cette étape doit répondre à une série d'exigences telles que la polyvalence ; la facilité d'utilisation ; l'efficacité ; la rentabilité, l'extraction et la préservation de la majeure partie des substances bioactives naturelles contenues dans le matériel végétal (Gullón et al., 2017).

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (traditionnelles). Elles comprennent l'extraction par solvant, l'extraction au Soxhlet et la macération. Les nouvelles (émergentes), parmi elles, on trouve l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction par champs électrique pulsé (PEF) (Antony et al., 2022).

III.1. Extraction par Soxhlet

Le Soxhlet est un appareil d'extraction qui permet de réaliser une extraction solide-liquide, nommée également la lixiviation mais aussi lixiviation (Luque de Castro, 1998). Tout en répétant infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (Penchev, 2010). Cet appareil (Figure 3) est utilisé dans divers domaines allant de la pharmacie, l'environnement et même pour les

Synthèse Bibliographique

denrées alimentaires. Il est constitué de trois composants principaux : le récipient de solvant (1,2), le récipient à échantillons (3-8) et le condenseur (9-11).

Lors de l'extraction au Soxhlet, l'échantillon (solide) est rempli à l'intérieur d'un dé à coudre fait de papier filtre épais. Ce dernier est placé dans un condenseur à reflux qui est monté au-dessus d'un ballon contenant le solvant (liquide) souhaité. Une fois le solvant a atteint sa température d'ébullition, la vapeur de ce dernier se condense dans le condenseur à reflux en haut de l'installation, remplissant ainsi la coupelle de l'extracteur. Ainsi, une partie du composé souhaité se dissout dans le solvant chaud. Lorsque la coupelle se remplit jusqu'au niveau du tube du siphon, le solvant s'écoule automatiquement à l'intérieur du ballon transportant avec lui la matière soluble.

Le solvant présent à l'intérieur du ballon va à nouveau s'évaporer et s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction. Ce processus est répété en continu, assurant ainsi un processus d'extraction complet (Ayodele, 2022).

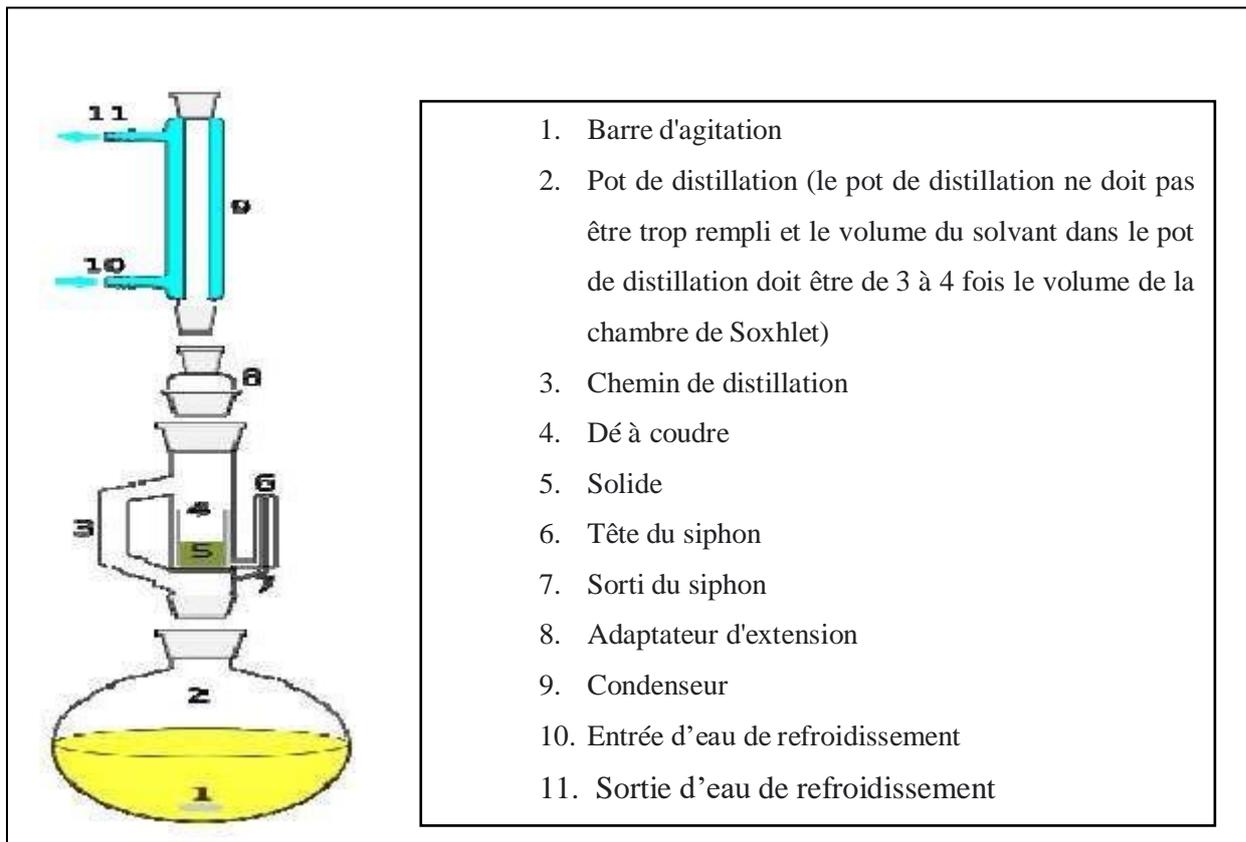


Figure 4 : Représentation schématique des différentes parties du Soxhlet (Jain, 2020).

Synthèse Bibliographique

III.2. Extraction par macération

La macération est une technique efficace et simple pour l'extraction des composés bioactifs (Ćujić *et al.*, 2015). Son principe repose sur la mise en contact d'une masse d'échantillon végétal avec un volume de solvant. La solution ainsi obtenue doit être agitée puis centrifugée et enfin filtrée (Oroian *et al.*, 2020).

III.3. Extraction par micro-onde

La première utilisation des micro-ondes s'est faite en 1950 après le dépôt d'un brevet par la société Raytheon suite à la découverte en 1945 des micro-ondes grâce au physicien Percy Spencer (Kanchan B *et al.*, 2020). En 1986, des recherches ont été entreprises pour l'utilisation des micro-ondes pour l'extraction (Ganzler *et al.*, 1986), et depuis, les travaux n'ont pas cessé de croître. C'est seulement en 1990 que la méthode d'extraction par solvant assisté par micro-ondes ou MAE « Micro wave Assisted Extraction » a été mise au point par l'équipe canadienne de Paré et ses collaborateurs (1990).

Les micro-ondes ou les hyperfréquences sont des ondes non ionisantes qui font partie du spectre électromagnétique dont la longueur d'onde est comprise entre 300 MHz et 300 GHz (Akhtar *et al.*, 2019). Le mécanisme du chauffage micro-ondes (Figure 5) repose sur l'interaction entre les micro-ondes et les molécules polaires conduisant ainsi à une surchauffe interne et une perturbation de la structure cellulaire facilitant la diffusion du composé bioactif à partir de la matrice végétale (Cheok *et al.*, 2014, Takeuchi *et al.*, 2009).

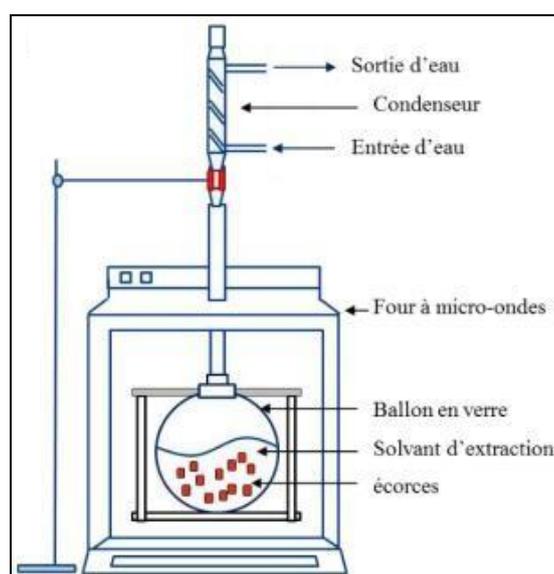


Figure 5 : Schéma du montage utilisé pour l'extraction par micro-ondes (Bouras, 2015).



Matériels
et
Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Description de l'étude et Objectifs

L'objet de notre étude est l'optimisation des facteurs influençant l'extraction (Taille des particules, températures, taux de remplissage...etc.) des différentes molécules dotées d'activités antimicrobiennes contenues dans les fruites de l'*E. citriodora*. Pour cela, trois méthodes ont été adoptées, à savoir : l'extraction par Soxhlet, par macération et l'extraction assistée par micro-ondes. Les expériences réalisées ont été réalisées en triplicat.

Le choix de la température du séchage adéquate de notre plante a été déterminé selon l'étude effectuée au cours de l'année précédente intitulée « Cinétique de séchage des feuilles et graines d'*E. citriodora* et l'étude de l'activité antibactérienne » qui était de 80°C à l'aide d'une étuve ventilée.

D'autre part, durant la même année, une autre étude a été réalisée, intitulée « Recherche de nouvelles molécules actives vis-à-vis des bactéries multi-résistantes » qui a confirmé que le méthanol est le solvant donnant le meilleur rendement par rapport aux autres solvants, ce qui explique son utilisation au cours de toutes les extractions effectuées.

Les extraits méthanoliques obtenus ont été testés sur différents pathogènes, Gram positif dont le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Bacillus sp* et Gram négatif dont *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, afin d'évaluer leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque. Tous les tests d'activité antibactérienne et les extractions ont été réalisés en triplicat.

II. Matière végétal et souches bactériennes

II.1. Matière végétal

II.1.1. Récolte et échantillonnage

Les fruits frais d'*E. citriodora* ont été cueillis le 02 avril 2022, au sein du parc national de Gouraya (**Figure 6**), aux hauteurs de la ville de Béjaïa où la plante a été sélectionnée et identifiée par un botaniste du parc. L'échantillonnage s'est fait sur 5 arbres différents, selon la hauteur et l'angle d'ensoleillement.



Figure 6 : Localisation géographique du parc national Gouraya (Q39P+5G Béjaïa).

Matériels et Méthodes

II.1.2. Séchage et broyage

Aussitôt après la collecte du matériel végétal, les fruits préalablement débarrassés de toutes les feuilles et tiges, ont été séchés à l'étuve ventilée à 80°C pendant 40 min. La matière sèche obtenue a été broyée à l'aide d'une meule à grains traditionnel "thassirth" (**Figure 7 A**), ensuite transférée dans un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière a été tamisée de manière à obtenir des particules de différentes tailles. Les poudres ainsi obtenues ont été conservées dans des bocaux (**Figure 7 B**) en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure 7 : Photographie originale, A : Meule à grains "thassirth" ; B : Poudre des fruits d'*E. citriodora*.

II.2. Les souches bactériennes

Les tests d'activité antimicrobienne ont été effectués sur une gamme de germes couramment responsables de diverses infections. Ces dernières (voir **Tableau I**) font partie de la collection des souches microbiennes du laboratoire de recherche au département de microbiologie (**Figure 8**), à l'université de Bejaia. Les souches ont été ré-identifiées et conservées à 4°C pour utilisation ultérieure.

Matériels et Méthodes

Tableau I : Les souches bactériennes utilisées et leurs codes.

Souches	Gram	Codes
<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline (SARM)	+	mm31
		IH03TG
		810
<i>Bacillus sp</i>	+	/
<i>Escherichia coli</i>	-	1443
		1437
		3137
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	2559
		7376
		223



Figure 8 : Photographie originale représentant notre collection de souches.

Matériels et Méthodes

III. Les Extractions des substances bioactives

III.1. Extraction par Soxhlet

Une série de 13 expériences (**Figure 9**) a été effectuée en suivant les protocoles décrits par (**Herzi, 2013 ; Suwari et al., 2017**) avec certaines modifications, où une quantité de 25g du broyat a été introduite à l'intérieur d'une cartouche et 100mL de méthanol (100%) de la marque SIGMA ALDRICH à l'intérieur d'un ballon.

Cinq variables différentes ont été prises en considération dont : La taille des particules, la température, le taux de remplissage, le temps d'extraction ainsi que le débit. Durant ces expériences, chacun des paramètres a été varié en maintenant les autres fixes.



Figure 9 : Photographie originale de l'extraction par Soxhlet.

Matériels et Méthodes

III.2. Extraction par Macération

Pour l'extraction par macération (**Figure10**), la quantité de 10g du broyat a été introduite dans un volume de 50mL de méthanol (100%) soit un ratio (volume du solvant/ masse de broyat) de 5mL/ g pendant une durée de 48h et cela sans agitation. Ces derniers ont été variés par la suite.

Les paramètres à optimiser lors de cette extraction sont : la taille des particules, la durée de macération, le pourcentage en méthanol, le ratio (volume du solvant/ masse de broyat) et enfin l'agitation. Ces derniers ont été variés suivant le protocole de (**Kouwelton et al., 2017**) avec certaines modifications.



Figure 10 : Photographie originale de l'extraction par macération.

III.3. Extraction par Micro-onde

L'extraction par micro-onde a été réalisée suivant le protocole décrit par (**Koné et al., 2017**) avec quelques modifications. Une quantité de 10g a été introduite à l'intérieur d'un ballon contenant 50mL de méthanol. Les paramètres opératoires pris en considération sont : tailles des particules, la durée, concentration en méthanol ainsi qu'la puissance.

Matériels et Méthodes

III.4. Détermination du rendement d'extraction

Après avoir effectué toutes les expériences, les extraits ont été versés dans des boîtes pétri en verre et misent à l'étuve à 50°C, durant une semaine. Cette étape permet l'évaporation du solvant. Les extraits secs ont été grattés et récupérés sous forme de poudre (Figure 11).

Les rendements sont déterminés par la différence entre le poids de la masse d'extrait sec et la masse de la matière végétale (Bouhui *et al.*, 2018).

$$\text{Rendement (\%)} = ((\text{Masse d'extrait sec}) * 100) / (\text{Masse de la matière végétale})$$

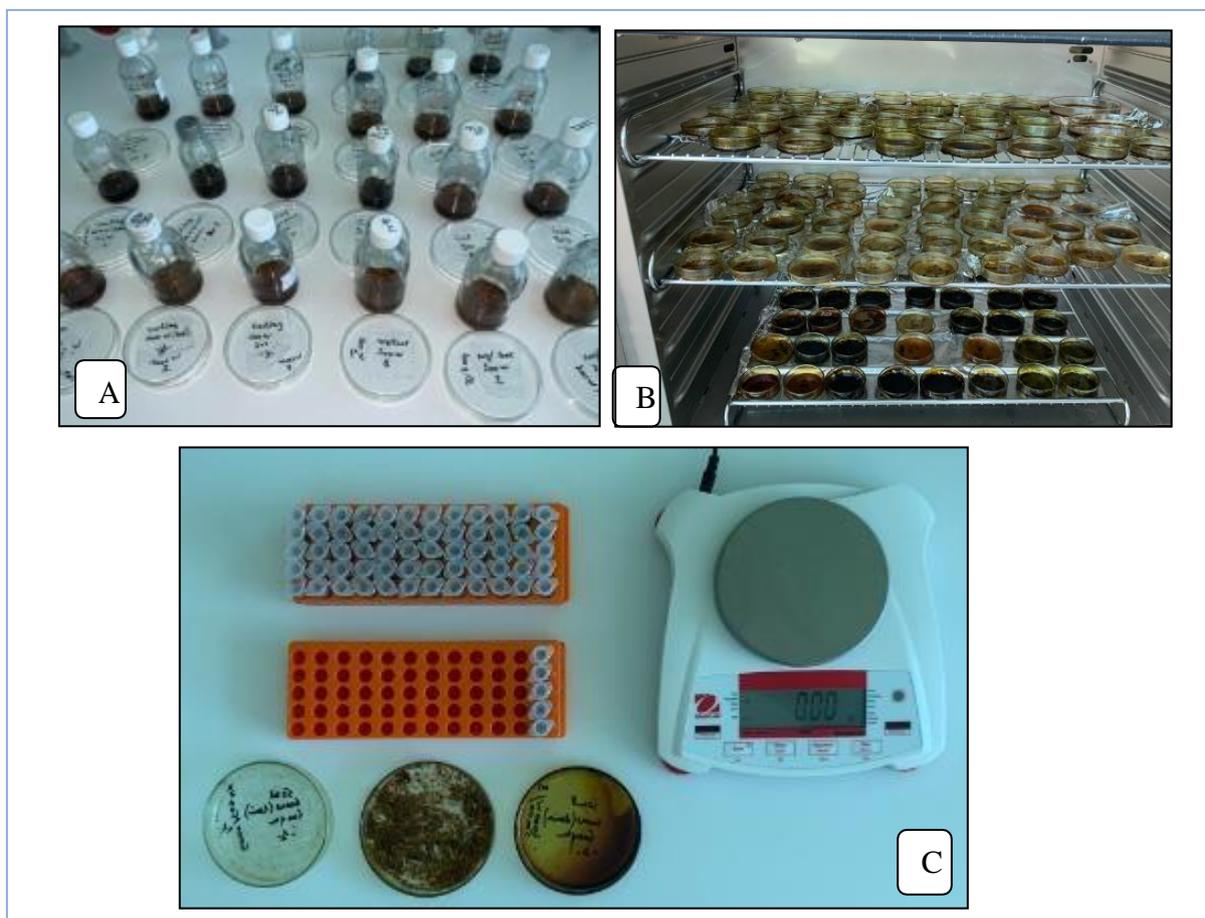


Figure 11 : Photographie originale, A : Préparation des extraits secs ; B : Séchage des extraits à l'étuve ; C : Grattage et récupération des extraits secs.

Matériels et Méthodes

IV. Screening et tests d'activité

IV.1. Préparation des extraits

Pour tester les différents extraits, nous avons suivi la méthode de **Chuku et al., (2016)**. Pour chaque paramètre, 0,5 g d'extrait a été dissous à l'intérieur d'un tube à essai stérile contenant 02 ml d'eau distillée stérile de manière à obtenir une concentration de 250 µg/ml. Ensuite, la suspension a été homogénéisée au vortex. Les extraits ainsi obtenus ont été stérilisés à l'aide d'un filtre-seringue de 0.22 µm de porosité (**Figure 12**). Ce dernier permet d'éliminer tous microorganismes, y compris les phages.



Figure 12 : Photographie originale de la filtration et de la préparation des extraits.

IV.2. Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions de l'inoculum bactérien ont été préparées en respectant l'étalon recommandé par M^c Farland, soit un standard de 0,5 M^c Farland équivalent à environ $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Étant donné que l'activité de tout agent antimicrobien dépend de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée (**Bashige et al., 2018**).

Les suspensions ont été préparées à partir d'une culture pure et fraîche (18 – 24H), trois à quatre colonies bien isolées (selon l'espèce) ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et mises en suspension dans 02mL d'eau physiologique stérile. Les suspensions ont été utilisées dans les 15min qui suivent leurs préparations (**Boulekbache et al., 2012**).

Matériels et Méthodes

IV.3. Préparation du milieu de culture et ensemencement

Aseptiquement, 10 ml et 15 ml du milieu Mueller Hinton (MH) ont été versés dans des boîtes de pétri en verre de 60mm et 90mm respectivement afin d'obtenir 4mm d'épaisseur. Une fois solidifié, le milieu est ensemencé à l'aide d'un écouvillon stérile, préalablement immergé dans la suspension bactérienne, par des stries serrées. L'opération a été faite en 3 fois tout en tournant la boîte d'un angle de 90° et en pivotant l'écouvillon sur lui-même à chaque fois. Enfin, l'écouvillon a été fait passer sur la périphérie de la gélose pour avoir un tapis uniforme afin d'observer la sensibilité des souches à l'extrait si y'a présence d'activité.



Figure 13 : Photographie originale de la préparation du milieu de culture ainsi que le remplissage des boîtes pétri.

IV.4. Test d'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des différents extraits d'*E. citriodora* a été déterminée par la méthode des disques décrite par (Bauer 1966), où les disques antibiotiques sont remplacés par des disques stériles vierges de 06 mm, capable de recevoir 45µl de solution. Sachant que les disques ont une capacité d'absorption limitée (Fontanay et al., 2015). Les disques ont été imbibés avec 40µl de chacun des extraits préparés de différents paramètres testés. Ensuite, en se servant d'une pince stérile, ils sont disposés aseptiquement à la surface de la gélose MH (Figure 13).

Matériels et Méthodes

Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Durant l'incubation, les substances présentes dans l'extrait sont censées diffuser dans la gélose. Leur effet se traduit par l'apparition autour des disques d'une zone circulaire transparente correspondante à l'absence de la croissance (Fontanay et al., 2015). Pour l'estimation de l'activité antimicrobienne des extraits, l'échelle de Ponce est utilisée (Ponce et al., 2003) (voir Tableau II).

Tableau II : Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne (Ponce et al, 2003).

Activité antimicrobienne	Degrés de sensibilité	Diamètre de la zone
Extrêmement sensible	+++	Plus de 20mm
Très sensible	++	15 à 19mm
sensible	+	8 à 14mm
Résistant	-	Moins de 8m

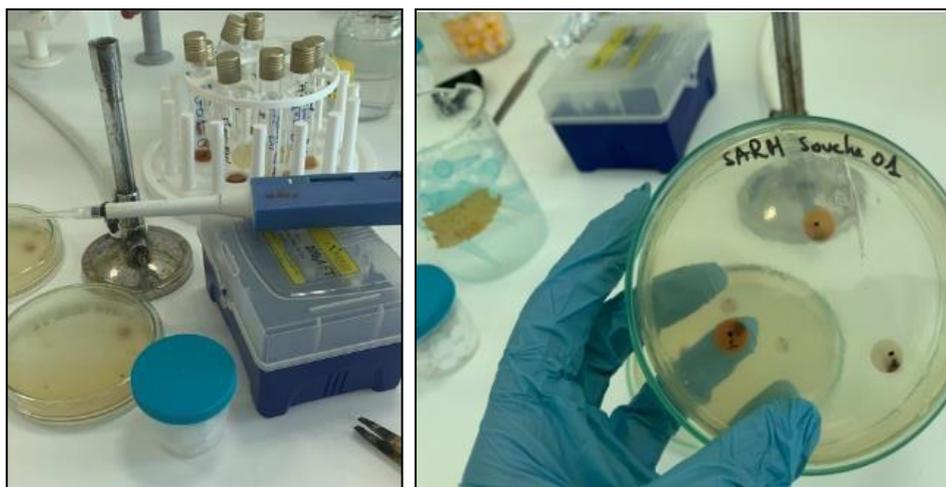


Figure 14 : Photographie originale de la préparation des tests d'activité antibactérienne.



*Résultats
et
Discussions*

Résultats et discussion

I. Rendement des extractions

I.1. Rendement du Soxhlet

D'après les résultats, le rendement d'extraction est effectivement variable en fonction des différents paramètres.

Les résultats montrent l'effet de la granulométrie sur le rendement d'extraction, où on remarque qu'il est inversement proportionnel avec la diminution de la taille des particules. Cela est expliqué par le fait que plus la taille des particules diminue, plus la surface de contact entre le solvant et le broyat devient plus grande, ce qui facilite la pénétration du solvant à l'intérieur des particules (**Herzi, 2013**).

Concernant l'effet de la température, le rendement est plus important pour la plus basse température. En revanche, une diminution est observée pour une température moyenne suivie d'une augmentation à la plus haute température. L'augmentation de la température de l'extraction augmente l'énergie cinétique du solvant, de sorte que sa pénétration dans le matériau devient plus importante. Les molécules sont donc plus facilement extraites (**Suwari et al., 2017**).

Nous avons observé dans les résultats que plus le taux de remplissage est élevé, meilleur est le rendement. Cela peut être dû au fait que plus le volume du solvant est en contact avec le broyat, mieux le transfert de métabolite s'effectue. L'extraction est moins sélective que dans le cas où le ratio volume sur masse de broyat est plus faible, où les substances avec le plus d'affinités avec le solvant sont extraites en premier lieu (**Koné et al., 2021**).

Le rendement le plus élevé de toutes les extractions est enregistré pour le débit moyen. Ce résultat est probablement dû à l'augmentation du nombre de cycles avec l'augmentation du débit. Cependant, l'augmentation du débit a fait apparaître une diminution du rendement. **Herzi(2013)** a expliqué qu'avec un débit élevé, le temps de séjour du solvant dans la cartouche est faible ce qui réduirait le temps de contact entre la matière végétal et le solvant d'où la diminution du rendement. Ces propos sont conformes avec nos résultats, où il y a eu une augmentation en passant d'une courte à une plus longue durée. Cela confirme que le débit le plus faible n'était pas suffisant avec une courte durée pour extraire la totalité des substances. Ces résultats sont en concordance avec ceux de **Ahmad et al., (2010)** et **Herzi, (2013)** où la tendance du rendement été en augmentation avec l'augmentation de la durée d'extraction.

Résultats et discussion

I.2. Rendement de la macération

En ce qui concerne la taille des particules, nous avons obtenu un rendement plus élevé avec les particules les plus fines en raison de l'augmentation de la surface active et de l'amélioration de contact entre la matière végétale et le solvant. C'est-à-dire, les particules de petite taille ont une surface de contact plus élevée, ce qui permet d'augmenter le transfert de masse (**Ćujić et al., 2016**).

Quant à la durée de macération, on remarque que le rendement augmente avec l'augmentation de la durée de contact, cela montre que la quantité de matière extraite dépend du temps de séjour du matériel au sein du solvant (**Groubert, 1984**).

D'autre part, nous avons observé également que le rendement est plus élevé lorsque le ratio volume/masse du broyat est à sa borne. D'après **Jovanović et al., (2017)**, un rapport solide-solvant plus élevé génère une diminution de la consommation de matière végétale et permet d'éviter la saturation du milieu d'extraction en favorisant le transfert de matière.

Le pourcentage en méthanol influence également le rendement. On constate que le solvant le plus concentré en méthanol donne un meilleur rendement. Cela peut s'expliquer par le fait que les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2012**).

Il ressort encore des résultats que l'agitation ainsi que sa vitesse influencent significativement le rendement. Selon (**Dibert et al., 1989**) l'agitation, maintenue durant une longue période, favorise les chocs entre les différentes particules et permet ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu dans le milieu, ce qui fait augmenter le rendement. De plus, l'agitation peut réduire l'épaisseur de la couche limite autour du solide et peut même limiter la formation de cette couche de solvant saturé au contact de la matière solide en créant un mouvement de fluide frais et moins chargé à ce niveau-là (**Frémeaux and Leybros, 1990**).

Résultats et discussion

I.3. Rendement du Micro-ondes

D'après le diagramme, on constate qu'une concentration en méthanol plus élevée donne un meilleur rendement. Comme il a été précédemment expliqué, le type et la quantité de solvant utilisé peuvent endommager les cellules et perméabiliser les parois cellulaires, facilitant ainsi l'extraction de grandes quantités de substances polaires et moyennement polaires (**Seidel, 2012**).

Avec l'augmentation de la taille des particules, on remarque la diminution du rendement. Cela reste conforme avec les résultats trouvés dans la littérature scientifique qui stipule que la particule de taille plus fine de l'échantillon peut offrir la plus grande surface ce qui assure un meilleur contact entre la matrice solide et le solvant (**Pandey et al., 2014**).

Nous avons également observé une légère augmentation du rendement d'extraction via l'augmentation de puissance de radiation. Cela peut être attribué à la destruction accélérée des cellules végétales suivie d'une diffusion rapide des constituants intracellulaires dans la solution, suite à l'absorbance de l'énergie des micro-ondes (**Akhbari et al., 2018**).

Ces résultats indiquent que le rendement est aussi affecté par le temps d'extraction. La plus longue durée montre un rendement plus élevé, par rapport à une courte et à une moyenne durée. La durée d'extraction est en fonction de la puissance des micro-ondes qui doit toujours être optimisée. **Xiao et al., (2008)** expliquent que l'efficacité de l'extraction est améliorée en augmentant la puissance des micro-ondes lorsque de courtes durées d'irradiation sont utilisées. Cependant une application des temps prolongés peut entraîner une dégradation des produits (**Camel, 2000**).

Résultats et discussion

II. Activité des substances sur les souches bactériennes

II.1. Evaluation de l'activité des extraits au soxhlet

Chacune des bactéries présente un degré de sensibilité différent de l'autre en fonction des différents extraits. Les diamètres d'inhibition obtenus par l'extraction au soxhlet varient pour *S. aureus* et *Bacillus sp* (**Figure 14**). En revanche, aucune activité n'est observée contre *E. coli* et *K. pneumoniae*.

▪ *S. aureus*

Les meilleures activités pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants:

- La taille des particules la plus fine.
- Le débit le plus haut.

Les activités les moins pertinentes pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La température la plus élevée.
- Les différents taux de remplissage.

▪ *Bacillus sp*

Les meilleures activités pour la souche *Bacillus sp* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- Une taille de particules moyenne.
- Un débit moyen.

Les activités les moins pertinentes pour la souche *Bacillus sp* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- la température la plus basse ainsi que la plus élevée.
- Le taux de remplissage moyen.
- La durée la plus longue.

Résultats et discussion

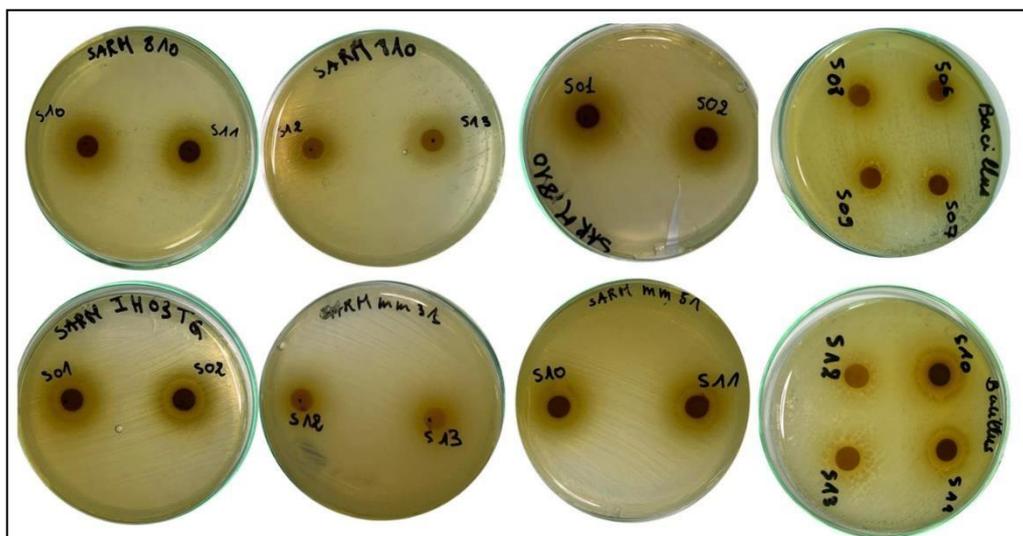


Figure 15 : Photographie originale représentant les zones d'inhibitions des souches Gram positif induites par les extraits obtenus par l'extraction au soxhlet.

II.2. Evaluation de l'activité des extraits par macération

Les résultats montrent qu'une activité est obtenue avec les extraits de la macération, contre les *S. aureus* et *Bacillus sp* (**Figure 15**). Cependant, les souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae* ne montre aucune sensibilité contre les mêmes extraits.

▪ *S. aureus*

Les meilleures activités pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La durée la plus élevée ainsi que la moyenne.
- La concentration la plus élevée en méthanol.
- Le ratio e plus haut.

Les activités les moins pertinentes pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La concentration plus faible ainsi que la plus élevée en méthanol.

▪ *Bacillus sp*

Les meilleures activités pour la souche *Bacillus sp* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La taille des particules la plus fine.
- la concentration la plus élevée en Méthanol.

Résultats et discussion

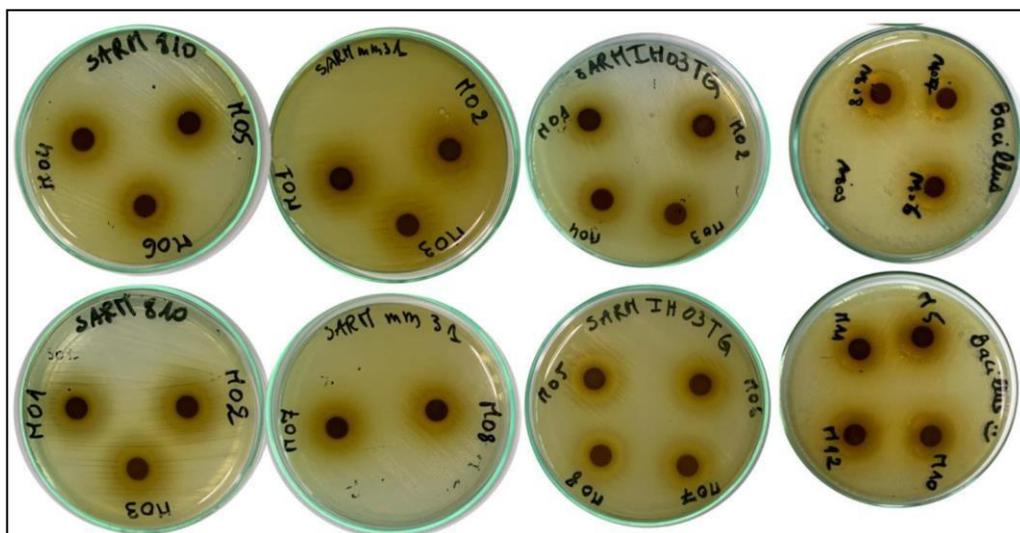


Figure 16 : Photographie originale des zones d'inhibitions des souches Gram positif induites par les extraits obtenus par l'extraction par macération.

II.3. Evaluation de l'activité des extraits obtenus par MAE

Les extraits obtenus par MAE donnent de très bons résultats pour *S. aureus* et *Bacillus sp* (**Figure 16**). Contrairement à ces résultats, les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* montre une résistance à ces extraits.

▪ *S. aureus*

Les meilleures activités pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La moyenne concentration en méthanol
- La moyenne ainsi que la plus grande taille des particules.
- La puissance moyenne.
- La durée moyenne.

L'activité la moins pertinente pour les souches de *S. aureus* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La moyenne taille des particules.

▪ *Bacillus sp* :

Les meilleures activités pour la souche *Bacillus sp* sont obtenues avec les paramètres suivants :

- La plus grande taille des particules.
- La puissance moyenne.

Résultats et discussion

- La durée moyenne.

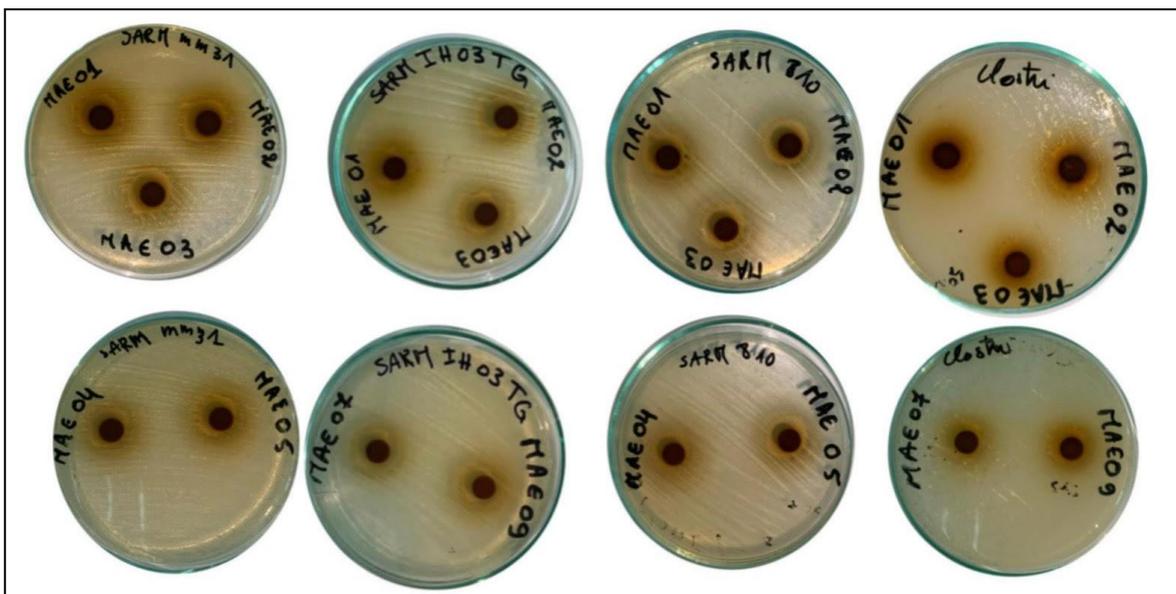


Figure 17 : Photographie originale des zones d'inhibitions des souches Gram positif induite par les extraits obtenus par l'MAE.

Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus par les activités antimicrobiennes réalisées sur les différents agents multi-résistants, pratiquement tous les extraits méthanoliques des fruits d'*E. Citriodora* ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis de tous les agents pathogènes à Gram positif. Cependant, aucune activité n'est constatée sur les bactéries à Gram négatif. Cette différence est expliquée par le fait que les bactéries Gram négatif sont dotées d'une couche de peptidoglycane nichée entre la membrane plasmique et l'assise externe composée de lipopolysaccharides et de protéines. Constituant ainsi une barrière imperméable aux substances susceptibles d'entrer et d'empêcher leur croissance (**Fertout-Mouri et al., 2016**). De plus, leur périplasme contient des enzymes capables de détruire les molécules étrangères introduites de l'extérieur (**Klančnik et al., 2010**). Contrairement aux Gram négatif, la couche peptidoglycane des Gram positif se situe à l'extérieur et leur permet donc d'être exposés aux composés actifs (**Fertout-Mouri et al., 2016**).

Les résultats obtenus dans l'étude réalisée par (**Su et al., 2017**) sont en concordance avec nos résultats. Dans ces travaux, il a été démontré que l'huile essentielle des fruits d'*E. Citriodora* inhibe mieux les bactéries Gram positif que les bactéries à Gram négatif. D'après les tests qu'ils ont réalisés, les composés actifs étaient le τ -Cadinol et le α -Cadinol. En effet, divers rapport de la littérature attestant de l'excellente efficacité antibactérienne de ces composés (**Kalemba et Kunicka 2003, Su et al., 2015**).

Selon l'étude menée par **Ololade et al., (2021)**, l'huile essentielle des fruits d'*E. Citriodora* a montré une activité antimicrobienne contre des Gram positif et Gram négatif. Ce qui est différent de nos résultats. Selon eux l'activité antimicrobienne est probablement dus à la présence de terpénoïdes qui sont connu par leurs propriétés antimicrobiennes, en particulier le 1,8-cinéole. D'autres études ont démontré cet effet (**Hendry et al., 2009 ; Dogan et al., 2016 ; Şimşek et Duman, 2017 ; Salehi, et al., 2019**). Ce composé peut être une solution efficace au problème de la résistance aux antibiotiques (**Şimşek et Duman, 2017**). La principale cible du cinéol est la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une dégradation de la stabilité structurale de la cellule, par conséquent une augmentation de la perméabilité (**Hendry et al., 2009**).

D'autres études attribuent cette activité à la présence d'autres composés comme le globulol (**Tan et al., 2008 ; Sahi, 2016**), le *p*-cymène (**Dogan et al., 2016**), citronellol (**Dogan et al., 2016**), l'acétate de citronellyle (**Dogan et al., 2016**), le terpinéol (**Dogan et al., 2016**), l' α -pinène (**Chikhoun et al., 2013 ; Elaïssi et al., 2012 ; sahi, 2016**). L'effet synergique entre ce composé et le 1,8-cinéole pour la plupart des espèces d'*Eucalyptus* étudiées est très important (**Limam et al., 2020**). L'efficacité optimale d'un extrait peut ne

Résultats et discussion

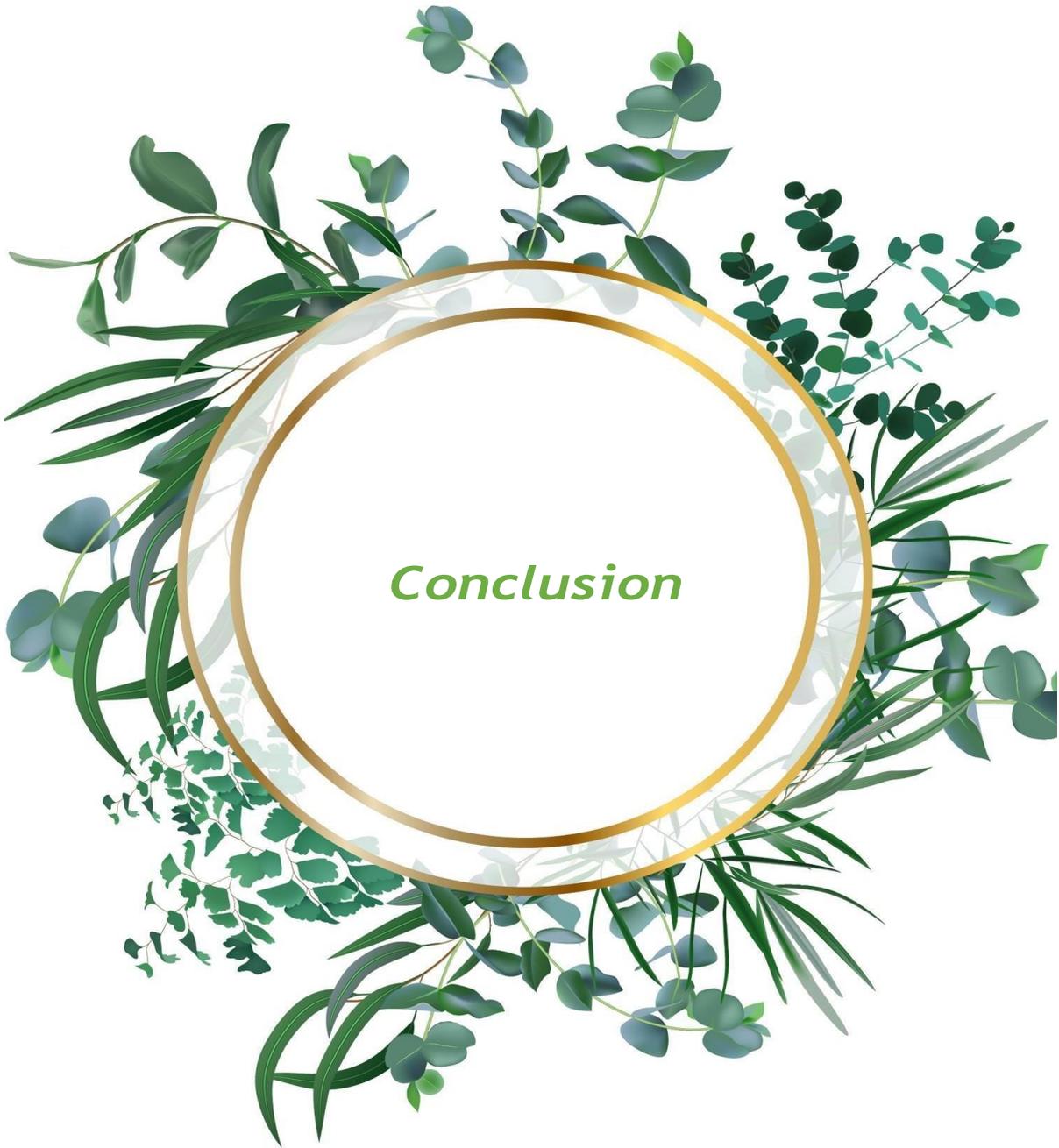
pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée ou synergie de différents composés à l'origine de cet extrait. Lorsqu'ils sont séparés, ils deviennent inactifs individuellement (**Fertout-Mouri et al., 2016**).

Les composés phénoliques sont reconnus pour leur effet antibactérien. Le mécanisme peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases, carbohydrases et autres interactions), ce qui provoque l'inactivation des adhésines microbiennes, des protéines de transport et de l'enveloppe cellulaire (**Cheurfa et Allem, 2017**).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention due à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

De façon globale, on déduit que les rendements obtenus par l'extraction par Soxhlet sont les plus faibles tandis que l'extraction par macération et l'MAE donnent des rendements plus significatifs. La comparaison entre ces trois méthodes d'extractions utilisées nous permet clairement d'assurer l'efficacité de l'MAE sur les fruits de l'*Eucalyptus citriodora*. Cette efficacité est attribuée à la combinaison optimale du temps et du niveau de puissance qui sont les deux principaux paramètres améliorant l'extraction des molécules ciblées (**Akhtar et al., 2019**). Selon (**Liu et al., 2016**), un temps adéquat d'exposition aux micro-ondes est nécessaire pour un bon rendement d'extraction, en raison d'un contact plus important entre la matrice de la plante et le solvant, le ramollissement du tissu végétal et l'affaiblissement de la paroi cellulaire. De plus, (**Akhtar et al., 2019**) expliquent que l'humidité présente à l'intérieur des cellules absorbe les micro-ondes, ce qui provoque le réchauffement interne de l'environnement cellulaire et crée une pression supplémentaire sur la paroi. Celle-ci éclate à son tour pour libérer son contenu plus tôt par rapport aux méthodes conventionnelles qui reposent uniquement sur le chauffage de la surface.

Nos résultats indiquent également que la taille des particules, en plus des deux paramètres cités au-dessus, ont un effet interactif sur le contenu final des extraits. Ce qui génère une activité antimicrobienne plus élevée montrant ainsi aucune perte de leur bioactivité due au chauffage par micro-ondes (**Akhtar et al., 2019**).



Conclusion

CONCLUSION

L'efficacité d'action des antibiotiques diminue de façon inquiétante à cause de l'émergence et de la propagation de l'antibiorésistance. De nos jours, beaucoup d'attention est portée sur les plantes médicinales comme une alternative thérapeutique, pour faire face à cette diminution d'efficacité.

Notre étude s'est intéressée à la recherche de molécules douées d'activité antibactérienne que peuvent renfermer les fruits d'*Eucalyptus citriodora*.

Suite aux différentes extractions effectuées, on conclut que les meilleurs rendements sont obtenus par l'extraction assistée par Micro-ondes, comparé à ceux obtenus par Soxhlet et macération. Plusieurs recherches attestent l'efficacité de cette technique innovante, en termes de réduction du temps d'extraction, en termes de rendement plus élevé par rapport aux méthodes conventionnelles et d'une consommation réduite de solvant.

L'optimisation a révélé que la combinaison des paramètres la plus rentable est : une forte concentration en méthanol, la plus fine taille de particules et une puissance élevée.

Les tests d'activités réalisées pour les extraits méthanoliques obtenus par les trois méthodes d'extraction ont révélé que les fruits d'*Eucalyptus citriodora* exhibent un pouvoir antimicrobien important contre les bactéries Gram positif à l'inverse des bactéries à Gram négatif.

Toutefois, l'MAE a montré plus d'efficacité, où certaines des souches se sont avérées extrêmement sensibles (plus de 20 mm de diamètre) ou très sensibles (entre 15 et 19 mm) à ses extraits. Ces résultats ont été remarqués avec les paramètres suivants : une concentration moyenne en méthanol ; La moyenne taille de particules ainsi que la plus grande taille ; La puissance moyenne et une durée également moyenne.

En outre, les résultats montrent que les souches testées n'ont pas la même sensibilité envers un même extrait. Ce qui nous laisse dire que le mode d'action des extraits dépend du type de microorganismes, du type d'extrait et de sa concentration mais peut également dépendre de leur composition chimique.

Pour conclure, les résultats de notre étude nous ont permis d'affirmer la présence d'une activité antimicrobienne au sein des fruits d'*Eucalyptus citriodora*. Cependant, l'ensemble de son potentiel médicinal n'est pas encore étudié de manière exhaustive. Notre travail a permis

CONCLUSION

d'ouvrir de nouvelles horizons et perspectives. Afin de compléter cette thématique de recherche, il serait intéressant de :

- ✓ Déterminer la composition chimique des extraits des fruits d'*Eucalyptus citriodora* par HPLC/MS.
- ✓ Fractionner les différents composants des extraits méthanoliques des fruits d'*Eucalyptus citriodora* afin de cibler les substances responsables de leur effet antibactérien et de déterminer la synergie entre ses différents constituants.
- ✓ De définir le mécanisme d'action de ces substances végétales sur les agents antimicrobiens.
- ✓ Etudier la toxicité des extraits méthanolique des fruits d'*Eucalyptus citriodora*.



*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Ah, Y.M., Kim, A.J. et Lee, J.Y. (2014).** Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(1): 8-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016>
- **Ahmad, A., Alkarkhi, A.F.M., Hena, S., Siddique, B.M. et Dur, K.W. (2010).** Optimisation de l'extraction Soxhlet d'Herba Leonuri à l'aide d'un plan d'expérience factoriel. *Journal international de chimie*. 2(1) : 198. doi:10.5539/ijc.v2n1p198
- **Ahmed, M. O. et Baptiste, K. E. (2018).** Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance*. 24(5): 590–606. doi:10.1089/mdr.2017.0147
- **Akhtar, I., Javad, S., Ansari, M., Ghaffar, N. et Tariq, A. (2019).** Process optimization for microwave assisted extraction of *Foeniculum vulgare* Mill using response surface methodology. *Journal of King Saud University - Science*. 32 (2): 1451-1458 doi:10.1016/j.jksus.2019.11.041
- **Ansari, P., Flatt, P.R., Harriott, P. et Abdel-Wahab, Y.H.A. (2021).** Propriétés insulinothropes et antidiabétiques des feuilles d'*Eucalyptus citriodora* et isolement de phytomolécules bioactives. *Journal de pharmacie et de pharmacologie*. 73(8) :1049–1061. <https://sci-hub.se/10.1093/jpp/rgab030>
- **Antony, A. et Farid, M. (2022).** Effet des températures sur les polyphénols pendant l'extraction. *Applied Sciences*. 12 (4) :2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- **Arab, K., Bouchenak, O. et Yahiaoui, K. (2015).** Phytochemical Study and Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Phenolic Compounds of *Pistacia Lentiscus L.* *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 6: 77. <https://doi.org/10.4314/jfas.v6i1.7>
- **Ayodele, O.O., Pourianejad, S., Trofe, A., Prokofjevs, A. et Ignatova, T. (2022).** Application of Soxhlet Extractor for Ultra-clean Graphene Transfer. *American Chemical Society Omega*. 7: 7297–7303. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07113>
- **Bashige, C.V., Bakari, A.S., Numbi, I.E., Kalonda, M.E., Okusa, N.P., Kahumba, B.J. et Lumbu, S.J.B. (2018).** Criblage Phytochimique et activité antimicrobienne de sept fleurs comestibles utilisées en médecine traditionnelle à Lubumbashi (RDC). *Journal of Applied Biosciences*. 124: 12455-12467.

Références bibliographiques

- **Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. et Turck, M. (1966).** Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493–496. <https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4 ts.493>
- **Bohui, P.S.G., Adima, A.A., Niamke, F.B. et N'guessan, J.G. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles des plantes médicinales. *Journal of Société Ouest--Africaine de Chimie*. 46 : 50-58.
- **BOURAS, M (2015).** Etude comparative et optimisation de prétraitements des écorces de bois pour l'extraction des composés phénoliques. ” Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Technologie de Compiègne”. PP : 249.
- **Bouyahya, A., Bakri, Y., Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S. et Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*. doi:10.1007/s10298-017-1118-z
- **Brooker, M.I.H. (2000).** A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (*Myrtaceae*). *Australian Systematic Botany*. 13 : 79. <https://doi.org/10.1071/SB98008>
- **Brown, N.M., Goodman, A.L. Horner, C., Jenkins, A. et Brown, E.M. (2021).** Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 76(6):1377-1378 <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa114>
- **Bussmann, R.W. et Glenn, A. (2012).** Traditional knowledge for modern ailments - plants used for the treatment of diabetes and cancer in Northern Peru. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(31):6916-6930.
- **Camel, V. (2000).** Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 19 (4): 229-248.
- **Cheok, C. Y., Salman, H. A. K. ett Sulaiman, R. (2014).** Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59: 16-40. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.057
- **Chuku, A., I. Ogbonna, A., A. Obande, G., Namang, M. et R. Ahmad, I. (2016).** Antimicrobial Effects of Leaves of *Eucalyptus camaldulensis* on Some Microbial Pathogens. *European Journal of Medicinal Plants*. 14(2): 1-8. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/25759>

Références bibliographiques

- **Contreras, G. A., Munita, J. M. et Arias, C. A. (2019).** Novel Strategies for the Management of Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *Current Infectious Disease Reports*. 21(7). doi:10.1007/s11908-019-0680-y.
- **Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016).** Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 19(4) :135–142. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.008
- **Dibert K., Cros E., Andrieu J. (1989).** Solvent Extraction of Oil and Chlorogenic Acid from Green Coffee. *Journal of Food Engineering*. 10, 1-11.
- **Divya, J. (2020).** Appareil Soxhlet : Extraction continue à chaud, collaboration Review : Plantes médicinales et santé humaine. Projet Welfare View, Edition Divya Jain,PP: 147-151 .
- **Doit, C., Mariani-Kurkdjian, P., et Bingen, E. (2010).** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie*. 17: 140-144. doi:10.1016/s0929-693x(10)70915-5
- **Doughari, J.H., El-mahmood, A.M. et Tyoyina, L. (2008).** Antimicrobial activity of leaf extracts of Senna obtusifolia (L). *African journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2(1) : 7-13.
- **Dufour, N. et Debarbieux, L. (2017).** La phagothérapie. *Médecine/sciences*. 33(4) : 410–416. doi:10.1051/medsci/20173304011
- **Ehueny, H., Koné, K., Yao, J., Kouassi, E., Yaya, S. et Sorho, S. (2021).** Modélisation et optimisation avec Scilab de l'extraction de polyphénols de *Tridax procumbens*. *Afrique Science Revue Internationale des Sciences et Technologie*. 19 : 173-188.
- **El Baraka, S. (2019).** L'Eucalyptus : Propriétés botaniques, phytochimiques, pharmacothérapeutiques et usage industriel. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohamed V, Faculté de médecine. Rabat. Maroc. PP : 115.
- **Erau, P. (2019).** L'eucalyptus : botanique, composition chimique, utilisation thérapeutiques et conseil à l'officine. Thèse de doctorat. Pharmacologie, Faculté de pharmacie de Marseille. PP : 225.
- **Erenler, R., Genç, N., Elmastaş, M. et Eminağaoğlu, Ö. (2019).** Evaluation of antioxidant capacity with total phenolic content of *Galanthus krasnovii* (Amaryllidaceae). *Turkish Journal of Biodiversity*. 2 (1): 13-17.

Références bibliographiques

- **Fertout-Mouri, N., Latreche, A., Mehdadi, Z., Benherraz, Z. (2016).** Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium L.* du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 85:253-262.
- **Fontanay, S., Mougenot, M.-E., & Duval, R. E. (2015).** Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*. 2(5):109-118. DOI: 10.4267/2042/56635
- **Ganzler, K., Salgó, A. et Valkó, K. (1986).** Microwave extraction. *Journal of Chromatography A*. 37(1):299-306. doi:10.1016/s0021-9673(01)94714-4
- **Gayet, C. (2013).** Guide de poche de phytothérapie: Acné, Migraine, Ballonnements Soignez-Vous avec les plantes. Editeur Leduc S. Paris, France. Edition Quotidien malin. PP: 13
- **Gbenou, J.D., Ahounou, J.F., Akakpo, H.B., Laleye, A., Yayi, E. et Gbaguidi, F. (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):1127-1134.
- **Gordon, N. C. et Wareham, D. W. (2010).** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35(3): 219-226. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.1
- **Groubert, A. (1984).** Techniques d'extraction végétale. Thèse doctorat en pharmacie. Université de Montpellier I. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques. Montpellier. France.
- **Gullon, B., Lu-chau, T.A., Moreira, M.T., Lema J.M. et Eibes, G. (2017).** Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in food science & technology*. 67: 220-235
- **Hammiche, V. (2014).** Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie*. 13(6): 358–372. doi:10.1007/s10298-014-0910-2
- **Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A. (2009).** Antimicrobial efficacy of eucalyptus Oil and 1,8-cineole alone and =combinationwith chionexidine digluconate againsi microorgan sms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 6(4) :1215-1225.
- **Herzi, N. (2013).** Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. ." Thèse doctorat

Références bibliographiques

en génie des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. France. PP : 185.

- **Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I.M.S. et Aziz, S.N. (2021).** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*. 48(10):6987-6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- **Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M. et McClean, S. (2021).** *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(6) : 3128. doi:10.3390/ijms22063128
- **Kalemba D, et Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*.10: 813-829.
- **Kanchan Bhatt, Devina Vaidya, Manisha Kaushal, Anil Gupta, Pooja Soni, Priyana Arya, Anjali Gautam and Chetna Sharma. (2020).** Microwaves and Radiowaves: In Food Processing and Preservation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(9): 118-131. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.015>
- **Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. et Možina, S.S. (2010).** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 81: 121–126.
- **Klemm, E. J., Wong, V. K. et Dougan, G. (2018).** Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(51): 12872–12877. doi:10.1073/pnas.1717162115
- **Koné, K. Yaya, S. et Sorho, S. (2017).** Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. 44 :15- 22.
- **Kouatchet, A. et Eveillard, M. (2012).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline en réanimation. *Réanimation*. 21(4) : 493–505. doi:10.1007/s13546-012-0497-2
- **Kyao, J.L., Boga, J.P., DAO, H. et Yao, T. (2022).** Bioefficacy of *Eucalyptus citriodora* essential oil in the control of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in chicken farms in Côte d'Ivoire. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 10(1):42-47. DOI: 10.22271/j.ento.2022.v10.i1a.8921

Références bibliographiques

- **Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D. et Tragiannidis, A. (2021).** *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*. 10(3): 373. doi:10.3390/pathogens10030373
- **Landoulsi, A., Roumy, V., Rivière, C., Sahpaz, S., Benhamida, J. et Hennebelle, T. (2018).** Composition chimique et activités pharmacologiques des espèces tunisiennes du genre *Eryngium L.* (Apiaceae). *Open Science*.1-23.
- **Lesens, O. (2009).** L'Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV). *Néphrologie & Thérapeutique*. 5: 261-264. doi:10.1016/s1769-7255(09)74556-0
- **Leybros, J. et Frémeaux, P. (1990).** "Extraction solide-liquide aspects théoriques." *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés*. 2780. (3) : 7-8.
- **Likibi, B.N., Tsiba, G., Madiélé Mabika, A.B., Etou Ossibi, A.W., Nsikabaka, S. et Ouamba, J.M. (2019).** Common chemical profiles of essential oils from eucalyptus citriodora hook. (Myrtaceae) and cymbopogon nardus (l.) rendle (poaceae) of Congo-Brazzaville. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. 9(5): 363-373.
- **Liu, Y., Ding, X.F., Kou, M.J., Chen, J.X., Zou, X.J., Jiang, R.X. et Dai, H. (2016).** Integrated traditional Chinese and Western medicine for menopausal syndrome: metaanalysis of randomized controlled trials. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 13 (1): 157–168.
- **Lupo, A., Haenni, M. et Madec, J.Y. (2018).** Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology Spectrum*. 6(3). doi:10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017
- **Luque de Castro, M.D. et Garcia-Ayuso, L.E. (1998).** Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. 369: 1- 10.
- **Macedo, I.T.F., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Vieira L. da S., Amóra S. et dos S.A. (2011).** Evaluation of Eucalyptus citriodora essential oil on goatgastrointestinalnematodes. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria*. 20(3):223-7.
- **Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. et Monnet, D. L. (2012).** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3): 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Références bibliographiques

- Miguel, M.G., Gago, C., Antunes, M.D., Lagoas, S., Faliero, M.L., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J.I. et Figueiredo, A.C. (2018). Antibacterial, Antioxidant, and Anti proliferative Activities of *Corymbia citriodora* and the Essential Oils of eight Eucalyptus species. *Medicines*. (61):1-12.
- Miller, W. R., Murray, B. E., Rice, L. B. et Arias, C. A. (2020). Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics of North America*. 34(4): 751–771. doi:10.1016/j.idc.2020.08.004
- Oliveira, D.M.P., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L. et Walker, M.J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 33(3):181-191. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.
- Oroian, M., Dranca, F. et Ursachi, F. (2020). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology*. 57(1), 70-78. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>
- Ouelhadj, A., Ait Salem, L. et Djenane, D. (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium x asperum* et son potentiel synergique avec la nisine. *Phytothérapie*. doi:10.1007/s10298-017-1164-6
- Pandey, A. et Tripathi, S. (2014). Concept of Standardization, Extraction and Pre-Phytochemical Screening Strategies for Herbal Drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2 :115-119.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.J. et Cheng, Z. (2018). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 37(1):177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Paré, J.R.J., Sigouin, M. et Lapointe, J., (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*. EP 398798.
- Penchev, P.I. (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.” Thèse doctorat en génie des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. France. PP : 229.
- Ramos Alvarenga, R.F., Wan, B., Inui, T., Franzblau, S.G., Pauli, G.F. et Jaki, B.U. (2014). Airborne anti tuberculosis activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *Journal of natural products*. 77(3):603-10.

Références bibliographiques

- **Reyes, K., Bardossy, A. C. et Zervos, M. (2016).** Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(4): 953–965. doi:10.1016/j.idc.2016.07.009.
- **Riwu, K. H. P., Effendi, M. H. et Rantam, F. A. (2020).** A Review of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Klebsiella pneumoniae* and Multidrug Resistant (MDR) on Companion Animals. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11(7): 270-277. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.7.43>
- **Robert, C. et Moellering, J. (1998).** Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 26(5): 1196–1199. <http://www.jstor.org/stable/4481572>
- **Paniagua-Zambrana, N. Y., Bussmann, R. W., & Romero, C. (2020).** *Eucalyptus citriodora* Hook. *Eucalyptus globulus* Labill. *Myrtaceae*. *Ethnobotany of the Andes*, 1–9. doi:10.1007/978-3-319-77093-2_118-1
- **Schalk, I.J. (2018).** Une stratégie cheval de Troie incluant une action suicide bactérienne pour l'utilisation efficace d'un antibiotique Gram-positif spécifique sur des bactéries Gram-négatives. *Tourillon de chimie médicinale*. 61(9) : 3842–3844. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00522
- **Seidel, V. (2012).** Initial and Bulk Extraction on natural products isolation. *Methods in Molecular Biology*. 864:27-41. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1_2.
- **Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z. et Ercili, S. (2009).** Total phenolic content antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22: 102-106.
- **Silva, V., Gabriel, S. I., Borrego, S. B., Tejedor-Junco, M. T., Manageiro, V., Ferreira, E. et Poeta, P. (2021).** Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages of *Staphylococcus aureus* from Wild Rodents: First Report of mecC-Positive Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) in Portugal. *Animals*. 11(6): 1537. [doi:10.3390/ani11061537](https://doi.org/10.3390/ani11061537)
- **Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017).** Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*. 15(11): 689–696. doi:10.1038/nrmicro.2017.75
- **Su, Y.C., Hsu, K.P., Wang, E.I.C. et Ho, C.L. (2015).** Composition, activités cytotoxiques in vitro et antimicrobiennes de l'huile essentielle de la fleur de *Diospyros discolor* de Taïwan. *Communications sur les produits naturels*. 10 :1311-1314.

Références bibliographiques

- **Suwari, S., Kotta, H. Z. et Buang, Y. (2017).** Optimization of soxhlet extraction and physicochemical analysis of crop oil from seed kernel of Feun Kase (*Thevetia peruviana*). *AIP Conference Proceedings*. 1911(1):020005. doi:10.1063/1.5015998 7.
- **Taguri, T., Tanaka, T. et Kouno, I. (2006).** Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biology Pharmacology Bulletin*. 29 (11): 2226-2235.
- **Takeuchi, T., Pereira, C., Braga, M., Marostica, M., Leal, P. et Meireles, M. (2009).** Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasoundassisted) from condimentary plants. 1st Edition. In: *Extracting bioactive compounds for food products*. Angela M. (ed). Meireles A. CRC Press. Boca Raton. Floride.PP: 137-218
- **Tan, M., Zhou, L., Huang, Y., Hao, X., et Wang, J. (2008).**Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *eucalyptus globulus Labill*. *Natural Product Research*. 22: 569-575.
- **Thabet. L, Frigui S., Mellouli A., Gargouri M., Maamar B., Harzallal I., Boukadida J. et Messadi, A.A. (2021).** Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care burn department in Tunisia. : A 6-YEAR STUDY (2014-2019). *Annals of Burns and Fire Disasters*. 3 (34):245-251.
- **Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y. et Luo, Y. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: *The polarity affects the bioactivities*. *Food Chemistry*. 113: 173-179.
- **Wang, C., Yang, J., Zhao, P., Zhou, Q., Mei, Z., Yang, G., Yang, X. et Feng, Y. (2014).** Chemical constituents from *Eucalyptus citriodora Hook* leaves and their glucose transporter 4 translocation activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24(14): 3096–3099. <https://sci-hub.se/10.1016/j.bmcl.2014.05.014>
- **Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L. et Wang, H. (2020).** The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(17): 6278. doi:10.3390/ijerph17176278
- **Xiao, W., Han, L. et Shi, B. (2008).** Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Flavonoid from *Radix Astragalus* using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*. 43(3): 671-681. doi:10.1080/01496390701812509

Références bibliographiques

- **Zacchaeus, S. (2021).** Health benefits of the fruit essential oil of *Eucalyptus citriodora*: secondary metabolites, radical scavenging antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial potential. *International Journal of Drug Discovery and Technology*. 13(4):

Sites web :

Anonyme 1: www.gbif.org. *Eucalyptus citriodora* Hook. [online] Available at: <https://www.gbif.org/species/3180581>

Anonyme 2 : iNaturalist. Photos of Lemon-scented Gum (*Corymbia citriodora*) · iNaturalist. [online] Available at: https://www.inaturalist.org/taxa/334772-Corymbia-citriodora/browse_photos.



Résumé

RESUME

Ce travail a comme objectif la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des fruits d'*Eucalyptus citriodora* obtenus par les deux techniques d'extraction non conventionnelle (soxhlet et macération) et la technique émergente (l'extraction assistée par micro-ondes), tout en optimisant les paramètres opératoires. La méthode de diffusion sur disques a été adoptée pour déterminer l'activité antimicrobienne vis-à-vis de souches bactériennes à Gram positif et négatif. Tous les extraits ont manifesté un effet inhibiteur remarquable contre le *S. aureus* et *Bacillus sp*, cependant, aucune activité inhibitrice vis-à-vis de *E. coli* et *K. pneumoniae* n'a été observée. Les extraits obtenus par MAE ont donné les meilleurs rendements, aussi bien que de remarquables activités, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 20 mm contre le SARM et *Bacillus sp*. Les paramètres d'extraction les plus efficaces sont : la taille fine (0,5 mm), une puissance de 1000W pendant 90s.

Mots clé : Multi-résistance, Activité antibactérienne, Extraction, SARM, *Eucalyptus citriodora*.

ABSTRACT

The purpose of this work is to demonstrate the antibacterial activity of methanolic extracts of *Eucalyptus citriodora* fruits obtained by the two non-conventional extraction techniques (soxhlet and maceration) and the emerging technique (microwave assisted extraction), while optimizing the operating parameters. The disc diffusion method was adopted to determine the antimicrobial activity towards Gram positive and negative bacterial strains. All extracts showed a significant inhibitory effect against *S. aureus* and *Bacillus sp*, however, no inhibitory activity against *E. coli* and *K. pneumoniae* was observed. The extracts obtained by MAE gave the best yields, and excellent activities, with inhibition zones up to 20 mm against MRSA and *Bacillus sp*. The most effective extraction parameters were: fine size (0.5 mm), 1000W power for 90s.

Key words: Multidrug resistance, Antibacterial activity, Extraction, MRSA, *Eucalyptus citriodora*.