

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*  
*Scientifique*  
*Université A.MIRA-BEJAIA*

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



## **Mémoire de Fin de Cycle**

En vue d'obtention du diplôme

**Master**

*Thème*

---

# **Etude de l'effet des extraits biologiques sur *Mycobacterium tuberculosis***

---

Présenté par :

**BELKADI Yasmine & BOUSAFSAFA Hafida**

soutenu le : **22/06/2023**

Devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> AMIR Nadir	MCA	Président
M <sup>r</sup> DJOUDI Ferhat	MCA	Promoteur
M <sup>me</sup> GHAROUT-SAIT Alima	MCA	Examinatrice

---

*Année Universitaire : 2022/2023*

---

# Remerciement



*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Mr DJOUDI.F d'avoir accepté d'être l'encadreur de notre mémoire de master ainsi qu'un grand et respectueux remerciement pour toutes ses orientations, son temps et son intention qui nous ont permis un bon déroulement de ce travail.*

*De très précieux remerciements vont aux membres du jury pour leur présence nécessaire*

*Mr AMIR d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire*

*Mme GHAROUT d'être l'examinatrice de notre mémoire*

*On vous remercie surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.*

*On n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe de laboratoire, en particulier la doctorante ADDALOU Sonia pour leur aide et soutien moral.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à tous ceux qui nous ont prêté main forte pour la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à tous...*

*Hafida ♥ Yasmine*



## *Dédicace*

*À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*À mon très cher père, Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

*À ma belle-mère Fatima*

*À mes chers frères Farid et Yasser*

*À mes chères sœurs, Hakima, Sylvia et Sarah*

*À Sabrina ainsi qu'à son conjoint Rassem, à mes amours*

*Anes et Arane*

*À Souraia et son époux Nassim*

*Vous êtes une famille en Or, vous êtes ma source de volonté, je vous remercie infiniment pour votre aide, votre encouragement et votre soutiens.*

*À mon cher binôme Mimine, pour notre sincère et profonde amitié qu'on a passé des moments agréables ensemble que je n'oublierais jamais. Je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*À mes meilleures copines chacune à son nom, et surtout Zahra, avec lesquelles j'ai passé les meilleurs moments de ma vie.*

*Enfin, je tiens à rendre hommage à la femme qui m'a porté neuf mois et qui m'a donné la vie avec un amour inconditionnel et éternel que je porterais pour toujours. Paix à ton âme maman chérie..*

*Dida*





## *Dédicace*

*Avec le soin et l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie spécialement à mes très chers parents, aucune dédicace ne saurait être assez expressive pour exprimer ma gratitude pour tous vos sacrifices pour moi*

*Toi ma source de volonté, cher papa, je te dois mes humbles et profonds remerciements pour le sens de persévérance que tu m'as appris tout au long de mes études, ton sacrifice, tes conseils et tes encouragements, que dieu te garde en très bonne santé.*

*À ma belle-mère Ourida*

*À mes très chers sœurs et frères, Faïza, Nadia, Fawzi et Adel  
Ainsi qu'à ma belle-sœur Nesrine*

*Vos conseils, vos encouragements et votre soutien inconditionnel me vont droit au cœur*

*Vous êtes et vous serez à jamais ma plus grande fierté, que Dieu vous garde pour moi.*

*À mes chers neveux, Didine, Yourane, Amine, Adam et Rayane et à ma petite princesse Ania, je vous aime infiniment.*

*À toutes mes cousines et copines surtout, Khalida, Kahina et notre benjamine Chahrazed*

*À ma meilleure amie et mon binôme Dida, je te remercie pour ta bonté, ton amitié et tous les efforts que tu as fournis pour la réalisation de ce travail. Ainsi qu'à notre meilleure amie Zahra avec qui on a passé de très bons moments.*

*Enfin, c'est avec une joie assombrie de tristesse et de regret que tu ne sois pas là en ce jour mémorable, chère maman ; Je tiens à te dédier ce travail avec le quel que tu seras fière de moi l'au-delà que tu es, ton âme et ton amour sont toujours là au fond de mon cœur et je les porterais pour toujours*

*Que ton âme repose en paix, Maman chérie...*

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste les tableaux**

**Introduction ..... 1**

**Chapitre I : synthèse bibliographique**

I. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
I.1. <i>Mycobacterium</i> .....	3
I.1.1. Caractéristiques spécifiques des Mycobactéries .....	3
I.1.2. Habitat .....	3
I.1.3. Classification .....	4
I.2. Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
I.2.1. Caractéristiques de <i>mycobactérium tuberculosis</i> .....	5
I.2.1.1. Caractères morphologiques .....	5
I.2.1.2. Caractères cultureux et biochimiques .....	6
I.2.1.3. Caractères physiopathologiques .....	7
I.2.1.4. Caractères génomique .....	7
II. Tuberculose .....	7
II.1. Historique et Définition .....	7
II.2. Épidémiologie de la tuberculose .....	9
II. 3. Diagnostic de la tuberculose .....	10
III. Traitement antituberculeux .....	11
IV. Résistance de <i>M. tuberculosis</i> aux antibiotiques .....	12
IV.1. Résistance naturelle .....	12
IV.2. Résistance acquise .....	13
IV.3. Mécanismes de résistance .....	13
V. Solutions pour la tuberculose résistante .....	14
V.1. Situation avec chiffres sur la résistance Pour l'Algérie .....	14
V.2. Recherche de nouvelles molécules contre la tuberculose .....	15
V.3. Médecine traditionnelle chinoise MTC .....	15
V.4. Utilisation de la phytothérapie .....	16

**Chapitre II : Matériel et méthode**

I. Objectif et cadre d'étude .....	17
II. Matériel végétal et extraction .....	17
III. Matériel Biologique .....	18
III.1. Mycobactéries .....	18
III.2. Souches bactériennes à Gram positif .....	19

III.3. Souches bactériennes à Gram négatif .....	21
IV. Etude de l'activité antimicrobienne .....	21
IV.1. Préparation des extraits .....	21
IV.2. Test d'activité vis-à-vis des mycobactéries .....	23
IV.3. Activité vis-à-vis des souches à Gram positif .....	24
IV.4. Activité vis-à-vis des souches à Gram négatif .....	26

### Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Activité de l'extrait sur les mycobactéries .....	27
I.1. Suivi de la croissance .....	27
I.2. Détermination de la CMI .....	29
II. Activité antibactérienne d'extrait sur les Gram positif .....	33
II.1. Suivi de croissance .....	33
II.2. Détermination de la CMI .....	33
III. Activité antibactérienne d'extrait sur les Gram négatif .....	36
III.1. Suivi de croissance .....	36
III.2. Détermination de la CMI .....	37

<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>40</b>
---	-----------

### Références bibliographiques

### Annexes

### Résumé

## *Liste d'abréviation*

**MT:** *Mycobacterium tuberculosis*

**Mb:** *Mycobacterium bovis*

**MTBC:** Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

**BK :** Bacille de Koch

**FEC :** Fruit d'Eucalyptus citronné

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**ATB :** Antibiotique

**CMI :** Concentration minimale d'inhibition

**BCG :** Bacille de Calmette et Guérin

**UFC :** Unité formant colonie

**DOTS :** Directly Observed Treatment Sort-course

**VIH :** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**COVID-19:** *Coronavirus* Disease 2019

**PCR:** Polymerase Chain reaction

**SNC :** système nerveux central

**MH :** Mueller Hinton

**LJ :** Lowenstein-Jensen

**T-RR :** Tuberculose résistante à la rifampicine

**TB-MR :** Tuberculose multi résistante

**TB-XDR :** Tuberculose ultra résistante

**HE :** huiles essentiels

**EME :** extrait méthanolique d'eucalyptus

**RIF :** Rifampicine

**EMB :** Ethambutol

**FQ** : Fluoroquinolone

**INH** : Hydrazide de l'acide iso nicotinique

**PZA** : Pyrazinamide

*E. feacalis* : *Enterococcus feacalis*

*S. haemolyticus* : *Staphylococcus haemolyticus*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistance à la méthicilline

*E. coli* : *Escherichia coli*

*A. baumannii* : *Acinetobacter baumannii*

*P.aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

**GC-MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**LC-MS** : La spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide

**RMN** : La Résonance Magnétique Nucléaire

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

# Liste des figures

<b>Figure n° 01</b> : Classification du genre <i>Mycobacterium</i> .....	4
<b>Figure n° 02</b> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> au microscope électronique .....	6
<b>Figure n° 03</b> : Structure d'un granulome tuberculeux .....	9
<b>Figure n° 04</b> : Carte représentative de l'incidence mondiale de la tuberculose en 2018, (pour 100 000 habitants) .....	10
<b>Figure n° 05</b> : le fruit d'eucalyptus .....	17
<b>Figure n° 06</b> : étapes d'extraction par la macération .....	18
<b>Figure n° 07</b> : Les souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>bovis</i> utilisées .....	19
<b>Figure n° 08</b> : préparation des concentrations d'extrait méthanolique dans l'eau distillée .....	22
<b>Figure n°09</b> : préparation des concentrations d'extrait méthanolique dans le bouillon Muller-Hinton .....	23
<b>Figure n°10</b> : différentes étapes pour la réalisation de test d'activité vis-à-vis des mycobactéries .....	24
<b>Figure n°11</b> : Détermination de la CMI d'extrait d'eucalyptus méthanolique sur milieu liquide MH .....	26
<b>Figure n°12</b> : La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. bovis</i> ...	30
<b>Figure n°13</b> : La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur les souches à Gram positif ...	34
<b>Figure n°14</b> : Résultats de CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus montre la différence entre les concentrations faibles et élevés sur les souches à G- .....	37
<b>Figure n°15</b> : La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur les souches à Gram négatif ...	37

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les différences de mycobactéries tuberculeuses .....	<b>5</b>
<b>Tableau II</b> : Souches étudiées et leurs identifications .....	<b>19</b>
<b>Tableau III</b> : Croissance de souches bactériennes à Gram positif sur CHROM-Agar .....	<b>20</b>
<b>Tableau IV</b> : Croissance de souches bactériennes à Gram négatif sur CHROM-Agar .....	<b>21</b>
<b>Tableau V</b> : concentrations finales d'extrait méthanolique dans l'eau distillée .....	<b>22</b>
<b>Tableau VI</b> : concentrations finales d'extrait méthanolique dans le bouillon Muller-Hinton .....	<b>22</b>
<b>Tableau VII</b> : Activité anti-mycobactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique .....	<b>28</b>
<b>Tableau VIII</b> : Activité anti-bactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique sur les Gram positif ( <i>Enterococcus sp</i> , <i>E. feacalis</i> , <i>S. haemolyticus</i> et <i>S. aureus</i> ) .....	<b>33</b>
<b>Tableau IX</b> : Activité anti-bactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique sur les Gram négatif ( <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> et <i>P. aerogenosa</i> ) .....	<b>36</b>

---

# *Introducción*

---

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse due à des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, hautement transmissible et difficilement traitable, ce qui la rend un problème de santé majeur à l'échelle mondiale (Heym, 2007). Le nombre de cas de tuberculose estimé par année s'élève à plus de 9,2 millions, la maladie a été déclarée urgence mondiale depuis 1993 par OMS (WHO, 2014). L'émergence de souches résistantes aux médicaments est l'une des principales raisons contribuant à l'augmentation de l'incidence mondiale de la tuberculose depuis 1980, qui constitue désormais une menace réelle pour le programme de lutte antituberculeuse dans de nombreux pays (Bunalema et al., 2010, Molly et al., 2011). En 2021, plus de 500.000 cas de la tuberculose dans le monde sont dus à des souches multi-résistantes MDR et extrêmement résistantes XDR aux antituberculeux (Banremila et al., 2023). À cet effet il existe un besoin urgent de trouver des agents anti-mycobactérienne alternatifs pour le traitement des microorganismes pathogènes résistants.

De plus, la résistance généralisée des bactéries aux antibiotiques et la facilité de transmission des gènes de résistance aux médicaments entre les différentes espèces bactériennes, y compris la flore commensale et les pathogènes comme les pathogènes d'origine alimentaire (*E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*) cause de centaines de milliers de décès chaque année. Le problème le plus grave est le nombre sans cesse croissant de bactéries résistantes aux antibiotiques couramment utilisés, y compris les médicaments de dernier recours (vancomycine) (Urban-Chmietet al., 2022).

La guérison par les plantes médicinales est aussi ancienne que l'humanité elle-même. Le lien entre l'homme et sa recherche de médicaments dans la nature remonte à un passé lointain, où les débuts de l'utilisation des plantes médicinales étaient instinctifs, comme c'est le cas chez les animaux. La prise de conscience de l'utilisation des plantes médicinales est le résultat de nombreuses années de lutte contre les maladies grâce auxquelles l'homme a appris à rechercher des médicaments dans les écorces, les graines, les fructifications et d'autres parties des plantes (Petrovska, 2012). Les plantes médicinales sont toujours considérées comme des sources importantes et prometteuses de médicaments pour traiter diverses maladies (Belhouala et Benarba, 2021). Etant donné qu'à l'époque il n'y avait pas suffisamment d'informations ni sur les raisons des maladies ni sur quelle plante et comment elle pouvait être utilisée comme remède, tout était basé sur l'expérience. Avec le temps, les raisons de l'utilisation de plantes médicinales spécifiques pour le traitement de certaines maladies ont été découvertes (Petrovska, 2012). La majorité de la population mondiale (87,5 %) utilise la médecine traditionnelle (l'utilisation

des plantes médicinales), cette dernière constitue la première stratégie thérapeutique pour 80% des pays en développement par contre elle connaît un regain d'intérêt dans les pays développés (**Sánchez et al., 2020**).

La valeur médicinale de ces plantes réside dans certaines substances chimiques telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les lignanes, les acides gras, les polyphénols, les quinones, les glycosides, les caroténoïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes les anthraquinones qui produisent une action biologique certaine sur le corps humain (**Edeoga, 2005**).

D'innombrables travaux de recherches ont prouvé que les extraits des plantes possèdent une variété d'effets pharmacologiques tels que des propriétés anti-inflammatoires, vasodilatatrices, antimicrobiennes, anticonvulsives, sédatives, antiplasmodiales, anticancéreuses, antioxydantes, anti-falciformes, antiprolifératives, antipyrétiques et anti-mycobactérienne (**Bongo et al., 2018**).

Dans la présente étude, nous avons choisi l'*Eucalyptus citriodora* qui est une espèce très utilisée dans les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques modernes. Son l'huile essentielle possède un large spectre d'activités biologiques, y compris la toxicité contre une large gamme de microbes (bactéries, champignons et levures), effets antalgique et anti-inflammatoire, activité antioxydante et propriété anti moustique (**Tolba et al., 2015**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de cette plante médicinale et d'étudié pour la première fois l'activité antibactérienne du fruit *Eucalyptus citriodora* ainsi l'utilisation des extraits naturels à la place des antibiotiques pour réduire le problème de la résistance aux médicaments.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer les propriétés anti-mycobactérienne et anti-bactérienne in vitro de l'extraits méthanolique d'*Eucalyptus citriodora* sur les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis sp* et *M. bovis*) et sept (07) souches ; à Gram positif (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus aureus*), et les Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, et *Acinetobacter baumannii*).

A cet effet, notre travail comporte trois (03) parties :

- Une synthèse bibliographique sur *Mycobacterium tuberculosis* et *Eucalyptus citriodora*.
- L'étude expérimentale : qui consiste la préparation des extraits et la réalisation des tests d'activité sur milieu L-J et sur bouillon M-H dans des microplaques.
- Les résultats obtenus, la discussion et une conclusion générale.

---

*Chapitre I*

*Synthèse*

*Bibliographique*

---

## I. *Mycobacterium tuberculosis*

### I.1. *Mycobacterium*

Sur le plan taxonomique, les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*, classe des *Actinobacteria*. La famille des *Mycobacteriaceae* ne comprend qu'un seul genre *Mycobacterium*, qui regroupe plus de 80 espèces. Sur le plan médical, les espèces *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae* et *M. canettii*, regroupées sous l'appellation *Mycobacterium tuberculosis* Complexe (MTBC), constituent les agents de la tuberculose humaine et animale (**Rastogi et al., 2001**). Le genre *Mycobacterium* présente une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcool-résistance, toutefois, cette propriété peut concerner également d'autres bactéries comme certaines Cyanobactéries et quelques *Actinomycètes*, parmi lesquels les *Nocardia* (**Florian, 2019**).

#### I.1.1. Caractéristiques spécifiques des Mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* est défini par 3 critères : (**Vincent et Portaels, 1992 ; Deschaseaux, 2005**).

✓ **L'acido-alcool-résistance**

Cette propriété est liée à la richesse de la paroi bactérienne en lipides et entraîne une imperméabilité aux colorants usuels ainsi qu'une résistance à la décoloration par un traitement acide/alcool. En revanche, la paroi fixe de façon intense les colorants alcalins tels que la fuchsine basique. La coloration de Ziehl-Neelsen, basée sur cette propriété, est utilisée pour la réalisation de l'examen microscopique.

✓ **La composition en acides mycoliques**

Ces acides gras insaturés à longue chaîne carbonée (C60 à C90) sont le support de l'acido-alcool-résistance et constituent un critère taxonomique de choix car leur structure varie selon les espèces bactériennes.

✓ **Le contenu de l'ADN en G/C %**

Le GC% des mycobactéries est compris entre 61 et 71%, à l'exception de *Mycobacterium leprae* dont le GC% est de 54 à 57%. Ce pourcentage élevé explique que les 2brins d'ADN soient fortement liés et impose des conditions techniques particulières lorsqu'il faut rompre les 3 liaisons hydrogènes.

#### I.1.2. Habitat

Les mycobactéries du groupe tuberculeux se rencontrent chez des hôtes animaux tandis que le réservoir de *Mycobacterium leprae* est uniquement humain. Le réservoir de *Mycobacterium tuberculosis* est représenté par l'homme atteint de tuberculose qui peut

contaminer son entourage par les crachats. Les mycobactéries atypiques quant à elles se trouvent dans l'environnement hydro-tellurique et contaminent l'homme de façon indirecte (Deschaseaux, 2005).

**I.1.3. Classification**

Le genre *Mycobacterium* rassemble plus de 80 espèces qui sont réparties en 3 groupes classés, en fonction de leur pouvoir pathogène représentés dans la figure 1 (Mathys, 2010).

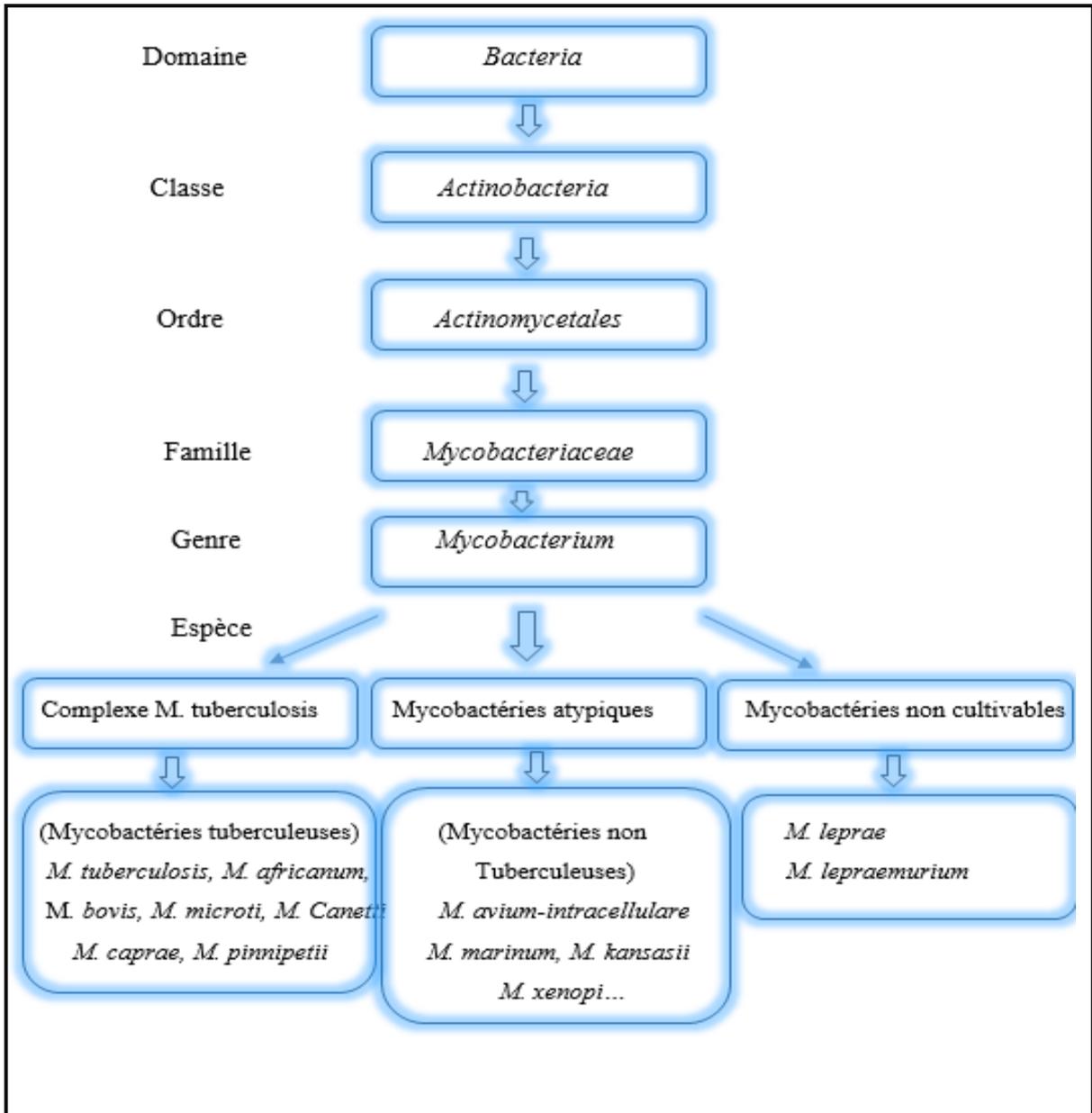


Figure n° 01 : Classification du genre *Mycobacterium* (Mathys, 2010).

## I.2.Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Le complexe tuberculosis regroupe les espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Canetti* et *M. microti*.

- ❖ *Mycobacterium tuberculosis* : dénommé bacille de Koch, est l'agent responsable de la tuberculose humaine. C'est un important pathogène pour l'homme, infectant un tiers de la population mondiale (Botella et al., 2011).
- ❖ *Mycobacterium bovis* : responsable des lésions tuberculeuses pulmonaires et des lésions des glandes mammaires chez les bovins. Il peut être pathogène pour tous les mammifères et également pour l'homme qui se contamine à partir du réservoir animal par inhalation de particules infectées, notamment dans les étables et la consommation de produits contaminés (Domenech, 2006).
- ❖ *Mycobacterium africanum* : est une espèce responsable de tuberculoses humaines, particulièrement en Afrique, mais rarement dans d'autres régions du monde (De Jong et al., 2010).
- ❖ *Mycobacterium microti* : est une espèce très peu pathogène pour l'homme qui infecte les rongeurs et les bovins (Frota et al., 2007).
- ❖ *Mycobacterium Canetti* : retrouvée en Afrique, cependant elle est rarement responsable de tuberculose (Deschaseaux, 2005).

**Tableau I** : Les différences entre mycobactéries tuberculeuses (Gille et Pierson, 2014).

	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<b>Culture (semaines)</b>	2 à 4	5 à 10	6 à 12
<b>Pathogène surtout</b>	Pour l'homme	Pour l'homme	Pour le bovin
<b>Présence</b>	Partout	En Afrique	Partout
<b>Pénétration plutôt</b>	Respiratoire	Respiratoire	Digestive
<b>1er organe cible</b>	Poumon	Poumon	Rein

### I.2.1.Caractéristiques de *mycobactérium tuberculosis*

#### I.2.1.1.Caractères morphologiques

*M. tuberculosis* se présente sous forme d'un fin bâtonnet, de 1 - 10 µm de long et 0,2 - 0,6 µm de large. Les bacilles tuberculeux sont rectilignes ou légèrement incurvés, aérobies ou micro aérophiles, immobiles, non sporulant, capsulées et se présentent en petits amas ou sous forme isolée, intra ou extracellulaire (Figure n° 02).

La croissance de *M. tuberculosis* permet la formation d'éléments bacillaires ou coccoïdes et elle est particulièrement lente, 28-72 jours, avec un temps de génération de 12 à 24h (Désiré, 2013). C'est un germe résistant au froid, à la dessiccation, à l'humidité, aux antiseptiques et détergents. Cependant, elles sont sensibles à la chaleur, lumière et rayons UV (Meyssonnier, 2012).

L'enveloppe mycobactérienne est constituée de trois éléments majeurs : la membrane cytoplasmique (assemblage de lipides associés à des protéines pour former une bicouche lipidique asymétrique) entourée d'une paroi cellulaire riche en lipides et en sucres, elle-même encerclée d'une capsule de polysaccharides, de protéines et d'une faible quantité de lipides. Ainsi, du cytoplasme vers l'extérieur de la bactérie, on distingue : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques (Koumba Yoya, 2010).

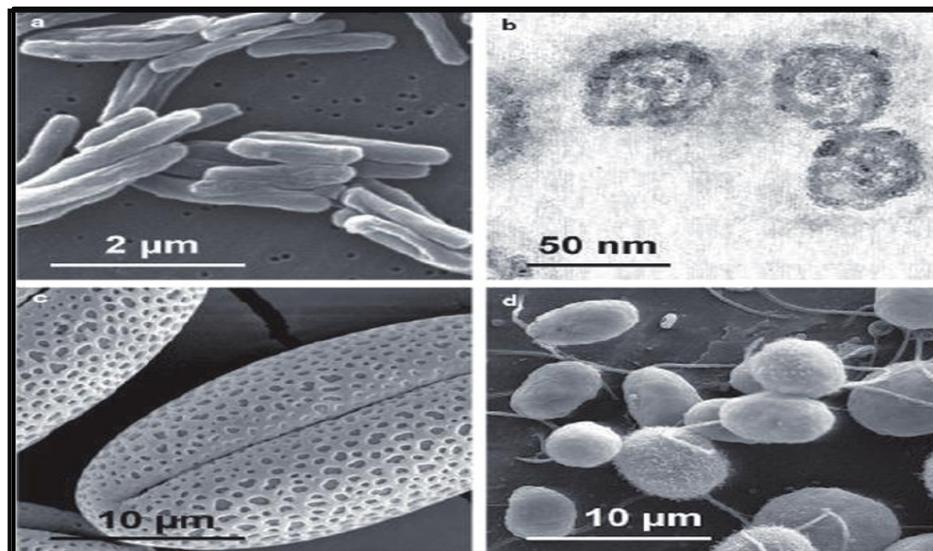


Figure n° 02 : *Mycobacterium tuberculosis* au microscope électronique (Jakob, 2014).

### I.2.1.2 Caractères cultureux et biochimiques

La température optimale de croissance de *M. tuberculosis* est de 35 à 37°C, avec un pH optimal de 6,7 à 6,9. Les colonies sur le milieu de culture solide à base de l'œuf (Lowenstein-Jensen) sont pigmentées, de couleur crème beige en forme de choux fleurs, atteignant jusqu'à 5 à 10 mm de diamètre et sont difficilement dissociable dans l'eau (Pilet et al., 1979).

*M. tuberculosis* est producteur d'une catalase, nitrate réductase, peroxydase et d'une uréase. Au cours de sa croissance il synthétise une quantité importante d'acide nicotinique (niacine), qui peut être mis en évidence par l'épreuve biochimique dite test de KONNO (niacine-test) (Ait Khaled et al., 1999).

**I.2.1.3 Caractères physiopathologiques**

Elle permet de mieux comprendre quels sont les facteurs de risque et pourquoi certaines populations sont plus exposées au risque de tuberculose que d'autres. La virulence de *M. tuberculosis* est liée à sa capacité de survie et de multiplication à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte, en échappant aux défenses immunitaires de ce dernier.

*M. tuberculosis* est toujours pathogène et ne se comporte jamais en saprophyte, il est responsable d'infections pulmonaires et extra-pulmonaires. La multiplication est la plus intense dans des organes oxygénés tel que le poumon, le rein et l'épiphyse osseuse (**Lompo, 2014**).

**I.2.1.4. Caractères génomique**

Le génome de *M. tuberculosis* souche de référence H37Rv a été séquencé et annoté. Le séquençage du génome a montré que le chromosome de *M. tuberculosis* est circulaire et contient 4411529 paires de bases avec un pourcentage en guanine et cytosine d'environ 65,6% et 3924 gènes codant des protéines (**Désiré, 2013**).

**II. Tuberculose****II.1. Historique et Définition**

Le bacille de la tuberculose a existé il y a 15000 à 20000 ans. Il a été découvert sur des reliques d'Égypte antique, d'Inde, et de Chine. Parmi la tuberculose spinale de momies égyptiennes, connue sous le nom de maladie de Pott a été trouvé par des archéologues (**News médical**). En 1865 : Jean Antoine Villemin fournissait les preuves expérimentales de la transmission de la tuberculose entre l'homme et l'animal (bovin, lapin) (**Prof et al., 2004**).

La découverte de l'agent bactérien de la tuberculose par Robert Koch date de 1882, d'où le nom de bacille de Koch ou BK donné au bacille tuberculeux (**Daniel, 2006**) En 1921, Calmette et Guérin mettent au point le BCG, un bacille rendu virulent par repiquages successifs et qui est à la base de la vaccination.

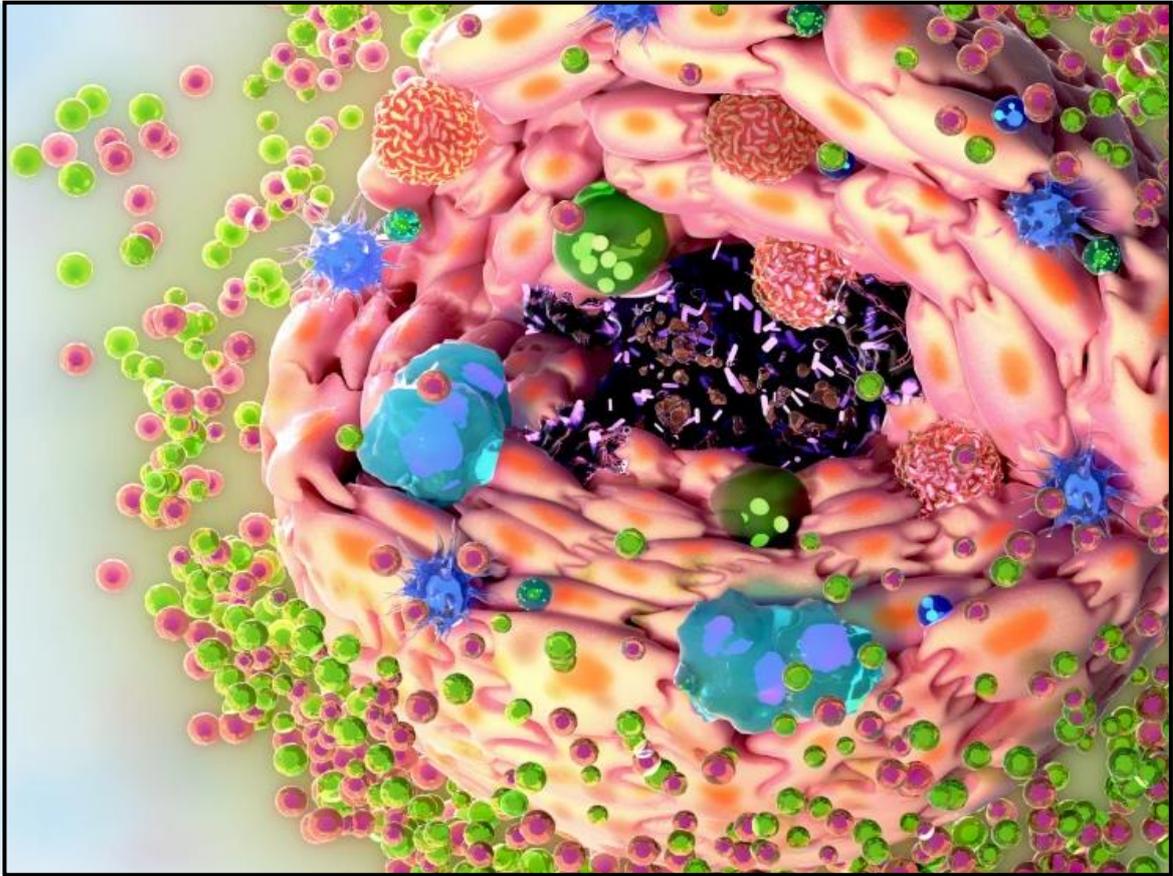
En 1944, Waksman découvre la Streptomycine qui s'avère efficace contre les bacilles tuberculeux. D'autres antibiotiques apparaissent ensuite comme l'Isoniazide en 1952, le Pyrazinamide en 1954, l'Ethambutol en 1962 et surtout la Rifampicine en 1968 Enfin, le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* fut réalisé en 1998 (**Daniel, 2005**).

L'apparition de la Co-infection *M. tuberculosis*/VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), en particulier en Afrique, et de tuberculoses résistantes aux antituberculeux, surtout en Europe de l'Est. L'OMS a mis en place, en 2006, une nouvelle stratégie appelée « Halte à la tuberculose » afin de renforcer le DOTS (Directly Observed Treatment Short-course), et d'apporter des réponses aux problèmes d'accès aux traitements de qualité dans les différentes régions du monde, pour le but d'une diminution de 50% de la prévalence et du nombre de morts par rapport à la situation de 1990.

Un nouveau plan intitulé « Transformer la lutte pour parvenir à l'élimination » a été instauré par l'OMS. En 2010, pour aider à la modernisation des laboratoires de diagnostic et assister la recherche dans la mise au point de tests de dépistage rapides, de schémas thérapeutiques moins longs et d'un vaccin efficace (Cécile, 2012).

La tuberculose, qui est la deuxième plus meurtrière des maladies infectieuses, après la COVID-19. Elle se transmet lorsque les personnes atteintes de tuberculose projettent des bacilles tuberculeux dans l'air, par exemple en toussant. La plupart des personnes qui développent la maladie sont des adultes. En 2021, les hommes représentaient 56,5 % de l'ensemble des cas, les femmes adultes 32,5 % et les enfants 11 %. De nombreux nouveaux cas de tuberculose sont attribuables à cinq facteurs de risque principaux : la dénutrition, une infection par le VIH, des troubles liés à la consommation d'alcool, le tabagisme et le diabète.

La tuberculose est une maladie qui peut être prévenue et guérie. Environ 85 % des personnes qui développent la maladie peuvent être traitées avec succès grâce à un schéma thérapeutique de 4 à 6 mois ; le traitement présente l'avantage supplémentaire de réduire la transmission ultérieure de l'infection (OMS, 2022).



**Figure n° 03 : Structure d'un granulome tuberculeux (Paul, 2023).**

Structure d'un granulome tuberculeux, illustration - stock illustration, Illustration d'un granulome tuberculeux, qui est un agrégat de cellules épitheïoïdes dérivées de macrophages. Il se compose de cellules géantes multi nucléées (grandes cellules bleues), de cellules spumeuses (vertes), de cellules épitheïoïdes (roses) et est entouré de lymphocytes tels que les cellules B et T (petites cellules rondes roses et vertes (Paul, 2023).

## II.2. Épidémiologie de la tuberculose

Selon le rapport sur la tuberculose dans le monde publié en 2022 par L'OMS, on estime que 10,6 millions de personnes ont développé la maladie en 2021, soit une augmentation de 4,5 % par rapport à 2020, et que 1,6 million de personnes sont décédées de la tuberculose (dont 187 000 parmi les personnes séropositives pour le VIH), 450 000 nouveaux cas de tuberculose résistante à la rifampicine (tuberculose-RR) ont été enregistrés en 2021.

Sept pays fortement touchés par la tuberculose dans la Région l'Afrique du Sud, l'Éthiopie, le Kenya, le Lesotho, la Namibie, la République-Unie de Tanzanie et la Zambie, ont atteint ou dépassé le jalon pour 2020, consistant à réduire de 20 % l'incidence de la maladie par rapport à 2015 (OMS, 2022).

En Algérie en 2018, le nombre de cas de tuberculose enregistrés est de 23078 répartir-en :

- **7053 cas de Tuberculose pulmonaire** (30.6%) dont 5750 cas sont des cas de tuberculose contagieuse avec une incidence de 13.8 cas pour 100.000 habitants.
- **16025 cas de Tuberculose Extra-Pulmonaire** (69.4%) avec une incidence de 38.4 cas pour 100.000 habitants dont les trois quarts des cas sont répartis seulement entre deux localisations : ganglionnaire et pleurale. (**Ministère de la santé, 2019**).

En 2021, l'Algérie a enregistré 18.825 cas de tuberculose, dont 5423 cas de tuberculose pulmonaire.



**Figure n° 04 :** Carte représentative de l'incidence mondiale de la tuberculose en 2018, (pour 100 000 habitants) (OMS, 2022).

### II.3. Diagnostic de la tuberculose

Les signes cliniques et radiologiques ne sont pas spécifiques et n'ont qu'une valeur d'orientation. Le diagnostic formel est bactériologique par mise en évidence à l'examen direct et l'identification du bacille tuberculeux à la culture sur milieux spécifiques.

L'identification par la biologie moléculaire par PCR est moins sensible que la culture mais très spécifique. L'anatomie pathologie peut contribuer au diagnostic. Le follicule tuberculoïde fait d'une association de lymphocytes, de cellules épithélioïdes, de cellules géantes, de nécrose caséuse, n'est pas spécifique mais reste un argument diagnostic majeur.

Chez un patient dont le tableau radio clinique est compatible avec une tuberculose, le diagnostic ne peut être écarté devant des examens microbiologiques et anatomopathologiques négatifs (**Dutronic, 2009**).

### **III. Traitement antituberculeux**

En cas de tuberculose le patient doit être isolé, avec ou sans hospitalisation, durant la phase de contagiosité maximale. Elle persiste 1 à 3 semaines après l'initiation du traitement. Ce dernier dépend de plusieurs facteurs : localisation, bactériologie, antécédents de traitements antituberculeux, statut sérologique vis-à-vis du VIH, et suit des protocoles standardisés. Administration quotidienne d'une seule prise orale à jeun d'antibiotiques, Le traitement d'attaque dure 2 mois, suivi d'une phase d'entretien pendant les 4 mois suivants (**Zumla et al., 2013**).

Ce traitement nécessite l'association de plusieurs médicaments antituberculeux essentiels. Elles existent sous la forme de comprimés contenant une triple association (isoniazide + rifampicine + pyrazinamide) ou une double association (isoniazide + rifampicine).

L'isoniazide (H) hydrazide de l'acide iso nicotinique (INH) ; est un médicament antituberculeux majeur bactéricide, actif sur le complexe tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) et indiqué dans la tuberculose en association avec les autres antituberculeux. La principale cible de l'INH est la protéine InhA, une enoyl-ACP réductase appartenant au système d'élongation des acides gras FAS-II impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques (**Compagnon, 2004**).

La rifampicine (R) ; est un antibiotique antituberculeux bactéricide, dérivé semi synthétique de la rifamycine, a pour cible l'ARN polymérase ADN dépendante. Les résistances observées sont dues à des mutations à l'origine d'altérations de la cible (**Mouton et al., 1997**). Il est indiqué en poly thérapie dans le traitement curatif de la tuberculose sous toutes ses formes et en mono ou bithérapie, en chimio prophylaxie (**Limosin, 2004**).

Ethambutol (E) ; inhibe d'une part le transfert des acides mycoliques dans la paroi et entraîne d'autre part l'accumulation de mono et di-mycolates de tréhalose, provoquant des changements du métabolisme lipidique. Il a une activité principalement bactériostatique et agit sur les bacilles intra et extracellulaires en phase de multiplication (**Mouton et al., 1997**).

Streptomycine (S) ; à une action bactériostatique et bactéricide par fixation sur les unités 30S des ribosomes bactériens, provoquant des erreurs de lecture du code génétique et l'élaboration de protéines non fonctionnelles, Il n'est plus très utilisé en première intention à cause de sa toxicité et du taux élevé de résistances primaires et secondaires ; il reste cependant très utile en tant qu'antibiotique relais. C'est le premier antibiotique

antituberculeux utilisé, il a permis de lutter efficacement contre les méningites tuberculeuses (Mouton *et al.*, 1997).

Il existe d'autres antituberculeux de seconde intention comme par exemple les fluoroquinolone (la lévofloxacine et la moxifloxacine), leur utilisation reste limitée notamment aux cas de tuberculose résistants aux principaux antituberculeux.

En plus de ces médicaments de traitement standard. Il existe également d'autres médicaments de réserves, ces médicaments sont moins actifs, et généralement plus toxiques que les médicaments essentiels. Les médicaments de réserve en Algérie sont au nombre de quatre : éthionamide (ET), ofloxacine (O), kanamycine (K), cyclosérine (C), ce sont des antituberculeux injectables de deuxième intention, comme (amikacine et capréomycine), réservés au traitement des cas chronique, définis comme échecs ou rechutes d'un traitement de deuxième ligne, qui sont souvent des cas de tuberculose à bacilles multi résistants. Ils sont commandés exclusivement par les médecins des services de pneumo-phthisiologie des CHU (PNLCT, 2011).

#### IV. Résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques

L'apparition de souches résistantes date des années 1990, et la première utilisation du terme MDR-TB (*multidrug resistant tuberculosis*) en 1992 (Dooley SW *et al.*, 1992). À cette époque, un rapport du CDC (*Center for Disease Control*) d'Atlanta à essayer de faire un recensement des cas de résistance aux États-Unis, de leurs causes et de leurs modalités, et de mesurer le défi qu'ils posent en termes de santé publique (Villarino ME *et al.*, 1992). L'étude porte sur les deux médicaments de première intention les plus efficaces, l'isoniazide (H) et la rifampicine (R). Les auteurs notent qu'au début de 1991 les causes sont toujours les mêmes : traitement mal suivi ou mal prescrit, retard au diagnostic par les médecins traitants. Deux origines possibles de cette résistance étaient envisagées : résistance acquise chez le malade, ou contamination par un bacille déjà résistant (Dominique, 2007).

##### IV.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux (isoniazide, pyrazinamide, éthambutol) est rare, et la sélection de souches résistantes aux médicaments résulte presque toujours de traitements inadéquats. Les bactéries du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistantes à d'autres Antibiotiques non tuberculeux, tel que les  $\beta$ -lactamines, macrolides, cyclines, sulfamides et glycopeptides (Veziris *et al.*, 2005). Cette multi résistance naturelle est dû à la richesse de la paroi en acides mycoliques, la synthèse d'enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines et modifiant les aminosides de type

aminoglycosyl-transférase, et la réduction de l'affinité pour les quinolones (Jarlieret *al.*, 1994).

#### IV.2. Résistance acquise

On sait que les mutations sont aléatoires et spontanées dans le chromosome bactérien, se produisant à un rythme lent, mais constant, ne sont pas transférable d'une souche à l'autre, car aucun élément génétique mobile (transposons, intégrons, plasmides...etc.) n'a été décrit dans un mécanisme de résistance chez ce pathogène. Pour les souches résistantes à plusieurs antibiotiques, chaque résistance est acquise indépendamment de l'autre, le plus souvent de façon successive en fonction des antibiotiques utilisés pour le traitement. Ces mutations ont lieu soit dans les gènes de structure de la cible de l'antibiotique, ce qui entraîne une diminution de l'affinité de la cible pour ce dernier (rifampicine, fluoroquinolone, aminosides, éthambutol), soit dans le gène codant une enzyme dite activatrice, car transformant l'antibiotique en une substance active (isoniazide, pyrazinamide) (Robert *et al.*, 2007). Plusieurs définitions sont actuellement utilisées pour décrire la résistance chez *M. tuberculosis* :

- La mono résistance décrit la résistance à une seule molécule antituberculeuse est confirmée (OMS, 2022).
- La tuberculose à bacilles multi résistants TB-MDR (pour tuberculosis multi Drug résistance) : se caractérise par la présence de souches de bacilles tuberculeux résistants aux 2 antibiotiques principaux, utilisés en première ligne, que sont la rifampicine et l'isoniazide (Ilboudo, 2013).
- La tuberculose ultrarésistante TB-XDR et TB pré-XDR (tuberculosis extensively Drug résistant) : est une forme de tuberculose résistante à au moins quatre antituberculeux de base. La tuberculose UR est résistante aux deux antituberculeux les plus puissants – l'isoniazide et la rifampicine et à n'importe quelle fluoroquinolone (par exemple, la lévofloxacine ou la moxifloxacine) et à au moins un des trois antituberculeux injectables de deuxième intention (amikacine, capréomycine ou kanamycine) (OMS, 2022).

#### IV.3. Mécanismes de résistance

Lorsque le traitement antituberculeux est mal prescrit ou mal suivi par le malade, il peut entraîner la sélection de mutants résistants (résistance secondaire ou acquise), cause majeure d'échec thérapeutique. Un patient tuberculeux porteur d'une souche devenue

résistante peut contaminer son entourage, qui peut alors développer une tuberculose à bacilles d'emblée résistants.

Contrairement aux autres bactéries pathogènes, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions. Par conséquent, la résistance n'est pas transférable entre les mycobactéries présentes chez un même patient, mais elle se transmet à toute la descendance. Jusqu'à présent, les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques ont été mises en évidence : (Mathys, 2009).

- Dans les gènes codant les protéines ciblent de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique (RIF, EMB, FQ,)
- Dans un gène codant une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme promédicament à la forme active (INH, PZA,)
- Dans une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique.

## **V. Solutions pour la tuberculose résistante**

### **V.1. Situation avec chiffres sur la résistance en l'Algérie**

L'Algérie a enregistré près de 26 000 cas de TB en 2019, avec 61 (46–77) cas par 100 000 habitants. Les proportions estimées de tuberculose multirésistante sont respectivement de 2,8 % et 21 % pour les nouveaux cas et les cas déjà traités. La dernière étude de (Banremila et al., 2023) rapporte 25,6 % d'isolats résistants à au moins 1 médicament, dont 10 MDR et 4 pré-XDR.

### **V.2. La recherche de nouvelles molécules contre la tuberculose**

Déverses études ont montrés qu'il existe de nouvelle molécules, qui peuvent être la solution pour la TB résistante.

Des chercheurs ont étudié les propriétés antifongiques, antibactériennes, antimycobactériennes, de l'extrait méthanolique d'*entada abyssinica steudel*, sur les souches de mycobactéries. L'extrait a montré une forte activité contre certaines souches de mycobactéries en particulier *M. tuberculosis* et une activité antibactérienne contre plusieurs souches. Les données suggèrent que l'extrait méthanolique d'*entada* pourrait être une riche source d'agent anti-mycobactérienne (Richard, 2010).

La bedaquiline et le delamanid ont montré leur efficacité contre placebo dans des essais de traitement de la tuberculose multirésistante. Le PA-824 combiné à la moxifloxacine et au pyrazinamide est aussi efficace que le traitement standard actuel durant Les 14 premiers jours. Les autres molécules bien que moins avancées ont montré des résultats prometteurs à un stade préclinique et permettent d'envisager un traitement sans isoniazide ni rifampicine plus court que le traitement actuel (**Vezeris, 2013**).

Une recherche a été faite par Bongo et *al.*, sur les feuilles de *terminalia ivorensis*, *carapa procera*, *fagara macrophylla*, *anacardium occidentale*, *ficus spp* et *depanoalpha*<sup>®</sup>, qui ont été extraits avec l'éther de pétrole, de l'acétate d'éthyle, et du méthanol afin de cribler les composés bioactifs potentiels dans différents extraits et d'évaluer leur activité anti-mycobactérienne contre *M. tuberculosis spp* et H37Rv. Il a été montré que seul l'extrait méthanolique présentait une bonne activité sur les deux souches que les autres, la présence de composés phytochimique dans les plantes tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les anthocyanes, et les quinones connus pour leur importance médicale à mise en évidence une source possible d'agents anti-mycobactérienne pour résoudre le problème de TB-MDR et de TB-XDR aux médicaments (**Bongo et al., 2017**).

Une étude démontre la synthèse de certains nouveaux composés de benzohydrazide, comme l'ont révélé les données susmentionnées, 4-Hydroxybenzhydrazides ont exercé une forte interaction avec la thioestérase de la polykétide synthase (5V3Y), il pourrait exercer son rôle vital en tant qu'agent antituberculeux par inhibition de l'activité thioestérase de l'enzyme polykétide synthase Pks13 (**Nilam, 2021**).

Une nouvelle molécule appelé TB-Killer a été le résultat d'une recherche intensive menée par des chercheurs en France, TB-killer agit en liant à un site spécifique sur l'enzyme TBK1, ce dernier implique dans la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire, TB-killer empêche le TBK1 de se lier à ses substrats naturels cela conduit à une inhibition de l'activité de TBK1 et induire sa dégradation. TB-killer bloque l'activité de l'ATP synthétase, et empêche la bactérie de se multiplier, ce qui la rendre incapable de se reproduire, ainsi cause des dommages aux tissus pulmonaires, comme il peut la tuer complètement, de plus TB-killer déclenche une réponse immunitaire (**Kestler et al., 2022**).

### V.3.Médecine traditionnelle chinoise MTC

En Chine, il semble que la Médecine traditionnelle chinoise (MTC) et ses techniques soient utilisées avec un certain succès pour traiter la tuberculose. C'est également le cas en Occident pour la clientèle d'origine asiatique, Mais pour la clientèle occidentale, les praticiens en MTC ne prétendent généralement pas pouvoir soigner cette maladie. Ils ont le

recours plus volontiers comme thérapie d'appoint pour diminuer les symptômes associés à la maladie et aider à composer avec les antibiotiques (Jacques, 2021). Dans leurs pratiques thérapeutiques, on peut regrouper le toucher sous trois formes : les massages tel que le *tui na* (pousser saisir) et le *dian xue* (massage par pression des points d'acupuncture dont la forme japonaise est le *shiatsu*), les techniques de visualisation (Technique de *qigong* c'est un procédé mental, dans lequel l'adepte fait circuler le souffle à l'aide de la pensée créatrice et de la respiration), l'acupuncture et la moxibustion souvent utilisée en complément de l'acupuncture (Guilloux, 2008).

#### **V.4. Utilisation de la phytothérapie**

Bien que de nombreux produits naturels soient efficaces pour renforcer le système immunitaire, tels que Echinaforce, Bio-Strath, L'Ortie, Molkosan, et le Chardon Marie et qu'ils soient utilisés par des tuberculeux à cet effet, une personne atteinte de cette maladie ne peut probablement recourir aux produits naturels que comme adjuvants aux médicaments. Car il est impératif de détruire les bactéries en cause sans tarder. Malheureusement, les propriétés antimicrobiennes des plantes sont généralement moins puissantes que celles des antibiotiques.

Parmi la cinquantaine de produits utilisés plus ou moins couramment par des personnes atteintes de tuberculose, aucun n'est appuyé par des études scientifiques. Il existe un usage traditionnel par certains produits naturels dans les cas de tuberculose, comme « l'eucalyptus, l'aunée, le lierre terrestre ou le plantain ».

L'OMS indique que la réglisse fait partie des pharmacopées traditionnelles pour soigner la tuberculose. Plusieurs commissions reconnaissent l'usage de la réglisse pour traiter les inflammations du système respiratoire, mais sans mentionner précisément la tuberculose (Jacques, 2021).

---

*Chapitre II*

*Matériel*

*Et*

*Méthodes*

---

## I. Objectif et cadre d'étude

Cette étude a été réalisée au cours de la période du 16 mars au 15 mai 2023, au niveau de laboratoire d'Ecologie Microbienne, faculté SNV de l'université Abderrahmane Mira Targa Ouzmour, wilaya de Bejaia. Son principal objectif consiste à évaluer l'activité anti-mycobactérienne (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) de l'extrait méthanolique d'Eucalyptus, ainsi son activité anti-bactérienne vis-à-vis des autres pathogènes fréquemment rencontrés, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et *Escherichia coli*.

Le matériel du laboratoire utilisé, les produits chimiques et les milieux de culture sont présentés en détail en annexe (Annexe n°01).

## II. Matériel végétal et extraction

La matière végétale utilisée est le fruit d'*Eucalyptus citriodora* (**Figure n° 05**). Les fruits de cet arbre ont été récoltés au niveau parc national du Gouraya, de la ville de Bejaïa. Les plantes ont été sélectionnées et identifiées par un botaniste du parc, qu'il a échantillonné 05 arbres différents selon la hauteur et l'angle d'ensoleillement.

Juste après la collecte, les fruits ont été broyées après les avoir séchés à 80°C pendant 40 min jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, ces derniers ont été conservés dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure n° 05** : le fruit d'eucalyptus.

Les fruits récoltés ont fait l'objet d'extraction méthanolique par la méthode de macération. Cette extraction a été réalisée conformément aux recommandations de **Kouwelton et ses collègues (2017)**, en respectant les paramètres suivants :

- La taille des particules (0.5 à 2 mm).
- Le temps d'extraction : 24 à 96 minutes.
- Le pourcentage (%) de méthanol : 50 à 90%.
- Le ratio 5 à 10 ml/g.
- L'agitation : 500,1600 rpm.

La récolte (guidée par le botaniste du parc) et l'extraction ont été réalisées, auparavant, par l'équipe 4 du laboratoire de recherche en Ecologie Microbienne.

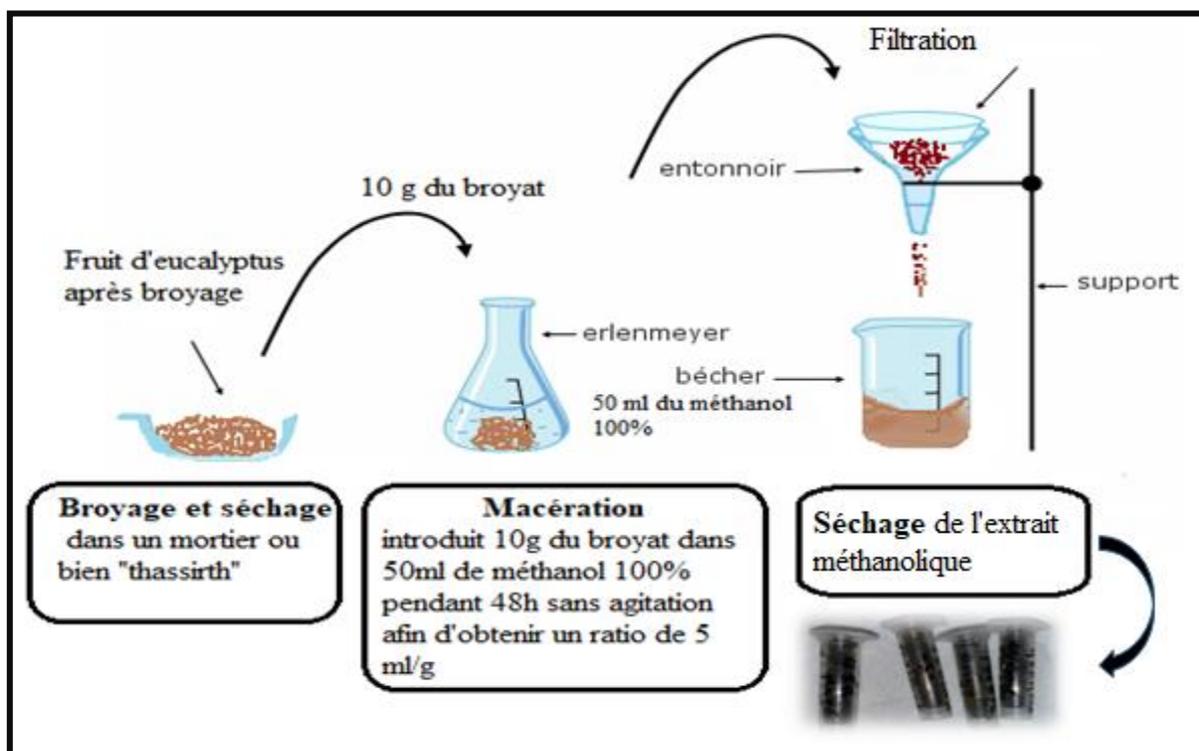


Figure n° 06 : étapes d'extraction par la macération.

### III. Matériel Biologique

#### III.1. Les mycobactéries

Des souches de *Mycobacterium tuberculosis*(2) et *M. bovis* (2) ont été étudiées, identifiées et conservées au niveau du laboratoire de recherche d'Ecologie Microbienne. Ces dernières ont été cultivées sur le milieu de culture Lowenstein-Jensen, et identifiées comme suit (**Tableau II**).

Tableau II : Souches étudiées et leurs identifications.

Numéro de la souche	L'espèce	L'identification
01	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTR1
02	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTR2
03	<i>Mycobacterium bovis</i>	B3
04	<i>Mycobacterium bovis</i>	B18

Figure n° 07 : Les souches de *Mycobacterium tuberculosis* et *bovis* utilisées.

### III.2. Les souches bactériennes à Gram positif

Les souches bactériennes utilisées sont ; *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus*, et *Staphylococcus aureus*. Toutes ses souches ont été obtenues au niveau de laboratoire de recherche d'Ecologie Microbienne déjà conservées dans des cryotubes à une température de -20 C°.

Les souches ont été repiquées sur le milieu chromogène CHROM-Agar orientation, qui permet une identification selon la couleur des colonies.

- A l'aide d'ose en plastique, prélever à partir du tube de conservation par pique centrale
- Ensemencer une boîte de Pétri contenant le milieu CHROM-Agar orientation, par la méthode des quadrants pour obtenir des colonies bien isolées.
- Incubées les biotes à 37°C pendant 24h.

L'identification des souches est basée sur la couleur des colonies, conformément aux orientations du producteur (**Tableau III**).

Tableau III : Croissance de souches bactériennes à Gram positif sur CHROM-Agar.

La souche	Croissance à 37°C	Couleur des colonies	Aspect es colonies
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bonne	colonies de petite taille, bleu-vert à bleues.	
<i>Enterococcus sp</i>	Bonne	Colonies bleu turquoise.	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Bonne	Colonies de petite taille Orange à rouge.	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bonne	Colonies doré opaque petites.	

III.3. Les souches bactériennes à Gram négatif

Les souches bactériennes à Gram négatif qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne des extraits d'Eucalyptus sont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii*. Elles proviennent également de la collection de souches du laboratoire de recherche d'Ecologie Microbienne.

Comme précédemment, le repiquage et l'identification de ces souches a été réalisé sur le milieu CHROM-Agar pour avoir des colonies fraîches à testés (Tableau IV).

Tableau IV : Croissance de souches bactériennes à Gram négatif sur CHROM-Agar.

La souche	Croissance à 37°C	Couleur des colonies	Aspect es colonies
<i>Escherichia coli</i>	Bonne	Colonies petites rose foncé a rougeâtre.	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bonne	Colonies bombées brillantes, légèrement jaunâtres et parfois muqueuses.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bonne	Colonies plates, à bord irrégulier et prenant un aspect irisé métallique avec le temps. Un pigment vert brillant.	

IV. Etude de l'activité antimicrobienne

IV.1. Préparation des extraits

Pour les tests d'activité vis-à-vis des mycobactéries, des concentrations finales dans l'eau distillée ont été fixées comme suit : 0,1mg/ml, 0,2 mg/ml ; 0,4mg/ml ; 0,8mg/ml ; 1,6mg/ml ; 3,2mg/ml ; 6,4mg/ml ; 12,8mg/ml et 25,6mg/ml. Pour cela, les quantités nécessaires d'extrait méthanolique ont été dissoutes dans 5 ml d'eau distillée (Tableau V), bien mélangé et passé au vortex et conservé à 4°C pour l'utilisation ultérieure.

**Tableau V** : concentrations finales d'extrait méthanolique dans l'eau distillée.

Quantité d'extrait (mg)	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
Volume eau distillée (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>3,2</b>	<b>6,4</b>	<b>12,8</b>	<b>25,6</b>



**Figure n° 08** : préparation des concentrations d'extrait méthanolique dans l'eau distillée.

Pour les tests d'activité vis-à-vis des pathogène à Gram positif et négatif, les mêmes concentrations finales ont été préparées, mais dans un bouillon Muller-Hinton à la place de l'eau distillée : Pour cela, les quantités nécessaires d'extrait méthanolique ont été dissoutes dans 50 ml de bouillon Muller-Hinton (**Tableau VI**), bien mélangé et passé au vortex et conservée à 4°C pour l'utilisation ultérieure.

**Tableau VI** : concentrations finales d'extrait méthanolique dans le bouillon Muller-Hinton.

Quantité d'extrait (mg)	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
Volume eau distillée (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>3,2</b>	<b>6,4</b>	<b>12,8</b>	<b>25,6</b>



**Figure n°09** : préparation des concentrations d'extrait méthanolique dans le bouillon Muller-Hinton.

#### IV.2. Test d'activité vis-à-vis des mycobactéries

Ce test consiste à évaluer l'activité de l'extrait méthanolique sur les souches des mycobactéries (*M. tuberculosis* et *M. bovis*). A cet effet, le milieu de culture Lowenstein-Jensen (L-J) a été préparé, selon les recommandations du fournisseur. Ensuite, les solutions de l'extrait méthanolique préparées précédemment dans l'eau distillée ont été filtrées par filtre seringue à 0,45  $\mu\text{m}$  et ajoutées au milieu de culture juste avant la coagulation en position incliné au bain-marie à 85°C pendant 45 minutes dans des tubes à essai, 7 ml dans chaque tube (**Bongo et al., 2017**). Dans des conditions strictement stériles, les souches mycobactéries (MTR1, MTR2, B3 et B18) ont été repiquées sur le milieu LJ contenant l'extrait méthanolique par la méthode des stries. Deux tubes ont été utilisés pour chaque concentration, Incuber les tubes à 37°C en position horizontale dans une étuve pendant 08 semaines (**Figure n°10**).



**Figure n°10** : différentes étapes pour la réalisation de test d'activité vis-à-vis des mycobactéries.

### IV.3. Activité vis-à-vis des souches à Gram positif

Le test étudié nécessite la détermination de la CMI (concentration minimale d'antimicrobiens inhibant la croissance d'un micro-organisme). La détermination de la CMI consiste à utiliser une méthode de micro-titrage standard en effectuant une double dilution sérielle du candidat (extrait) composé dans un milieu de croissance liquide (MH) dans une microplaque, puis en inoculant chaque puits avec une quantité prédéfinie de bactéries. Les microplaques peuvent ensuite être incubées et évaluées en termes de croissance bactérienne en utilisant un lecteur de microplaque afin d'identifier la concentration efficace la plus basse du composé (Morel, 2017).

Ce test consiste à évaluer l'activité de l'extrait méthanolique sur les souches bactériennes à Gram positif (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus aureus*). A cet effet, le milieu de culture bouillon Muller-

Hinton a été préparé, selon les recommandations du fournisseur. Pour réaliser ce test suivant le protocole de Vanegas et ses collègues avec quelques modifications (Vanegas et al., 2021), il est indispensable de :

- Préparer les suspensions bactériennes ; à partir des souches fraîches qui ont été repiquées sur le milieu CHROMagar, prélever à l'aide des anses de platine quelques colonies à faire homogénéiser sur 5ml d'eau physiologique pour chaque souche.
- Préparer 09 microplaques d'un volume de 300µL chaque puits, chacune pour une différente concentration d'eucalyptus préparés dans le bouillon MH (0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 0.8mg/ml, 1.6mg/ml, 3.2mg/ml, 6.4mg/ml, 12.8mg/ml et 25.6mg/ml) respectivement.
- Identifier les microplaques verticalement par T, S1, S2, S3 et S4.  
T : Témoin positif (avec souche bactérienne, sans extrait)  
S1: *Enterococcus sp.*  
S2: *Enterococcus faecalis.*  
S3: *Staphylococcus haemolyticus*  
S4 : *Staphylococcus aureus.*

Et horizontalement par -1, -2, -3, -4, -5, et -6 respectivement des dilutions  $10^6$  UFC/ml,  $10^5$  UFC/ml,  $10^4$  UFC/ml,  $10^3$  UFC/ml,  $10^2$  UFC/ml et 10 UFC/ml.

- Mettre dans chaque puits un volume de 270µl du bouillon MH déjà additionné d'extrait méthanolique, en ordre de chaque concentration dans une microplaque.
- Ajouter un volume de 30µl de chaque suspension bactérienne dans la première ligne verticale des microplaques (S1, S2, S3 et S4) ce qui donne  $10^6$  UFC/ml.
- Pipeter le mélange à l'aide de micropipette, en diluant horizontalement avec un volume de 30µL jusqu'à la dilution -6 ou à 10 UFC/ml.
- Incuber les microplaques à 37°C pendant 24h.

IV.4. Activité vis-à-vis des souches à Gram négatif

Ce test consiste à évaluer l'activité de l'extrait méthanolique sur les souches bactériennes à Gram négatif, (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii*), utilisant le même milieu de culture bouillon Muller-Hinton, et les mêmes étapes utilisées précédemment pour les souches à Gram positif.

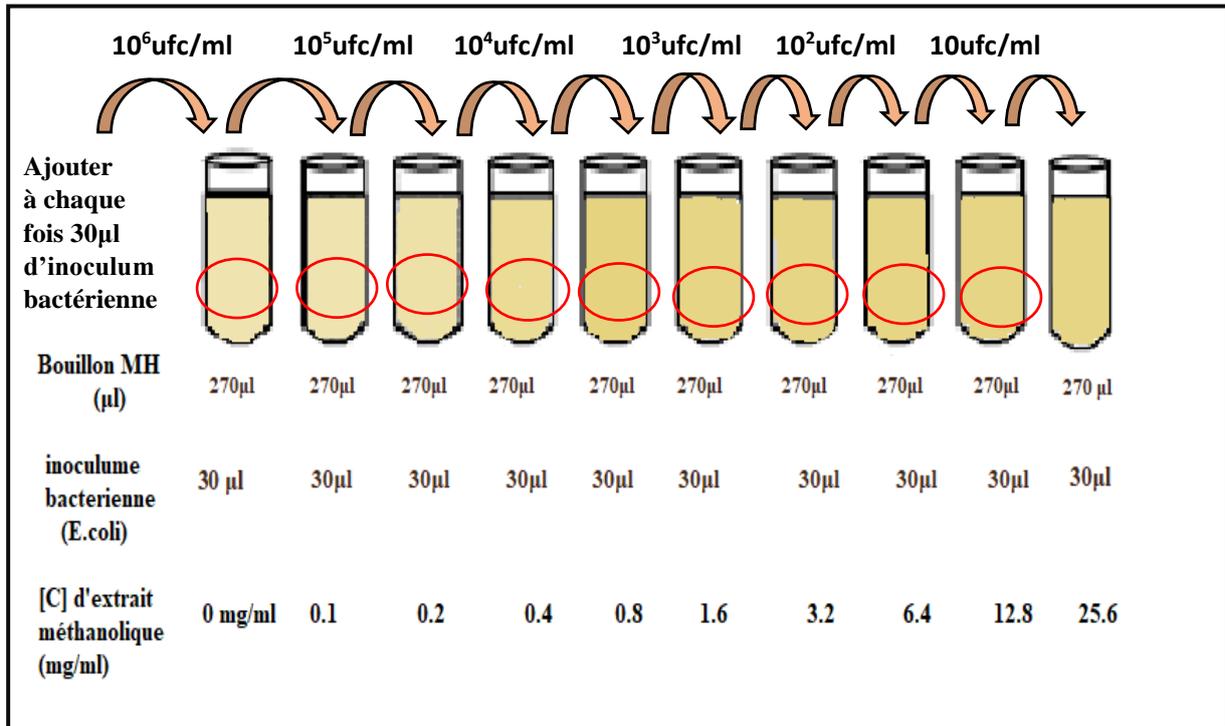


Figure n°11 : Détermination de la CMI d'extrait d'eucalyptus méthanolique sur milieu liquide MH.

---

*Chapitre III*

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

---

## **I. Activité de l'extrait sur les mycobactéries**

### **I.1. Suivi de la croissance**

Dans cette étude, effectuée au niveau de laboratoire de recherche Ecologie Microbienne de l'université de Bejaia, les résultats de l'activité anti-mycobactérienne de l'extrait méthanolique d'Eucalyptus sur 02 souches de *M. tuberculosis* et 02 souches de *M. bovis* sont présentés dans le Tableau VII. A noter que l'interprétation de ces résultats a été entamée dès le début de la 3<sup>ème</sup> semaine, en respectant les mesures suivantes :

Le temps de division de *M. tuberculosis* étant de 20h en moyenne, les cultures ne seront positives qu'après au moins trois semaines d'incubation à 37°C pour les milieux solides. Sur le milieu Lowenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* ont l'aspect suivant :

- De teinte crème-beige.
- Sèches.
- À surface rugueuse.
- En chou-fleur.

Cependant, *M. bovis* pousse en 45 à 60 jours sur milieux enrichis type Lowenstein-Jensen donnant des colonies lisses homogènes, translucides (permettant le passage de la lumière).

Tableau VII : Activité anti-mycobactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique.

Concentrations d'extrait	Témoïn		0,1mg/ml		0,2mg/ml		0,4mg/ml		0,8mg/ml		1,6mg/ml		3,2mg/ml		6,4mg/ml		12,8mg/ml		25,6mg/ml	
	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02	T01	T02
<b>Semaine n°03</b>																				
S1 : MTR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Semaine n°04</b>																				
S1 : MTR1	+	+	±	±	+	±	+	+	±	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	+	±	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	±	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Semaine n°05</b>																				
S1 : MTR1	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Semaine n°06</b>																				
S1 : MTR1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	-	-	-	-	-
<b>Semaine n°07</b>																				
S1 : MTR1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
<b>Semaine n°08</b>																				
S1 : MTR1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
S2 : MTR2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
S3 : B3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
S4 : B18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

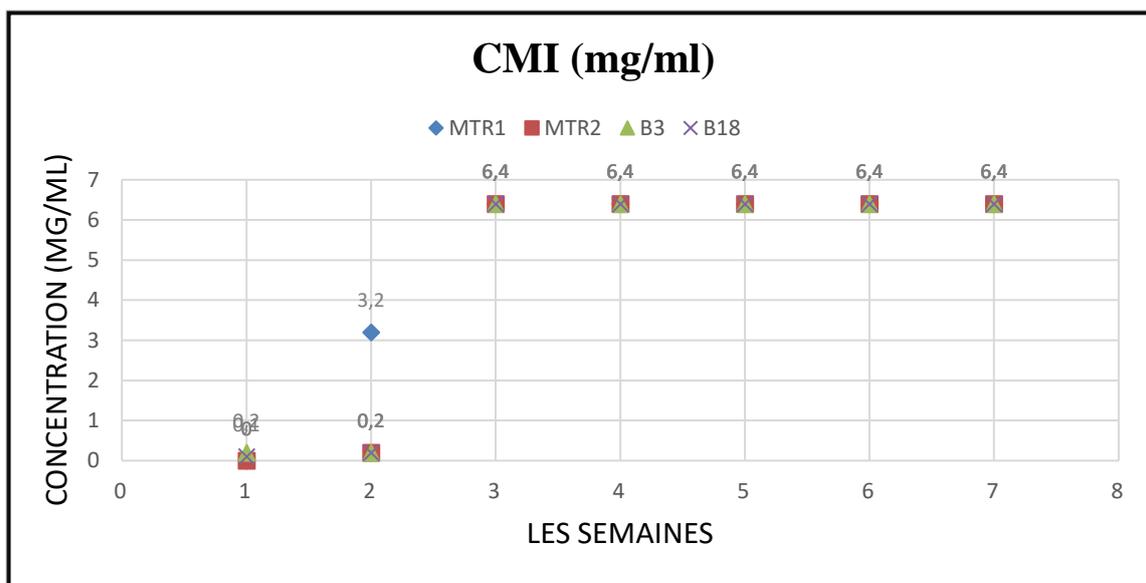
(-) : Absence de colonies (croissance nulle) ; (±) : Une croissance modérée ; (+) : Présence des colonies (croissance) ; (++) : Présence des colonies (croissance remarquable élevée) ; (+++) : Présence des colonies (croissance remarquable très élevée) ; (T) : tube.

Les tubes cultivés ont été examinés visuellement en comparaison aux tubes témoins qui ont été considérés positifs ou une source de croissance dont des colonies doivent être clairement apparente. Toutes les expériences ont été réalisées en double exemplaire (2 tubes pour chaque concentration).

Nous avons remarqué une faible croissance (croissance modérée) à la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine pour les concentrations basses et une croissance nulle pour les concentrations élevés d'extrait méthanolique, causée par le temps de génération extrêmement long de *M. tuberculosis* et *M. bovis*. Puis à la 5<sup>ème</sup> semaine on voit clairement des colonies bien visibles, croissance remarquable très élevée pour les *M. tuberculosis* (MTR1, MTR2) et *M. bovis* (B3, B18), à des concentrations basses d'extrait méthanolique d'eucalyptus (0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,8mg/ml, 1,6mg/ml). La croissance de ses souches a été ralentie à partir de 3,2mg/ml jusqu'à l'absence complète de colonies (croissance nulle) à des concentrations élevées d'extrait méthanoïque d'eucalyptus (6,4mg/ml, 12,8mg/ml, 25,6mg/ml), ce qui montre la capacité de cet extrait à inhiber la croissance de *M. tuberculosis* (MTR1, MTR2) et *M. bovis* (B3, B18). L'effet de l'extrait méthanolique d'eucalyptus commence à apparaître à partir de la concentration 6,4mg/ml.

### **I.2. Détermination de la CMI**

L'extrait méthanolique d'eucalyptus démontre une activité sur toutes les souches étudiées, *M. tuberculosis* (MTR1, MTR2) et *M. bovis* (B3, B18). L'effet inhibiteur de cet extrait sur toutes les souches commence à partir d'une concentration minimale inhibitrice bien précise CMI = 6,4 mg/ml, représenté dans la **Figure n°12**.



**Figure n°12 :** La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur *M. tuberculosis* et *M. bovis*.

La tuberculose (TB) reste un sérieux problème de santé dans de nombreuses régions du monde, et le développement d'une résistance aux antibiotiques par ce pathogène impose un besoin récurrent pour la recherche de nouveaux médicaments, afin de remplacer ceux qui ont perdu leur efficacité (Muna, 2012). Cette étude a pour objet d'évaluer les propriétés médicinales anti-mycobactériennes de fruits d'*Eucalyptus citriodora* obtenus à partir de plante récoltée au niveau de parc national du Gouraya, de la ville de Bejaïa. En utilisant une quantité de ce fruit sèche avec un solvant (Méthanol) sur milieu LJ.

De nombreuses études ont été réalisées, sur les propriétés anti-mycobactériennes de plusieurs espèces d'Eucalyptus, tels que *globulus labil*, *camaldulensis*, *dalrympleana*, *urnigera*, *deglupta* et l'*eucalyptus citronné*, mais seules les espèces *globulus* et *citronné* ont été sélectionnés pour leurs propriétés anti-bactériennes (Mulyaningsih, 2011).

*E. citronné* a également été testé pour ses propriétés ; antirhumatismale, anti-inflammatoire, antalgique, insectifuge, antifongique, sédative/ relaxante, anti-hypertensive (par régulation du SNC), myorelaxante, anti-infectieuse, apaisante cutanée, régulation du pancréas (Faucon, 2019). Cependant, aucune étude n'ait indiqué l'activité anti-mycobactériennes d'eucalyptus citronné, les résultats de cette étude confirment l'activité anti-mycobactériennes d'eucalyptus citronné.

L'extrait méthanolique d'eucalyptus *citronné* étudié a montré une bonne action anti-mycobactérienne sur les souches *M. tuberculosis* spp et *M. bovis*, où la croissance a été inhibée à 100% pendant huit semaines à des concentrations élevées. Dans la littérature scientifique, peu d'information concernant l'activité anti-mycobactériennes d'eucalyptus ont été rapportées. Cependant il existe des études sur l'activité anti-mycobactériennes d'autres genres que l'eucalyptus, telles que ; *Anacardium occidentale* en utilisant une approche quantitative la technique (BACTEC), où ils ont considéré toute absence de croissance comme efficacité de l'extrait (**Olugbuyiro et al., 2013**). Bongo et ses collègues, ont rapporté les propriétés anti-mycobactériennes des espèces *Terminalia*, mais seules quelques espèces de ce genre ont été explorées pour leurs constituants anti-mycobactériennes, extraits de *T. phanerophlebia* ont montré de bonnes propriétés antimicrobiennes activités contre deux souches de mycobactéries *M. tuberculosis* spp et *M. bovis* ainsi que deux autres souches bactériennes responsables d'infections opportunistes liées aux affections respiratoires (**Bongo, 2018**). Kayoka et al., ont rapporté une activité inhibitrice sur *M. bovis* chez trois espèces d'Anacardicea (**Kayoka, 2016**). De plus, Depanoalpha® et ficus spp a montré une l'activité anti-mycobactériennes sur toutes les souches de mycobactéries (**Bongo, 2017**).

En utilisant la méthode quantitative des proportions sur le milieu L-J, aucune activité n'a été exercé sur les 4 souches testées (MTR1, MTR2, B3, B18) pour les concentrations inférieures ou égales à 1,6mg/ml, cela est probablement dû à la faible concentration de l'extrait méthanolique dans le milieu. L'activité était assez bonne à des concentrations élevées d'extrait 6,4 mg/ml sur l'ensemble des souches. Nos résultats sont proches aux autres résultats qui ont prouvé qu'il y avait une inhibition de *M. tuberculosis* et *M. bovis* sur milieu L-J additionné avec 1 mg/ml ou plus d'extrait de plantes (**Marita, 2010**).

Les résultats du test de l'activité anti-mycobactérienne est de 6,4 mg/ml à 12,8 mg/ml pour les quatre souches, qui sont moins puissants que le médicament standard isoniazide (de 0,02 à 0,20mg/ml). Mais quand même l'extrait méthanolique d'eucalyptus a montré son effet inhibiteur sur les souches *M. tuberculosis* (MTR1, MTR2) et sur les *M. bovis* (B3, B18) et une exploration de la composition moléculaire de cet extrait permettrait de déterminer la ou les molécules douées d'activité.

L'eucalyptus est riche en grande variété de métabolites secondaires fournissant des propriétés (antifongique, antiallergique), et la présence de ces produits chimiques à savoir ; le plus notable l'eucalyptol (ou cinéol), Monoterpènes, Sesquiterpènes,

Glucosides d'acide oleuropéique, Polycétones cycliques, Acylphloroglucinols, Glycosides de phloroglucinol, Acylphloroglucinols dimères, Robusta dials, Euglobales, Macrocarpales, Eucalyptone G and rhodomyrtone, Flavonoïdes, Catéchines, Tanins hydrolysables,  $\beta$ -dicétones, Triterpènes, Composés stéroïdiens et Glycosides cyanogéniques dans toutes les parties de la plante (feuilles, tiges, graines , fruits) **(Brezáni et Šmejkal, 2013 ; Salehi et al., 2019)**. Ses composants ont été retrouvés dans la plupart des plantes qui ont montré in vitro les propriétés antimicrobiennes.

Depuis l'antiquité, l'eucalyptus a été utilisé dans le traitement de la bronchite aiguës et chroniques, la tuberculose pulmonaire, l'asthme (ils modifient les sécrétions, favorisent l'expectoration, calment la toux), les douleurs névralgiques, l'otite, la sinusite, les infections cutanées et les infections des voies urinaires. L'eucalyptus est aussi fébrifuge, tonique de l'appareil digestif et vermifuge. En usage externe, antiseptique et cicatrisant, il s'emploie sur les plaies, les brûlures, les ulcères (décoction ou teinture étendue) et en injections dans la vaginite, la leucorrhée, la blennorrhagie **(Bouasla et Bouasla, 2017)**.

Ajayi et ses collaborateurs ont rapporté que les antibiotiques ou Substances antimicrobiennes comme les saponines, les glycosides, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins, etc. se trouvent être répartis dans toutes les parties des plantes **(Ajayi, 2011)**. Ces composés phytochimiques, précisément les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins, ont fait leurs preuves et possèdent une activité anti-mycobactériennes **(Bunalema, 2010)**. Les flavonoïdes inhibent la synthèse des acides gras, la biosynthèse de l'acide mycosique et biosynthèse de novo des acides gras chez les mycobactéries **(Marita, 2010)**. Les profils biochimiques d'une plante spécifique peuvent être influencés par plusieurs facteurs tels que la variation géographique, le climat, le sol, saison, et d'autre part les solvants utilisés, la pièce usagée, différentes méthodes d'extraction ont des effets sur la composition et la diversité des produits chimiques contenus dans plantes médicinales **(Bongo, 2018)**. Comme les phytochimiques étaient identifié dans la plante utilisée, désormais la nécessité d'identifier et caractériser la ou les molécules qui possèdent l'activité anti-mycobactérienne.

D'après l'intelligence artificielle, le cinéol présent dans l'eucalyptus agit en perturbent la membrane cellulaire de *M. tuberculosis*, entraînant ainsi une altération de la perméabilité membranaire.

En outre, l'extrait méthanolique d'eucalyptus peut également induire la mort cellulaire programmé (apoptose) chez *M. tuberculosis*, ce qui suggère qu'il peut être efficace même contre les souches résistantes aux médicaments.

## II. Activité antibactérienne d'extrait sur les Gram positif

### II.1. Suivi de croissance

L'activité anti-bactérienne de l'extrait méthanolique d'Eucalyptus est évaluée sur les souches à Gram positif (*Enterococcus sp*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus* et *staphylococcus aureus*), les résultats sont représentés dans le Tableau VIII. Les microplaques ont été lues visuellement, apparition de trouble ou changement de couleur (croissance bactérienne), ni trouble ni changement de couleur (absence de croissance), comparant aux puits témoins qu'ont été toujours positifs.

**Tableau VIII :** Activité anti-bactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique sur les Gram positif (*Enterococcus sp*, *E. faecalis*, *S. haemolyticus* et *S. aureus*).

Concentration de l'extrait	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,6 mg/ml	3,2 mg/ml	6,4 mg/ml	12,8 mg/ml	25,6 mg/ml
Témoin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-

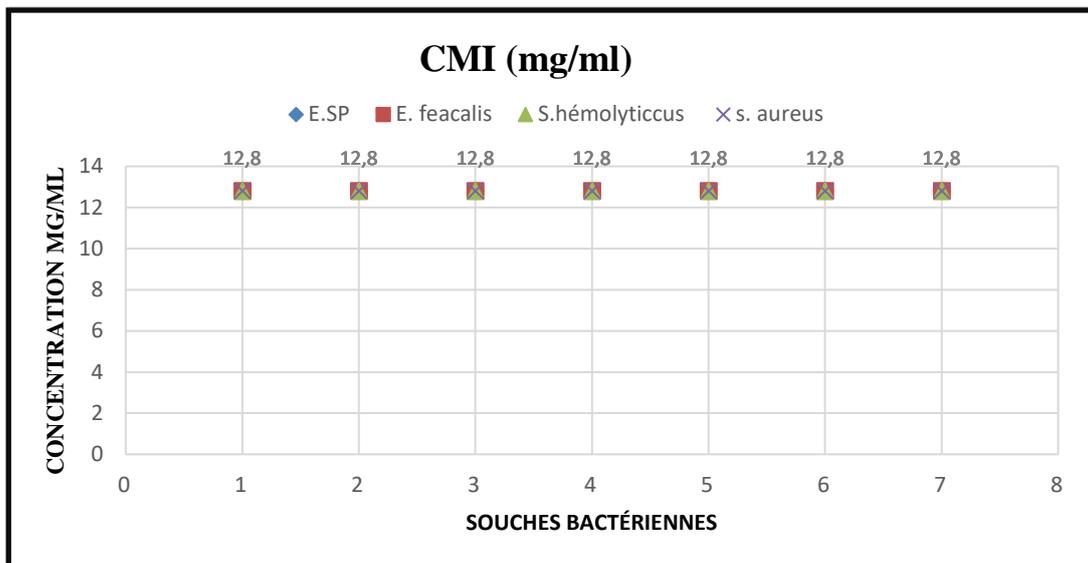
(-) : Absence de croissance (ni trouble ni changement de couleur) ; (+) : croissance bactérienne (trouble, changement de couleur).

Après 24h d'incubation, les résultats des microplaques ont montrés ; l'apparition de trouble (croissance bactérienne) chez toutes les souches aux niveaux des puits à des faibles concentrations d'extrait méthanolique (0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,4mg/ml, 0,8mg/ml, 1,6mg/ml, 3,2mg/ml, 6,4mg/ml). Par contre à des concentrations élevés d'extrait (12,8mg/ml, 25,6mg/ml), on remarque une absence totale de la croissance bactérienne, constatée par l'absence de trouble et aucun changement de couleur, en comparaison avec le témoin positif. L'extrait exerce une activité anti-bactérienne sur les souches à Gram positif (*Enterococcus sp*, *E. faecalis*, *S. haemolyticus* et *S. aureus*) pour des concentrations bien précises où l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne commence à apparaître.

### II.2. Détermination de la CMI

La valeur CMI est considérée comme la concentration minimale de l'extrait qui inhibe complètement la croissance visible des microorganismes, l'extrait méthanolique d'eucalyptus active sur toutes les souches à Gram positif utilisée. L'effet inhibiteur de cet

extrait commence à apparaître à partir de la CMI = 12,8 mg/ml, représenté dans la **Figure n°13**.



**Figure n°13** : La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur les souches à Gram positif.

L'augmentation de la résistance des pathogènes aux antibiotiques représente une menace majeure pour la santé publique car elle réduit l'efficacité des traitements antibiotiques, ce qui pourrait entraîner une augmentation de la morbidité et de la mortalité. *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA), les *entérocoques* résistants à la vancomycine (ERV) et le *Staphylococcus haemolyticus* sont les pathogènes résistants les plus importants parmi les bactéries à Gram positif concernant les infections nosocomiales. L'apparition de résistances chez les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Acinetobacter baumannii*) a également été documentée. De nombreux antibiotiques fréquemment utilisés par le passé sont devenus moins efficaces contre ces agents pathogènes (Mulyaningsih, 2011). Par conséquent, il existe un besoin urgent de trouver des agents antimicrobiens alternatifs pour le traitement des microorganismes pathogènes résistants.

Plusieurs rapports ont documenté les propriétés anti-bactériennes de l'extrait d'eucalyptus Mulyaningsih et al., 2011, ont rapporté les propriétés anti-bactériennes de l'espèce *eucalyptus globulus* contre les bactéries multi-résistantes (MDR), comme résultat l'E. *Globulus* a exercé l'activité la plus prononcée contre les bactéries MRSA. De nombreuses études ont montré que les huiles extraites des espèces d'*eucalyptus* ont une activité contre certaines bactéries à Gram- et à Gram+, mais à des degrés divers.

**Elaissi et al., (2011)** ont évalué l'activité antibactérienne de vingt espèces d'Eucalyptus récoltées dans des régions en Tunisie, par la méthode des disques sur gélose, contre deux bactéries à Gram+ : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Ils ont trouvé que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles présente des variations considérables entre les différentes espèces d'eucalyptus. Cette variabilité a été attribuée à la composition chimique des huiles de feuilles. La plus grande efficacité contre *Staphylococcus aureus* a été observée avec l'huile d'*Eucalyptus odorata* ( $16,0 \pm 1,0$  mm), caractérisée par une proportion plus élevée de *cryptone*. Cette efficacité diminue dans le cas des huiles d'*Eucalyptus diversicolor* et d'*Eucalyptus tereticornis* qui contiennent une teneur plus faible en *cryptone*.

Un autre travail réalisé par **Chaves et al., 2018**, a rapporté un effet antibactérien de l'huile essentielle d'Eucalyptus camaldulensis sur les MRSA. Cette huile a présenté une activité significative contre *Staphylococcus aureus* (CMI =  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Une étude récente réalisée par **Limam et al., (2020)**, impliquant cette fois différents espèces d'eucalyptus plantées en Tunisie. L'objectif de cette étude est de déterminer la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de ces espèces et d'évaluer leurs activités antioxydantes et antibactériennes contre six bactéries pathogènes humaines Gram+ et Gram-, L'activité antibactérienne a été évaluée qualitativement et quantitativement par deux méthodes différentes ; diffusion en milieu gélosé (méthode de disques), (CMI) et (CMB). Toutes les huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne importante contre toutes les bactéries testées. L'huile d'Eucalyptus camaldulensis présente la plus grande zone d'inhibition ( $25,33 \pm 2,84$ ) et la plus faible concentration minimale inhibitrice (CMI =  $0,93 \text{ mg/ml}$ ) contre la bactérie *Serratia marcescens*.

La détermination de la CMI en milieu liquide MH par dilution, a montré l'absence de l'effet anti-bactérienne de l'extrait méthanolique sur les souches à Gram positif à leurs concentrations ( $0,1 \text{ mg/ml}$ , à  $6,4 \text{ mg/ml}$ ), par contre à des concentrations plus élevés ( $12,8 \text{ mg/ml}$  à  $25,6 \text{ mg/ml}$ ), l'extrait a exercé une forte activité qui inhibe complètement leurs croissances.

D'après les résultats de la CMI, il apparaît que toutes les souches bactériennes Gram-positives testées sont inhibées à  $12,8 \text{ mg/ml}$ , ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de cet extrait.

Les composés phytochimiques précisément les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins ont fait leurs preuves possèdent une activité anti-bactérienne. Les plantes riches en

tanins sont beaucoup utilisées pour les affections digestives ; en cas de diarrhée causées par les bactéries pathogènes, ulcère et pour soulager les hémorroïdes comme pour le bouillon blanc (Oullali et Chamek, 2018). Certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (nicotine, caféine, morphine, lupinine) et anticancéreux (Iserin et al., 2001).

### III. Activité antibactérienne d'extrait sur les Gram négatif

#### III.1. Suivi de croissance

L'activité anti-bactérienne de l'extrait méthanolique d'Eucalyptus est évaluée sur les souches à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*), les résultats sont représentés dans le Tableau IX, les microplaques ont été lues visuellement.

**Tableau IX** : Activité anti-bactérienne de différentes concentrations d'extrait méthanolique sur les Gram négatif (*E. coli*, *A.baumannii* et *P. aeruginosa*).

Concentration de l'extrait	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,6 mg/ml	3,2 mg/ml	6,4 mg/ml	12,8 mg/ml	25,6 mg/ml
Témoin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(-) : Absence de croissance (ni trouble ni changement de couleur), (+) : croissance bactérienne (trouble, changement de couleur).

Nous avons lu visuellement les résultats des microplaques après 24h, et nous avons observé une activité antimicrobienne variable vis-à-vis de toutes les souches testées. Les souches d'*E.coli* et *A.baumannii* ne semblent pas affectées par la présence de faibles concentrations de l'extrait (de 0,1 mg/ml à 0,8 mg/ml), et une croissance est observée (trouble, changement de couleur). Cependant, à partir des 1,6 mg/ml, aucune croissance n'est observée, même après repiquage des souches sur une gélose CHROM-Agar, cela explique la sensibilité de ses souches aux concentrations élevées d'extrait méthanolique. Par contre *P. aeruginosa* présente une croissance bactérienne visible avec un trouble et un changement de couleur jusqu'à la concentration 6,4 mg/ml, et à partir de 12,8mg/ml, aucune croissance n'est enregistrée.

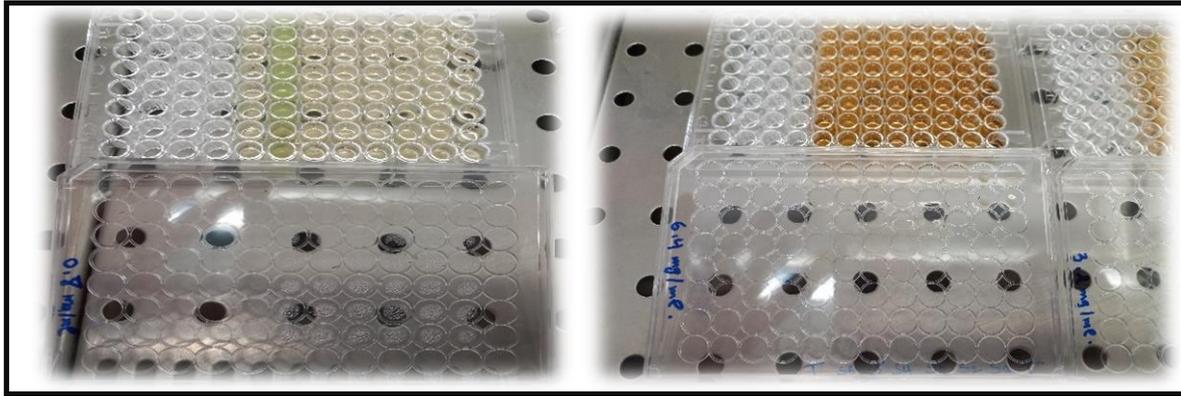


Figure n°14 : Résultats de CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus montre la différence entre les concentrations faibles et élevés sur les souches à G-.

### III.2. Détermination de la CMI

L'extrait méthanolique d'eucalyptus exprime une activité antibactérienne sur t les 3 souches à Gram négatif testée. L'effet inhibiteur de cet extrait sur les souches à Gram négatif commence à partir d'une concentration minimale inhibitrice bien précise, CMI =1,6 mg/ml pour les souches (*E. coli*, *A.baumannii*) et CMI=12,8mg/ml pour la souche *P. aerogenosa*, représenté dans la Figure n°15.

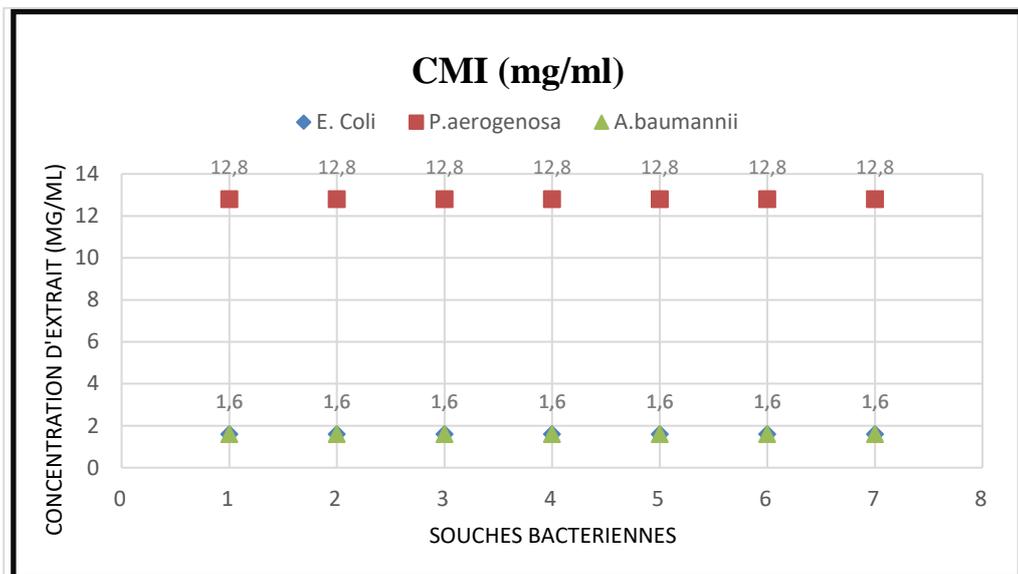


Figure n°15 : La CMI de l'extrait méthanolique d'eucalyptus sur les souches à Gram négatif.

Grâce à la composition chimique d'Eucalyptus et à son principe actif qui est le 1,8-cinéole possède des vertus considérables : astringents, hémostatiques, fébrifuges désinfectants, antiseptiques, c'est l'un des meilleurs remèdes contre l'inflammation chronique de la muqueuse gastrique et de la muqueuse intestinale. Les fruits du genre

Eucalyptus possèdent diverses activités biologiques, elles peuvent être antibactériennes, sur plusieurs agents pathogènes (Atmani-Merabet et al., 2020).

Mulyaningsih et al., 2011, ont rapporté les propriétés anti-bactériennes de l'espèce *eucalyptus globulus* contre les bactéries multi-résistantes (MDR), toutes les huiles et les composants étaient à peine actifs contre les bactéries MDR Gram-négatif tels que (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*).

Un autre travail réalisé par Chaves et al., 2018, a rapporté un effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sur *E. coli*. Cette huile n'a aucune activité significative contre *Escherichia coli* (CMI > 1000 µg ml<sup>-1</sup>).

D'après Benali et Raho Ghalem (2014), l'activité antimicrobienne de l'HE de feuilles d'Eucalyptus peut être attribuée à la présence de concentration élevée en 1,8-cinéole (15%- 78%). Dans une étude faite par Ghanmi et al., (2011), il a été rapporté que le 1,8-cinéole (42,30 %) est le constituant majoritaire de l'huile essentielle des feuilles d'*E. camaldulensis* récolté au nord du Maroc. Des études faites sur l'activité antimicrobienne de 1,8-cinéole, indiquent des effets à large spectre sur les bactéries à Gram positif et négatif (Talha et al, 2021).

Dans une autre recherche menée par Fenghour et al., (2021), étudiant l'effet antibactérien des huiles essentielles de deux plantes *Eucalyptus camaldulensis* et *Artemisia herba alba* sur certaines souches bactériennes. Les résultats ont confirmé les propriétés antibactériennes de ces deux HE, en effet elles ont montré une inhibition de croissance significative de *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *E. coli*, *K. pneumonia* et *P.aeruginosa*.

La détermination de la CMI en milieu liquide MH par dilution, a montré une activité de l'extrait méthanolique sur les souches à Gram négatives, à des concentrations moins élevées que les Gram+. L'effet de l'extrait pour *E. coli* et *A. baumannii* a commencé à apparaître à partir de 1,6 mg/ml, mais pour *Pseudomonas aeruginosa* il a commencé à partir de 12,8 mg/ml, L'extrait méthanolique de fruit d'*eucalyptus citronné* est révélé actif avec un degré différent, lié au contenu d'extrait aux substances à activité antimicrobienne.

D'après les résultats de la CMI, les Gram-négatif ont été inhibés à une CMI= 1,6 mg/ml, qui fait que les Gram-négatif sont les plus sensibles aux extraits méthanolique d'Eucalyptus que les bactéries Gram-positif.

Plusieurs études testant l'activité inhibitrice d'eucalyptus, confirment que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles que les bactéries Gram (-). Cette résistance est liée

à la complexité de leur enveloppe cellulaire qui contient une double membrane qui présente une perméabilité sélective (Busatta et al., 2008). Par ailleurs, notre étude a montré le contraire. *E. Coli* et *A. baumannii* sont les plus sensibles de toutes les souches testées. Moreira et al., 2005, ont montré que les bactéries Gram (-) peuvent être sensibles à l'action d'eucalyptus, en effet cette sensibilité dépend aussi des propriétés d'extrait méthanolique d'eucalyptus dont l'action inhibitrice et bactéricide est due à leur richesse en molécules actives (Satrani et al., 2007). À cet effet, on suspecte que cet extrait possède un effet inhibiteur au niveau de la paroi bactérienne, exactement sur la perméabilité sélective de la membrane.

Des études ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif et Gram positif (Ulanowska et al., 2007). Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Tim et Andrew, 2005).

En outre, l'eucalyptus possède une activité antioxydante, de nombreuses maladies, telles que le cancer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le diabète, la fibromyalgie, l'arthrite, les allergies et le vieillissement, sont liées au stress oxydatif. Pour lutter contre ce dernier, il a été suggéré de prendre des antioxydants (l'eucalyptus) qui peuvent être efficaces pour inhiber de tels phénomènes (Bhuyan et al., 2017).

Au jour d'aujourd'hui, aucune étude n'a été faite sur les différentes activités d'extrait méthanolique d'*eucalyptus citronné*, mais d'après nos résultats cet extrait peut être utilisé comme agent antibactérien. Son action antimicrobienne dépend principalement de ses constituants chimiques. Son composant majeur est le terpène 1, 8-cinéole, Ce composé (1, 8-cinéole) d'après Blejan et al., 2021 pourrait augmenter la perméabilité de la membrane bactérienne, facilitant ainsi la pénétration d'autres composés qui ciblent la respiration bactérienne ou l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilms microbiens. L'*eucalyptus citronné* est une source potentielle de composés antimicrobiens agissant contre diverses bactéries : espèces à Gram positif et à Gram négatif.

---

# *Conclusión*

---

La résistance aux antituberculeux des souches de *Mycobacterium tuberculosis* est un problème majeur de santé publique, ainsi que d'autres souches bactériennes présentent une résistance accrue aux antibiotiques et aux agents antimicrobiens, ce qui représente un fardeau considérable pour les soins de santé humaine et leur traitement devient un défi complexe. Cette situation constitue une menace mondiale et oblige la communauté scientifique d'aller de l'avant et de contrecarrer ce phénomène. Raison pour laquelle plusieurs travaux sont en cours dans le but de chercher de nouvelles molécules actives sur les pathogènes en générale et les Mycobactéries en particulier. Pour atteindre cet objectif, les plantes médicinales présentent une source inépuisable de composés naturels, bioactifs qui agissent directement sur l'organisme, ce qui jouent un rôle déterminant dans la préservation de la santé humaine.

Notre étude a été menée pour déterminer l'activité antimycobactériennes des extraits méthanolique d'Eucalyptus citronné (*Eucalyptus citriodora*), ainsi son activité antibactérienne sur d'autres souches bactérienne (*Enterococcus sp*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aerogenosa*). Cette activité qui pourrait potentiellement servir de remède dans le traitement des maladies infectieuses, serait également une solution miracle dans la lutte contre antibiorésistance.

Nos résultats ont montré l'efficacité d'extraits méthanolique d'eucalyptus citronné, avec une activité antimycobactériennes sur les souches *M. tuberculosis* et *M. bovis*. L'activité inhibitrice de cet extrait s'observe avec des concentrations relativement élevées (à 12,8 mg/ml ou plus). En revanche, les concentrations inférieures à 12,8mg/ml ne présentent aucune activité sur MTBC. De même pour certaines testés, comme *Enterococcus sp*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*, la concentration minimale inhibitrice est de 12,8mg/ml d'extrait. Tandis que cet extrait présente une activité antibactérienne plus intéressante chez *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumannii*, à des concentrations moins élevées, à partir de 1,6mg/ml.

Ces résultats démontrent que les extraits méthanolique d'*Eucalyptus citriodora* présentent un effet inhibiteur intéressant contre les souches testées. Ce qui suggère que, cette plante représente une source naturelle et prometteuse de molécules bioactives qui possèdent des activités antimycobactériennes et antibactérienne très importantes.

De nombreuses perspectives découlent de cette étude où plusieurs investigations sont possibles pour la continuité de ces travaux comme :

- Élargir la panoplie de méthodes d'extraction des principes actifs en utilisant d'autres procédés d'extraction.
- Pousser l'identification des principes actifs responsables de l'activité biologique par des techniques avancées, comme l'HPLC, GC-MS, LC-MS et RMN.
- Étudier l'effet des autres parties de la plante et tester l'activité antibactérienne des extraits combinés avec d'autres antibiotiques.
- Vérifier *in vivo* l'activité de ces extraits utilisant des modèles animaux et procéder à des essais cliniques pour permettre leur utilisation dans la prise en charge de ces infections.

## *Références Bibliographiques*

### *A*

**Aît Khaled N, Enarson D, Billo N, (1999)** ; Épidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. *Rev Mal Respir.*14: 5S8–5S18.

**Ajayi I, Ajibade O and Oderinde R, (2011)**; Preliminary Phytochemical Analysis of some Plant Seeds. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2011, 1 (3): 1-4.

**Atmani-Merabet G, Fellah S, Belkhiri A, (2020)**; Comparative study of two Eucalyptus species from Algeria: chemical composition toxicity and acaricidal effect on *Varroa destructor*. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(3), 144-148.

### *B*

**Banremila D, Djoudi F, Gharout-Sait A, SlimaniKh, Spitaleri A, and al, (2023)**: Comprehensive Drug Resistance Characterization of Pulmonary Tuberculosis in Algeria: Insights on Mycobacterium tuberculosis Strains by Whole-Genome Sequencing. *Microbial drug resistance*, Volume 00, Number 00, 2023. Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/mdr.2022.0321.

**Belhouala K and Benarba B (2021)** Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Algeria: A Multiregional Ethnobotanical Study. *Front. Pharmacol.*12:760492. doi: 10.3389/fphar.2021.760492

**Benali Met Raho Ghalem B (2014)**; Antibacterial activity of essential oil of North West Algerian Eucalyptus camaldulensis against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Coastal Life Medicine*. Two (10), 799-800p.

**Bhuyan and al., (2017)** Phytochemical, antibacterial and antifungal properties of an aqueous extract of Eucalyptus microcorys leaves. *South African Journal of Botany* 112.

**Bongo G, Huruma T, Koto-te-Nyiwa N, Malakalinga J, Tshiana C, Pambu A, Mwanza F, Mbadiko C, Makengo G, and al., (2017)**: Comparative Anti-mycobacterial Activity on Lowenstein-Jensen Slants of Selected Medicinal Plants Used in the Congolese Pharmacopeia, *Journal of Diseases and Medicinal Plants*. Vol. 3, No. 5, 2017, pp. 88-96. doi: 10.11648/j.jdmp.20170305.12.

**Bongo G, Tuntufye H, Malakalinga J, Ngbolua K, Pambu A, Claudine T, et al., (2018)** : Anti-Mycobacterial Activity on Middlebrook 7H10 Agar of Selected Congolese Medicinal Plants, department of Biology, Faculty of Science, American institute of science ISSN: 2381-7690 (Print); ISSN: 2381-7704 Vol. 4, No. 4, 2018, pp. 68-77.

**Bouasla A, and Bouasla I, (2017)**; Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine* 36: 68–81

**Botella H, Peyron P, Levillain F, Poincloux R, Poquet Y, Brandli I and al. (2011).** Mycobacterial p (1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe*. 10:248-59.

**Brezáni, V, Šmejkal K, (2013);** Secondary metabolites isolated from the genus *Eucalyptus*. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 65–75.

**Briestler and Shannon K, (2022);** Latent tuberculosis testing through the ages: the search for a sleeping killer; 2022.

**Bunalema, L, (2010);** Anti-mycobacterial activity and acute toxicity of *Erythrina abyssinica*, *Cryptolepis sanguinolenta* and *Solanum incanum*. Unpublished Dissertation for Award of MSc Degree at the University of Makerere, Kampala, Uganda, 2010, 53pp.

**Bunalema L, 2010;** Anti-mycobacterial activity and acute toxicity of *Erythrina abyssinica*, *Cryptolepis sanguinolenta* and *Solanum incanum*. Unpublished Dissertation for Award of MSc Degree at the University of Makerere, Kampala, Uganda, 2010, 53pp.

**Busatta C, Vidal RS, Popiolski C, Mossie AJ, Dariva C, Rodrigues ARM and al., (2008);** Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausages. *Microbiologie Alimentaire* 25,207-211.

### C

**Cécile L, (2012) :** Rôle de la 4'-Phosphopantéthéinyl transférase Pptt dans la multiplication et la persistance de *Mycobacterium tuberculosis* et mise en place d'un test d'activité enzymatique pour la recherche de nouveaux antituberculeux, thèse de doctorat université de Toulouse, 199p.

**Chaves and al., (2018);** Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops & Products* 112.

**Compagnon P, Bouquet S, Houin G, (2004) ;** Suivi thérapeutique de l'isoniazide. In : Marquet P. Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments. Paris: Elsevier, 2004; pp. 97-104.

### D

**Daniel T.M, (2005);** Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 9:1181-1182.

**Daniel T.M, (2006):** The history of tuberculosis. *Respir Med*. 100:1862-1870.

**De Jong B.C, Adetifa I, Walther B, Hill P.C, Antonio M, Ota M, Adegbola R.A, (2010);** Differences between tuberculosis cases infected with *Mycobacterium africanum*, West African type 2, relative to Euro-American *Mycobacterium tuberculosis*: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 58:102-105.

**Désiré I, (2013)**; Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe mycobacterium tuberculosis résistant à l'isoniazide et à la rifampicine. Université d'Ouagadougou. Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Moléculaire. P 58.

**Deschaseaux C, (2005)**; Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : Etude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique IS611 O-RFLP. University Henri Poincare, Nancy 1.120 p.

**Dooley SW, Jarvis WS, Martone WJ, Snider DE, (1992)**; Multidrug-resistant tuberculosis (editorial). *Ann Intern Med* 1992; 117: 257–8.

**Domenech R, (2006)**; Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86:77-109.

**Dominique L, (2007)**; *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance Département de génétique, développement et pathologie moléculaire, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

**Dutronc H, Dauchy F-A, Dupon M, (2009)**; Tuberculose. *Rev Prat* 2009; 59:405-414.

### *E*

**Edeoga H. O., Okwu D. E. and Mbaebie B. O, (2005)**; phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4 (7): 685.

**ElaissiA, Hadj S, MabroukS, Larbi M, Chemli R, Harzallah-SkhiriF, (2011)**; Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils. *Food Chemistry* 129: 1427–1434.

### *F*

**Faucon M, (2019)**; Traité d'aromathérapie scientifique et médicale, Éditions Sang de la Terre.

**Fenghour H, Bouabida H, Dris D and Houhamdi M, (2021)**; Antibacterial effect of essential oils of two plants *Eucalyptus camaldulensis* and *Artemisia herba alba* on some bacterial strains. *BiosystemsDiversity*. 29(2).

**Frota C, Hunt D, Buxtonrs R, Hinds J, Kremer K, Gilles P, (2007)**; Panteix, Précis de bactériologie clinique.

## G

**Ghanmi M, Hmiri S, Rahouti M, Habibi Z, Satrani B, and El Ajjouri M. (2011) ;** Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Menthapulegium* et d'*Eucalyptus camadulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration de pommes en conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. Volume 80 - Année 2011, 824 - 836 URL : <https://popups.uliege.be/0037-9565/index.php?id=3375>.

**GuillouxR, (2008) ;** Le toucher en médecine chinoise ;Corps 2006/1 (n° 1), pages 99 à 106.

## H

**Heym B, (2007) ;** Chinet / Méthodes diagnostiques de l'infection tuberculeuse en 2007 : intradermoréaction à la tuberculine ou interféron- $\gamma$  La Revue de Médecine Interne ; 28. (3) :147-150 DOI : 10.1016/j.revmed.2006.12.006.

## I

**Ilboudo D,(2013) ;** Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe *Mycobacterium tuberculosis* résistant à l'isoniazide et à la rifampicine. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire. Université d'Ouagadougou, Faculté des Sciences de la nature et de la vie. 78.

**Iserin P, (2001) ;** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, PréparationsSoins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres. 335 p.

## J

**Jakob L, (2014);**Physical and Biological Properties of Bioaerosols, Lund University LU · Department of Design Sciences. August 2014. DOI:10.1007/978-1-4419-5582-1\_3.

**Jarlier V andNikaido H,(1994);**Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS MicrobiolLett.* 123: 11-18.

## K

**Kayoka K, Eloff N, Chikwelu L, and Lyndy J, (2016);** Antimycobacterial Activity and Low Cytotoxicity of Leaf Extracts of Some African Anacardiaceae Tree Species. *Phytotherapyresearch*, 2016, 1-11

**KoumbaYoya G, (2010) ;** Synthèse d'analogues cinnamiques : inhibiteurs potentiels contre *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. Université Paul Sabatier. P 250.

**Kouwelton K, Yaya S, 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.

### L

**Limosin A, Bouquet S, la Guellec C, Rey E, venisse N, (2004);** suivi thérapeutique de rifampicine in, suivi thérapeutique pharmacologie pour l'adaptation de posologie des médicaments. *Collection option/Bio*, Ed Elsevier, paris.2004:105-114.

**Limam and al., (2020);** Variation in chemical profile of leaves essential oils from thirteen Tunisian Eucalyptus species and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. *Industrial Crops&Products* 158 : 112964.

**Lompo B. Y. A. (2014) ;** Etude des résistances primaire et secondaire du complexe *tuberculosis* aux antituberculeux dans la région des hauts bassins. Diplôme de Master. University polytechnique de Bobo-Dioulasso. P 71.

### M

**Mariita M, (2010) ;** Efficacy of medicinal plants used by communities around Lake Victoria region and The Samburu against *Mycobacteria*, selected bacteria and *Candida albicans*, Unpublished Dissertation for Award of MSc degree in the School of Pure and Applied Sciences, Kenyatta University, Nairobi, Kenya, 2010a, 139pp.

**Mathys V,(2009) ;**Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. 2009.172.

**Mathys V,(2010);** Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis*aux agents anti-tuberculeux. Thèse de doctoratUniversitéLibre de Bruxelles. P 224.

**Meyssonier V, Veziris N, Bastian S, Texier-Maugein J, Jarlier V and Robert J, (2012);**Increase in primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* inyounger birth cohorts in France. *J. Infect*. 64(6) :589-591.

**Ministère de la santé, (2019) ;** journée mondiale de lutte contre la tuberculose (24 Mars 2019).

**Molly A, James, J., Misra, S, Sagadevan, L. D. M., Veettil, A. K. T. and Thankamani, V.(2011);** Anti-mycobacterial activity of the plant extracts of *Alstoniascholaris*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2011, 4 (1): 40-42.

**Morel A, (2017) ;** Fosfomycine et lincomycine sur *Staphylococcus aureus* et non *aureus*. Proposition de diamètres critiques. Concentrations minimales bactéricides de la lincomycine. *Sciences pharmaceutiques*. 2017. ffdumas-01529358f.

**Moreira M, Ponce A, de Valle C, Roura S, (2005);** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* WT, 38: 565-570.

**Mouton Y, Deboscker Y, Dubreuil L, ThabautA, (1997);** Antibiotiques, antiviraux, antiinfectieux. Paris: John LibbeyEurotext, 261p.

**Muna M and Fauzia R, (2012);** Antibacterial Activity of Medicinal Aqueous Plant Extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2012, 8(3).

**Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, and Wink M,(2011);** Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens; Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, ImNeuenheimer Feld, Heidelberg, Germany.

### N

**News Médical- Histoire de la Tuberculose. Disponible sur ;** <http://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-%28French%29.aspx>. (Consulter le : 26.05.2023)

**Nilam H,Himani R. Gandhi-Krishna A and al., (2021) ;**Synthesis, pharmacokinetic and molecular docking studies of new benzohydrazide derivatives possessing anti-tubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv, Department of Chemistry, Saurashtra University, Rajkot 360 0 05, Gujarat, India.

### O

**Olugbuyiro A, Moody O and Hamann M,(2013);**Antiinfectivepotential of some medicinal plants used in South- West Nigeria. *International Journal of Innovations in Biosciences*, 2013, 3(3):103.

**OMS, (2022) ;**Rapport sur la tuberculose dans le monde 2022 (en anglais).

**OMS, (2018) ;** La tuberculose ultrarésistante 2018.

**Oullali L et Chamek C, (2018) ;** Contribution à l'Etude Ethno pharmacognosique des Plantes Médicinales Utilisées pour le Traitement des Affections de l'Appareil Digestif en

Kabylie. Mémoire de fin d'étude, Université Mouloud Mammeri, Faculté de Médecine, Tizi Ouzou, Algérie.

### P

**Paul A,(2023)** ; De nouvelles connaissances en biologie cellulaire orientent la recherche de vaccins contre la tuberculose.

**Petrovska.BB.(2012)**. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews 10.4103/0973-7847.95849.

**Prof H, Weiss N, Gabriela E, Pfyffer, (2004)** ;La tuberculose Humaine et Animale Au Tchad : Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Faculté de l'Université de la philosophie et des sciences naturelles Basel. P 113.

**Programme national de lutte contre la tuberculose en Algérie,(2011)** ;Manuel de la lutte antituberculeuse à l'usage des personnels médicaux.

### R

**Rastogi N, Legrand E and Sola C, (2001)**;the mycobacteria: an introduction to Nomenclature and pathogenesis. Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur, B.P. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 20 (1).

**Richard M, Mariita, John A, Orodho, Paul O, Paul K,Mbugua, (2010)**; Antifungal, antibacterial and ant mycobacterial activity of *Entada abyssinnica* Steudel ex A. Rich (Fabaceae) methanol extract, Department of Plant and Microbial Sciences, 1Educational Management, Policy and Curriculum studies, Kenyatta University, P.O. Box 43844-00100, Nairobi, Kenya.

**Robert J, Veziris N, Truffot-Pernod C, Grigorescu C, Jarlier V,(2007)**;Surveillance de la résistance aux antituberculeux en France : données récentes. Centre national de référence des Mycobactéries et de la résistance des Mycobactéries aux anti-tuberculeux, Paris, France.*BullEpidemioHebd.* (11) : 90-91.

### S

**Sánchez et al., (2020)**. *BMC Complementary Medicine and Therapies* (2020) 20:306

**Satrani B,Fougrach H,Bourkhiss B,Bousta D, et Talbi M, (2007)** ; Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp : 85-96.

### T

**Talhaar M, Alnomanib Y and Mirforughi S,(2021)**; Eucalyptus camaldulensis efficiency for application against microbial infections. *Medical Microbiology*.32, 1–5p.

**Tim P, Andrew L, (2005);** Antimicrobial activity of flavonoids. *Journal Antimicrob Ag*, 26.

**Tolba H et al. (2015).** Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Médicale* (2015) 25, e128—e133

### U

**Ulanowska K, Majchrzyk A, Moskot M, Jakbkiewicz-Banecka J, Âgrzyn G, (2007);** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62: 132-135p.

**Urban-Chmie R et al, (2022).** Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics* 2022, 11, 1079.

### V

**Vanegas D et al, (2021);** Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils. *BMC Research Notes* (2021). 14:439. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05838-8>

**Vezeris N, Cambau E, Sougakoff W, Robert J and Jarlier V,(2005) ;** Resistance to antituberculousdrugs. *Science*.12.102-109.

**Vezeris N, (2013);** new antituberculous drugs (2): New molecules, UPMC université Paris 06, ER5, EA 1541, laboratoire de bactériologie-hygiène, 75005 Paris, France

**Villarino ME, Geiter LJ, Simone PM;** The multidrug-resistant tuberculosis challenge to public health efforts to control tuberculosis. Center for Disease Control, Atlanta. *Publ Health Rep* 1992; 107: 616–25.

**VincentL.F et Portaels,(1992) :** Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : actualités et perspectives. *Méd. Mal. Infect.* 22: 391-409.

### W

**World Health Organization report (WHO), (2014);** Global Tuberculosis. WHO Geneva, Switzerland, 2014, 171pp.

### Z

**Zumla A, Raviglione M, Hafner R, (2013);** Tuberculosis, the *New England journal of medicine* 8(20).

# Annexe n°01

## Matériels de laboratoire

### Appareils



Autoclave



Etuve



Bain marie



Vortex

# Annexe n°01



Bec benzène



Bain marie à agitation



Agiteur magnétique  
Plaque chauffante



Balance de précision

# Annexe n°01

## Matériels



Flacons stériles



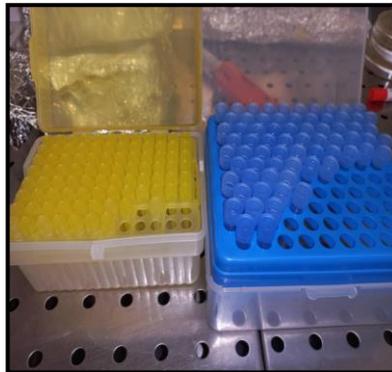
Eprouvette graduée



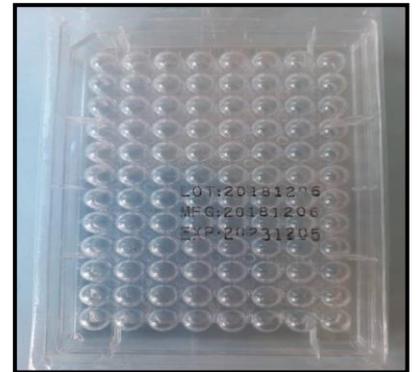
Erlenmeyer



Micropipette



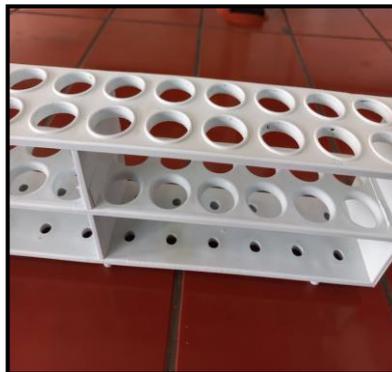
Embouts pour micropipette



Microplaque



Tube à essai



Portoir



Barreau magnétique

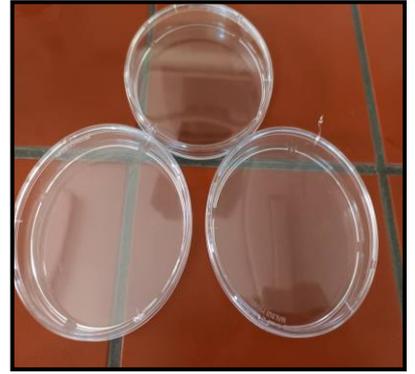
# Annexe n°01



Oses en plastique



Pipette Pasteur



Boite PETRI



Seringue stérile



Filtre seringue

# Annexe n°01

## Produits



Milieu de culture  
LJ



Milieu de culture  
MH



Milieu de culture  
CHROMagar



Eau distillée stérile



Eau physiologique



Solvant éthanol



L'extrait méthanolique  
d'eucalyptus



Glycérol

**Résumé :** La TB et les autres maladies infectieuses touchent des milliers de personnes chaque jour. De plus, le problème de la multi-résistance et ultra-résistance a créé le besoin urgent de trouver des agents antimicrobiens alternatifs pour le traitement des microorganismes pathogènes résistants. Un grand nombre des plantes médicinales utilisées dans plusieurs recherches représente une source inépuisable des substances bioactives qui possèdent des propriétés biologiques très importantes. Pour le besoin de la présente étude, nous avons choisi l'*Eucalyptus citriodora* parmi les plantes médicinales pour sa valeur nutritionnelle et médicale. Le but de notre travail était d'étudier les propriétés anti-mycobactérienne et antibactérienne de l'extrait méthanolique des grains d'eucalyptus citronné. L'extrait a été testé sur 4 souches de MTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), et également contre quelques souches bactériennes à Gram-positif (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus aureus*) et à Gram-négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii*) en utilisant la méthode de détermination de la CMI sur milieu liquide sur microplaque 96 puits. L'extrait a montré une activité contre toutes les souches de mycobacterium testées avec une valeur de CMI= 6,4mg/ml. Il a également montré une activité contre les 4 souches Gram-positif, CMI=12,8mg/ml, et contre les souches Gram-négatif, CMI=1,6 mg/ml. Cet extrait pourrait être une riche source d'agents anti-mycobactériennes et antibactériennes, ainsi antifongiques et antioxydantes. Cependant, des recherches supplémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence.

**Mots clés :** anti-mycobactérienne, anti-bactérienne, extrait méthanolique, *Eucalyptus citriodora*

**Abstract:** Infectious disease that affects thousands of people every day, the problem of the drug multi-resistance and ultra-resistance has created the urgent need to find alternative anti-mycobacterial agents for the treatment of resistant pathogenic microorganisms. A large number of medicinal plants used in many researches represent an inexhaustible source of bioactive substances, which possess very important biological properties. For the purpose of the present study, we chose *Eucalyptus citriodora* among the medicinal plants for its nutritional and medical value. The aim of our work was to study the anti-mycobacterial and antibacterial properties of the methanolic extract of lemon eucalyptus seeds. The extract was tested against four strains of MTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), and against some Gram-positive bacterial strains (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*) using the MIC determination method on 96-well micro-dilution at different concentrations of the extract. The extract showed activity against all *Mycobacterium strains* tested with a MIC value of 6,4mg/ml. It also showed activity against four Gram-positive strains, MIC=12.8mg/ml, and against Gram-negative strains, MIC=1.6 mg/ml. This extract could be a rich source of anti-mycobacterial and anti-bacterial agents, as well as antifungal and antioxidant. However, further research will be needed to be able to confirm the highlighted activities.

**Key words:** anti-mycobacterial, anti-bacterial, methanolic extract, *Eucalyptus citriodora*