

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLAB Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Thème

***Etude du potentiel microbicide d'un extrait végétal sur
des souches d'Enterobacteriaceae***

Réalisé par : MELEK RANIA et GAMRAOUI AMIRA

Devant les membres du jury :

Président	Dr. Nouredine BENYAHIA	MCA	USDB1
Examineur	Dr. Khadidja ZEROUTI	MCB	USDB1
Promoteur	Dr. Radia AÏSSANI-EL FERTAS	MCB	USDB1
Co- Promoteur	Pr. Ziane Hanifa	Professeur	EPH El Kettar

Promotion 2021/2022

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la force et la persévérance d'accomplir cet humble travail et de le préserver à travers toutes les circonstances.

À notre promotrice, **Mme Aissani El-Faratas Radia**, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience, et surtout son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire. Pour tout cela, nous tenons à vous exprimer nos sentiments de profonde gratitude et reconnaissance.

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice **Pr Ziane Hanifa** ainsi qu'à **Mme. RAHIM Ibtissem**, sans lesquelles ce travail ne serait pas ce qu'il en est.

Nous remercions Mr. Benyahia.N . de nous avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail

Nous sommes très reconnaissantes que Madame **Zerrouti K.** est acceptée d'être examinatrice de ce travail

Nous adressons, nos sincères remerciements à Mme SAADI LEILA, chef d'option BMC à l'USDB1 pour son aide, son enseignement, et sa motivation tout au long de notre Parcours, ainsi que Mr. Benyahia, qui nous a toujours incité à atteindre nos objectifs et toujours être à la hauteur de nos attentes envers la science .

Nous présentons ici le témoignage de nos sincères gratitude à tous les enseignants de l'USDB qui ont contribué à notre formation tout au long de 5 dernières années.

Nous avons croisé durant notre parcours, des personnes formidables, charitables, qui nous ont apporté aide et soutien sans rien demander en retour. La liste est bien longue et très éclectique; Nos Chers enseignants :(Dr. Benhmed, madame Zineb), ainsi qu'aux ingénieurs du laboratoire de la station expérimentale. Nous ne vous oublierons jamais. Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Dédicace

A mes grands-parents Sid Ahmed et Lila Méziani qui nous ont quittées , ça m'attriste de ne pas vous avoir à mes cotés mais vous resterez à tout jamais dans mon cœur , vous avez rendu ma vie meilleure et j'espère vous rendre honneur .

Que dieu vous accueille dans son vaste paradis

A mes parents Lamia et Sofiane , à qui je dois tout , merci de votre soutien et la motivation , j'espère vous avoir rendu fière .

A ma grand-mère que dieu la garde et lui donne une longue vie avec beaucoup de santé

A mon frère Adel et ma sœur Soumia , je vous remercie de votre soutien , votre amour ,votre bienveillance , à ma très chère Djazia je ne te remercierai jamais assez de m'avoir donné le plus merveilleux des cadeaux , mon neveu Ilian

A toute la famille Melek et Meziani

A ma Binôme Amira et mes amis Nina , Nafila, Lilya , Meryem et Rania , Nassim , fadil ,ainsi qu'à toute la promo master 2 biologie moléculaire et cellulaire2021-2022

Rania.

Je dédie ce travail à

A ma grand-mère, qui m'a quitté trop tôt mais qui reste toujours gravé dans mon cœur.

A ma très chère maman, Sabrina, et mon papa, Mourad. Je vous dois tout, et j'espère vous rendre chaque jour plus fière.

A mon frère Tarek et ma petite sœur Sara, mes amours et ma joie dans vie.

A ma meilleure amie, Ahlem, je ne serais pas qui je suis aujourd'hui sans toi.

Mes cousines Naziha, Halouma et Imene et ma petite Alaa.

A ma deuxième mère Radia, mes grands-parents, mes tantes, mes oncles et toutes mes chères.

Ma binôme, Rania, mes amies Camelia, Randa,

Et surtout à mon fiancé, Billel, pour son encouragement, son soutien, sa patience et son amour.

Merci à toutes personnes qui a cru en moi, qui m'a inspiré et qui m'a aidé ne serait qu'avec une prière.

Amira

La propagation des maladies infectieuses d'origine bactériennes causées principalement par l'émergence des bactéries multirésistantes, face aux thérapies classiques à base d'antibiotiques et les immunothérapies, est une cause majeure de mortalité dans le monde. Cette propagation est actuellement dite pandémique et de nombreuses études suggèrent la nécessité de considérer des thérapies alternatives, dont la plus pertinente est la phytothérapie.

Dans ce cadre, nous avons entrepris d'évaluer le potentiel antimicrobien de deux extraits éthanoliques de *Moringa Olifeira* et *Artemisia annua*, deux espèces caractérisées par une large distribution mondiale. Pour cela, nous avons travaillé sur de souches bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae* d'origine clinique et communautaire. Nous avons mis en évidence le profil de résistance de ses souches par antibiogrammes, puis testé leurs virulences face au sérum humain. Nous avons aussi développé un modèle de sepsis mono bactérien sur des souris BALB/c en utilisant une souche de la collection ; il s'agit de *S. marcescens*. Nous avons également testé et comparé le pouvoir antimicrobien, antibiofilm et antioxydant de ces extraits *in vitro*.

Les résultats de cette étude ont révélé une diversité phénotypique marquée concernant le profil de résistances et de virulence des souches de notre collection. Le profil de résistance le plus inquiétant qui fut observé était dû à la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) par 46.29% des souches. Un potentiel de virulence semble se définir chez ces souches, puisqu'elles étaient, pour la quasi-totalité, résistantes à l'effet bactéricide du sérum humain et formaient un biofilm. De plus, nous avons réussi à induire un sepsis bactérien dans un modèle murin (souris BALB/c), soutenant encore plus le caractère pathogène de certaines de ces souches. Les extraits éthanolique de *M. oleifera* (EEM) et *A. annua* (EEA) ont révélé un rendement appréciable. Une activité antioxydante, par le test DPPH, fut observée chez l'EEM (35,82 à 74,55 % à 0,05 à 0,5 mg/mL respectivement) et l'EEA (41,98 à 88,53 % à 0,05 à 0,5 mg/mL respectivement). Ces extraits présentaient un certain potentiel antibactérien et antibiofilm. En effet, nous avons observé une inhibition de la croissance bactérienne à partir de 30 μ g/ml de l'EEM et l'EEA sur milieu gélosé, et que ces 2 extraits étaient capables de modifier l'intensité du biofilm formé de 44.44% des souches. Ces résultats soutiennent les données indiquant le potentiel thérapeutique de ces extraits et leur éventuelle utilisation comme alternative à l'antibiothérapie.

Mots clés : *Moringa oleifera*, *Artemisia annua*, *Enterobacteriaceae*, antibactérien ; anti-infectieux, antibiofilm, antioxydant.

The spread of infectious diseases of bacterial origin caused mainly by the emergence of by the emergence of multi-resistant bacteria, in the face of classical therapies based on antibiotics and immunotherapies, is a major cause of mortality in the world. This spread is currently said to be pandemic and many studies suggest the need to consider alternative therapies, the most relevant of which is phytotherapy.

In this context, we undertook to evaluate the antimicrobial potential of two ethanolic extracts ethanolic extracts of *Moringa Olifeira* and *Artemisia annua*, two species characterized by a worldwide distribution. For this purpose, we worked on bacterial strains of the family Enterobactereaceae family of clinical and community origin. We have highlighted the resistance profile of these strains by antibiograms, then tested their virulence against human serum.

We also developed a model of mono bacterial sepsis on BALB/c mice using a strain of the collection; it is *S. marcescens*. We have also tested and compared the antimicrobial, antibiofilm and antioxidant properties of these extracts in vitro.

The results of this study revealed a marked phenotypic diversity in the resistance and virulence profile of the strains in our collection. The most worrisome resistance profile observed was observed due to the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) by 46.29% of the strains. A potential for virulence seems to be defined in these strains, since almost all of them almost all of them were resistant to the bactericidal effect of human serum and formed a biofilm. Furthermore, we have succeeded in inducing bacterial sepsis in a mouse model (BALB/c mice), supporting further BALB/c mice), further supporting the pathogenic character of some of these strains. The ethanolic extracts ethanolic extracts of *M. oleifera* (EEM) and *A. annua* (EEA) showed appreciable yield. An antioxidant activity, by DPPH assay, was observed in EEM (35.82 to 74.55% at 0.05 to 0.5 mg/mL respectively) and EEA (41.98 to 88.53% at 0.05 to 0.5 mg/mL respectively). These extracts showed some antibacterial and antibiofilm potential.

Indeed, we have observed an inhibition of bacterial growth from 30 μ g/ml of EEM and EEA on agar medium, and that these 2 extracts were able to modify the intensity of the biofilm formed by 44.44% of the strains.

These results support the data indicating the therapeutic potential of these extracts and their possible use as an alternative to antibiotic therapy.

Key words: *Moringa oleifera*, *Artemisia anua*, *Enterobacteriaceae*, antibacterial; anti-infective, antibiofilm, antioxidant.

يعد انتشار الأمراض المعدية ذات الأصل الجراثيمي الزاجم بشكل رئيسي عن ظهور بكتيريا متعددة المقاومة، في مواجهة العلاجات الكالسنيكية الوائمة على المضادات الحيوية والعلاجات المناعية، سبباً رئيسياً لوفيات ني العالم. يُزال حالياً أن هذا الانتشار هو جائحة ونشر العديد من الدراسات إلى الحاجة إلى التنكير في العلاجات بديلة، وأكثرها صلة بالعلاج بالنباتات في هذا السياق، نعدنا بتقييم إمكانات مضادات الميكروبات الشنيزن من المستخلصات الإيثانولية من مستخلصات، وهما نوعان يتميزان بالتوزيع في جميع أنحاء العالم. لهذا الغرض، عملنا *Moringa oleifera*, *Artemisia anua* على سالت بكتيرية من عائلة البكتيريا المعوية من أصل سريري ومجتمعي. لقد سلطنا الضوء على خصائص المقاومة. لهذه السالت بواسطة المضادات الحيوية، ثم اخبرنا شديها ضد مصال الدم البشري

؛ . لؤد نما أفضا BALB/c نما أفضا بنطوير نموذج للإنتان البكتيري الأحادي باستخدام سالتة من المجموععة النيران باختبار ومقارنة الخصائص الميكروبية والمضادات الحيوية ومضادات الألكسدة لهذه المستخلصات في المخبر. كشفت نتائج هذه الدراسة عن نوع ظاهري ملحوظ في ملف المقاومة للسالت في مجموعتنا. لوحظ شكل المقاومة الألكتر مقاومة lactamases (ESBL) إثارة للقلق الذي لوحظ بسبب إنتاج طيف مهند من 46.29% من السالت- بواسطة لتأثير مهند الجراثيم ني مصال الإنسان وتشكل غشا حويلاً. عالوة على ذلك، لؤد نجحنا ني إحداث نعين الدم البكتيري ني، ودعم الطابع الممرض لبعض هذه (BALB / c)، ودعم المزيد من النيران (النيران / c) نموذج النيران إلى 74.55% عند 0.05 إلى 0.5 مجم / مل على التوالي. أظهرت هذه (41.98) EEA مجم / مل على التوالي (و 0.5 المظنطفات بعض إلى 88.53% عند 0.05 إلى 0.5 مجم / مل على التوالي). لوحظ نشاط مضادات الألكسدة، بواسطة مقايسة الإمكانيات المضادة للبكتيريا والمضادات الحيوية

، وأن هذين EEA onagar و EEM ني الواقع، لؤد الحظنا تثبيط نمو البكتيريا من 30 ميكروغرام / مل من وسط المستخلصين كإنا قادرين على تعديل شدة البيوفيلم المنكون بنسبة 44.44% من السالت. تدعم هذه النتائج البيانات التي تشير إلى الإمكانيات العلاجية لهذه المستخلصات واستخدامها المرحمل كبديل للعلاج بالمضادات الحيوية

الكلمات الأساسية: المورينجا أوليفيرا، الأترطاسيا أنوا، الألمعانية، مضاد الجراثيم؛ مضاد للعدوى، مضاد حيوي،

مضاد لألكسدة

AB: Artemisia annua Brute

AHLS: acyl-homoserine lactone

AMC: amoxicilline + acide clavulanique

AMP: ampicilline

BLSE: beta lactamases à spectre élargi

CTX : céfotaxime

CTX-M : enzymes de class A des BLSE.

CZ : Céfazoline

DL50 : dose létale 50

DPPH : le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

DMSO :diméthylsulfoxyde

ExPEC :Extra intestinal Pathogenic E coli (les E coli pathogènes extra intestinaux)

Les EPEC : entéropathogénique e coli

EHEC :Entérohémmorragique e coli

ETEC, :Entertoxigénique e coli

EIEC :Enteroinvasives e coli

EAEC : Enteroaggrégative e coli

DAEC :Diffusion-adhérent

EEA : Extrait Ethanolique d'Artemisia annua

EEM: Extrait Ethanolique de Moringa oleifera

GLASS: Global Antimicrobial Resistance Surveillance System

IC: Concentration inhibition

LB: milieu luria-Bertani

MB: Moringa Brute

MH: Muller Hinton

OMS: Organisation mondiale de la santé

µg: microgramme

μl : microlitre

PLP :protéine liant la pénicilline

TPC : conteneue phénolique totale

TFC :conteneue flavonoïde totale

UFC :unité formant colonie

Zn²⁺ :l'hydroxyde de zinc

Figure 1 : <i>Escherichia coli</i>	5
Figure 2 : <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
Figure 3 : Les voies d'activation du système du complément	7
Figure 4 : Mécanismes d'échappement au système du complément	8
Figure 5 : Formation de Biofilm	10
Figure 6 : <i>Artemisia annua</i>	13
Figure 7 : Répartition des souches isolées selon l'origine	24
Figure 8 : Répartition des souches isolées selon le sexe	25
Figure 9 : Répartition des souches isolées selon le type de prélèvement	26
Figure 10 : Histogramme de la répartition du profil selon la résistance	28
Figure 11 : Répartition du profil de résistance des souches BLSE	29
Figure 12 : Synergie entre les disques d'antibiotique AMC et CTX	29
Figure 13 : Potentiel de virulence en présence du sérum humain	31
Figure 14 : Effet du sepsis sur le poids des souris BALB/c à J0 et à J1	32
Figure 15 : Effet du sepsis sur le poids du cœur et de la rate.	33
Figure 16 : Résultats du frottis sanguin, coloration MGG.	34
Figure 17 : Souris BALB/c septique.	35
Figure 18 : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques	35
Figure 19: Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques	36
Figure 20 : Résultats du test d'activité antibactérienne de différentes concentrations d'EEM et EEA	38
Figure 21: : Méthode spectrophotométrique pour la mesure de l'intensité du biofilm formé	40

Tableau I Répartition des souches d'entérobactéries selon le type de prélèvement	27
Tableau II Résultat de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection	40
Tableau III Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches en présence de EEM	41
Tableau IV Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches en présence de EEA	41

Introduction	1
Rappels bibliographiques	3
I. Maladies infectieuses liées aux entérobactéries : pathogénicité et résistance	3
1. Caractéristiques générales des entérobactéries	3
I. 2. Pouvoir pathogène des entérobactéries	3
I. 2. 1. Infections à entérobactéries	3
I. 2. 2. Facteurs de virulence et entérobactéries	4
I. 3. Résistance au système du complément des entérobactéries	6
I. 4. Biofilms et Entérobactéries	9
I. 5. Résistance aux antibiotiques et entérobactéries	10
II. Thérapies alternatives dans le traitement des infections à entérobactéries : phytothérapie	11
II. 1. Apport de la phytothérapie en médecine infectieuse	12
II. 2. Exemple de plantes médicinales utilisées en phytothérapie : <i>L'armoise (Artemisia)</i>	13
II. 2. 1. Caractéristiques phytochimiques et nutritionnelles de <i>d'Artemisia annua</i>	14
II. 2. 2. Propriétés thérapeutiques de <i>A. annua</i>	14
Matériels et Méthodes	16
I. Matériels	16
I. 1. Matériel biologique	16
I. 2. Matériel non biologique	17
II. Méthodes	17
II. 1. Etude du potentiel de virulence des souches d'entérobactéries	17
II. 1. 1. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain	18
II. 1. 2. Développement d'un modèle de sepsis monobactérien sur des souris BALB/c	18
II. 1. 3. Etude histologique	18
II. 1. 4. Etude de formules sanguines par coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG)	18
II. 2. Etude de l'effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Artemisia annua</i> sur les entérobactéries	19
II. 2. 1. Extraction éthanolique des feuilles de <i>Artemisia annua</i> et de <i>Moringa oleifera</i>	19
II. 2. 2. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> des feuilles de <i>Moringa oleifera</i> et de <i>Artemisia annua</i>	20
II. 2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Artemisia annua</i> et de <i>Moringa oleifera</i> sur les entérobactéries	21

II. 3. Effet d'<i>Artemisia annua</i> et de <i>Moringa oleifera</i> sur la formation de Biofilm	22
III. Etude statistique	22
Résultats et discussion	24
I. Etude de quelques paramètres épidémiologiques	24
I.1. Répartition des souches bactériennes selon l'origine nosocomiale ou communautaire	24
I. 2. Répartition des souches bactériennes selon le sexe	24
I. 3. Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement	25
I. 5. Répartition des souches bactériennes selon l'espèce	26
II. Etude phénotypique du profil de sensibilité aux antibiotiques	28
III. Etude du potentiel de virulence des souches cliniques d'entérobactéries	30
III. 1. Croissance des bactéries en présence de sérum humain	30
III. 2. Développement d'un modèle de sepsis monobactérien sur des souris BALB/c	31
III. 2. 1. Effet de <i>S. marcescens</i> sur le poids des souris et des organes	32
III. 2. 2. Effet de <i>S. marcescens</i> sur le taux de leucocytes et lymphocytes sanguins	33
III. 2. 3. Effet de <i>S. marcescens</i> sur l'histologie cardiaque	34
IV. Comparaison de l'effet antibactérien et antibiofilm de l'extrait éthanolique des feuilles d'<i>Artemisia annua</i> et <i>Moringa oleifera</i> sur les souches d'entérobactéries d'origine cliniques	36
IV. 1. Rendement de l'extraction éthanolique des feuilles d'<i>Artemisia annua</i> et <i>Moringa oleifera</i>	36
IV. 2. Résultats de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	37
IV. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de d'<i>Artemisia annua</i> et de <i>Moringa oleifera</i> sur les entérobactéries	38
IV. 4. Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique des feuilles d'<i>Artemisia annua</i> et <i>Moringa oleifera</i> sur la formation de Biofilm	40
Conclusion	43
Références bibliographiques	44
Annexes	

La famille des *Enterobacteraeae* est reconnue pour être l'un des groupes procaryotes les plus influents sur l'histoire humaine. Ces bacilles à Gram négatif sont omniprésents. Certains ont un potentiel de pathogénicité de gravité différente. Ils sont actuellement les agents majeurs dans les infections bactériennes (**Janda et Abbott, 2021**)

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies infectieuses d'origines bactériennes sont classées parmi les principales causes de mortalité dans le monde, ce qui fait de la lutte contre les agents responsables de ces infections une priorité mondiale (**OMS, 2021**). Cette lutte est néanmoins compromise aujourd'hui par plusieurs pratiques et facteurs socio-économiques, constaté le plus souvent dans le pays en voie de développement, comme la consommation et commercialisations anarchique et non régulé des antibiotiques, l'accès restreints aux eaux potables et le traitement inadéquat des infections qui ont abouti à l'émergence d'agents pathogènes résistants aux thérapies classiques (**Leverstein et al., 2011**).

Ajouter au profil de résistance aux antibiotiques effrayants et caractéristique de ce groupe bactérien, de nombreux facteurs de virulence sont exprimés par ces bactéries et qui leur permettent de causer des dommages cellulaires et tissulaire chez l'hôte. Nous nous retrouvons, donc, avec une pathogénicité exacerbée par la résistances multiples aux antibiotiques, tout particulièrement, par la production de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) (**Wellington et al., 2013**).

Face à ce gros problème de santé publique, il est nécessaire de développer des thérapies alternatives. La phytothérapie est l'une de ces voies alternatives. En effet, de nombreuses études ont démontrés le potentiel antimicrobiens, antioxydants et anti-cancérogène de certaines molécules extraites des végétaux ((**Skowyra et al., 2014, Song et al., 2015, Siwińska, Malgorzata et al., 2021**).

Dans ce cadre, nous avons entrepris d'évaluer, *in vitro*, le potentiel antimicrobien, antibiofilm et antioxydant de deux extraits végétaux ; *Artemisia annua* et *Moringa oleifera*. Ce potentiel fut mesuré sur une collection de souches d'entérobactéries d'origine clinique et communautaire. Les objectifs de notre étude concernent la :

- Caractérisation phénotypique du profil de résistance aux antibiotiques et de virulence de ces souches.

- Evaluation des activités antibactériennes, antibiofilm et antioxydants des extraits éthanoliques des feuilles de *Moringa oleifera* et *Artemisia annua*.
- Comparaison de ces activités entre les 2 extraits.

I. Maladies infectieuses liées aux entérobactéries : pathogénicité et résistance

I. 1. Caractéristiques générales des entérobactéries

La première apparition du terme « *Enterobacterae* » était en 1929, du grec *enteron*, signifiant « intestin » faisant allusion au foyer principal des espèces de cette famille.

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, immobiles ou mobiles, aérobies anaérobies facultatif et sont d'une grande hétérogénéité. Les bactéries de ce groupe sont retrouvées partout dans le monde sur une variété de niches écologiques telle la surface des eaux, le sol, les végétaux ainsi que naturellement dans la flore des animaux et hommes (Avril *et al.*, 2000 ; Jenkins *et al.*, 2017 ; Kang *et al.*, 2018). Elles comprennent plusieurs espèces modèles, telles que la célèbre *Escherichia coli*. Elles varient dans leur milieu, leur degré de pathogénicité ainsi que leur impact sur leur hôte et son environnement. Ce groupe bactérien comporte plus de 50 genres et 210 espèces commensales (*E. coli*) et parasitaires (*Yersinia*) (Jenkins *et al.*, 2017).

L'identification des entérobactéries passe par une méthodologie rigoureuse dont l'étape la plus importante est les tests biochimiques, qui consistent à mettre en évidence leurs propriétés biochimiques et métaboliques (Aniambossou, 2016). Les membres de ce groupe fermentent le glucose, ne possèdent pas d'oxydase, possèdent une catalase (à l'exception de *Shigella dysenteriae*) et réduisent les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*) (Drahme, 2001 ; Barthelemy, 2016). Le reste des caractéristiques biochimiques sont résumées dans le **tableau I en annexe 1**.

I. 2. Pouvoir pathogène des entérobactéries

I. 2. 1. Infections à entérobactéries

Les entérobactéries sont à la fois associées aux infections gastro-intestinales mais aussi extra-intestinales y compris, les infections des voies urinaires, des bactériémies, des pneumonies, des infections abdominales ou pelviennes, des infections du site opératoire, des méningites et divers abcès. Elles constituent plus de 80% des souches isolées avec *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* et *Morganella* étant les plus souvent retrouvés. (Romily *et al.*, 2011 ; Jenkins *et al.*, 2017 ; Kus, 2014 ; Fauchère et Avril, 2002). Parmi les

infections extra intestinales causées par les entérobactéries (**Kus, 2014 ; Kang et al., 2017 ; Jenkins, 2018**):

- Les pneumonies : souvent associé à *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* et toute autre bactérie en cas d'immunodépression.
- Les bactériémies : communautaires (*E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* et *Shigella dysenteriae*) ou nosocomiales (*Enterobacter*, *Proteus spp*).
- Les infections urinaires : communautaires (*E. Coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*) ou nosocomiales (en addition *Enterobacter*, *Citrobacter*).
- Les infections neurologiques : *E. Coli* K1 est l'agent pathogène des méningites néonatal.

I. 2. 2. Facteurs de virulence et entérobactéries

Le pouvoir pathogène des entérobactéries est lié étroitement à leurs facteurs de virulence. Le tableau **II en (Annexe 2)** représente la classification des facteurs de virulences décrits dans la majorité des espèces de la famille des *Enterobactereaceae* (**Jenkins, 2017**).

Escherichia Coli regroupent des souches commensales, appartenant à la flore naturelle de l'intestin de l'homme ainsi que des souches pathogènes responsables d'infections gastro-intestinales. Ces souches doivent leur pathogénicité à leur capacité à acquérir des facteurs de virulence et leur transmission *via* les eaux, les aliments contaminés et la voie féco-orale (**Kang et al., 2018 ; Freney et al., 2000 ; Farmer et al., 2007 ; Gadau, 2019**). *E. coli* est également impliquée dans plusieurs infections extra intestinales, urinaires, abdominales et méningites, ces souches sont dites ExPEC ou *E. Coli* pathogène extra-intestinaux (**Alain et Bernard, 2002**). D'après les estimations de l'OMS en 2015, les souches pathogènes de l'*E. Coli* sont à l'origine du syndrome diarrhéique, mettant fin a des millions de vies dans les pays en voie de développement (**Kang et al., 2018**). On compte six pathotypes intestinaux de cette espèce : i) Les EPEC, entéropathogénique (responsables de diarrhée infantile persistante), ii) les EHEC, Enterohémostatique, iii) les ETEC, entérotoxigénique, iv) les EIEC, entéroinvasives, v) les EAEC, Entero-agrégants et vi) les DAEC, diffusion-adhérent (**Croxen et al., 2013**).

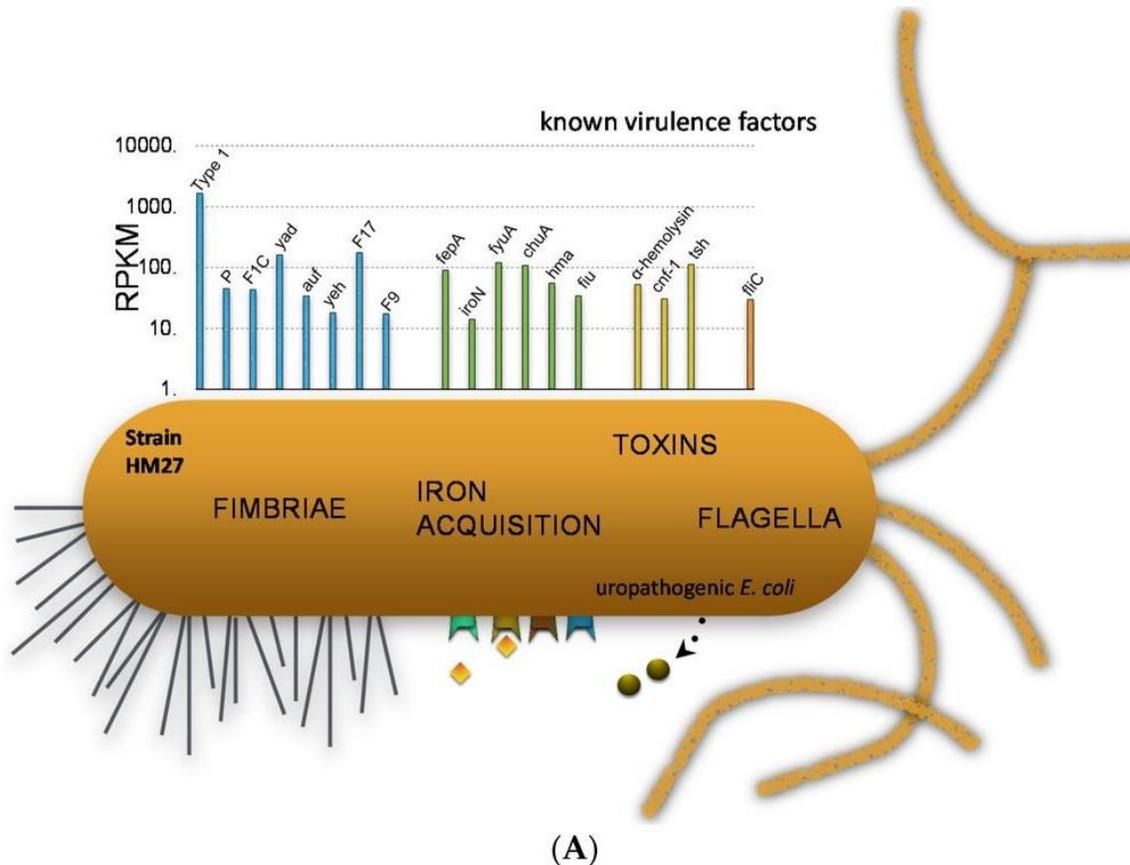


Figure 1 : Niveaux de transcription du gène de virulence d'*E. coli* pendant les infections urinaires humaines (Mobley, 2016).

Il existe une hétérogénéité entre les souches dans l'expression des gènes de virulence in vivo. Il est important de noter que l'expression de fimbria de type 1 est essentielle à prendre en compte car son expression est essentielle dans le modèle murin, mais pour la plupart, les gènes fim sont exprimés de manière variable dans l'UTI humaine (parfois ON et parfois OFF). Le promoteur de la fimbria de type 1 réside sur un élément inversible et peut s'inverser à l'aide de recombinases, puis est activé et désactivé.

L'espèce modèle de la *Klebsiella* est *Klebsiella pneumoniae*. C'est un pathogène opportuniste responsable de diverses infections (urinaires, respiratoires, septicémiques, les infections du site opératoire et les infections liées aux cathéters) nosocomiales et communautaires. Le facteur de virulence majeure de cette espèce est la capsule (Podschun et Ullman, 1998). Plus de 78 antigènes capsulaires (K) ont été identifiés chez *K. pneumoniae*. Les sérotypes K1 et K2 sont décrits comme étant les plus virulents. Les souches dites hypervirulentes

(hv) sont caractérisées par la production accrue des polysaccharides capsulaires (CPS) (**Pan et al., 2013**). La pathogénicité de la *Klebsiella pneumoniae* revient également à la présence d'autres facteurs de virulence telle les adhésines (Fimbriae de type 1 et type3), la production de sidérophores, la résistance au système du complément et la formation de biofilm (**Gadou, 2015 ; Jenkins et al., 2017**).

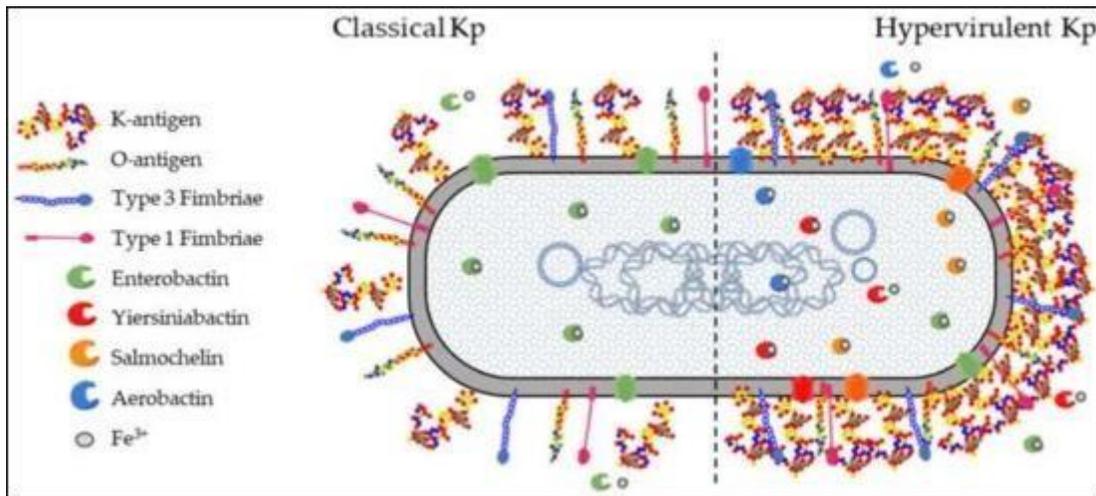


Figure 2 : Facteurs de Virulence de la *Klebsiella pneumoniae* (**Arato et al., 2021**).

La figure décrit les facteurs de virulence de la KP. La capsule est une matrice polysaccharidique extracellulaire qui enveloppe la bactérie et qui est surproduite dans les souches hypervirulentes Kp (Hv-Kp). Le lipopolysaccharide (LPS) fait partie intégrante de l'partie externe de la membrane externe et est produit à la fois par les souches classiques et Hv-Kp. Les fimbriae de type 1 et de type 3 sont des structures adhésives liées à la membrane. Les sidérophores piégeant le fer sont de petites molécules sécrétées reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques médiant leur absorption. L'entérobactine est produite par pratiquement toutes les souches Kp tandis que d'autres sidérophores sont généralement sécrétés par les souches Hv-Kp.

I. 3 Résistance au système du complément des entérobactéries

Le système du complément est un ensemble de glycoprotéines solubles ou membranaires. Ces protéines interviennent dans l'activation la signalisation et la régulation du système du complément (**Sarma et Ward, 2011**). L'activation du système du complément peut se faire selon trois voies : Classique, lectines et alterne (**Figure 3**). Il résulte de son activation, la formation

d'un complexe d'attaque membranaire à la surface des microorganismes ou des cellules infectées. Ces derniers subiront une lyse du fait d'un choc osmotique. L'activation du système du complément aboutit aussi à la libération de médiateurs inflammatoires chimiotactiques (anaphylatoxines) et à des opsonines (impliquées dans l'opsonisation) (Merle et al. 2015).

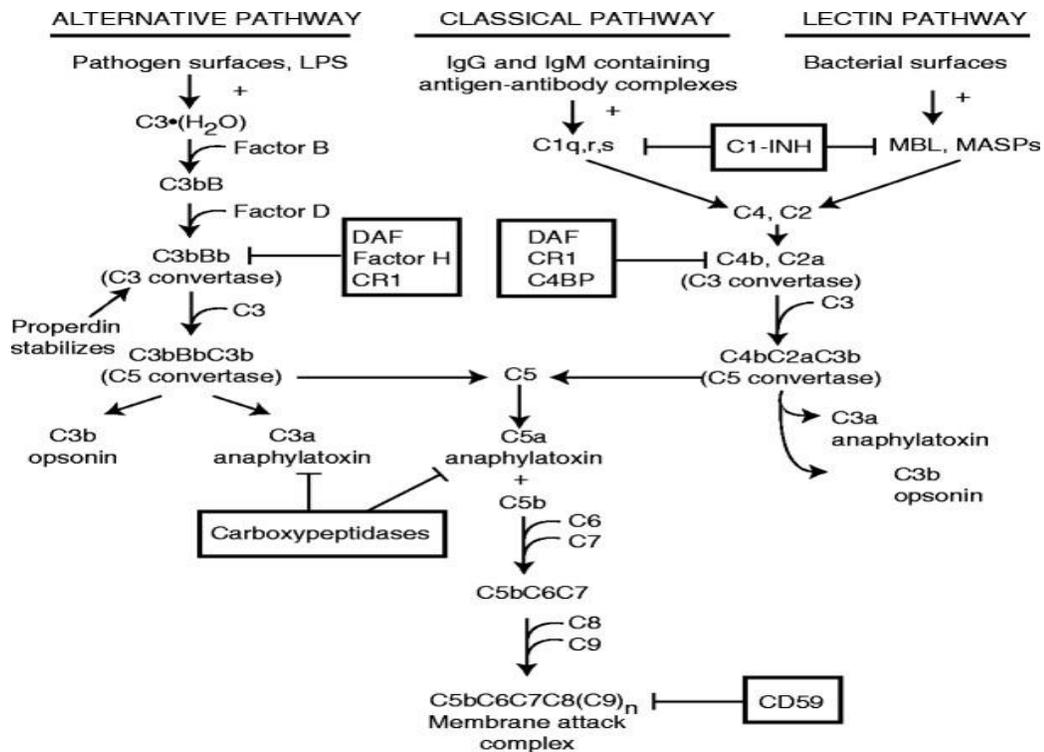


Figure 3 : Voies d'activation du system du complément (Sarma et Ward, 2011).

Les trois voies d'activation du complément, voie classique, voie alternatives et voie lectine ; leurs modes d'activations respectives ainsi que les facteurs pouvant les inhibées (marqué par cadrage).

Au cours de l'évolution et au fils de leur interaction avec l'organisme hôte, les entérobactéries ont développé diverses stratégies d'échappement au système du complément, comme nous pouvons l'apprécier dans la **figure 4**.

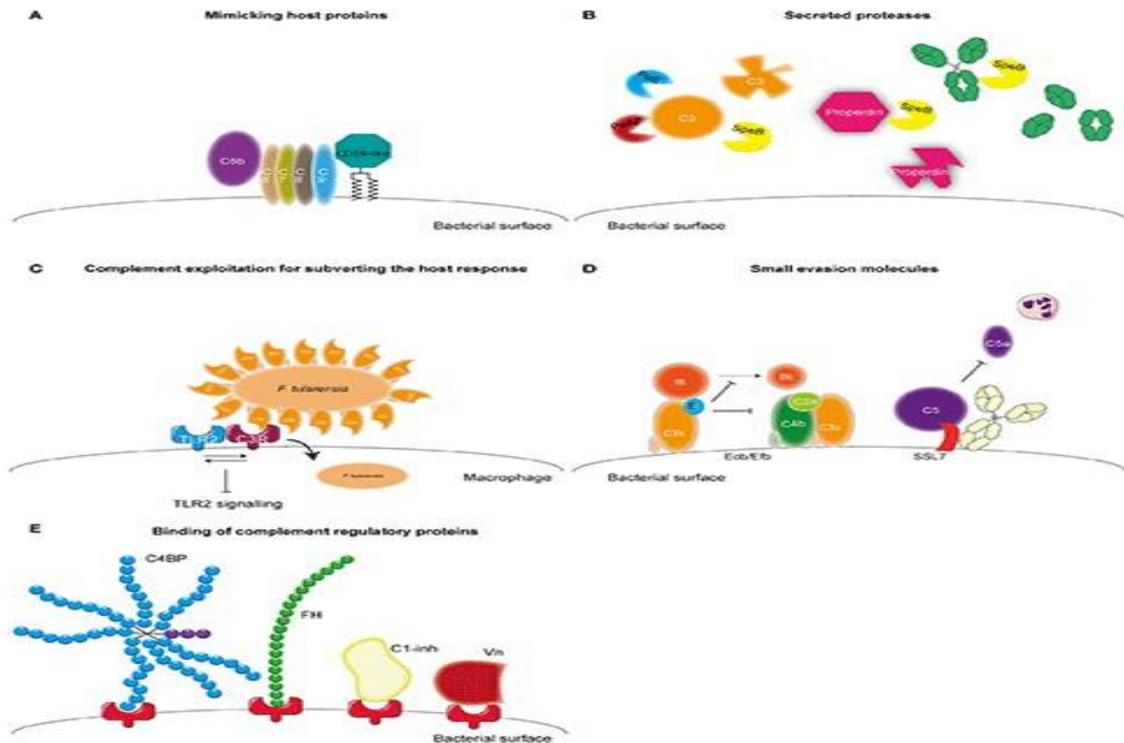


Figure 4 : Mécanismes d'échappements des bactéries au system du complément (Merle et *al.*, 2015).

La figure présentes les différentes voies d'échappement d'un pathogène face au system du complément. A. Par la synthèse de proteine homologues. B. Secretion d'enzymes. C. Highjacking, ou transfert des molécules du complements. D. Evasion par micromolécules. D.

Les « SPATES », ou serine-protéase auto-transporteurs sont une superfamille de facteurs de virulence, qui ont un rôle majeur dans l'établissement d'une infection. Ils procèdent au clivage des molécules du complément. Le facteur « Pic » par exemple, clive les molécules C2, C3/C3b et C4/C4b. Il agit en synergie avec les facteurs d'inhibition H et I (Freire et *al.*, 2020).

Les polysaccharides capsulaires, les protéases, les adhésines, les invasines sont autant de molécules capables de conférer aux *Enterobactereaceae* une dangereuse résistance au système du complémentaire et au sérum (Abreu et Barbosa, 2017).

I. 4. Biofilms et Entérobactéries

La croissance bactérien est caractériser par deux formes évolutives, planctonique (Cellules isolées, surnageant en milieu liquides) ou en agrégats sessiles, adhérant aux surface biotique ou abiotiques. Actuellement, on estime que moins de 0.1% de la biomasse microbien est en forme planctoniques, et que la vaste majorité de ses organisme vivent en cluster. Ce sont les biofilms (Potera, 1998 ; Donlan et Costerton, 2002).

Les biofilms sont des clusters bactériens cohérant disposées en couches, entourées d'une matrice de substances polymériques extracellulaire et associées à des surfaces, possédant souvent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles complexes et une tolérance au agent antimicrobien supérieur à celle de leur forme planctonique. Ils sont omniprésents dans la nature, ils forment souvent des couches muqueuse sur des pierres, ou d'autre interface eau, air. (Bjarnsholt, 2011).

La formation d'un biofilm est assez classique chez les entérobactéries. Elle commence par la fixation des cellules des microorganismes sur des surfaces à substrat reconditionné par des molécules ambiantes. Cette étape est réversible et les cellules peuvent se détacher facilement. C'est au niveau de la matrice extracellulaires, faites de polysaccharides, protéines, de glycoprotéines et d'ADN, que les cellules se fixes, et c'est cette structure qui donnent vie à un biofilm mature hétérogène. Ce processus complexe et hautement régulé est résumé dans la **figure 3** (Bjarnsholt, 2011). Plus le biofilm est mature, plus il est hétérogènes. C'est dans cet environnement qu'on observe ce qu'on appelle le « Quorum Sensing » ou perception du quorum.

La base de cette communication réside sur le principe qu'une bactérie produit des molécules de signalisation à faible mass moléculaires quand la concentration extracellulaire n'a pas atteint un certain seuil. Cependant, quand la densité augmente, une concentration critique peut être atteinte ce qui permet aux molécules de signalisation d'être capté et à la bactérie de répondre. Les entérobactéries, comme la plupart des grams négatifs, utilise les AHLs (N-acyl-homoserine lactones) comme molécules de signalisations.

En santé humaine, les biofilms sont un sérieux problème médical. En effet, ils se forment souvent à la surface de matériaux chirurgicaux (prothèse, sondes, cathéter...) et constituent un foyer d'infection chronique, conduisant souvent à la mort du patient. Par exemple, les poumons des patients atteints de fibrose kystiques sont souvent envahis par un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* (Mah, 2012).

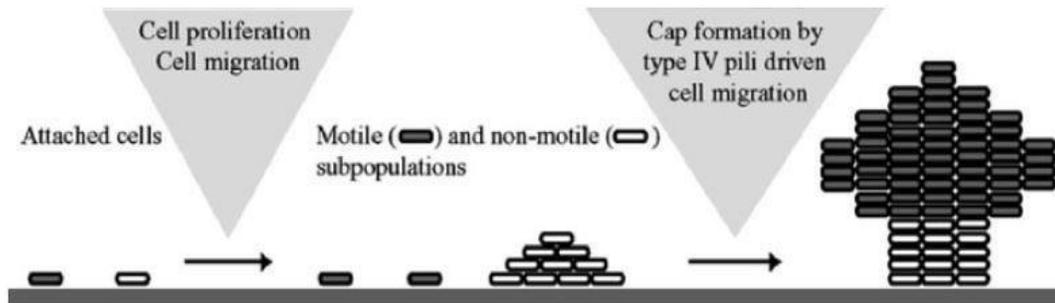


Figure 5 :Formation de Biofilm chez le model *P. Aeruginosa* (Bjarnshot, 2011).

I. 5. Résistance aux antibiotiques et entérobactéries

L'introduction des pénicillines semi-synthétiques (entre autres, l'ampicilline) dans les années 1960 et leur association ultérieure avec des inhibiteurs de β -lactamases (notamment, l'amoxicilline et l'acide clavulanique) ont permis de traiter avec succès les infections causées par les entérobactéries. Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement des infections bactériennes en raison de leur faible toxicité et de leur efficacité. Cependant, les β -lactamases codées par le chromosome ou par des plasmides en, conférant la résistance à certaines β -lactamines, ont considérablement compromis cet avantage thérapeutique. Ceci a entraîné l'utilisation accrue des aminoglycosides (tels que la gentamicine et l'amikacine), des céphalosporines de troisième génération (comme le céfotaxime et la ceftazidime), et les quinolones (ciprofloxacine) (Wellington et al., 2013).

Le problème de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries est dominé actuellement par celui de la résistance aux céphalosporines de dernière génération et aux carbapénèmes. Deux groupes de β -lactamines ayant le spectre d'activité le plus large (Nordmann et Poirel, 2012).

La résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatif peut être le résultat de mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques. Il peut y avoir une altération des protéines liant la pénicilline ou « PLP », la production de β -lactamases ou un accès limité aux PLP cibles (**Tang et al., 2014**).

La production d'enzymes hydrolytiques appelées β -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des β -lactamines (**Livermore, 1995 ; Bradford, 2001**).

Sur la base de leur mécanisme catalytique, les β -lactamases sont divisées en deux types : les sérines- β -lactamases, utilisant un site actif à sérine pour hydrolyser le noyau β -lactame et les métallo- β -lactamases nécessitant des ions Zn^{2+} (**Jacoby et Bush, 2014**).

Les BLSE, ou β -lactamases à spectre-étendu sont des β -lactamases capables de conférer une résistance bactériennes aux pénicillines, aux céphalosporines de première, deuxième ou troisième génération ainsi qu'à l'azeteronam mais pas aux céphamicines ni aux carbapnèmes par l'hydrolyse de ses antibiotiques et qui sont inhibés par l'acide clavulanique. (**Paterson, Bonomo R., 2005**).

Deux classifications des β -lactamases sont considérées les plus pertinentes. Il s'agit de la classification d'Ambler et celle de Bush-Jacoby-Medeiros (**Gadou, 2019**).

La classification de Bush repose sur les similarités fonctionnel et enzymatique et les divise en quatre groupes. C'est une classification phénotypique et est la plus prélevant pour le clinicien comme un outil diagnostique (**Bush et al., 1995**).

La classification d'Ambler est basée sur les similarités séquentielles et l'homologie génique et non phénotypique, divises les β -lactamase en quatre groupe majeur allons de A à D (**Paterson et Bonomo, 2005**).

II. Thérapies alternatives dans le traitement des infections à entérobactéries : phytothérapie

La phytothérapie est un domaine de la médecine qui utilise les plantes soit pour traiter des maladies, soit en tant qu'agents de promotion de la santé. Elle est souvent désignée sous le nom d'herboristerie dans la médecine occidentale. Historiquement, les produits naturels ont fourni une source inépuisable de médicaments. Les produits dérivés des plantes ont dominé la pharmacopée

humaine depuis des milliers d'années (**Schmidt et al., 2008**). La phytothérapie est utilisée depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours, et présente de nombreux progrès en matière de guérison (**Alesaeidi et Miraj, 2016**).

La fabrication des phytothérapies consiste à traiter uniformément les matières premières d'origine végétale de sorte que le produit final contienne un constituant marqueur de référence à une concentration vérifiée. En matière de traitement, ce qui importe le plus, c'est de délivrer le constituant actif à une dose thérapeutique appropriée. L'utilisation traditionnelle des phytothérapies préserve généralement la composition originale et l'intégrité de la plante de sorte que soit la plante entière, soit un pourcentage souhaité de ses composants, est utilisé à des fins médicinales (**Falzon et Balabanova, 2017**).

II. 1. Apport de la phytothérapie en médecine infectieuse

Il est bien établi que la résistance bactérienne aux antibiotiques est un grave problème de santé publique qui concerne presque tous les agents antibactériens et qui se manifeste dans tous les domaines de leur utilisation (**Rossi et al., 2007**). A la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle, plusieurs travaux scientifiques relataient de l'action antiseptique de plusieurs plantes. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles, par exemple, s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses. La connaissance des plantes et l'étude de leurs propriétés, leurs effets thérapeutiques se révèlent une nécessité primordiale, pour découvrir de nouveaux principes actifs pouvant annoncer une révolution de la médecine (**Chebaibi et al., 2015**)

Les avantages des plantes pour la santé humaine sont dus à leur richesse en flavonoïdes, qui ont des propriétés antioxydantes. L'échinacée, par exemple, est une plante principalement utilisée pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures. Elle a un effet préventif sur le rhume. Il semblerait que l'échinacée améliore la fonction des macrophages, grâce à ses alcaloïdes, ses huiles et d'autres constituants chimiques actifs (**Falzon et Balabanova, 2017**). Il fut rapporté par (**Lubbe et al., 2012**) que les composés responsables de l'inhibition de la réplication du VIH étaient deux flavonoïdes ; l'arcapilline et l'isorhamnetine, ainsi que l'esculétine (une coumarine).

II. 2. Exemple de plantes médicinale utilisée en phytothérapie : L'armoise (*Artemisia*)

La famille des *Asteraceae* comprend un grand nombre de genres, dont le genre *Artemisia* qui est l'un des plus grands et des plus répandus dans le monde (**Bora et Sharma, 2011**). Il est communément appelé « absinthe », alors qu'elle désigne en réalité l'espèce *Artemisia absinthium* (**Vallés et al., 2011**). Nous retrouvons aussi d'autres espèces très répandues et connues telles que *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Artemisia abrotanum* et *Artemisia afra*. Ces espèces étaient utilisées pour traiter la fièvre et le paludisme, respectivement, en Chine, en Europe et en Afrique (**Willcox, 2009**).

Artemisia annua est une plante herbacée annuelle, d'où le nom « annua » (**Figure 6**). La plante est cultivée en Asie, en Inde, en Europe centrale et orientale, dans les régions tempérées d'Amérique, d'Afrique, d'Australie et dans les régions tropicales (**Alesaeidi et Miraj, 2016**). Elle est largement utilisée comme épice alimentaire, tisane et plante médicinale dans les climats doux d'Asie, comme en Chine et en Corée (**Ko et al., 2016**). *Artemisia annua* est utilisée en médecine traditionnelle depuis de nombreuses années en Asie et en Afrique pour le traitement de la malaria et de la fièvre, sous forme de thé ou de jus pressé (**Muller et al., 2000**).



Figure 6 : *Artemisia annua*

II. 2. 1. Caractéristiques phytochimique et nutritionnelle de d'*Artemisia annua*

Des études phytochimiques ont montré que *A. annua* contient de nombreux composants actifs en plus de l'artémisinine, notamment des flavonoïdes, coumarines, d'autres sesquiterpènes, des huiles volatiles, des monoterpénoïdes et des lignanes, qui présentent divers avantages pour la santé (**Fu et al., 2020**).

L'artémisinine est le médicament le plus efficace dérivé d'*Artemisia annua*. La teneur en artémisinine dans cette plante est très variable, allant de 0,01 % à 1 %, selon la variété, et peut même atteindre 1,4 % dans certaines souches cultivées (**Brown, 2010**). D'autres composants comme l'acide artémisinique, la casticine, le chrysosplénol D et le β -caryophyllène ont également été largement étudiés. L'acide artémisinique a été signalé comme possédant une activité anti-adipogène. La casticine et le chrysosplénol D présentaient des activités anti-inflammatoires et anticancéreuses. Le β -caryophyllène a montré un effet leishmanicide significatif (**Fung et al., 2020**).

Les composants minéraux provenant des différents tissus de *A. annua* sont énumérés et présentés dans le **tableau III** en (**annexe 3**), ainsi que le profil constitutionnel des acides aminés (g/100 g) dans différents tissus d'*Artemisia annua*. Il est mentionné aussi sur ce tableau, les concentrations des vitamines retrouvées tels que les vitamines A et E.

II. 2. 2. propriétés thérapeutique d'*A. annua*

Artemisia annua est couramment utilisée pour ses propriétés antipaludiques, immunosuppressives, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antihypertensives, antioxydantes, antimicrobiennes, antiparasitaires, insecticides et antivirales (**Naeem et al., 2018**).

L'artémisinine et ses dérivés exercent leur effet en interférant avec la voie de catabolisme de l'hémoglobine plasmodiale et en inhibant la polymérisation de l'hème. Une étude expérimentale *in vitro* montre l'inhibition de l'activité protéolytique de la vacuole digestive du parasite de la malaria par l'artémisinine (**Ferreira, 2004**). Des études cliniques comparatives ont été menées pour évaluer l'efficacité de l'herbe entière d'*A. annua* et de la chloroquine. Les extraits organiques d'*A. annua* se sont avérés plus efficaces, plus rapides et moins toxiques que la chloroquine pour traiter la malaria (**Huang et al., 2010 ;Tayeb et al., 2012**). Elle réduit significativement la parasitémie et améliore la réponse immunitaire en stimulant l'activité

phagocytaire des macrophages. L'activité de l'extrait de la plante entière est plus prononcée en raison de la présence de divers phytoconstituants qui confèrent un potentiel antipaludique synergique (Willcox 2009 ; Donno et al., 2012).

Des études de recherche ont été menées pour évaluer le potentiel antimicrobien des huiles essentielles obtenues à partir d'*A. annua*. Les expériences ont révélé que l'huile essentielle a montré un potentiel antimicrobien contre une large gamme de bactéries à Gram négatif et positives et de champignons (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Enterococcus hirae*, *Candida albicans*) (Juteau et al., 2002 ; Das 2012). Les composés les plus importants qui ont été étudiés pour ce potentiel bioactif sont la scopoletine (Tzeng et al., 2007). L'acide artémisinique a également été étudié pour son activité antibactérienne (Huang et al., 2010).

A. annua possède un certain nombre de groupes de composés ayant des activités anti-inflammatoire, tels que les triterpénoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols et la coumarine (Das 2012). D'autres analyses de recherche font également état d'autres composés anti-inflammatoires comme la scopoletine (une coumarine), l'artémisinine, la dihydroartémisinine et l'artéméther (Bhakuni et al. 2001).

Plusieurs études ont été effectuées au but de déterminer le potentiel antioxydant de la *A.annua*. Une équipe malaysienne en 2012 a évalué le potentiel de cette plante sous différents modes d'extraction par quantification du contenu phénolique (TPC) et de flavonoïde (TFC). Ils ont constaté que l'activité antioxydante la plus puissante fut obtenue en utilisant le méthanol comme solvant (Shahid et al., 2012).

Dans une autre étude, en 2014 à Barcelone, il fut constaté que les flavonoïdes de l'extrait des feuilles possèdent une variété d'activités biologiques, même si l'artémisine représente un composant bioactif majeur dans cette plante (Skowrya et al., 2014).

En Corée, *A. annua* est dite le « *Goddongsook* », une plante thérapeutique dans les régions du sud étudiée principalement pour ses propriétés antioxydantes. En 2015, le profil polyphénolique et la capacité antioxydante de la racine, de la tige, des parties foliaires et florales d'*A. annua* L. ont été déterminées. Des 32 polyphénols présents dans divers tissus d'*A. annua*, quatre acides hydroxycinnamiques et six flavonoïdes ont été identifiés pour la première fois.

L'activité antioxydante des racines était plus élevée que les autres tissus, ce qui pourrait être attribué à sa plus grande teneur en polyphénols (**Y. Song et al., 2015**).

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la FSNV de l'université de Blida 1 (Station expérimentale), et le laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC d'Alger, durant une période de 5 mois, de février à juillet 2022.

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet potentiellement thérapeutique et anti-infectieux de 2 extraits végétaux, *Artemisia annua*, et *Moringa oleifera in vitro*. L'extrait éthanolique des feuilles de ces plantes ont été testées, quant à leur éventuelle activité antibactérienne et anti-biofilm, sur des souches cliniques et communautaires.

I. 1. Matériel biologique :

➤ **Souches bactériennes :**

Nous avons travaillé sur une collection de souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces souches sont d'origine nosocomiale et communautaire. Elles ont été isolées chez des patients à partir de divers prélèvements biologiques. Les données démographiques ont été enregistrées et consignées dans un fichier Excel.

L'identification de ces souches fut obtenue en utilisant les galeries API20E, suivie d'un antibiogramme réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé, selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013) (**Annexe 1**).

Des souches de référence ont aussi été utilisées pour les besoins de validation de certaines techniques. Il s'agit des souches *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* K12 BM21, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

➤ **Sérum humain :**

La recherche de la sensibilité au système du complément a nécessité l'utilisation de sérum humain, préparé à partir du sang d'individus sains. La préparation de ce composant biologique est détaillée dans la section II. 1.

➤ **Animaux**

Le modèle murin de sepsis a été réalisé sur des souris mâles, âgées de 10 à 12 semaines (20-25g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie. Il s'agit des souris BALB/c (n=10).

Les souris ont été acclimatées à l'animalerie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, dans un environnement où la température moyenne était et l'humidité était ambiante. Le régime

alimentaire se limitait à un aliment granulé (glucides 49,80% ; protéines 34.50% ; lipides 10% et complexe minéral vitaminé : 5.70%) et à de l'eau du robinet.

Toutes les expériences ont été menées conformément au Comité d'Ethique de l'Université de Blida 1, et à la législation algérienne de la protection des animaux d'expérimentations utilisées à des fins scientifiques [loi n°12- 235/2012; Décret exécutif n° 10-90].

➤ **Matériel végétal :**

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est un don de l'institut Ibn Hounein (Blida, Algérie). La gérante de l'institut, Mme Sihem NADGI nous a procuré la poudre de feuilles d'*Artemisia annua* et de *Moringa oleifera*, récoltées durant le mois d'aout 2021 dans la région de Bouismail et d'El Goléa (El Menea) respectivement. Les feuilles furent séchées à température ambiante (25-30 °C), à l'abri du soleil au laboratoire dans l'enceinte de l'institut pendant 3 semaines. Les feuilles ont ensuite été pulvérisées, permettant d'obtenir une poudre.

I. 2. Matériel non biologique :

Nous avons utilisé de la verrerie, de l'appareillage, des milieux de culture, des réactifs.

Leurs caractéristiques sont résumées dans l'**annexe 1**.

II. Méthodes

II. 1. Etude du potentiel de virulence des souches d'entérobactéries

II. 1. 1. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain

Le potentiel de virulence a été étudié à travers l'étude de l'effet bactéricide du sérum humain, sur nos souches, par activation du complément. Cet effet fut analysé par une méthode décrite par **Fierer et al. (1972)** ; il s'agit de la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide.

Une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle diluée à 1/500 estensemencée par étalement sur gélose MH. Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, 50 µL de sérum sont déposés au centre de la boîte de culture. La présence ou l'absence de croissance bactérienne, observée à l'endroit du dépôt du sérum après incubation toute la nuit à 37°C, témoigne de la résistance ou de la sensibilité de la souche testée. La souche *E. coli* K12-BM21 sensible au sérum est utilisée comme témoin de l'activité du sérum.

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain d'individus sains. Le sang est prélevé dans des tubes secs, puis incubés à température ambiante pendant 2 à 4 heures pour permettre la coagulation. Le caillot formé est enlevé avant de centrifuger le contenu des tubes à 120 000 rpm pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45µm, aliquoté puis conservé à -20°C.

II. 1. 2. Développement d'un modèle de sepsis monobactérien sur des souris BALB/c

Les injections intraveineuses ou intrapéritonéales de bactéries vivantes, sont souvent utilisées pour induire le sepsis dans les modèles murins. *E. coli* est généralement utilisé pour mimer le sepsis à Gram négatif, alors que les Staphylocoques sont utilisés pour celui des Gram positif (Lewis et al., 2016). Dans notre travail de recherche, nous avons induit un sepsis monobactérien dans un modèle murin de souris BALB/c.

Les souris BALB/c ont été réparties en 2 lots

- Lots contrôle (n=5) : n'ayant reçu aucun traitement.
- Lots septiques (n=5) : ont reçu en intrapéritonéale (i.p) 100 µL d'une suspension de 10⁶ cellules/ml de *S. marsecens*,

II. 1. 3. Etude histologique

Les organes prélevés furent découpés puis fixés dans du formol tamponné à 4% pendant 24h. Les pièces ont été déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène.

Des blocs ont été confectionnés, après imprégnation des fragments fixés à la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été faites à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (Martoja et Martoja, 1967).

Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope muni de caméra numérique. Les protocoles histologiques sont décrits en détail dans l'**annexe 2**.

II. 1. 4. Etude de formules sanguines par coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG)

L'étude fine des Formules sanguines se fait au microscope après coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG).

Une goutte de sang, prélevé sur tube EDTA, est étalée uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules. Le frottis est ensuite séché rapidement à l'abri des poussières. Il est ensuite fixé par May-Grünwald pendant 3 min puis coloré par Giemsa pendant 15 min et lavé à l'eau courante. Les lames sont séchées puis observées au microscope grossissement Gx100 et Gx400.

II. 2. Etude de l'effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* sur les entérobactéries

II. 2. 1. Extraction éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* et de *Moringa oleifera*

L'extraction de nos plantes a été réalisée par une méthode simple et adéquate appelée Soxhlet, Depuis le labo de chimie de l'université de Blida1 C'est une méthode qui permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec un solvant frais, dans notre cas nous avons utilisé l'éthanol.

Tout d'abord, après avoir pesé la masse désirée de chacune de nos plantes, nous l'avons introduite dans des cartouches poreuses entre autres du papier filtre qu'on insère ensuite dans l'extracteur. Ensuite, on a fixé fermement le ballon contenant de l'éthanol à l'aide d'une pince, puis on a placé l'extracteur contenant la cartouche sur le ballon. Enfin, nous avons ajusté le réfrigérant à eau sur l'extracteur et pour finir on allume le système de chauffage dont le ballon est inséré.

Le principe : Le solvant se vaporise par le tube de distillation pour se recondenser dans la chambre d'extraction dans le but de solubiliser les composés organiques de notre plante.

Après la montée du solvant dans la chambre d'extraction, et qu'il sera supérieur de la hauteur au niveau du coude du siphon, se poursuit la vidange qui se caractérise par la descente du solvant ainsi que l'extrait dans la chambre de stockage à savoir le ballon. La deuxième étape est l'évaporation par rotavapeur qui est un évaporateur rotatif qui permet de réaliser une distillation simple sous pression réduite, le but de cette étape est de séparer le solvant des autres constituants ou d'éventuels impuretés après la phase organique de l'extraction.

Figure de l'appareillage **en annexe**

II. 2. 2. Etude de l'activité antioxydante *in vitro* des feuilles de *Moringa oleifera* et de *Artemisia annua*

L'effet antioxydant de l'EEM et de l'EEA a également été étudié. Le pouvoir antioxydant d'un composé définit sa capacité à empêcher l'oxydation d'un autre. L'activité antioxydante de L'EEM a été mesurée par le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette molécule possède un électron non apparié au niveau de son atome d'azote et reste stable sans former de dimère. Ce composé se caractérise par sa coloration violette et absorbe à 517nm. La recombinaison de ce radical entraîne une décoloration du violet en jaune. Ce test consiste donc à mesurer cette décoloration induite par la réduction du DPPH radicalaire (forme recombinée) par les extraits végétaux. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Majhenic, et al., 2007**).

L'effet de l'EEM et de l'EEA brut sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**. Un volume de 500 µL de différentes concentrations de l'extrait (62.5, 125, 500, et 1000µg/ml) est ajouté à 500 µL de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/L) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 1000 µL de méthanol avec 1000 µL d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Après incubation à l'obscurité pendant 30min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Tous les essais ont été effectués deux fois afin de vérifier la reproductibilité.

Les résultats sont exprimés en terme pourcentages d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition du DPPH} = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait.

L'IC₅₀ (*inhibitory concentration 50%* ; concentration inhibitrice à 50 %) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées.

II. 2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* et de *Moringa oleifera* sur les entérobactéries

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. Pour préparer l'inoculum, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont prélevées à l'aide d'une anse en platine puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland, soit une densité optique égale à 0,08 à 0,10, lue à une longueur d'onde de 620 nm correspondant à 10⁸ UFC/ml (**Fertout-Mour et al., 2016**).

➤ Préparation des dilutions des extraits

La solubilisation des extraits est faite dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO à 5%). Ce dernier a été testé vis-à-vis de chaque type de souche bactérienne et aucune inhibition n'a été observée. Pour chacun des 2 extraits, une solution mère à 100µg/ml est obtenue. Ces solutions mères sont diluées progressivement dans le DMSO afin de préparer, pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 30 et 60µg/ml. Les solutions issues de chaque type d'extrait ainsi que les solutions mères sont ensuite utilisées pour la détermination de leurs activités antibactériennes.

➤ Technique de diffusion en milieu gélosé

Le test de la sensibilité des bactéries est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques dont le principe est inspiré de l'antibiogramme visant à tester la sensibilité des souches bactériennes par diffusion de l'extrait sur le milieu solide créant ainsi un gradient de concentrations entre le composé et le microorganisme ciblé.

Dans des boîtes de Pétri stériles, 20 ml de gélose (Muller Hinton) sont coulés. Après solidification, sur chaque milieu de culture 1 ml de suspension bactérienne de 10⁶ UFC/ml a étéensemencé sur toute la surface. Des disques en papier Whatman N°1 stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés des solutions aux différentes concentrations (30, 60 et 100µg/ml) et

disposés à la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 h.

➤ **Expression des résultats**

La détermination de l'activité antibactérienne est estimée par la mesure, à l'aide d'une règle, du diamètre (mm) de la zone d'inhibition induit par les différentes concentrations autour des disques. Chaque expérience est répétée trois fois, en même temps et au même endroit. Les résultats sont symbolisés par des signes suivant la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits testés : (-) : résistant ($\emptyset < 08$ mm), (+) : Sensible ($09 < \emptyset < 14$ mm), (++) : Très sensible ($15 < \emptyset < 19$ mm) et (+++) : Extrêmement sensible ($\emptyset > 20$ mm) (**Ponce et al., 2003**). Des essais témoins sont effectués *in vitro* pour le DMSO sur chacune des souches bactériennes utilisées.

II. 3. Effet d'*Artemisia annua* et de *Moringa oleifera* sur la formation de Biofilm

Les biofilm sont recherchés à partir d'une culture bactérienne d'une nuit à 37 °C dans du LB. Une dilution au 1/100 est réalisée (dans 200µL de LB), puis déposée dans une microplaque de 96 puits et incubée une nuit à 37 °C. Les biofilms sont colorés au cristal violet (1%) ; Le colorant est solubilisé avec de l'éthanol absolu et mesuré par spectrophotométrie à 590nm. L'effet de l'EEM et de l'EEA sur la formation de biofilm est mesuré en incubant les bactéries de la microplaque en présence d'une concentration de 100µg/ml des extraits végétaux. Ainsi, nous recherchons si l'EEM et l'EEA ont un effet sur la première étape de la formation de biofilm, à savoir l'attachement. L'intensité du biofilm formé est lue comme suit :

- DO > 0.5 : Biofilm de forte intensité.
- 0.1 < DO < 0.5: Biofilm de moyenne intensité
- DO < 0.1 : Biofilm de faible intensité.

Les souches de référence *E. coli* ATCC 25922 ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été testées pour leur capacité à former un biofilm. L'effet de l'EEM et l'EEA sur ces souches a aussi été testé dans les mêmes conditions que les souches sauvages.

III. Etude statistique

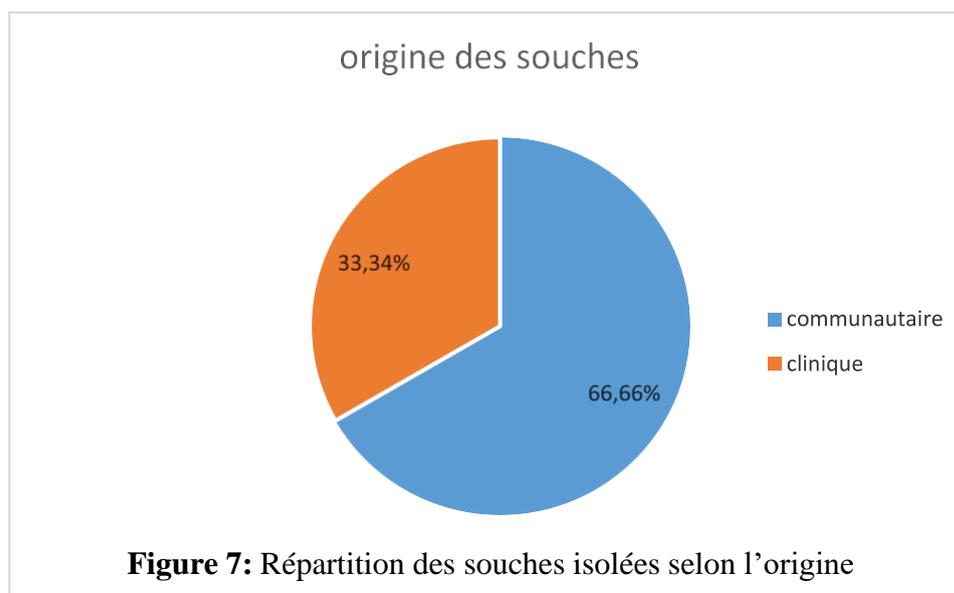
Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Le logiciel GraphPad Prism v. 6.0 est utilisé pour analyser les données.

Le test ANOVA unidirectionnel avec un test *post hoc* de Tukey est utilisé pour comparer les différences entre les groupes, avec $P < 0,05$ étant considéré comme statistiquement significatif.

I. Etude de quelques paramètres épidémiologiques

I. 1. Répartition des souches bactériennes selon l'origine nosocomiale ou communautaire

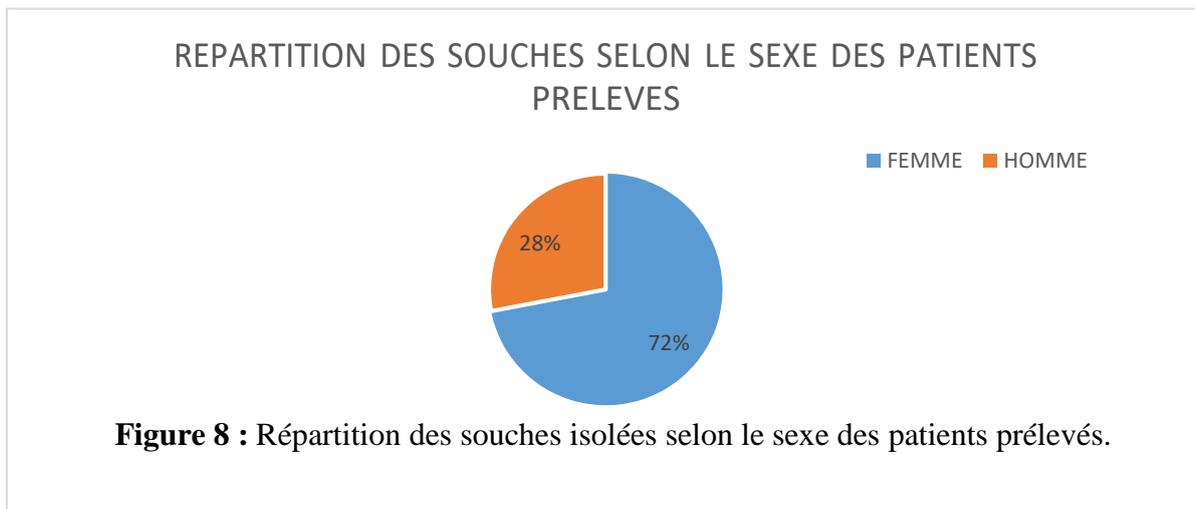
Dans notre étude, nous avons travaillé sur 54 souches dont 36 (66.66%) étaient d'origine communautaire et 18 (33.34%) d'origine clinique (**Figure 7**).



Nos résultats sont similaires à ceux de **Lahlou et al. (2009)**, **Sheerin (2011)** et **Oladeinde (2011)**, qui rapportent que la majorité de leurs échantillons sont d'origine communautaire. Deux tiers de la population étudiée étaient d'origine communautaire. La propagation des infections d'origine bactérienne n'est plus limitée au milieu clinique. Elle s'étend bien au-delà du milieu hospitalier, et représente ainsi un danger de plus en plus grandissant pour la santé publique. D'après l'OMS, les infections nosocomiales ne comptent que 7-10% des mortalités. *E. coli* et *K. pneumonia* sont les deux souches les plus isolées dans les infections à entérobactéries. *E. Coli* est particulièrement isolée dans la communauté (**Allocati et al., 2013**).

I. 2. Répartition des souches bactériennes selon le sexe

Nous n'avons pu identifier le sexe de l'ensemble des patients prélevés. Le sexe n'était pas mentionné dans les fiches pour 8 d'entre eux. Pour ce qui est du reste, les résultats montrent que les souches isolées étaient prédominantes chez les femmes (n=33,71.73%) comparés aux hommes (n=13 ; 28.26%) avec un ratio H/F de 0.4 (**Figure 8**).



La prépondérance de souches prélevées de patient de sexe féminin (n=33) correspond à la dominance des infections bactériennes urinaire d'*Enterobacteriaceae* chez les femmes. Ceci est dû à plusieurs facteurs de risque présents chez les femmes. Parmi les facteurs qui peuvent rendre la femme plus sensible aux infections urinaires nous retrouvons, la structure anatomique de l'appareil urogénital, la grossesse, les rapports sexuels, les altérations post-ménopausiques de la flore vaginale et l'évacuation incomplète de la vessie (Sheerin, 2011 ; Lahlou et al., 2009).

I. 3. Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement

La majorité des souches étaient isolées à partir des urines (n=35 ; 70%) (Figure 9). La majorité était d'origine communautaire (n =35 ;100 %). Les souches issues du pus (n=5 ; 10%), de la muqueuse anale (n=6 ; 12%) et du sang (n=4 ; 8%) étaient quasi-exclusivement d'origine clinique.

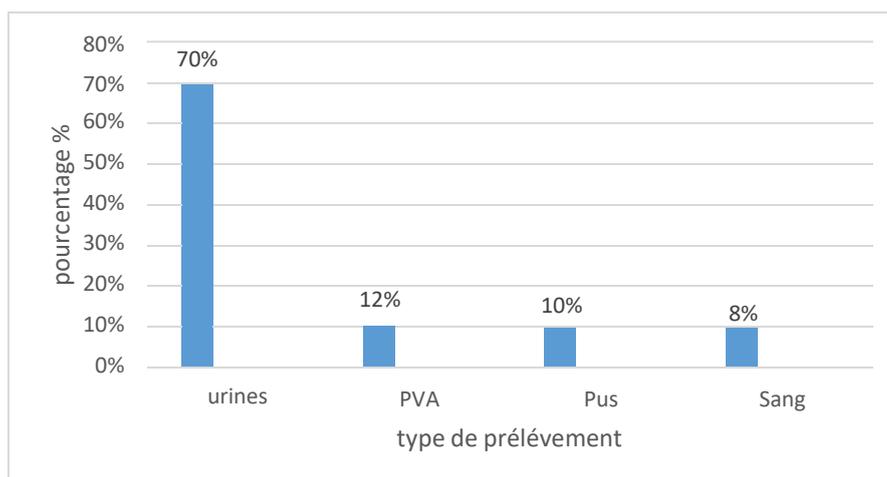


Figure 9: Répartition des souches selon le type de prélèvement

Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature concernant des études épidémiologique. En effet, **Lahlou et al. (2009)** indique que, sur 6000 ECBU réalisés, 70% étaient d'origine communautaire. Les mêmes résultats ont été rapportés par **Oladeinde et al. (2011)** et **Sheerin (2018)**.

Nous constatons que la majorité des souches était d'origine urinaire, ce qui révèle la prévalence statistique des infections urinaires dans cette étude. Les infections des voies urinaires sont parmi les infections les plus fréquentes en pratique clinique dans le monde. (**Öztürk et Murt, 2020**).

Dans le même contexte, dans une étude effectuée en 2018 en Uganda, il a été rapporté que sur un total de 267 échantillons, 32.2% était d'origine urinaire avec la dominance de l'espèce *E. coli* (41.9%) (**Odoki., 2019**).

Ces données similaires à ce que nous avons observées dans notre étude, indiquent qu'il existe une propagation pandémique des infections d'origine urinaires communautaires, en raison du manque de ressources, d'hygiène ainsi qu'à des facteurs biologiques comme la résistance antimicrobienne dans ces niches.

I. 5. Répartition des souches bactériennes selon l'espèce

Les cultures positives obtenues ont été soumises à des tests d'orientation ainsi qu'à une identification biochimique par les galeries miniaturisées API. Les 54 souches bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ont été identifiées au moins jusqu'au genre. Plus de la moitié des souches (n=30 ; 55.55%) étaient de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Les autres

espèces identifiées étaient *E. coli* (n=15 ; 27.77%), *Serratia marcescens* (n=4 ; 7.4%), *Citrobacter spp.* (n=3 ; 5.55%) et *Enterobacater spp.* (n=2 ; 3.7%) (**Tableau I**).

Les espèces identifiées ont été réparties selon la nature du prélèvement. Les résultats de cette répartition montrent que l'espèce dominante, à savoir *K. pneumoniae*, était souvent isolée des urines (n=16 ; 55.17%) dont l'intégralité étaient d'origine communautaire. Les autres klebsielles étaient isolées du sang (n=4 ; 13.79%), de la muqueuse anale (n=5 ; 17.24%) et du pus (n=3 ; 10.34%). La quasi-totalité des souches d'*Escherichia coli* étaient d'origine urinaire (n=13, 92.85%).

Tableau I: Répartition des souches d'entérobactéries selon le type de prélèvement

Espèce	Urines	Sang	Pus	Prélèvement anal
<i>K. pneumoniae</i> (n=30)	16	4	3	5
<i>E. coli</i> (n=15)	13	0	0	1
<i>S. marcescens</i> (n=4)	1	0	2	0
<i>Citrobacter spp.</i> (n=3)	3	0	0	0
<i>Enterobacter spp.</i> (n=2)	2	0	0	0

La plupart des études épidémiologiques indiquent que l'espèce la plus isolée dans les infections urinaires c'est *E. coli*. C'est le cas des travaux de **Lahlou et al. (2009)**, **Larabi et al. (2003)** ainsi que celle de **Odoki (2019)**, qui rapportent des taux respectifs de 72% et 69.5%. *E. coli* est l'espèce dominante dans les infections urinaires communautaires, avec une prédisposition à l'infection chez les femmes et les personnes âgées. Elle est souvent caractérisée par un profil de résistance aux antibiotiques et de virulence assez marquée lui permettant de coloniser l'épithélium urinaire (cystite), parfois de le traverser pour se retrouver dans les reins (pyélonéphrite) **Oladeinde et al. (2011)**.

La virulence de *E. coli* dans les infections urinaire est dû à l'expression des facteurs de virulence liés à la pathogénicité des ExPEC. Ils sont nombreux et ont un large éventail d'activités, qu'ils soient liés à la colonisation bactérienne, à ceux liés à la virulence, en passant par les adhésines, les toxines, les facteurs d'acquisition du fer, les lipopolysaccharides, les capsules de polysaccharides et les invasines. Ces facteurs sont codés par des gènes présents dans des îlots de pathogénicité (PAI), des plasmides et autres éléments génétiques mobiles **Sorwanska et al. (2019)**.

II. Etude phénotypique du profil de sensibilité aux antibiotiques

Dans ce volet, les niveaux de sensibilité à différentes molécules antibiotiques ont été évalués par la technique de l'antibiogramme. Nous nous sommes intéressés, uniquement, au profil de sensibilité aux antibiotiques de la famille des β -lactamines.

Nous avons remarqué que les taux de résistance les plus élevés, dans la famille des β -lactamines, tel représentait dans la figure... étaient vis-à-vis de l'ampicilline (n=49 ; 94.23%). Suivi par la Céfazoline (n=30 ;58%), l'amoxicilline (n=23 ;44.23%) et le Céfotaxime (n=22 ;42.30%).

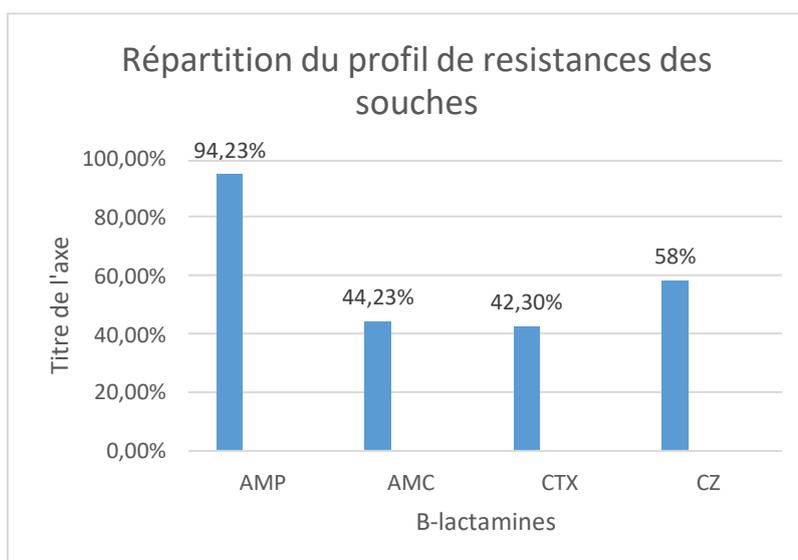


Figure 10: histogramme représentant la répartition du profil de résistance des souches

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur en Algérie, ainsi que dans le monde entier. Une augmentation accrue de la résistance est observée chez les bacilles à Gram négatifs ces dernières années (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**). L'utilisation empirique des antibiotiques pour la prise en charge des infections est en partie responsable de l'émergence de bactéries ainsi qu'à leur résistances naturelles ou acquises, ne sont sensibles qu'à un petit nombre de familles ou de sous familles d'antibiotiques (**Ntock et al., 2021**). Des résultats similaires aux nôtres ont été décrits dans les études de **Canton et Coque (2006)** et **Nachimuthu (2021)**, où la résistance s'étendait bien au-delà des antibiotiques communs et où plusieurs phénomènes de synergie entre les disques en été notés.

Par ailleurs, dans notre étude nous avons révélé un phénotype encore plus inquiétant ; il s'agit de la production de β -lactamases à spectre élargi. En effet, 24 souches d'entérobactéries, soit 44.44%, présentaient un phénotype BLSE, qui s'est traduit par une image de synergie entre

le disque d'AMC et de CTX ou CRO (**Figure 11**). Ci-dessous un histogramme présentant le pourcentage du profil de résistance des BLSE (**Figure 12**).

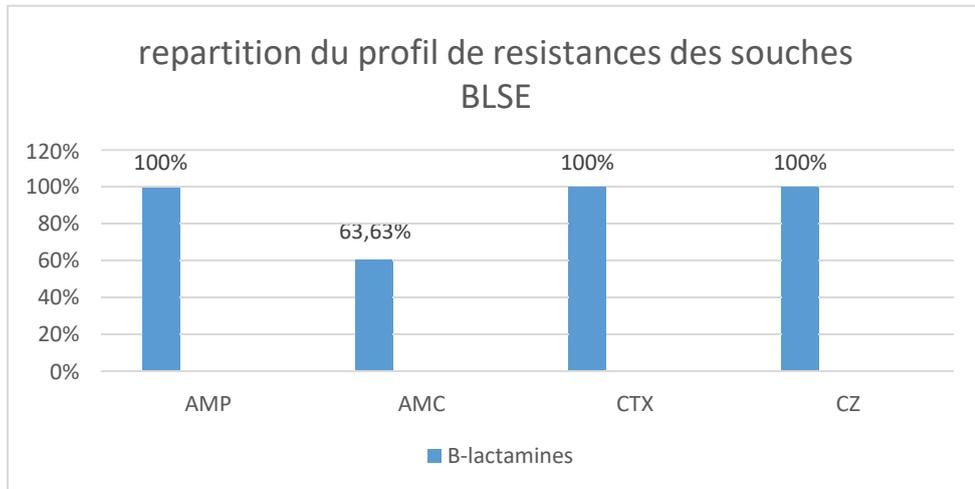


Figure 11 : Répartition du profil de résistance des souches BLSE



Figure 12 : Synergie entre les disques d'antibiotique AMC et CTX

Ces résultats nous ont permis de répartir nos souches dans 2 groupes, phénotypiquement différents :

- Souches productrices de β -lactamases à spectre élargi dites « BLSE » au nombre de 24 soit 44.44% des souches.

- Souches non productrices de β -lactamases à spectre élargi dites « non BLSE » au nombre de 30 soit 55.55%.

Il est important de noter que la majorité des souches BLSE étaient d'origine clinique (n=16 ; 66.66%). La différence est très hautement significative avec les souches BLSE d'origine communautaire ($P= 0.0001$).

La propagation des β -lactamases à spectre étendu parmi les bactéries à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires est un défi important pour les cliniciens, qui doivent adapter leur protocole thérapeutique et souvent avoir recours aux molécules dites de « réserve ». L'émergence des souches d'entérobactéries productrice de BLSE dans la communauté, tout particulièrement le type CTX-M, est l'un des changements épidémiologiques les plus importants dans le domaine des maladies infectieuses au cours de ces dernières années **Rodríguez-Baño et Pascual, (2008)**. En octobre 2015, LOMS a mis en point le GLASS, un système de surveillance, de prévention et de control des agents multirésistants à l'échelle globale. **(OMS., 2015)**. En effet, ces dernières années, la résistance aux antibiotiques a viré d'un souci clinique à une crise sanitaire majeure, avec une propagation explosive des BLSE de type CTX-M. Ces enzymes confèrent une résistance à presque toutes les β -lactamines, dont les C3G, le premier recourt des patients atteints d'infections à entérobactéries **Dubois et al., (2009)**. De plus, les gènes BLSE sont plasmidique et possèdent un environnement génétique favorable à leur transfert d'une cellule à une autre **Nachimuthu R et al., (2021)**. Les gènes *bla_{CTX-M}* sont prédominants dans la famille des gènes codant les BLSE. Ils sont activement impliqués dans la transmission de la résistance à la troisième/quatrième génération **Livermore, (2012)**.

III. Etude du potentiel de virulence des souches cliniques d'entérobactéries

III. 1. Croissance des bactéries en présence de sérum humain

Nous avons analysé la croissance bactérienne dans du sérum humain avec une méthode qualitative, la méthode des spots. Les résultats indiquent que la majorité des souches (n=45 ; 83.3%) étaient capable de croître en présence de sérum, seules 9 souches en étaient sensibles (16.66%) **(Figure 13)**.

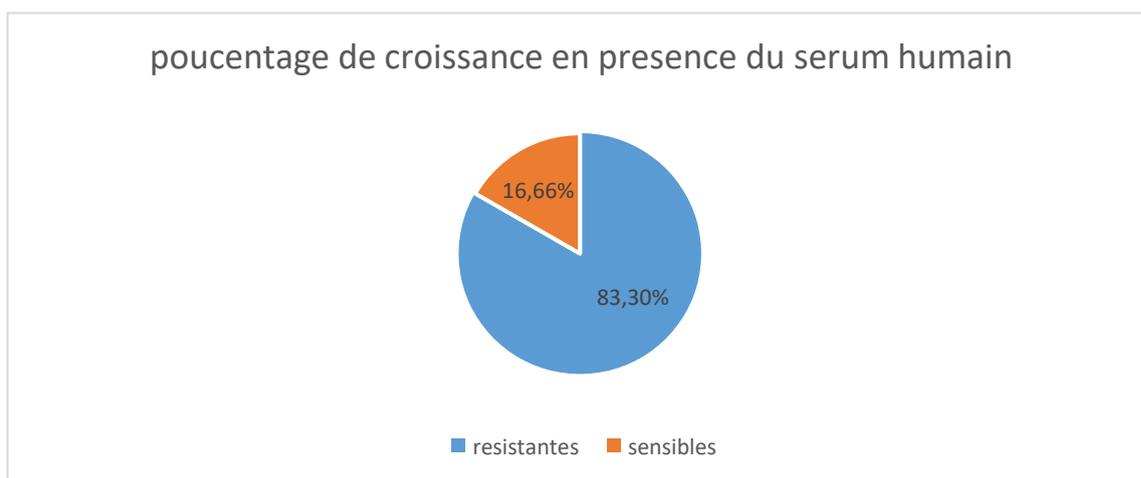


Figure 13 : Effet bactéricide du sérum humain sur les souches de notre collection

Les souches résistantes ont donc échappé à l’action des protéines du complément présentes dans le sérum humain. Même si 7 des souches sensibles étaient de phénotypes Non BLSE, la différence entre les 2 groupes concernant ce paramètre, était non significative avec une valeur $P=0.2702$.

La résistance au complément est fortement corrélée à la capacité de survie systémique, de multiplication et de propagation d'un large éventail d'agents pathogènes à Gram négatif, y compris les *Enterobacteriaceae* (Lambris et al., 2008). Elle soutient le pouvoir infectieux des entérobactéries. Parmi les 29 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 26 étaient résistantes au sérum humain. Plusieurs facteurs contribuent à cette virulence tout particulièrement la capsule. Au niveau génomique, plus de 90 gènes ont été liée à la virulence de cette espèce. Certains d’entre eux lui permettent d’échapper à l’action bactéricide du complément (*rfah*, *Ipp* et *arnD*) (Short et al., 2020). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cet échappement. L’échec de l’activation d’une des voies par exemple, la dégradation des protéines du complément ainsi que le ‘*Highkacking*’ des inhibiteurs tel que les Facteur I et H ou le C1inh qui ont but de désactiver et régulé les trois voies (Short et al., 2020 ; Lambris et al., 2008).

III. 2. Développement d’un modèle de sepsis monobactérien sur des souris BALB/c

Dans une étude antérieure, la dose létale 50 ou « DL50 » d’une des souches de notre collection a été mesurée. Il s’agit de *S. marcescens* isolée à partir d’une prothèse biliaire d’un patient cancéreux. Le test de survie fut réalisé sur modèle murin utilisant des souris BLAB/C.

Trois concentrations ont été testées : 10^6 , 10^7 et 10^8 CFU. Chaque lot se composait de 6 souris. La DL50 a été estimée entre 10^7 et 10^8 UFC/100 μ L.

En se basant sur les résultats de la pathogénicité de *S. marcescens*, la dose que nous avons choisie pour induire le sepsis est une dose sub-létale de 10^6 UFC/ml qui induit une mortalité de 16,66%, un taux similaire de celui observé chez les patients septiques.

III. 2. 1. Effet de *S. marcescens* sur le poids des souris et des organes

Le sepsis peut être caractérisé par une perte de poids significative. Une perte probablement due à une forte consommation d'énergie par l'organisme pour combattre l'agent pathogène.

Les résultats de notre étude montrent que le poids des animaux reste inchangé après 24h de traitement (**Figure 14**). Nos résultats sont différents des travaux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** dans d'autres modèles de sepsis. Ces résultats pourraient être expliqués par le délai de traitement qui était court (24h) mais suffisant pour induire un sepsis.

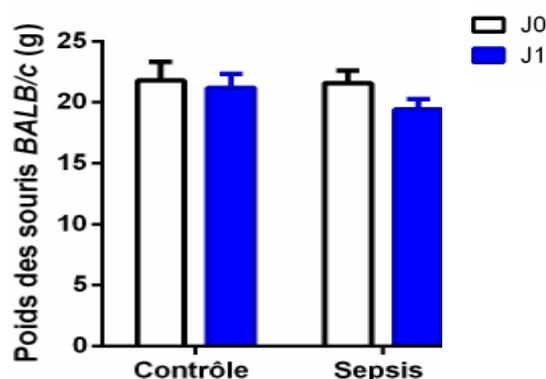


Figure 14 : Effet du sepsis sur le poids des souris BALB/c à J0 et à J1.

Cependant, nous avons observé une augmentation du poids du coeur et de la rate chez les souris septiques (**Figure 15**). Ces résultats reflètent une hypertrophie cardiaque et une splénomégalie induite par le sepsis. Ces résultats concordent avec ceux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** qui ont démontré, dans différents modèles de sepsis, une hypertrophie cardiaque après 24h. L'hypertrophie cardiaque suggère une dilatation et une altération des propriétés contractiles ventriculaires tandis que la splénomégalie de la rate, organe lymphoïde secondaire, suggère une augmentation du volume de la rate signe de réponse immunitaire et inflammatoire.

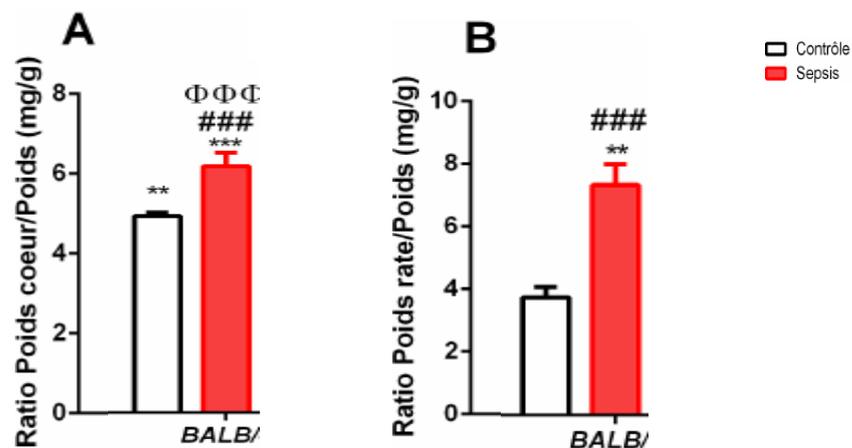


Figure 15 : Effet du sepsis sur le poids du coeur et de la rate. A, ratio poids du coeur/ poids des souris. B, ratio poids de la rate/ poids des souris

III. 2. 2. Effet de *S. marcescens* sur le taux de leucocytes et lymphocytes sanguins

Les souris septiques présentaient des taux de leucocytes et de lymphocytes supérieurs au contrôle. Le sepsis augmente de 84,4 % et de 132,26% les taux respectifs de leucocytes ($8,85 \pm 1,65 \times 10^9/L$) et de lymphocytes ($7,2 \pm 1,6 \times 10^9/L$) chez les souris BALB/c.

Ces résultats corroborent ceux du frottis sanguin qui montrent une augmentation du taux de leucocytes chez les souris BALB/c septique mais pas chez les souris contrôle (**Figure 16**).

Plusieurs travaux indiquent des différences dans les fonctions immunitaires des souris BALB/c dans les conditions physiologiques. Des différences ayant une origine génétique qui détermine l'efficacité des réponses immunes anti-infectieuses et la sensibilité aux germes pathogènes propre à chaque souche murine (**Trunova et al., 2011 ; Sellers et al., 2012**). Une prédominance des réactions immunitaires humorales induites par les cellules T auxiliaires de type 2 (Th2), dans des conditions physiologiques ou pendant une stimulation antigénique, a été observée chez les souris BALB/c (**Trunova et al., 2011**). Les souris de ce profil sont largement utilisées dans les études concernant la relation entre les processus physiopathologiques et les caractéristiques génétiques du système immunitaire.

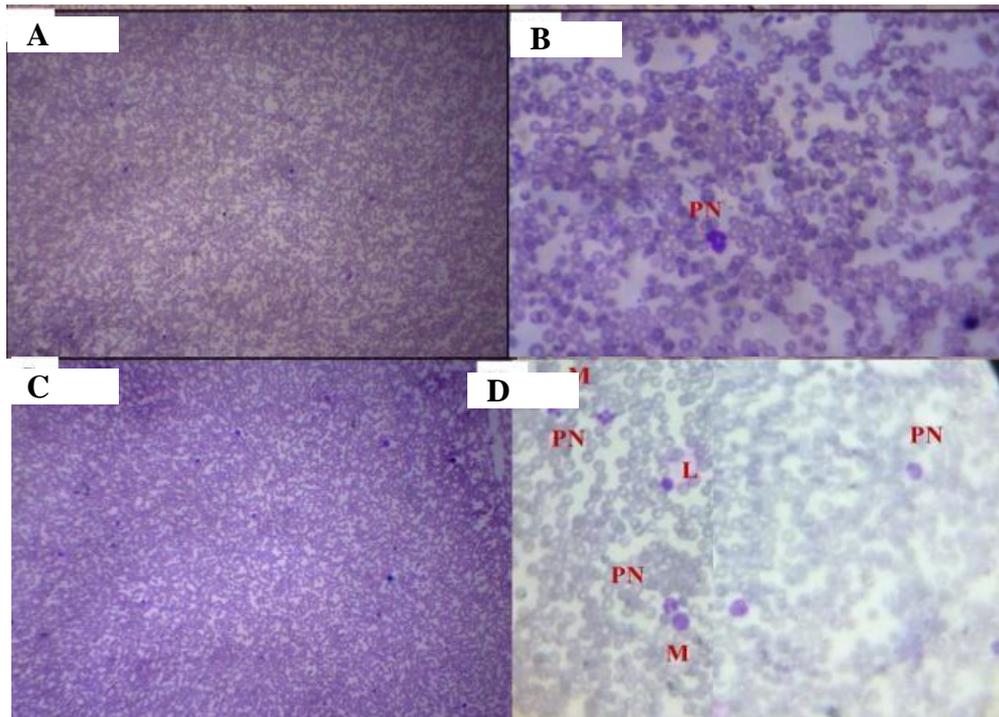


Figure 16 : Résultats de frottis sanguin, coloration MGG. A (Gx100) et B (Gx400): frottis de souris BALB/c contrôle. C (Gx100) et D (Gx400): frottis de souris BALB/c septiques.

III. 2. 3. Effet de *S. marcescens* sur l'histologie cardiaque

Les coupes histologiques du coeur des souris BALB/c septique montrent des anomalies structurales comparées au contrôle. Des dommages sévères sont observés caractérisés par une mort cellulaire par nécrose (**Figure 17**) avec une dégénérescence des fibres musculaires et une augmentation de l'espace intercellulaire, un oedème et une infiltration de polynucléaires (**Figure 18**). Une congestion de capillaires a été également observée traduisant une réponse inflammatoire au niveau cardiaque (**Figure 19**). La mort myocytaire représente une perte de tissu contractile et est responsable à la fois d'une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes restant (non lésé), et d'une fibrose de remplacement. Il serait donc intéressant de faire la coloration de trichrome de Masson dans le but de visualiser la fibrose.

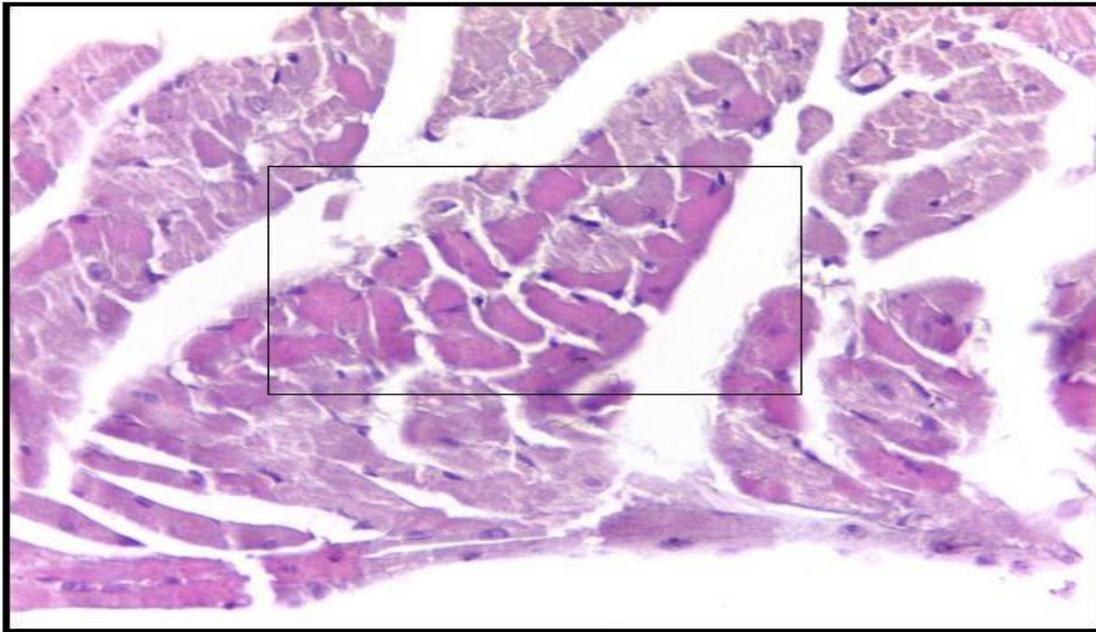


Figure 17 : souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx400). Groupe de cardiomyocytes en nécrose de coagulation : fibres hypercontractées, au cytoplasme éosinophile et homogénéisé. Les noyaux sont pycnotiques. (Encadré).

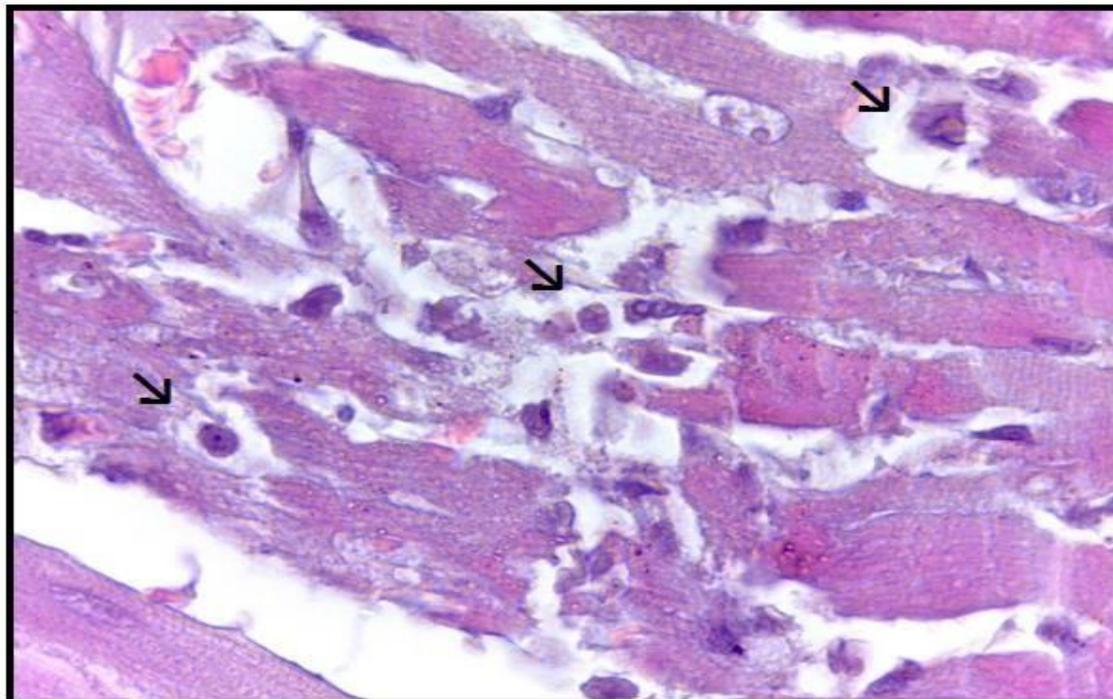


Figure 18 : Micrographie d'une coupe transversale du coeur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de liquéfaction, au cytoplasme infiltré de macrophages (↘)

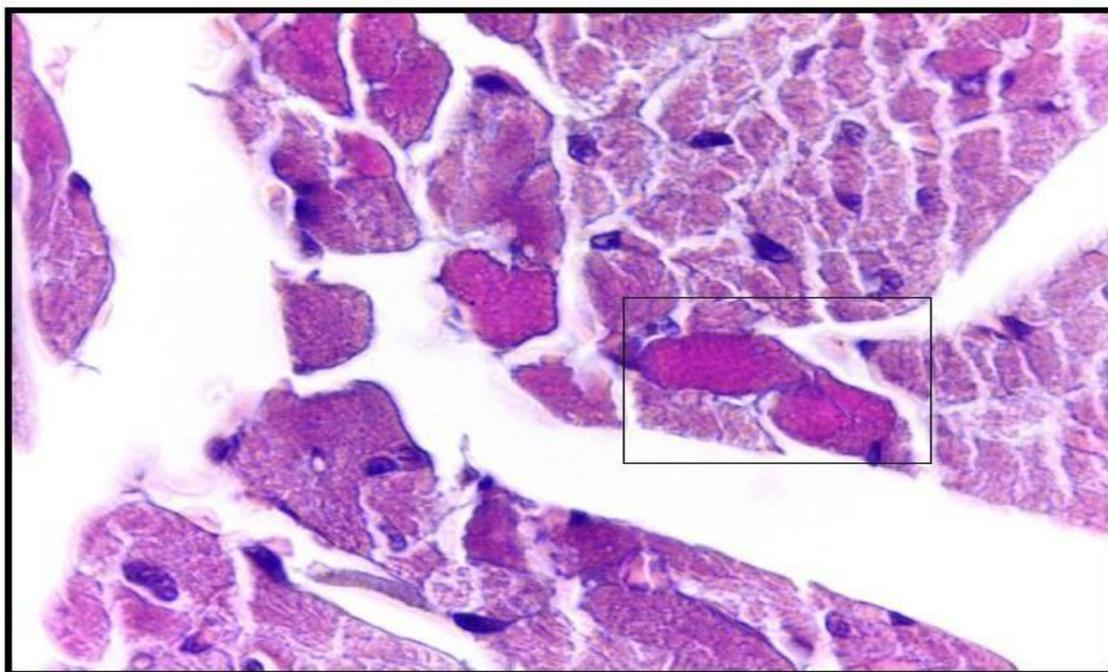


Figure 19: Micrographie d'une coupe transversale du coeur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de coagulation, au cytoplasme très éosinophile homogénéisé et sans limites nettes. (Encadré).

IV. Comparaison de l'effet antibactérien et antibiofilm de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* et *Moringa oleifera* sur les souches d'entérobactéries d'origine cliniques

IV. 1. Rendement de l'extraction éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* et *Moringa oleifera*

L'extraction de 250 g de poudre des feuilles de *Moringa oleifera* a produit un extrait éthanolique sec de 53.24g, soit un rendement de 21.29 %.

Dans l'étude de **Martinez-Correra et al. (2017)**, dont le but était d'extraire les composés bioactifs d'*Artemisia annua* avec des solvants différents. L'extraction éthanolique a permis d'obtenir 90 mg de composés phénoliques par gramme d'extrait. Les différentes concentrations d'éthanol dans le solvant d'extraction ont déterminé une variation du rendement d'extraction pour les espèces appartenant aux différentes classes chimiques. En effet, les anthocyanines, les flavanones et les flavanols ont été détectés de manière significative dans l'éthanol à 90 %. Les composés phénoliques à faible poids moléculaire et les stilbènes étaient

présents dans l'éthanol à 50 %. Enfin, l'éthanol à 25% a montré un bon rendement d'extraction pour les lignanes et les composés phénoliques à faible poids moléculaire **Abate et al. , (2021)**.

Le méthanol (80%) et l'éthanol (70%) se sont avérés être les meilleurs solvants pour l'extraction des composés antioxydants des feuilles de moringa, dans l'étude de **Siddhuraju et Becker (2003)**.

IV. 2. Résultats de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité anti-radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène et la forme non radicalaire, le DPPH-H est ainsi formée (**Bortolomeazzi et al. 2007**). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration de l'extrait utilisé et du témoin acide ascorbique (antioxydant de référence).

L'activité antioxydante de l'extrait est exprimée en IC50, qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH (**Abdulmajed et al., 2005; Ahmad et al., 2012; Ranga et al., 2009**). Plus la valeur de l'IC50 est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

L'étude de l'activité antioxydante de l'EEM, révèle que les substances bioactives produites par cette dernière sont capables de piéger les radicaux libres de DPPH et ont un pouvoir réducteur remarquable. L'EEM a montré une activité de piégeage des radicaux libres DPPH de 35,82 à 74,55 % à 0,05 à 0,5 mg/mL respectivement par rapport à l'acide ascorbique qui a montré une activité de 41,98 à 88,53 % à une concentration de 0,05 à 0,5 mg/mL, respectivement.

La concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH est de 160µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL. L'activité antioxydante de l'extrait était proportionnellement liée à la composition de métabolite secondaire et liée de concentration de composés bioactifs.

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait d'artemesia, révèle que les substances bioactives produites par cette dernière sont capables de piéger les radicaux libres de DPPH et ont un pouvoir réducteur remarquable. L'extrait d'artemesia a montré une activité de piégeage des radicaux libres DPPH de 35,05 à 81,85 % à 0,05 à 0,5 mg/mL respectivement par rapport à l'acide ascorbique qui a montré une activité de 41,98 à 88,53 % à une concentration de 0,05 à 0,5 mg/mL, respectivement.

La concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH est de 110µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL.

L'activité antioxydante de l'extrait était proportionnellement liée à la composition de métabolite secondaire et liée de concentration de composés bioactifs.

IV. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de d'*Artemisia annua* et de *Moringa oleifera* sur les entérobactéries

Nous avons testé l'activité antibactérienne à différentes concentrations de l'EEM et de l'EEA (30µg/ml, 60µg/ml, 100µg/ml ainsi que l'extrait brut). Les résultats révèlent des zones d'inhibition à partir de 30 µg/ml (**Figure 20**). Le nombre de souches sensibles et le diamètre d'inhibition était proportionnel à la concentration en EEM. En effet, nous sommes passés de 6 souches sensibles à 30 µg/ml à 28 souches sensibles à l'extrait brut de l'EEM. Le diamètre d'inhibitions était supérieur ou égal à 8mm.



Figure 20 : Résultats du test d'activité antibactérienne de différentes concentrations d'EEM et EEA

Par manque de consommable et de milieux de culture, seules 32 souches ont été testées pour leur sensibilité à l'extrait brut.

Le nombre de souches sensibles et le diamètre d'inhibition était proportionnel à la concentration en EEA. En effet, nous sommes passés d'une seule souche sensible à 30 µg/ml à 26 souches sensibles à l'extrait brut de l'EEA . Le diamètre d'inhibitions était supérieur ou égal

à 8 Par manque de consommable et de milieux de culture, seules 32 souches ont été testées pour leur sensibilité à l'extrait brut.

Le nombre de souches sensibles et le diamètre d'inhibition était proportionnel à la concentration en EEA. En effet, nous sommes passés d'une seule souche sensible à 30 µg/ml à 26 souches sensibles à l'extrait brut de l'EEA. Le diamètre d'inhibitions était supérieur ou égal à 8mm.

Les deux extraits éthanoliques ont donner des résultats positifs par rapport à la sensibilité des souches, à partir de différentes concentrations en allant de 30 µg/ml jusqu'à l'extrait brute des deux plantes, cependant il est important de noter que le nombre de souche ayant une sensibilité à l'EEM est plus important de ceux sensible à l'EEA.

Récemment il a été rapporté par **Feng et al. (2020)** d'une étude réalisée par **Habibi et al. (2013)** que l'huile essentielle française d'*Artemisia annua* n'a montré aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, alors que les huiles essentielles roumaine, italienne et chinoise ont toutes montré une activité antibactérienne. Les profils chimiques de l'huile essentielle variaient beaucoup. Le camphre, cétone et 1,8-cinéole étaient les principaux composants de l'huile provenant des parties aériennes de cette plante. Concernant l'huile essentielle obtenue à partir des graines de *A. annua*, le trans-3(10)-carène-4-ol était le composant le plus abondant. Le camphre n'a pas été détectée.

Pawar et al. (2015) en Inde ont réalisé une étude sur de l'activité antibactérienne des feuilles d'*Artemisia annua*, à partir d'une extraction au soxhlet par solvant méthanolique. L'activité testait à une concentration de 50mg/ml de l'extrait, a eu pour résultats 16mm de diamètre d'inhibition pour la *Klebsiella pneumoniae*. Les activités biologiques d'un extrait dépendent de nombreux facteurs notamment de la géographie et son climat, parties de la plante utilisées, différences génétiques et processus de culture, la méthode d'extraction ainsi que les solvants utilisés (**Septembre-Malaterre et al., 2020**).

Le potentiel des principes actifs des graines de *M. oleifera* a été exploré par **Mangale et al. (2012)**. Ils ont montré que le nombre de colonies bactériennes et fongiques sur les plaques diminuait avec l'augmentation des concentrations de l'extrait. Les modes d'extraction des principes actifs jouent un rôle dans l'efficacité des extraits de *M. oleifera* contre divers micro-organismes pathogènes. Par exemple, l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *M. oleifera* a montré une action antimicrobienne plus large que celle des extraits aqueux (**Donli et Dauda, 2003**).

IV. 4. Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Artemisia annua* et *Moringa oleifera* sur la formation de Biofilm

Dans la recherche de la formation de biofilm, par manque de moyen, seules 18 souches sensibles à l'EEM ainsi que l'EEA furent testées (16 souches sauvages et 2 souches de référence). Les résultats montrent que l'ensemble de ces souches pouvaient former un biofilm dont l'intensité fut mesurée par spectrophotométrie. Les biofilms formés étaient de forte (10 ; 55.55%) ou de moyenne intensité (8 ; 44.44%) avec des proportions similaires (**Tableau II**, **figure 21**). Il est important de noter que les souches de référence *E. coli* ATCC 25922 ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 formaient un biofilm, de moyenne (DO= 0.179) et de forte (DO=1.676) intensité respectivement.

TableauII : Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection

Intensité du biofilm (n, %)		
Faible	Moyenne	Forte
0 (0)	8 (47.05)	10 (52.94)

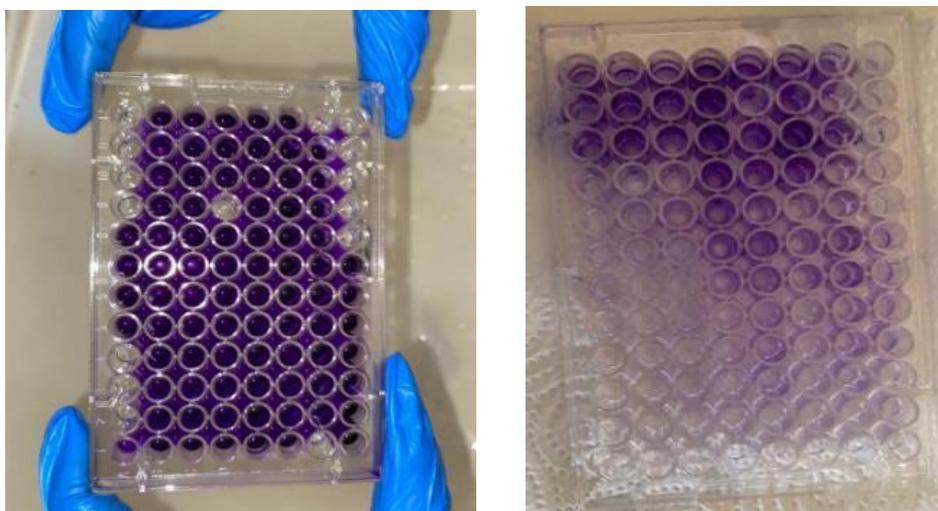


Figure 21: Méthode spectrophotométrique pour la mesure de l'intensité du biofilm formé

L'effet de l'EEM sur la formation de biofilm a été mesuré, en ajoutant cet extrait à T0 ; c'est-à-dire au moment où nous procédons à l'inoculation des microplaques avec notre culture bactérienne. La concentration de l'EEM était de 100 µg/ml. Il semblerait que l'EEM ait affecté

l'intensité du biofilm de 14 souches, dont la DO fut modifiée (soit en augmentant soit en diminuant), comme nous pouvons le constater dans le **Tableau III**

Tableau III : Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection en présence de l'EEM

Do			Intensité du biofilm (n, %)		
DO stable	DO diminuée	DO augmentée	Faible	Moyenne	Forte
2 (11.11)	8 (44.44)	7 (46.66)	2 (11.11)	7 (46.66)	9 (50)

Nous constatons d'après le tableau V que l'intensité du biofilm a basculé de moyenne/forte à faible pour 2 souches parmi les 18, en présence de l'EEM. L'extrait de moringa a diminué la DO des biofilms de 8 souches et l'a augmenté pour 7 autres parmi les 18 souches testées.

Tableau IV : Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection en présence de l'EEA

Do			Intensité du biofilm (n, %)		
DO stable	DO diminuée	DO augmentée	Faible	Moyenne	Forte
1 (5.55)	8 (44.44)	9(50)	2 (11.11)	3 (16.66)	13 (72.22)

Nous constatons d'après le tableau... que l'intensité du biofilm a basculé de moyenne/forte à faible pour une seule souche parmi les 18, en présence de l'EEA. L'extrait de l'Artemisia a diminué la DO des biofilms de 8 souches et l'a augmenté pour 9 autres parmi les 18 souches testées. Qu'il s'agisse de la moringa ou de l'Artemisia, ces 2 plantes semblent tantôt potentialiser la formation de biofilm tantôt l'inhiber. Des concentrations plus élevées doivent être utilisées pour, éventuellement, constater un effet négatif sur la formation de biofilm comme ce fut rapporté par certaines études. Il serait aussi intéressant d'introduire l'extrait après formation du biofilm (biofilm mature).

Marinas et al. (2015) ont rapporté une bonne activité antibiofilm de l'extrait d'*Artemisia*, inhibant à la fois le stade initial de l'adhésion des cellules microbiennes au substrat inerte et le biofilm mature. Ces effets étaient différents d'une souche microbienne à une autre. L'huile essentielle a inhibé l'expression des lipases chez *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *E. coli*, ainsi que les hémolysines d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*. Des facteurs directement impliqués dans la pathogenèse de ces bactéries. Ces effets antibiofilm seraient liés aux composants de l'extrait de la partie aérienne d'*Artemisia annua*. Citons par exemple le camphre, la cétone d'*Artemisia*, le 1,8-cinéole, l' α -pinène, le germacrène D, le trans- β -caryophyllène et l'*Artemisia* ketone (**Marinas et al., 2015 ; Feng et al., 2020**).

Notre travail avait pour objectif l'évaluation du potentiel antimicrobien, antioxydant et antibiofilm, des extraits des feuilles de la *Moringa olifeira* et l'*Artemisia annua*. Deux plantes au potentiel thérapeutique avéré. Les activités biologiques des 2 extraits ont été testées sur une collection de souches bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, et à l'origine de diverses infections chez l'homme. Nous avons caractérisé sur le plan phénotypique les profils de résistance aux antibiotiques et de virulence de ces souches.

Nos résultats révèlent des profils de résistance hétérogène marqués par la fréquence des souches de phénotype BLSE (44%). La quasi-totalité de ces souches ont exprimé une résistance au sérum, un caractère qui traduit une virulence potentielle. De plus, nous avons réussi à induire un sepsis au bout de 24h, dans modèle murin de souris BALB/c, en utilisant une souche de la collection (*S. marcescens*). Ce résultat indique que cette souche est capable d'induire une infection systémique (atteinte cardiaque et splénique) et donc possède un certain pouvoir pathogène.

Les extraits éthanoliques du *Moringa oléifera* et *Artemisia annua*, ont exprimé une activité antioxydante appréciable, révélé par le test DPPH. L'EEA et l'EEM ont eu un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Cette inhibition fut observée à partir de 30µg/ml de l'extrait, avec un avantage plus marqué pour l'EEM. De la même façon, nous avons constaté que ces extraits ont aussi un effet sur la formation de biofilm, tantôt en l'inhibant, tantôt en le potentialisant. L'effet potentialisant fut observé plus pour l'EEA.

L'ensemble de nos résultats ouvres à plusieurs perspectives prometteuses, qui incite à la considération de *Moringa oleifera* et *Artemisia annua* comme agent antioxydant et antiinfectieux, pouvant éventuellement constituer une bonne alternative aux thérapies classiques. En perspectives il serait intéressant de :

- Elargir l'étude avec des analyses bio-informatique en utilisant le Docking moléculaire par exemple.
- La modification des paramètres de l'étude et l'introduction de nouveaux paramètres biologique à analyser.
- S'approfondir sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets présentés par la *Moringa* et l'*Artemisia*.

1. **Abate, G., Zhang, L., Pucci, M., Morbini, G., Mac Sweeney, E., Maccarinelli, G., Mastinu, A. (2021).** Phytochemical Analysis and Anti-Inflammatory Activity of Different Ethanolic Phyto-Extracts of *Artemisia annua* L. *Biomolecules*, 11(7), 975.
2. **Abreu, Afonso G., and Angela S. Barbosa.** "How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing." *Frontiers in immunology* 8 (2017)
3. **Alesaeidi, S., & Miraj, S. (2016).** A Systematic Review of Anti-malarial Properties, Immunosuppressive Properties, Anti-inflammatory Properties, and Anti-cancer Properties of *Artemisia Annua*. *Electronic Physician*, 8(10), 3150–3155.
4. **Allocati, Nerino. Masulli, F. Alexeyev and Di Illio (2013).** *Escherichia coli* in Europe : An Overview. *Int J Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 6235-6254.
5. **Aniambossou, Victonie alidah sessi.** *Nécessité d'utiliser les tests biochimiques pour identifier les entérobactéries.* EPAC/UAC, 2016.
6. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000.** *Bactériologie clinique, Ellipses 2ième édition*, Paris, France, 602 p.
7. **Baba Ahmed-KaziTani, Z., & Arlet, G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169–178.
8. **Barthelemy.s, Buxeraud.j** *La vaccination, une démarche de santé publique in actualités pharmaceutiques*, vol, n 498 (septembre 2010) 2016-elsevier.
9. **Bhakuni, R. & Jain, D. & Sharma, R. & Kumar, Siddela. (2000).** Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Cur. Sci.* 80.
10. **Bora, K. S., & Sharma, A. (2010).** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmaceutical Biology*, 49(1), 101–109.
11. **Bradford, P. A. (2001).** Extended-Spectrum-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951
12. **Braun, V., Günther, H., Neuß, B. et al.** Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 141, 371–376 (1985). <https://doi.org/10.1007/BF00428852>
13. **Brisibe, E. A., Umoren, U. E., Brisibe, F., Magalhães, P. M., Ferreira, J. F. S., Luthria, D., Prior, R. L. (2009)**

14. **Brown, G. D. (2010).** The Biosynthesis of Artemisinin (Qinghaosu) and the Phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules*, 15(11), 7603–7698.
15. **Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A., 1995.** A functional classification scheme for lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.
16. **Cantón, R., & Coque, T. M. (2006).** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466–475
17. **Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., & Ed-Dra, A. (2015).** Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355–362.
18. **Croxen, Matthew A., Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska, and B. Brett Finlay. "Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli." *Clinical microbiology reviews* 26, no. 4 (2013): 822-880.**
19. **De Donno, A., Grassi, T., Idolo, A., Guido, M., Papadia, P., Caccioppola, A., ... Fanizzi, F. P. (2012).** First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(11), 696–700.
20. **Donli, P. O., & Dauda, H. (2003).** Evaluation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. *Pest Management Science*, 59(9), 1060–1062.
21. **Drame B., 2001.** Micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des enterobactéries : intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Senegal. 115 p.
22. **Falzon, C. C., & Balabanova, A. (2017).** Phytotherapy. Primary Care: Clinics in Office Practice, 44(2), 217–227.
23. **Farmer J.J., Boatwright K.D. & Janda J.M., 2007.** Enterobacteriaceae : Introduction and identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A.P faller (Eds.), *Manual of Clinical microbiology*, 669p.
24. **Fauchere J.L. & Avril J.L., 2002.** Bactériologie générale et médicale. *Ellipses Edition Marketing*. Paris, 260 p.
25. **Feng, X., Cao, S., Qiu, F., & Zhang, B. (2020).** Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacology & Therapeutics*, 107650.

26. **Ferreira, J.F. S. (2004).** Artemisia Annu L. The hope against Malaria and Cancer
27. **Freire, C.A., Santos, A.C.M., Pignatari, A.C. et al.** Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among *Escherichia coli* isolated from the bloodstream. *Braz J Microbiol* **51**, 447–454 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00224->
28. **Freney J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C., 2000.** *Precis de bacteriologie clinique. Editions ESKA, France, 1692 p.*
29. **Fu, C., Yu, P., Wang, M., & Qiu, F. (2020).** Phytochemical analysis and geographic assessment of flavonoids, coumarins and sesquiterpenes in Artemisia annua L. based on HPLC-DAD quantification and LC-ESI-QTOF-MS/MS confirmation. *Food Chemistry*, 312, 126070
30. **G.V. Carbonell, G.V. Carbonell a, H.H.M. Della Colleta a, T. Yano a;* , A.L.C. Darini b, C.E. Levy c, B.A.L. Fonseca. /FEMS Immunology and Medical Microbiology** **28 (2000)** 143^149
31. **Gadou V., 2019.** *Epidemiologie moleculaire des enterobacteries productrices de β -lactamases a spectre elargi resistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'abidjan, cote d'ivoire.* Thèse 2019-2020.
32. **Habibi, Z., Ghanian, S., Ghasemi, S., & Yousefi, M. (2013).** Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from seeds of Artemisia annua L. from Iran. *Natural Product Research*, 27(2), 198–200
33. **Hejazi, A., and F. R. Falkiner. "Serratia marcescens." *Journal of medical microbiology* 46.11 (1997): 903-912**
34. **Huang, L., Xie, C., Duan, B., & Chen, S. (2010).** Mapping the potential distribution of high artemisinin-yielding Artemisia annua L. (Qinghao) in China with a geographic information system. *Chinese Medicine*, 5(1), 18.
35. **Jenkins, Claire, Rentenaar, J. Rob , Landraud Luce and Brisse Sylvain Infectious Diseases**, 180, 1565-1578.e2
36. **Juteau, F., Masotti, V., Bessière, J. M., Dherbomez, M., & Viano, J. (2002).** *Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil. Fitoterapia*, 73(6), 532–535.

37. **Kang, Eugene, Alanna Crouse, Lucie Chevallier, Stéphanie M. Pontier, Ashwag Alzahrani, Navoun Silué, François-Xavier Campbell-Valois, Xavier Montagutelli, Samantha Gruenheid, and Danielle Malo.** "Enterobacteria and host resistance to infection." *Mammalian genome* 29, no. 7 (2018): 558-576.
38. **Ko, Y. S., Lee, W. S., Panchanathan, R., Joo, Y. N., Choi, Y. H., Kim, G. S., ... Kim, H. J. (2016).** Polyphenols from *Artemisia annua* L Inhibit Adhesion and EMT of Highly Metastatic Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1180–1188.
39. **Kurz CL, Chauvet S, Andrès E, Aurouze M, Vallet I, Michel GP, Uh M, Celli J, Filloux A, De Bentzmann S, Steinmetz I, Hoffmann JA, Finlay BB, Gorvel JP, Ferrandon D, Ewbank JJ.** Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J.* 2003 Apr 1;22(7):1451-60. doi: 10.1093/emboj/cdg159. PMID: 12660152; PMCID: PMC152903.
40. **Lahlou Amine, I., Chegri, M., & L’Kassmi, H. (2009).** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. *Antibiotiques*, 11(2), 90–96.
41. **Lahlou, I. Amine M. Chegri, and H. L’kassmi.** "Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès." *Antibiotiques* 11.2 (2009): 90-96.
42. **Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. 2008.** Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6:132–142.
43. **Larabi, K., Masmoudi, A., & Fendri, C. (2003).** Étude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d’infections urinaires dans un CHU de Tunis : à propos de 1930 cas. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33(7), 348–352.
44. **Livermore, D. M. (1995).** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584.
45. **Lubbe, A., Seibert, I., Klimkait, T., & van der Kooy, F. (2012).** Ethnopharmacology in overdrive: The remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 854–859.
46. **Mah, Thlen-Fah (2012).** *Future Microbiol.* 1061-1072. ISSN 1746-0913

47. **Mangale M ,&Chonde, Sonal &Raut, Prakash. (2012).** Study of Moringa oleifera (Drumstick) seed as natural Absorbent and Antimicrobial agent for River water treatment. Res. J. Recent Sci. 1.
48. **Marinas, I. C., Oprea, E., Chifiriuc, M. C., Badea, I. A., Buleandra, M., & Lazar, V. (2015).** Chemical Composition and Antipathogenic Activity of Artemisia annua Essential Oil from Romania. Chemistry & Biodiversity, 12(10), 1554–1564.
49. **Martinez-Correa, H. A., Bitencourt, R. G., Kayano, A. C. A. V., Magalhães, P. M., Costa, F. T. M., & Cabral, F. A. (2017).** Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of Artemisia annua L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. Industrial Crops and Products, 95, 535–542.
50. **Miajlovic H, Smith SG. 2014.** Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 354:1–9.
51. **Miajlovic, Helen., Smith, Stephen G. Smith. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 354, Issue 1, May 2014, Pages 1–9, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12419>**
52. **Mueller, M., Karhagomba, I., Hirt, H., & Wemakor, E. (2000).** *The potential of Artemisia annua L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. Journal of Ethnopharmacology, 73(3), 487–493*
53. **Nachimuthu R, Kannan VR, Bozdogan B, Krishnakumar V, S KP, Manohar P. CTX-M-type ESBL-mediated resistance to third-generation cephalosporins and conjugative transfer of resistance in Gram-negative bacteria isolated from hospitals in Tamil Nadu, India. Access Microbiol. 2020 Jun 11;3(3):000142. doi: 10.1099/acmi.0.000142. PMID: 34151148; PMCID: PMC8209704.**
54. **Neil S. Sheerin, Urinary tract infection, Medicine, Volume 39, Issue 7, 2011, Pages 384-389, ISSN1357 3039, <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.04.003>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303911000946>)**
55. **Nordmann, P., & Poirel, L. (2012).** Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(3), 487–489.

56. **Nordmann, Patrice., Naas Thierry et Laurent Poirel (2013).** Global Spread of Carbapenemases-producing Enterobacteriaceae. DOI: <https://dx.doi.org/10.3210/eid1710.110655>.
57. **Ntock, Ferdinand &Junette, Metogo&Tochie, JoelNoutakdie& Kona, Stephane&Ebongue, Marie &anaba, dominique&OkallaEbongue, Cecile&OwonoEtoundi, Paul &Luma, Henry &Minkande, Jacqueline. (2021).** Infections a bacteries multirésistantes a l’admission des patients dans un service de réanimation de douala. *La Revue de médecine.* 11. 1287-1291
58. **Oladeinde BH, Omoregie R, Olley M, Anunibe JA. Urinary tract infection in a rural community of Nigeria. N Am J Med Sci. 2011 Feb;3(2):75-7. doi: 10.4297/najms.2011.375. PMID: 22540069; PMCID: PMC3336890.**
59. **Pan Y-J, Lin T-L, Chen Y-H, Hsu C-R, Hsieh P-F, Wu M-C, et al. (2013)** Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by *wzc* Sequencing. *PLoS ONE* 8(12): e80670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080670>
60. **Paterson, D. L., &Bonomo, R. A. (2005).** Extended-Spectrum -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686.
61. **Pawar B, &Nirgude, Machindra&Shinde, Harshraj. (2015).** Antimicrobial Investigation of *Artemisia annua* Leaf Extract against Human Pathogenic Microorganisms. *International Journal of Agriculture Innovations and Research.* 3. 2319-1473.
62. **Podschun R. & Ullmann U., 1998.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens epidemiology,taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Review*,589-603.
63. **Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M. et al.** Biofilm formation by multidrug resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated from solid organ transplant recipients. *SciRep* 9, 8928 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45060-y>
64. **Rodrigues, A. P., Holanda, A. R. M., Lustosa, G. P., Nóbrega, S. M. B., Santana, W. J., Souza, L. B. S., &Coutinho, H. D. M. (2006).** Virulence Factors and Resistance Mechanisms of *Serratia marcescens*, *ActaMicrobiologicaetImmunologicaHungarica*, 53(1), 89-93. Retrieved Jun 30, 2022

65. **Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. (2008).** *Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 6(5), 671–683*
66. **Romli A.,** 2011. Maroc Medical, tome 33 n°1, mars 2011.
67. **Rossi, P.-G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., ... Bolla, J.-M. (2007).** Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research, 19(2), 176–182.*
68. **Ruan, Y., Braum, V. Hemolysin as a marker for *Serratia* Arch. Microbiol. 154, 221–225 (1990).** <https://doi.org/10.1007/BF00248958>
69. **Öztürk, Recep, and Ahmet Murt.** "Epidemiology of urological infections: a global burden." *World journal of urology* 38, no. 11 (2020): 2669-2679.
70. **Sarma, J.V., Ward, P.A. The complement system. Cell Tissue Res 343, 227–235 (2011).** <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
71. **Sarowska Jolanta.,** Bozena Futoma-Kolech, Jama-Kmiecik Agnieszka(2019). Virulence Factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources. <https://doi.org/10.1186/s1399-019-0290-0>
72. **Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008).** A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism, 57, S3–S9.*
73. **Septembre-Malaterre, A., Lalarizo Rakoto, M., Marodon, C., Bedoui, Y., Nakab, J., Simon, E., ... Gasque, P. (2020).** *Artemisia annua*, a Traditional Plant Brought to Light. *International Journal of Molecular Sciences, 21(14), 4986.*
74. **Shahid, Iqbal., Umer Younas., Kim Wei Chan., Zia-Ui-Haq Mohammed.** Chemical Compositions of *Artemisia annua* L leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. ISSN 1420-3049.
75. **Siddhuraju P, Becker K. (2003)** Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem.*
76. **Siwińska, Malgorzata, et al.** "Phytotherapy In The Prevention And Support Of Treatment Of Infections." *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology* 60.2 (2021): 161-172.

77. **Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (2014).** Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 3–13.
78. **TZENG, T., LIN, Y., JONG, T., & CHANG, C. (2007).** *Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from Artemisia annua L. Separation and Purification Technology*, 56(1), 18–24.
79. **Vallès, J., Garcia, S., Hidalgo, O., Martín, J., Pellicer, J., Sanz, M., & Garnatje, T. (2011).** Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in Artemisia (Asteraceae). *Advances in Botanical Research*, 349–419.
80. **Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., ... Williams, A. P. (2013).** The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155–165
81. **Willcox, M. (2009).** Artemisia Species: From Traditional Medicines to Modern Antimalarials—and Back Again. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(2), 101–109.
82. **Woodward Clarke K. B. 1913;** A case of infection in man by the bacterium prodigiosum. *Lancet* 1:314–315

Annexes 1

Tableau I : Caractères biochimiques des *Enterobacteriaceae* (Avril et al., 2000 ; Gadou., 2019)

	Esch	Citro	Entero	Klep	Serr	Salm	Prot	Yers	Shig
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	-	+	+/-
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-
VP	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Citr	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-
Mob	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Urée	-	-	-	+	-	-	+	+	-
TDA	-	-	-	-	-	-	+	-	-
H2S	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-

(+) Resultat Positif

(-) Resultat Negatif

OPNG= Ortho NitroPhénylGalactoside ; VP = Voges Proskauer ; Citr= Citrate ; Mob= Mobilité ; TDA= Tryptophane désaminase ; H2S :Hydrogène sulfureux.

Le tableau resume les principaux caractères biochimiques des entérobactéries qui sont la capacité a fermenter le glucose ; la fermentation du lactose ; l'utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone ; Production d'uréase ; Reduction du nitrates en nitrites ; procuton d'indole ; production d'acetoine et désamination du tryptophane.

Tableau II: Classification des facteurs de virulence entre les Enterobacteriaceae (Jenkins et al., 2017)

TABLE 180-2 Classification of Virulence Factors Described in Enterobacteriaceae Species			
Type of Virulence Factor (VF)	DESCRIPTION		
	Bacterial Source	VF-Specific Nomenclature	Major Function
Colonization factors, adhesins	<i>Escherichia coli</i>	P-fimbriae: type 1 common pili; sfa fimbriae: CFA/I, CS2-25 in ETEC; bundle-forming pilus (BFP) in EPEC; AAF/I-V in EAEC; Afa adhesins in DAEC	Adherence to target epithelial cells via specific receptors
	<i>Shigella</i>	–	
	<i>Salmonella</i>	Type 1 fimbriae; Long polar fimbriae; Curli fimbriae	
	<i>Yersinia</i>	Invasin	
	<i>Proteus</i>	MR/P fimbriae; PMF (<i>P. mirabilis</i> fimbriae), ATF (ambient temperature fimbriae), NAF (nonagglutinating fimbriae)	
Component of secretion system	<i>Klebsiella</i>	Type 1 common fimbriae, type 3 and type 6 fimbriae	Molecular needle that permits export of secreted bacterial proteins across bacterial membranes and injection directly into target eukaryotic cells
	<i>Escherichia coli</i>	T3SS <i>sep/esp</i> locus in EPEC and EHEC	
	<i>Salmonella</i>	T3SS <i>inv/spa</i> locus	
	<i>Shigella</i>	T3SS <i>mxi/spa</i> locus (also described in EIEC)	
Flagella	<i>Yersinia</i>	T3SS <i>ycs</i> and <i>ysa</i> loci	Mobility, pro-inflammatory activity
	Many members of Enterobacteriaceae except <i>Shigella</i>	–	
Capsular polysaccharide	<i>Escherichia coli</i>	K1 antigen	Resistance to antimicrobial complement activity and prevention of antibacterial serum resistance
	<i>Salmonella</i> serotype Typhi	Vi antigen	
	<i>Klebsiella</i>	K capsular antigens: K1, K2, K4 and K57 emergent capsule	
Iron capture system	<i>Yersinia</i>	YadA, Ail (attachment invasion locus)	Iron acquisition
	<i>Escherichia coli</i>	Aerobactin, chu protein, yersiniabactin in EAEC	
Toxins, cytotoxic effectors	<i>Shigella</i>	<i>foc</i> , <i>fet</i> , <i>iuc</i> and <i>iut</i> loci	Mucolytic activity; modification of 28S ribosomal subunit leading to apoptosis of target cells
	<i>Yersinia</i>	Yersiniabactin	
	<i>Shigella</i> spp.	SPATEs	
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Shiga toxin (Stx1) (ADP ribosyltransferase toxins)	
	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	Shiga-like toxins (Stx1 and Stx2)	
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	Thermolabile and thermostable enterotoxins (LT, ST)	Increase of intracellular cAMP causes modification of apical ion channel activity in target cells	
Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>	EAST-1, plasmid-encoded toxin (Pet), SPATEs	Unknown	
Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>	Hemolysin alpha (RTX toxins), CNF1	Pro-inflammatory activity; modification of Rho GTPase (for CNF1)	
T3SS EFFECTORS			
Effectors targeting or mimicking Rho GTPase family members	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Yersinia</i>	SopE2, SopE, SptP IpaA, IpaC, IpgB1, IpgB2 YopT, YopE, YpkA/YopO	Modification of cytoskeletal actin and macropinocytosis
Effectors targeting innate immune signaling pathways	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Yersinia</i>	SipB (SspB), AvrA, SspH1, SpvC OspG, OspF, IpaB YopJ	Apoptosis in macrophages and dendritic cells; inhibition of NF-κB signaling and IL-8 production
Effectors targeting actin polymerization directly	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Yersinia</i>	Tir SipA (SspA), SipC (SspC) IcsA (VirG), IcsP, VirA YopH	Actin nucleation and pedestal formation Induction of actin polymerization Actin nucleation Antiphagocytic activity targeting a major focal adhesin
Effectors promoting intracellular survival	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	SseF, SseG, SseJ, SopD2, SifA, PipB2, SspH2, SptP IcsB	Contribution of Sif formation and microtubule formation Host cell survival and prevention of autophagic recognition of IcsA/VirG

cAMP, cyclic adenosine monophosphate; DAEC, diffusely adherent *E. coli*; EAEC, enteraggregative *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; EIEC, enteroinvasive *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; IL, interleukin; NF-κB, nuclear factor kappa B; SPATEs, serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae.

Tableau III: Les composants minéraux (Brisibe et al., 2009)

Mineral	Inflorescence	Leaves	Stems	Roots
Potassium	24,568 (3.4)	26,332 (0.4)	13,488 (0.9)	11,126 (4.2)
Calcium	4,405 (0.1)	11,470 (0.4)	2,037 (0.2)	946 (0.9)
Magnesium	2,291 (2.2)	7,138 (0.4)	1,704 (2.3)	850 (14.6)
Phosphorus	3,354 (1.8)	3,665 (0.4)	871 (0.7)	664 (15.8)
Sulphur	4,585 (3.8)	3,908 (1.4)	742 (1.9)	471 (16.2)
Iron	224 (0.6)	196 (0.7)	22.2 (13.0)	682 (3.0)
Manganese	296 (3.6)	219 (0.3)	21.0 (0.7)	19.8 (3.9)
Aluminum	64.1 (2.4)	134 (0.0)	21.9 (2.6)	848 (0.7)
Zinc	60.4 (0.8)	64.5 (43.2)	46.2 (87.0)	75.9 (34.5)
Copper	31.6 (1.6)	14.3 (3.0)	6.7 (13.8)	22.5 (0.0)
Boron	17.5 (1.2)	18.0 (8.0)	4.5 (32.4)	5.0 (16.0)
Sodium	<0.1 (0.0)	<0.1 (0.0)	<0.1 (0.0)	106 (5.3)

Annexes 2



Figure 1 : Appareillage du Soxhlet (Laboratoire de chimie)