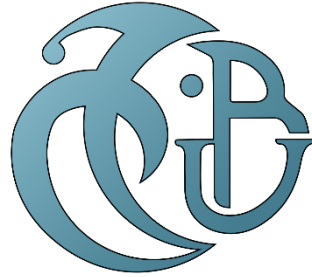


**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**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 de l'effet thérapeutique antiinfectieux d'un extrait végétal sur un modèle bactérien à Gram négatif.***

**Réalisé par : Rania ASROUN et Meryem HASNAOUI**

**Devant les membres du jury :**

<b>Président</b>	<b>Dr. Amel Kanane</b>	<b>MCA</b>	<b>USDB1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Dr. Sabiha KESKAS</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB1</b>
<b>Promoteur</b>	<b>Dr. Radia AÏSSANI-EL FERTAS</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>
<b>Co-Promoteur</b>	<b>Dr. Ibtissem RAHIM</b>	<b>MCA</b>	<b>USDB1</b>

**Promotion 2021/2022**



## *Remerciement*

Tous d'abord, nous tenons à remercier « Allah » qui nous a donné la force, la patience et le courage pour achever ce modeste travail.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements pour notre promotrice Mme AISSANI EL-FERTAS, nous avons eu le privilège de travailler avec elle et d'apprécier ses qualités et ses valeurs, son sérieux, sa compétence et son sens de devoir qui nous ont énormément marquées. Nous saisissons cette occasion pour lui exprimer notre profonde gratitude.

Nous tenons également à remercier notre Co-promotrice Mme RAHIM pour son aide, ses précieux conseils et son suivi qu'il nous a prodigués tout au long de notre recherche.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres du jury, Mme Kanane, et Mme Keskas d'avoir accepté avec grande modestie d'examiner notre travail ceci est un honneur pour nous.

Nous exprimons notre reconnaissance aux Personnels du laboratoire de TARZALI, le chef de service du laboratoire de CHU SIDI GHILES, Mme NADJI Sihem de l'institut ISHAK IBN HOUNAINE, Mme Timizart Zineb du laboratoire de phytopharmacie USDB 1 , personelles du laboratoire d'analyse médicale Dr Benhelal, Pr KOUCHKAR et personelles du CPMC d'Alger.

Un grand merci à tous ceux qui nous ont aidées de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

C'est avec fierté et des yeux en larmes que Je dédie ce travail à ma famille

Mes parents qui m'ont toujours soutenue, cru en moi, et entouré d'amour et de courage.

À mon cher papa mon Héro, l'épaule sur laquelle je peux appuyer, et ma source de confiance d'assurance et de force.

À ma douce maman ma meilleure amie, ma confidente, et la source de toutes mes bonnes qualités qui a arrosé mon esprit et mes pensées de maturité, et qui m'a accompagné tout au long de la rédaction de ce mémoire.

À mon frère anis et ma sœur serine mes amours et ma fierté, et mon adorable petit frère Mohamed ma source de joie et de bonheur.

À mes très chères et aimantes tantes mes exemples, et ma source de motivation.

À mes deux grand-mères titis ouezna et Jida mekyousa ma source de bénédiction, et qui m'illumine le chemin avec leurs Douâa.

Me voilà faire un premier pas vers mes objectifs, ce n'est certainement pas la fin de mes études, je n'arrêterai jamais d'apprendre et de me développer et de nourrir ma curiosité car mes rêves sont encore plus loin...

**Asroun Rania, septembre 2022.**



## **Dédicace**

### **Ma Mère**

*Tu étais mon médecin qui est resté debout toute la nuit pour mon confort, Tu étais celle qui a tant souffert dans mon enfance.*

*C'est toi qui m'as protégé de moi-même et de tous les malheurs, C'est toi qui t'es battue pour mon succès.*

*Tout cela restera une dette envers moi, et je ne pourrai pas remplir un quart de ton droit avec mes paroles ou la moitié avec mes actions.*

*À cette occasion je vous dédie ce travail*

*Puisse Dieu tout puissant t'accorder longue vie, santé, bonheur pour que notre vie soit illuminée pour toujours*

### **Mon Père**

*Je sais que tu n'as jamais cessé de formuler des prières à mon égard .Tu as toujours veillé à ce que je ne manque de rien pour mener à bien mes études.*

*Si j'ai pu arriver jusque-là, c'est grâce à tes efforts et sacrifices, J'espère qu'en ce jour l'un de tes rêves se réalise à travers moi en concrétisant le fruit de tes sacrifices.*

*A toi, je dédie ce travail en gage de mon amour et mon respect les plus profonds.*

*Puisse Dieu te préserver et faire de moi une fille à la hauteur de ton espérance.*

*Puisse Dieu tout puissant t'accorder longue vie, santé, bonheur pour que notre vie soit illuminée pour toujours*

### **Mes deux frères Akram et Adem**

*Merci Pour votre présence, Amour et encouragement.*

*Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère,*

*Je vous aime mes Frères que notre fraternité se prolonge à l'éternité...*

*À mon grand père, ma tante maternelle et mes cousines Sarah et Aya. Merci pour votre amour, soutiens et prières , que dieux vous garde pour moi.*

*A mes copine Dounia , Hassna , Hayet , Nihad, Rania , Wissem et Wafaa . En souvenir de nos bons moments, en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble,*

*J'espère que notre amitié durera éternellement.*

***Je dédie ce modeste travail***

**Hasnaoui Meryem, Septembre 2022**

L'Antibiorésistance cause un problème de santé majeure dans de nombreux pays. Le passage vers les thérapies alternatives telles que la phytothérapie s'avère nécessaire. *Moringa oleifera* dite « l'arbre miraculeux » est passé, en une décennie du statut de plante marginale à celui de nouvelle ressource alimentaire, économique et thérapeutique.

Le présent travail a pour objectif l'étude du potentiel thérapeutique anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* (EEM), cultivée en Algérie. Pour les besoins de notre étude, nous avons travaillé sur une collection de souches bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, d'origine clinique et communautaire et ayant causées des infections chez l'homme. Nous avons aussi développé un modèle murin de sepsis en utilisant des souris BALB/c. Après avoir déterminé les profils de résistance aux antibiotiques et de virulence, en appliquant un antibiogramme et en recherchant l'effet bactéricide du sérum humain sur nos souches, nous avons testé, *in vitro*, le pouvoir antibactérien, antibiofilm et antioxydant. L'activité anti-inflammatoire de l'EEM fut appréciée en développant un modèle murin de sepsis puis en traitant les animaux avec l'EEM administré par voie intrapéritonéale.

Les résultats indiquent que les profils de résistance aux antibiotiques étaient divers et variés et possédaient un certain potentiel de virulence. En effet, 46.29% des souches produisaient des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi et la quasi-totalité résistait au pouvoir bactéricide du sérum humain. Le test DPPH a révélé une activité antioxydante de l'EEM. Ce dernier a démontré une activité antibactérienne à différentes concentrations avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 8mm. Toutes les souches formaient un biofilm de moyenne ou de forte intensité. L'EEM était capable de modifier l'intensité du biofilm formait de 47.05% des souches en la diminuant. Les résultats histologiques du modèle infectieux que nous avons développé indiquent que certains organes, tels que le foie, le cœur, les poumons et la rate montrent des signes inflammatoires d'origine infectieuse. Le traitement des souris septiques avec une dose de 500 $\mu$ g/ml d'EEM avant et après induction du sepsis, semble avoir un effet bénéfique en atténuant l'inflammation induite par le sepsis.

Mots clés : *Moringa oleifera*, *Enterobacteriaceae*,  $\beta$ -lactamases, sepsis, souris BALB/c, effet thérapeutique.

Antibiorésistance is a major Health problem in many countries. The transition to alternative therapies such as Phytotherapy is necessary. *Moringa oleifera*, known as the "miraculous tree", has gone in a decade from being a marginal plant to a new food source, and an economic and therapeutic resource

The present work aims to study the therapeutic anti-infective potential of the éthanolique extract of the leaves of *Moringa oleifera* (EEM), cultivated in Algeria. For the purposes of our study, we worked on a collection of bacterial strains belonging to the Enterobacteriaceae family, from clinical and community origins and that caused infections in humans. We have also developed a mouse model of sepsis using BALB/c mice. After determining the antibiotic resistance and virulence profiles, applying an antibiogram and looking for the bactericidal effect of human serum on our strains, we tested, *in vitro*, the antibacterial, antibiofilm and antioxidant potential. In addition, for the test of anti-inflammatory activity of EEM we developed a mouse model of sepsis and then treated the animals with EEM injection administered intraperitoneally.

The results shows that the patterns of antibiotic resistance were diverse and varied and possessed a high potential of virulence. Indeed, 46.29% of the strains produced broad-spectrum  $\beta$ -lactamases and almost all of them resisted the bactericidal power of human serum. The DPPH test revealed antioxidant activity of EEM. This main extract also demonstrated an antibacterial activity at different concentrations with inhibition diameters that reached more than 8mm. All strains formed medium to high biofilm intensity. The EEM was able to modify the intensity of the biofilm formed by 47.05% of the strains by decreasing it. The histological results of the infectious model that we have developed indicate that certain organs, such as the liver, the heart, the lungs and the spleen show inflammatory signs of infectious origin. The treatment of septic mice with a dose of 500 $\mu$ g/ml of EEM before and after sepsis induction appears to have a beneficial effect in attenuating sepsis-induced inflammation.

Key words: *Moringa oleifera*, *Enterobacteriaceae*,  $\beta$ -lactamases, sepsis, BALB/c mice, therapeutic effect.

تعتبر مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية مشكلة صحية كبيرة في العديد من البلدان. الانتقال إلى العلاجات البديلة مثل العلاج بالنباتات أصبح يبدو ضروريا. انتقلت مورينجا أوليفيرا، المعروفة باسم "الشجرة المعجزة"، من نبات هامشي إلى مصدر غذائي واقتصادي وعلاجي جديد خلال عقد من الزمان

يهدف عملنا إلى دراسة الإمكانيات العلاجية المضادة للعدوى الالتهابية للمستخلص الإيثانولي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا المزروع في الجزائر. لغرض دراستنا، عملنا على مجموعة من السلالات البكتيرية التي تنتمي إلى صنف البكتيريا المعوية، من أصل سريري ومجمعي معدية للبشر. وهذا بعد تحديد خصائص مقاومة مجموعتنا من البكتيريا للمضادات الحيوية وشدة عدوتها، باستخدام اختبار للمضادات الحيوية والبحث عن تأثيرها في مصل الدم البشري بعدها أجرينا في المختبر عدة تجارب لتقييم قوة المستخلص النباتي للمورينجا أوليفيرا المضادة للبكتيريا والمضادة لتشكيل الأغشية الحيوية البكتيرية والمضادة لأكسدة وكذا قدرتها المضادة للالتهاب قمنا أيضًا بتطوير نموذج حي للإنتان الدم باستخدام فئران من فصيلة بلب / ج وهذا باتباع بروتوكول تجريبي طورناه بأنفسنا ينص على حقن الفئران على مستوى منطقة الصفاق بمحلول المستخلص النباتي

تشير النتائج إلى أن أنماط مقاومة مجموعتنا من البكتيريا للمضادات الحيوية كانت متنوعة و يمكن تصنيفها شديدة العدوى بحيث ان 46.29% من المجموعة منتجة لإنزيمات بيتا لاكتاماز واسعة الطيف ، وقد قاومت جميعها تقريبًا مصل الدم البشري لاحظنا أيضا بعد اختبار ال نشاطا مضادا للأكسدة لمستخلصنا النباتي كما اظهر هذا الأخير نشاطًا مضادًا للبكتيريا عند استعماله بتركيز مختلفة حيث تجاوزت اقطار تثبيط نمو البكتيريا ال 8مم. من جهة أخرى كشف اختبار قياس شدة تشكل الأغشية الحيوية البكتيرية ان بكتيريا مجموعتنا كانت قادرة على تشكيل اغشية ذات كثافة متوسطة الى عالية غير ان مستخلصنا النباتي استطاع تخفيض هاته الشدة بنسبة 47.05 %

تشير النتائج النسيجية للنموذج الحيواني الممرض بإنتان الدم الذي طورناه إلى أن بعض الأعضاء، مثل الكبد والقلب والرئتين والطحال، تظهر علامات التهابية من أصل بكتيري الا ان علاج الفئران الإنتانية بجرعة 500 ميكروغرام / مل من مستخلصنا النباتي قبل وبعد تحريض الإنتان يبدو أن له تأثير مفيد في تخفيف الالتهاب الناجم عن الإنتان.

الكلمات المفتاحية: مورينجا أوليفيرا، البكتيريا المعوية، انزيمات بيتا لاكتاماز، إنتان الدم , فئران بلب/ج , مفعول علاجي.

<b>UPEC</b>	: Les souches uropathogènes
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharides
<b>PapG</b>	: L'adhésine de type P
<b>HMV</b>	: Le phénotype d'hypermucoviscosité
<b>LT</b>	: Lymphocytes T
<b>CAM</b>	: Le complexe d'attaque membranaire
<b>QS</b>	: Quorum_sensing
<b>AI</b>	: Auto_inducteurs
<b>AHL</b>	: Acyl homosérine lactone
<b>LuxR</b>	: Protéine cytoplasmique
<b>OMS</b>	: Organisation mondiale de la Santé
<b>NBLSE</b>	: Souches non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi
<b>BLSE</b>	: Souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi
<b>C3G</b>	: Les céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>HE</b>	: Les huiles essentielles
<b>PAC</b>	: Proantho cyanidines
<b>CAPE</b>	: Acide 3-phényllactique, ester phénéthylique d'acide caféique
<b>IL-8</b>	: L'interleukine 8
<b>TCD4+</b>	: Cellules lymphocytes T auxiliaires
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: Interférons gamma
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>ABTS</b>	: L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6 - sulphonique)

<b>MH</b>	: Muller Hilton
<b>EEM</b>	: Extrait éthanolique de Moringa
<b>EC50</b>	: La concentration efficace médiane
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>i.p</b>	: Intrapéritonéal
<b>NaCl</b>	: Chlorure de sodium
<b>MGG</b>	: May-Gründwald-Giemsa
<b>EDTA</b>	: Éthylènediaminetétraacétique
<b>ECBU</b>	: Examen Cytobactériologique des Urines
<b>CTX</b>	: le céfotaxime
<b>AMP</b>	: l'ampicilline
<b>AMC</b>	: l'amoxicilline + acide clavulanique
<b>CZ</b>	: la Céfazoline
<b>CRO</b>	: La Ceftriaxone
<b>HPLC</b>	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>GL</b>	: Les glucosinolates
<b>ITC</b>	: Isothiocyanates
<b>DO</b>	: la densité optique
<b>HE</b>	: l'hématoxyline et à l'éosine

<b>Figure 1</b> : Facteurs de virulence des souches UPEC	4
<b>Figure 2</b> : Facteurs de virulences exprimés par les souches classiques et hyper virulentes de <i>Klebsielle pneumoniae</i>	5
<b>Figure 3</b> : Voies d'activation du système du complément	6
<b>Figure 4</b> : étapes de formation d'un Biofilm	8
<b>Figure 5</b> : Mécanismes primaires de la résistance aux $\beta$ -lactamines chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	9
<b>Figure 6</b> : Les différentes parties de l'arbre <i>Moringa oleifera</i>	12
<b>Figure 7</b> : principe d'extraction par soxhlet	17
<b>Figure 8</b> : extraction éthanolique du matériel végétale	18
<b>Figure 9</b> : récupération de l'extrait végétale brute	18
<b>Figure 10</b> : étapes de la réalisation du test DPPH	20
<b>Figure 11</b> : répartition des souris en lots pour le protocole pharmacologique	23
<b>Figure 12</b> : injection intrapéritonéale des souris	24
<b>Figure 13</b> : Répartition des souches isolées selon l'origine	25
<b>Figure 14</b> : Répartition des souches isolées selon le sexe des patients prélevés	26
<b>Figure 15</b> : Répartition des souches bactériennes selon l'âge	27
<b>Figure 16</b> : Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement	28
<b>Figure 17</b> : Pourcentage de résistance aux Antibiotique de la famille des $\beta$ -lactamines	30
<b>Figure 18</b> : Synergie entre les disques d'antibiotique AMC et CTX	31
<b>Figure 19</b> : Potentiel de virulence des souches en présence de sérum humain	32
<b>Figure 20</b> : Résultats test résistance au sérum humain	33
<b>Figure 21</b> : Extrait éthanolique des feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	34
<b>Figure 22</b> : résultats du test d'activité antibactérienne de différentes concentrations d'EEM	36
<b>Figure 23</b> : Méthode spectrophotométrie pour la mesure de l'intensité du biofilm formé	39
<b>Figure 24</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles	40
<b>Figure 25</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles	41
<b>Figure 26</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles	41
<b>Figure 27</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septique	42
<b>Figure 28</b> : micrographie d'une coupe transversale de foie des souris BALB/c septique	42
<b>Figure 29</b> : micrographie d'une coupe transversale des poumons des souris BALB/c septique	43

<b>Figure 30</b> : micrographie d'une coupe transversale de cœur des souris BALB/c septique	43
<b>Figure 31</b> : micrographie d'une coupe transversale de foie des souris BALB/c traité par <i>Moringa oleifera</i>	45
<b>Figure 32</b> : micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c traité par <i>Moringa oleifera</i>	45
<b>Figure 33</b> : micrographie d'une coupe transversale de poumon des souris BALB/c traité par <i>Moringa oleifera</i>	46
<b>Figure 34</b> : micrographie d'une coupe transversale de cœur des souris BALB/c traité par <i>Moringa oleifera</i>	46



<b>Tableau I :</b> Répartition des souches selon la fréquence d'isolement	27
<b>Tableau II :</b> Répartition des souches d'entérobactéries selon le type de prélèvement	29
<b>Tableau III :</b> Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection	38
<b>Tableau IV :</b> Résultats de l'intensité des biofilms formés par les souches de notre collection en présence de l'EEM	39
<b>Tableau V :</b> Comparaison des résultats de l'histologie entre lots sepsis et lot traité	44

Titre	n° Page
Introduction	1
Chapitre I : Rappelles bibliographiques	
I. Maladies infectieuses liées aux Entérobactéries : Pathogénicité et résistance aux antibiotiques	2
I.1.Caractéristiques générales des Enterobacteriaceae	2
I.2. Pouvoir pathogène des entérobactéries	3
I. 2. 1. Infections à entérobactéries	3
I. 2. 2. Facteurs de virulence des entérobactéries	3
I. 3. Exemple de mécanismes de virulence chez les entérobactéries	5
I. 3. 1. Résistance au système du complément	5
I. 3. 2. Formation de biofilm	7
I. 4. Résistance aux antibiotiques et entérobactéries	8
II. Thérapie Alternative dans le traitement des infections bactériennes : phytothérapie	10
II. 1. Apport de la phytothérapie en médecine infectieuses	10
II. 2. Exemple de plante médicinale dans le traitement des infections bactériennes : Moringa oleifera	11
II .2. 1 Valeurs nutritifs et caractérisation phytochimique	13
II .2.2 Activité antioxydante de Moringa oleifera	13
II. 2. 3. Effets thérapeutique de Moringa Oleifera	14
Chapitre II : Matériel et méthode	
I. Matériel	15
I. 1. Matériel biologique	15
I. 2. Matériel non biologique	16
II. Méthodes	16
II. 1. Etude du potentiel de virulence des souches d'entérobactéries	16
II. 2. Etude de l'effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de Moringa oleifera	17
II. 2. 1. Extraction éthanolique des feuilles Moringa oleifera	17
II. 2. 2. Etude de l'activité antioxydante in vitro des feuilles de Moringa oleifera	19
II. 2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de Moringa oleifera sur les entérobactéries	21
II. 2. 4. Effet de Moringa oleifera sur la formation de Biofilm	22

II. 3. Etude de l'effet de l'extrait de feuille de Moringa oleifera sur l'inflammation induite par sepsis	23
II. 3. 1. Modèle murin de sepsis monomicrobien	23
II. 3. 2. Protocole pharmacologique	23
II. 3. 3. Etude histologique	24
III. Etude statistique	24
Chapitre III : Résultats et discussion	
I. Etude de quelques paramètres épidémiologiques.	25
I. 1. Répartition des souches bactériennes selon l'origine nosocomiale ou communautaire	25
I. 2. Répartition des souches bactériennes selon le sexe	25
I. 3. Répartition des souches bactériennes selon l'âge	26
I. 4. Répartition des souches bactériennes selon l'espèce	27
I. 5. Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement	28
II. Etude phénotypique du profil de sensibilité aux antibiotiques	29
III. Etude du potentiel de virulence des souches par leur culture en présence de sérum humain	32
IV. Effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de Moringa Oleifera	34
IV. 1. Rendement de l'extraction éthanolique des feuilles de Moringa oleifera	34
IV. 2. Résultats de l'activité antioxydante in vitro de Moringa oleifera	34
IV. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de Moringa oleifera sur les entérobactéries	36
IV. 4. Résultats de l'effet de Moringa oleifera sur la formation de Biofilm	38
V. Etude d'un modèle murin de sepsis monobactérien à <i>S. marcescens</i> et de l'effet de l'extrait de feuille de Moringa oleifera sur ce sepsis	40
Conclusion	49
Références Bibliographiques	50
Annexes	

# *Introduction*

Depuis leur identification en 1928 et leur synthèse industrielle en 1932, les antibiotiques se trouvent au 21<sup>ème</sup> siècle, inutiles face à de nombreuses bactéries au profil de résistance inquiétant. Ainsi, des scientifiques estiment que d'ici 2050 l'antibiorésistance deviendra la première cause de mortalité au monde (OMS, 2014)

Le 27 février 2017, l'OMS tire la sonnette d'alarme, concernant l'antibiorésistance, en lançant un appel général aux professionnelles de santé, et publie une liste d'agents bactériens les plus résistants. Les Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases étaient en tête de liste. Le développement de nouveaux traitements, et la recherche d'autres alternatives semble fut fortement. C'est ainsi que la médecine traditionnelle, et la phytothérapie furent remises au goût du jour. Actuellement, l'attention s'est portée sur certaines activités biologiques notamment l'activité antibactérienne et antioxydante des plantes médicinales en raison de leurs rôles dans la prévention de diverses pathologies (OMS, 2017 ; Ducrot *et al.*, 2017)

Le Moringa est un arbre de région tropicale, seul genre de la famille *Moringaceae*, avec 13 différentes espèces dont *Moringa oleifera*. Il pousse principalement en Inde, en Afrique centrale et à Madagascar. Il est souvent appelé « l'arbre miraculeux » en raison de ses extraordinaires propriétés nutritionnelles et médicinales dont elle fait preuve. *Moringa oleifera* possède différents effets thérapeutiques, tels que des activités anti-inflammatoires, hypolipémiantes, antioxydantes, antidiabétiques et chimioprotectrices (hépatique, cardiaque, rénale et nerveuse) ainsi que des effets anti-helminthiques, antibactériens et détoxifiants (Walter *et al.*, 2010 ; Mohamed *et al.*, 2020).

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques option, spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire, nous avons réalisé un mémoire de fin d'étude portant sur l'identification du potentiel antibactérien, antioxydant, anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des feuilles du *Moringa Oleifera* sur un modèle bactérien à Gram négatif. Les principaux objectifs que nous nous sommes posés sont les suivants :

- Caractérisation phénotypique des souches d'entérobactéries isolées des milieux hospitaliers et communautaires, concernant le profil de sensibilité aux antibiotiques et aux protéines du système de complément.
- Etude de l'activité antioxydante, antibactérienne et antibiofilm, *in vitro* de l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* (EEM)
- Etude de l'effet potentiellement thérapeutique de l'EEM dans un modèle murin de sepsis.

## *Rappels Bibliographiques*

## **I. Maladies infectieuses liées aux Entérobactéries : Pathogénicité et résistance aux antibiotiques**

### **I.1. Caractéristiques générales des *Enterobacteriaceae***

Les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont celles qui sont le plus souvent rencontrées en clinique. Elles forment un vaste groupe de bacilles à Gram négatif, aérobies-anaérobies facultatifs, non sporulés qui sont très largement distribués dans la nature et peuvent faire partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans ce groupe de bactéries entériques figurent des bactéries pathogènes strictes comme le genre *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia* d'autres considérées comme opportunistes ou pathogènes occasionnels comme *Escherichia*, *Proteus* et *Klebsiella* (Freney, 2007).

Il existe plus de 30 genres d'entérobactéries, et 120 espèces, mais seules 20 espèces peuvent causer des pathologies infectieuses chez l'homme (Tableau I, annexe 1) (Donnenberg et Rock, 2014).

La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude des caractères biochimiques. Certains peuvent être commun partagé entre toutes les espèces, et d'autres uniques à certaines espèces dits caractères de différenciation (Gadou, 2019). Les entérobactéries partagent le fait qu'elles soient oxydase négatives, qu'elles aient un métabolisme anaérobique, qui fermentent le glucose et autres sucres, produisent la catalase, et réduisent le nitrate en nitrite. Les caractères de différenciation concernent le métabolisme des protéines (Présence d'uréase, production d'indole, la dégradation du tryptophane), types de sucre fermenté (glucose, lactose, saccharose), la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, et la production d'enzymes (décarboxylases, désaminases, et d'hydrogène sulfuré) (Abbas et al., 2019).

Les entérobactéries se développent rapidement, *in vitro* et *in vivo* dans des milieux ordinaires en aéro-anaérobiose. La température optimale de croissance varie entre 37°C à 40°C (Abbas et al., 2020).

## **I.2. Pouvoir pathogène des entérobactéries**

### **I.2.1. Infections à entérobactéries**

La pathogénicité constitue l'aptitude d'une bactérie à induire l'apparition d'une pathologie infectieuse dans un organisme récepteur. Les facteurs de virulence sont les produits bactériens qui participent à cette pathogénicité (**Glamiche et al., 1998**).

Les infections causées par les entérobactéries sont majoritairement nosocomiales et souvent associées à une durée d'hospitalisation longue, mal entretenue, ou étant en rapport avec de mauvaises conditions sanitaires. Elles commencent à apparaître entre 24 à 72 heures après l'hospitalisation (**Iachassinne et al., 2004**). Les entérobactéries sont connues pour être des microorganismes opportunistes à l'origine d'un taux de mortalité très élevé, particulièrement chez les individus fragilisés (**Donnenberg et Rock., 2014**).

Les entérobactéries sont responsables de diverses infections telles que les infections du tractus urinaire et respiratoire, les abcès cérébraux, les méningites, les bactériémies et septicémies, les infections des tissus mous, infections ophtalmologiques et les infections liées aux dispositifs médicaux (**Kus, 2014**).

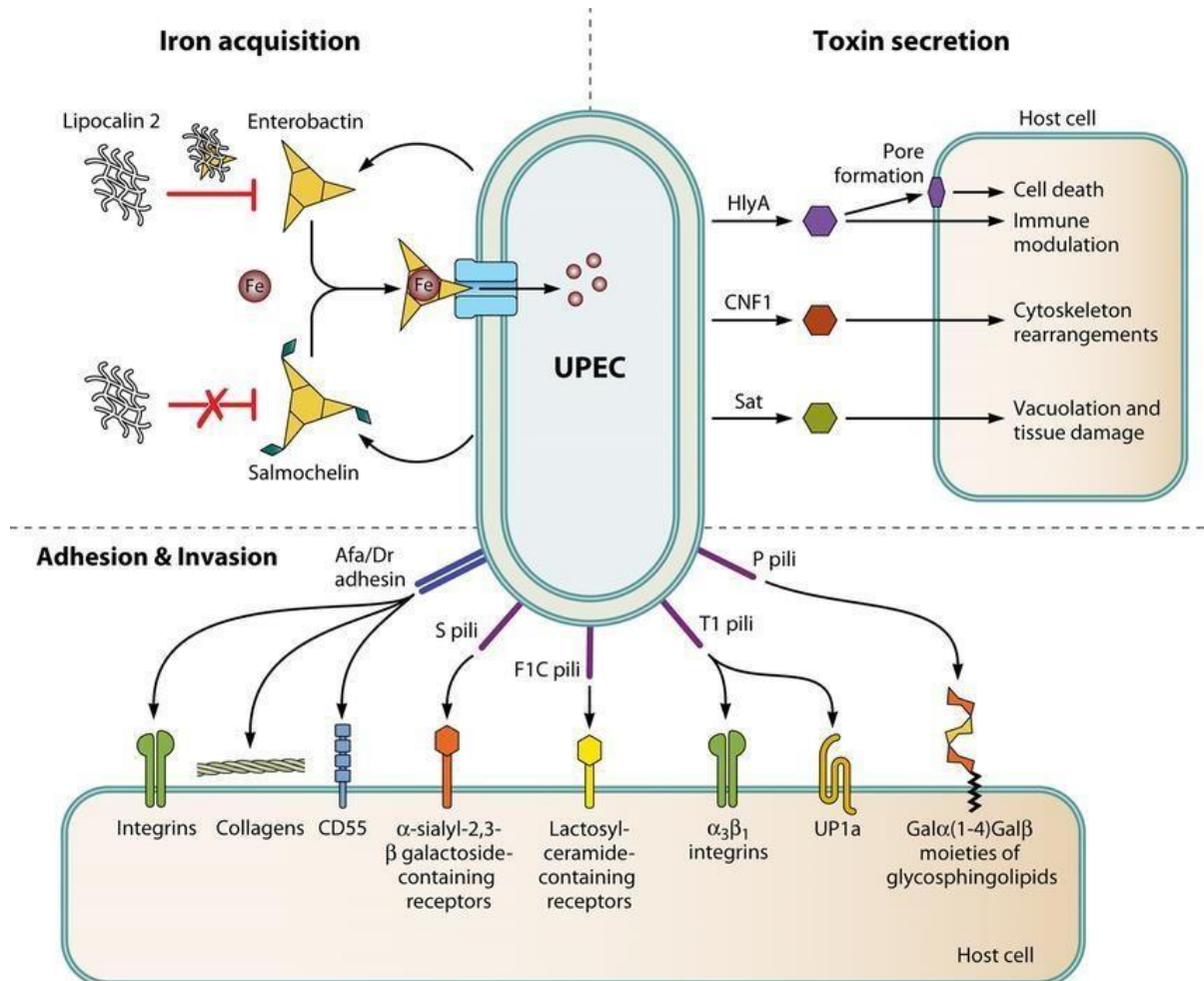
La plus grave conséquence liée aux infections par les entérobactéries est le sepsis. Un terme anglo-saxon et international employé pour caractériser une réaction inflammatoire généralisée et associée à une infection. Le sepsis peut être provoqué par des bactéries, des champignons et des virus (le cas de SARS-Cov2). Il provoque une dérégulation de la réponse de l'hôte entraînant un dysfonctionnement d'organes, un « choc septique » voir la mort du patient. Les cas de sepsis sont accompagnés par des taux très élevés de cytokines pro-inflammatoires, conséquence d'un « orage cytokinique », faisant de ces molécules d'excellents biomarqueurs pour le diagnostic de cette pathologie et sa prise en charge (**Madushani et al., 2022**).

### **I.2.2. Facteurs de virulence des entérobactéries**

Un facteur de virulence est défini comme une molécule spécifique produite par un micro-organisme, responsable de son pouvoir pathogène. Il contribue ainsi à la colonisation, la multiplication, l'invasion, et l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Il peut s'agir de la capsule, des adhésines, des toxines, des sidérophores, de la formation de biofilm...



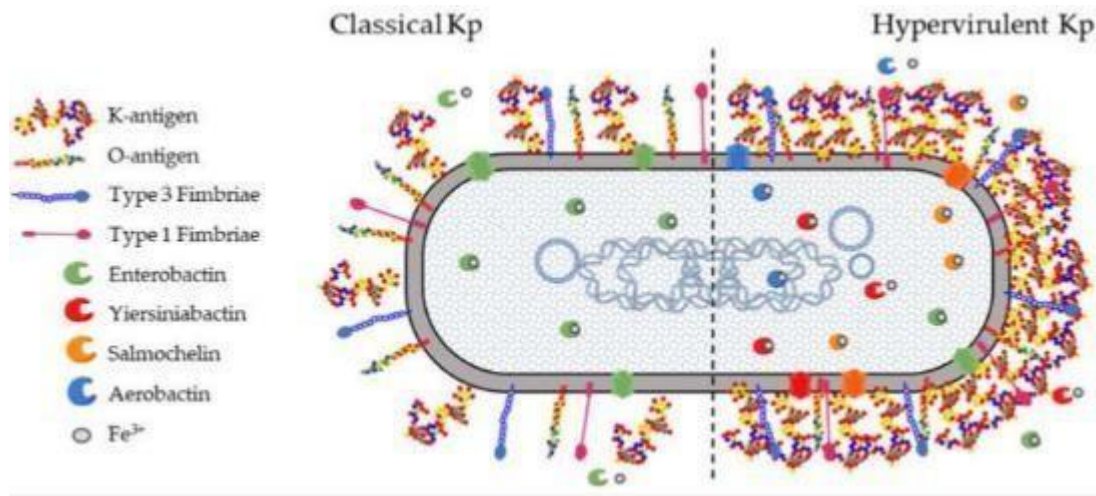
L'espèce type des entérobactéries, *Escherichia coli* peut se présenter sous différents pathovars. Les souches uropathogènes (UPEC), expriment divers facteurs de virulence qui contribuent à la colonisation du tractus urinaire. Parmi ces facteurs, nous citons : l'antigène O du LPS, les adhésines fimbriaires, l'adhésine de type P (PapG), l'entérobactine et les hémolysines (Figure 1) (Chabnon et Archambaud, 1987 ; Kenneth et al., 2003 ; Mainil, 2003 ; Bidet et al., 2012).



**Figure 1 : Facteurs de virulence des souches UPEC (Mulvey, 2016).**

*Klebsiella pneumoniae* est un autre pathogène opportuniste que compte la famille des entérobactéries, et qui peut être à l'origine de nombreuses infections nosocomiales et communautaires. Elle cause diverses infections dont la pneumonie, les infections du tractus urinaire et gastro-intestinales, des bactériémies et le sepsis. Elle peut exprimer différents facteurs de virulence qui lui permettent de coloniser la surface des muqueuses, envahir l'organisme et échapper au système immunitaire. Parmi les facteurs de virulence, nous retrouvons, la capsule, le phénotype d'hypermucoviscosité (HMV), les adhésines fimbriaires, les sidérophores et la formation de biofilm (Figure 2). Certains gènes de virulence sont

associés à des taux de morbidité et mortalité très élevés. C'est le cas du gène *rmpA* associé au phénotype d'hypermucoviscosité (Clegg et al., 2015).



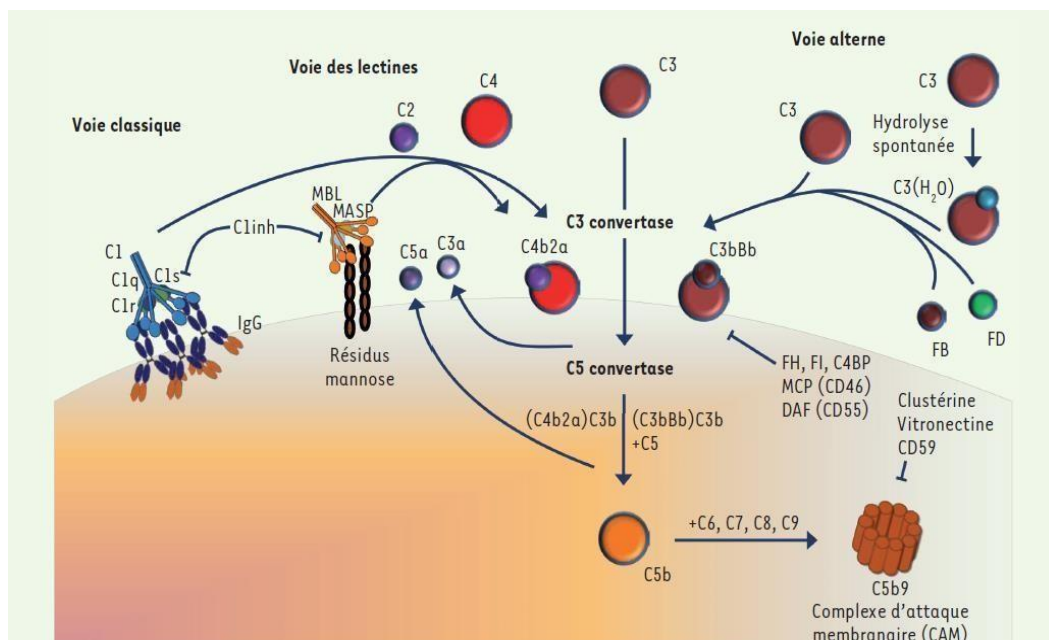
**Figure 2 :** Facteurs de virulences exprimés par les souches classiques et hypervirulentes de *Klebsiellapneumoniae*(Arato et al.,2016).

### I. 3. Exemple de mécanismes de virulence chez les entérobactéries

#### I. 3. 1. Résistance au système du complément

Le système du complément découvert à la fin des années 1890, est un composant thermolabile du sérum et qui fait partie du système immunitaire inné. Il a aussi un rôle clé dans l'immunité adaptative en modulant et modifiant les réponses des lymphocytes T (LT) (Horea et al., 2005 ). Son activation conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire, à la surface des microorganismes ou des cellules infectées, conduisant à leur élimination par choc osmotique. L'activation du système du complément conduit aussi à la libération de molécules pro-inflammatoires et chimiotactiques (C5a, C3a et C4a), qui soutiennent la réponse inflammatoire au cours d'une infection. Il libère des opsonines telles que le C3b qui permettent l'opsonisation des bactéries par les cellules phagocytaires. Il existe trois voies d'activation du système du complément, illustrées dans la figure 3 (Daugan et al.,2017).

Malgré la complexité du système du complément et ces différentes voies d'activation, les entérobactéries ont évolué de telle façon à exploiter plusieurs mécanismes d'échappement, pour limiter leur détection et leur destruction par le système du complément (Merle *et al.*, 2015). En effet, les entérobactéries peuvent exprimer certains facteurs de virulence qui empêchent l'activation du système du complément. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* exprime une capsule polysaccharidique (Dolores *et al.*, 2000) qui entrave le dépôt des protéines du complément à la surface bactérienne. La formation du MAC est donc abolie quel que soit la voie d'activation ciblée (Dennis *et al.*, 2016). De plus, la capsule masque les épitopes normalement reconnus par les anticorps, bloquant ainsi l'activation du complément par la voie classique (Dennis *et al.*, 2016).



**Figure 3 : Voies d'activation du système du complément (Daugan *et al.*, 2017).**

- Voie classique dont son activation est initiée à la suite de la fixation d'une cible sur complexe C1 constitué d'une molécule de reconnaissance, le C1q et deux sérines protéases, C1r et C1s. Après activation du complexe C1 il va à son rôle se fixer sur des immunoglobulines IgG ou d'autres molécules endogènes, afin de lancer une cascade de signalisation activatrice du système immunitaire inné

- Voie des lectines s'active suite à la reconnaissance des résidus glycaniques de l'agent pathogène, par un complexe de nature (lectine/ ficoline \_ sérine estérases) comme le complexe (MPL\_MASP). Les deux voies classique et voie des lectines sont analogues car elles mènent aux deux au clivage de deux enzymes communes, la C4 et la C2, ce qui forme l'enzyme initiateur de la cascade de signalisation, la C3 convertase.

- Voie alterne qui agit comme un système de surveillance qui hydrolyse spontanément la C3 en C3(H<sub>2</sub>O) qui est capable de se lier à plusieurs facteurs, et être clivé en C3 convertase après sa liaison.

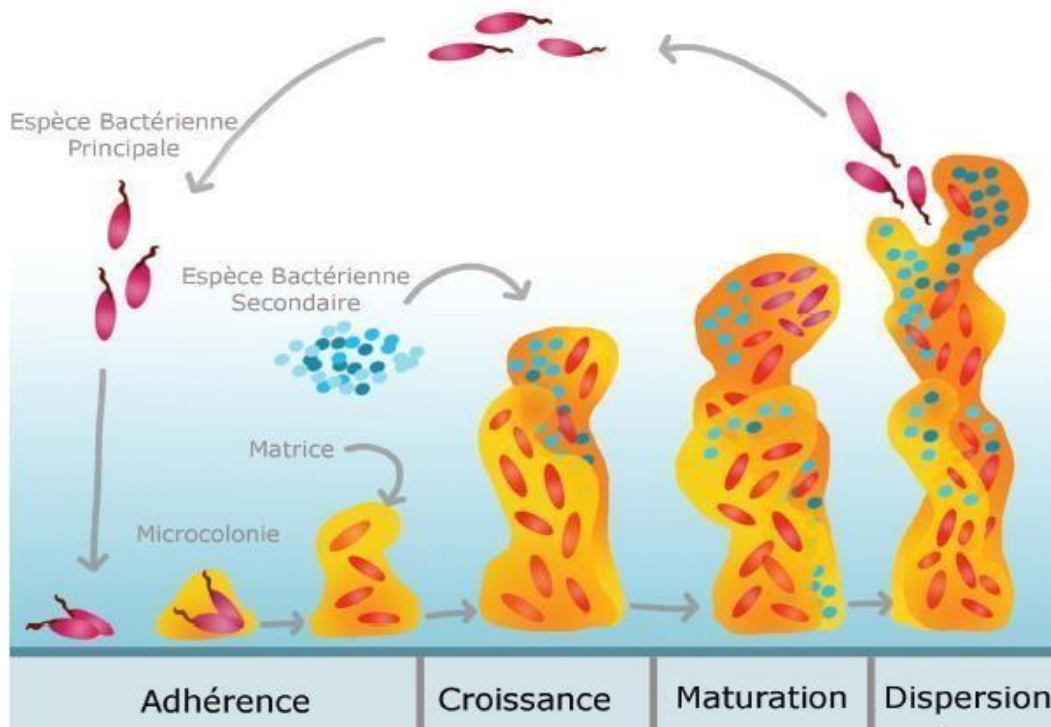
Ces trois voies d'activation se rejoignent toutes dans une voie d'activation de (SC), la voie terminale qui permet la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM, C5b-9) qui permet de lyser les agents pathogènes.

### **I.3. 2. Formation de biofilm**

Les biofilms sont des structures hétérogènes constituées par des populations bactériennes ou des agrégats de cellules bactériennes attachés englobés dans une matrice extracellulaire polymérique, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles (**Roux et Ghicho, 2006**). La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations. La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (**Tremblay et al., 2014**). La **figure 4** montre les étapes de formation de biofilm.

Dans un biofilm les bactéries communiquent, s'échangent, et se soutiennent car la force est dans l'union. Un mécanisme de communication spécifique aux bactéries est prépondérant coordonne les diverses activités biologiques au sein du biofilm, il s'agit du « Quorum\_sensing » ou QS. Le QS est la régulation de l'expression des gènes en réponse aux fluctuations de la densité de la population cellulaire bactérienne, afin de produire et sécréter des molécules de signal chimique dont la concentration augmente avec l'augmentation de la densité de la population (**Miller et Bassler, 2001**). Ce système fonctionne grâce à des molécules chimiques spécifiques et de signalisation appelées « auto\_inducteurs » (AI).

Chez les bactéries à Gram négatif, c'est les acylhomosérines lactones ou « AHLs » qui sont à l'origine de la signalisation bactérienne. Ces AHL sont captés par la protéine cytoplasmique « LuxR », qui enchaîne une cascade de signalisation activatrice des gènes de QS (**Okada et al., 2005**). Le QS joue plusieurs rôles : contrôle de la sécrétion des facteurs de virulence, sporulation, formation et densité du biofilm (**Bassler et Loscick, 2006**).



**Figure 4 :  tapes de formation d'un Biofilm (Tremblay et al.,2017).**

Les bactéries doivent, dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (fimbriae, flagelle).

Puis les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies. Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents.

L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes.

#### **1.4. Résistance aux antibiotiques et entérobactéries**

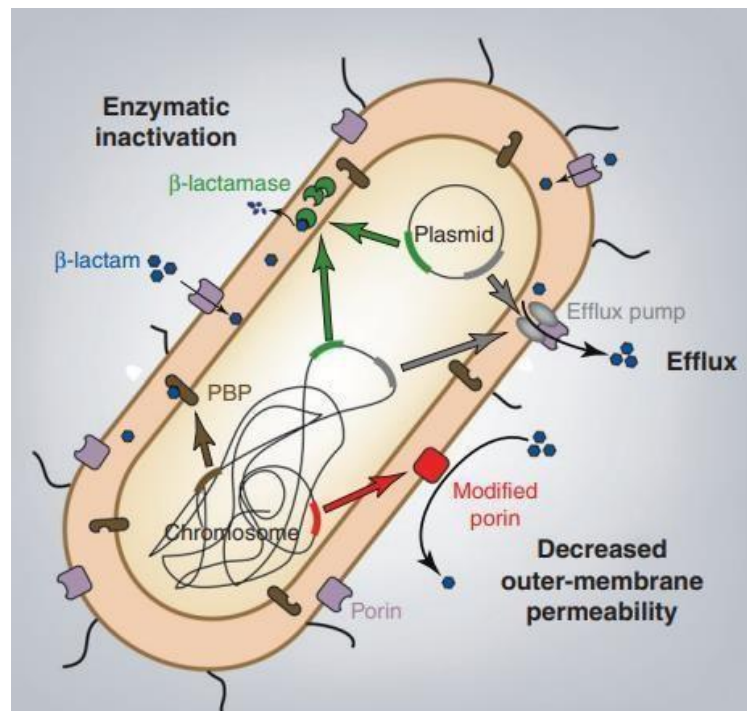
Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances de différentes espèces bactériennes notamment les entérobactéries. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant, qui affecte de nombreux pays (Mirabaude, 2003). Le clinicien est souvent devant une impasse thérapeutique, ne sachant plus quoi prescrire, dans certains cas infectieux où le germe est multirésistant. L'OMS appelle, donc, les chercheurs à développer de nouveaux antibiotiques contre les agents pathogènes qui nuisent



à la santé publique, tout particulièrement, les entérobactéries productrices de BLSE et celles résistantes au carbapénèmes(OMS,2017).

Une souche est dite résistante lorsqu'elle se multiplie en présence de concentrations élevées en antibiotiques comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (Muylaert et Mainil, 2012). Les bactéries ont développé au fil des années une multitude de moyens pour se protéger contre les antibiotiques. Ces mécanismes de résistances sont très variés, mais possèdent tous un point en commun, ils sont inscrits dans le code génétique des bactéries. Leur très grande plasticité génétique, leur reproduction rapide et leur capacité à partager du matériel génétique sont à la base de l'émergence et de la propagation de la résistance (Sèdo Ami, 2020).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques rencontrés chez les entérobactéries peuvent être « Enzymatique » ou « non Enzymatique » » (Figure 5) (Philippon, 2008). Le premier est souvent rencontré et où l'on constate la production d'une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique. L'exemple le plus cité et le plus répandu parmi les entérobactéries, c'est la production d'une  $\beta$ -lactamase capable d'hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines. Quand cette enzyme confère la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération « C3G », le profil de résistance de ces bactéries est appelé « BLSE » ou bactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi.



**Figure 5** : Mécanismes primaires de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les *Enterobacteriaceae* (Nordmann et al., 2012)

## **II. Thérapie Alternative dans le traitement des infections bactériennes : phytothérapie**

Selon l'OMS, 80% des populations des pays en voie de développement ont recours aux plantes pour traiter divers problèmes de santé. Si ces « anciennes » pratiques ont continué d'exister jusqu'à aujourd'hui malgré la présence dominante de la médecine « moderne », c'est parce qu'elles enregistrent des succès thérapeutiques (OMS,2002).

La médecine traditionnelle est l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur des théories, des croyances et des expériences auxquelles différentes cultures ont recours, pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales (OMS, 2002).

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et, plus particulièrement pour les populations démunies des pays en voie de développement, qui en dépendent, pour assurer leurs soins de santé primaires et leur subsistance. Ces communautés utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments (Bouزيد et al., 2016). De nombreuses études attestent des propriétés antibactériennes de certaines plantes ou substances naturelles capables de lutter efficacement contre certaines maladies infectieuses. On pourrait les classer en 3 catégories : les huiles essentielles (HE), les produits de la ruche ainsi que les plantes et champignons.

Au vu de l'augmentation croissante de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il devient primordial de développer d'autres stratégies thérapeutiques et de rechercher des biomolécules d'origine naturelle, ayant une activité antimicrobienne. La connaissance des plantes, de leurs dérivés et l'étude de leurs propriétés et de leurs effets thérapeutiques permettra, certainement ? de découvrir de nouveaux principes actifs aux activités intéressantes (Chebaibi et al., 2015).

### **II.1. Apport de la phytothérapie en médecine infectieuses**

De nombreuses publications attestent de l'apport de la phytothérapie en médecine infectieuse. En effet, certains extraits végétaux et HE ont montré leurs efficacités dans le traitement des infections urinaires. Citons par exemple les extraits de jus de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) riche en proantho\_cyanidines (PAC), des feuilles de la busserole (*Arctostaphylos uva-ursi*) ou raisin d'ours riche en arbutoside, ainsi que l'HE des Baies de genévrier et de thym riche en thymole et en aldéhyde aromatiques (Debré, 2019).

Les infections respiratoires telles que la grippe, les bronchites et les pneumonies ont, depuis longtemps, été traitées par les anciennes civilisations, avec du miel. Le miel de Manuka récolté en Australie a la capacité d'inhiber, *in vitro*, la réplication du virus de la grippe. Les biomolécules dérivées des flavonoïdes interagiraient avec le lysozyme et les antiviraux zanamivir ou oseltamivir (**Haoud et Mellali,2021**). Il a aussi été démontré que certains composés du miel d'abeille domestique ainsi que la propolis (acide 3-phényllactique, ester phénéthylique d'acide caféique [CAPE], lumichrome, galangine, chrysin et acide caféique) pouvaient potentiellement inhiber la réplication du SARS-CoV2(**El Hashem,2020**).D'autre par les graines de nigelle (*nigellasativa*) contiennent de nombreux composés bioactifs telle que la thymoquinone, (27,8 %-57,0 %), le p-siméon (7,1 %-15,5 %), le karvakrol (5,8 %-11,6 %), le t-anetol (0,25 %-2,3 %), le 4-terpinéol (2,0 %-6,6 %) et le longifoline (1,0 %-8,0 %) qui pourraient potentiellement diminuer de la charge virale du SARS-CoV2 par l'augmentation de l'induction de l'interleukine 8 (IL-8) et augmenter le nombre de cellules lymphocytes T auxiliaires (TCD4+) et de stimuler leur action. Elle augmenterait également les niveaux des interférons gamma (IFN- $\gamma$ ), ce qui a pour conséquence de réduire considérablement la charge virale de souris infectées par le cytomégalo virus (**Ulsali et al.,2014 ; Haoud et Mellali,2021**).

De récentes études ce sont concentrées sur la recherche de biomolécules végétales qui peuvent inhiber cette communication bactérienne par QS et la formation de biofilm. Dans le cas d'infection par les bactéries à Gram négatif, les AHLs sont les premières cibles thérapeutiques dans ce cas-là. Ainsi, il a été prouvé que la vanilline extraite des gousses de vanille (*Vanillaplanifolia*) interagit avec LuxR, en entrant en compétition avec les AHLs. La formation de biofilm est ainsi perturbée (**Ponnusamy et al.,2009**).

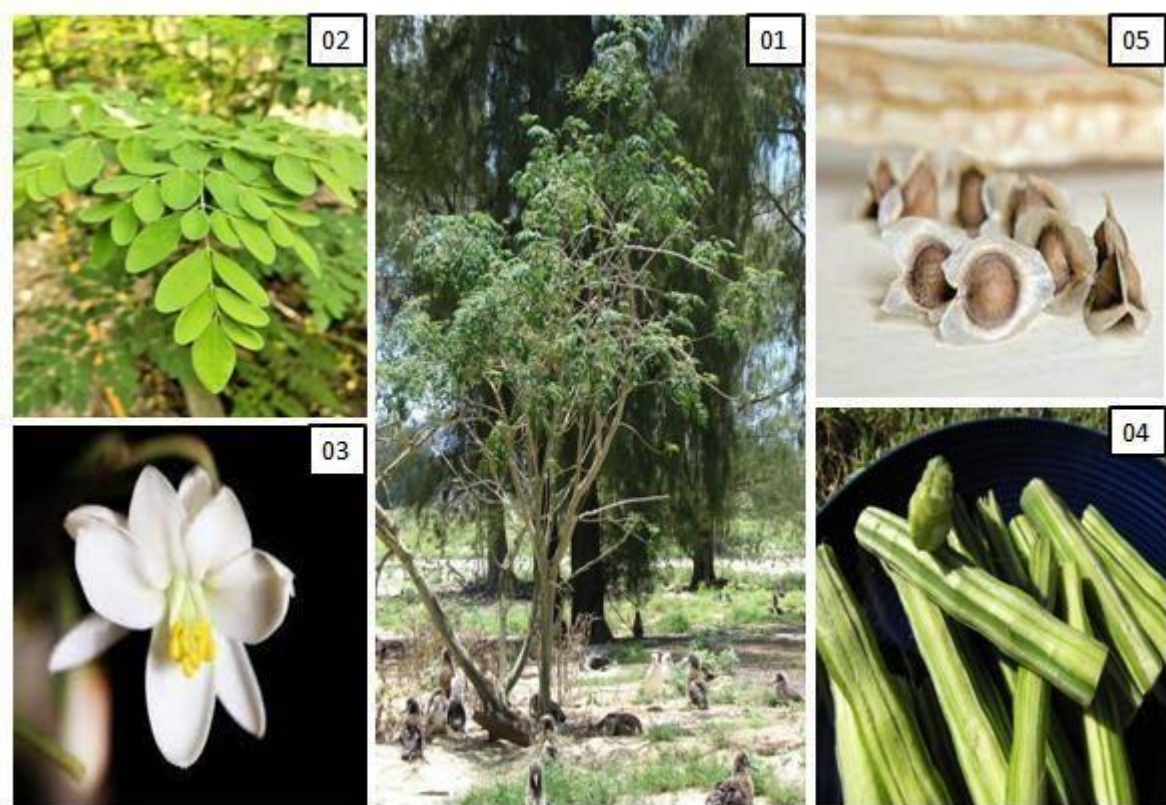
Les extraits de *Moringa oleifera* semblent, aussi, avoir un effet anti QS, de par leur abondance en acide Chlorogénique, acide gallique et quercétine (**Singh et al., 2009**) .

## **II.2. Exemple de plante médicinale dans le traitement des infections bactériennes : *Moringa oleifera***

*Moringa oleifera* communément appelé raifort, pilon, arbre de vie ou encore en ébéday en Afrique francophone, appartient à la famille des *Moringaceae* qui comprend environ 12 à 14 espèces. C'est un arbre à croissance rapide, résistant à la sécheresse et largement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales du monde (**ILanko et al., 2019 ; Binette et Jardin, 2022**).La classification botanique de *Moringa oleifera* est indiquée dans (**Tableau II, annexe 1**)



Sous les tropiques, le Moringa est un petit arbre de 10 à 12m maximum au feuillage caduc. Il présente un tronc droit de 1 à 2m d'hauteur, un système racinaire qui s'enfonce jusqu'à 1.30m de profondeur, des racines blanche à une odeurs spécifiques, des feuilles alternes bi ou tirpennées , des fleurs qui se présente sous forme de panicules axillaires blanche ou crème de couleur avec des points jaunes à la base, ainsi que des fruits sous forme de gousses à trois lobes mesurant 20 à 60 cm, avec des graines rondes avec une coque semi-perméable (**Figure 6**) (**Bouzarne et Boukedroun, 2013**).



**Figure 6 :** Les différentes parties de l'arbre *Moringa oleifera*.

L'arbre de *Moringa Oleifera* (1), les feuilles (2), des fleurs (3), les fruits (4), les graines (5) .

Le Moringa est largement connu et utilisé en phytothérapie. Parmi les roturiers, il a gagné son nom comme "l'arbre miracle" en raison de ses incroyables capacités de guérison pour divers maux (**Ahmed et al., 2014**). Plusieurs investigations ont été menées pour isoler les bioactifs composés de diverses parties de la plante en raison de ses diverses applications qui présente une gamme variée d'utilisations médicinales qui comprennent des propriétés antioxydantes et anticarcinogène , anti-inflammatoire, antispasmodique et diurétique

antiulcéreuse, antibactérienne et antifongique et la cicatrisation des plaies ( **Sulaiman et al., 2011**).

## **II. 2. 1 Valeurs nutritifs et caractérisation phytochimique**

Toutes les parties (feuilles, fleurs, fruits, écorces et racines) du *Moringa* ont des vertus médicinales confirmées par des années de recherches et d'expérimentation dans différents pays africains, asiatiques et panaméricains (**Millogo et al ., 2017**). Plusieurs travaux ont mis en évidence les qualités nutritionnelles exceptionnelles des feuilles de *M. oleifera*, qui sont utilisées dans divers domaines en Asie et en Afrique en raison de leur richesse en protéines, vitamines (A, B, C, E), ainsi que leur forte teneur en sels minéraux : calcium (Ca), Potassium (K), Magnésium (Mg), Phosphore (P), Fer (Fe), Zinc (Zn), Cuivre (Cu), Manganèse (Mn), Sodium (Na), Chlore (Cl) (**Wouyo et al., 2014**), et également de bons acides gras, les fibres, les oligoéléments (**Latla et Oulad laid, 2020**). La poudre de feuilles de *Moringa* est riche en minéraux notamment en calcium, en potassium et en magnésium. La teneur en fer des gousses est très faible par rapport à celle des autres produits (**Tableau III, annexe 1**) (**Ndong et al., 2007**).

En termes de composition phytochimiques, toutes les parties de *Moringa* contiennent des alcaloïdes, flavonoïdes, des composés phénoliques, des tanins, stérols, terpénoïdes, saponines, anthraquinones, sucres réducteurs avec des proportions différents. *Moringa* est un réservoir d'éléments diététiques supplémentaires réagissant comme stimulateurs cardiaques et circulatoires, antioxydants, anti-inflammatoires, antipyrétiques, antiépileptiques, diurétiques, antihypertensives, antispasmodiques, hypocholestémiques, antidiabétiques, antibactériennes, antiulcéreux et hépatoprotecteurs (**Latla et Oulad laid, 2020**).

### **II.2.2 Activité antioxydante de *Moringa oleifera***

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux libres superoxide  $O_2^{\bullet-}$ , hydroxyl  $HO^{\bullet}$ , alkoxy  $RO^{\bullet}$  et peroxy  $RO_2^{\bullet}$ . Ces radicaux sont impliqués dans le stress oxydant qui est caractérisé par un déséquilibre entre la production des ERO (prooxydants) et l'élimination de ces espèces par le mécanisme de défense antioxydante. (**Serigne et al., 2015**) Les antioxydants, également appelés « pièges à radicaux libres », sont des composés qui, soit réduisent la production des radicaux libres (ERO/ROS), soit réagissent avec eux et les neutralisent), prévenant ainsi les dommages qu'ils causent.

(**Azouz Boussalem et Haridi , 2021**) A ce titre, *Moringa Oleifera* est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que : les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants exercent ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (**Boudjouref ,2011 ; Ouladlaid et Hadjkouider, 2018**). Les flavonoïdes particulièrement peuvent empêchés les dommages oxydatifs soit par capture des radicaux, par chélation des métaux (le fer et le cuivre) ou par inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Achat, 2013**).

### **II.2.3. Effets thérapeutique de *Moringa Oleifera***

Des études in vivo et in vitro ont montré que divers extraits de feuilles de *Moringa* possèdent différents effets thérapeutiques, tels que des activités anti-inflammatoires hypolipidémiantes, antioxydantes, antidiabétiques et chimio protectrices (hépatique, cardiaque, rénale, nerveuse) (**EL-serehey et al., 2020**).

Une activité antimicrobienne de diverses parties de *Moringa* ,contre une gamme d'agents pathogènes, fut rapportée (**ILanko et al., 2019**).

En effet, une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* a été détectée dans des extraits aqueux et éthanoliques de *Moringa* (**Ouladlaid et Hadjkouider, 2018**). De plus, il a été décrit par **Azzouz et Haridi(2021)** que les extraits de *M. oleifera* ont la capacité de piéger les radicaux libre (DPPH et ABTS) d'une façon concentration dépendante. Une étude réalisée par **Ming- Chih et al.(2011)** indique que la tendance de l'activité antioxydante en fonction des parties du *Moringa* était : feuille > tige pour les échantillons des deux saisons étudiées, et que les extraits méthanoliques de *Moringa* peuvent être utilisés comme source facilement accessible d'antioxydants naturels dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

## *Matériel et Méthodes*

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 6 mois, de février à aout 2022.

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet potentiellement thérapeutique et antiinfectieux d'un extrait végétal, *Moringa oleifera*, *in vitro* et *in vivo*. L'extrait éthanolique des feuilles de cette plante ont été testées, quant à leur éventuelle activité antibactérienne et anti-infectieuse, sur des souches cliniques et communautaires. Ces effets ont ensuite été appréciés, *in vivo*, dans un modèle murin de sepsis à bactérie à Gram négatif.

## **I. Matériels**

### **I. 1. Matériel biologique :**

#### ➤ **Souches bactériennes :**

Nous avons travaillé sur une collection de 54 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 2**).

Des souches de référence ont aussi étaient 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 males, âgées de 10 à 12 semaines (20-25g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie. Il s'agit des souris BALB/c (n=15).

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 Hounain (Blida, Algérie). La gérante de l'institut, Mme Sihem NADGI nous a procuré la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*, récoltées durant le mois d'août 2021 dans la région d'El Goléa (El Menea). 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 (**Annexe 2**).

**II. Méthodes**

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

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.

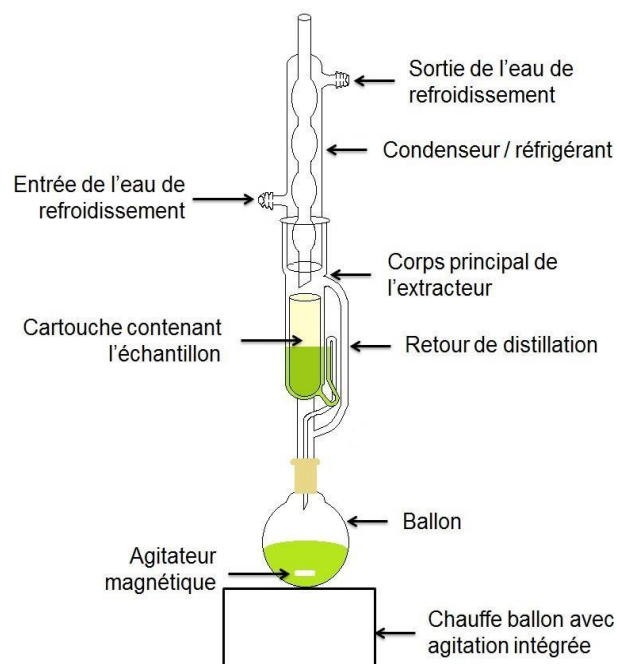
Une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle diluée à 1/500 estensemencée par étalement sur gélose MH. Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, 50 µL de sérum sont déposés au centre de la boîte de culture. La présence ou l'absence de croissance bactérienne, observée 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. 2. Etude de l'effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera***

### **II. 2. 1. Extraction éthanolique des feuilles *Moringa oleifera***

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. La poudre de la plante utilisée est introduite dans une cartouche en papier filtre, cette dernière sera placée dans le corps en verre du Soxhlet surmonté d'un réfrigérant. Le Soxhlet se compose d'un tube siphon et d'un tube de distillation. L'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le solvant condensé s'accumule dans le réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand ce dernier atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (**figure 7**)(Penchev, 2010 ; Feknous et al., 2014 ; Tiên, 2016).



**Figure 7** : principe d'extraction par Soxhlet



Dans notre travail nous avons utilisé 250g de la poudre de Moringa subdivisée dans deux corps de soxhlet (125g dans chaque cartouche), ainsi que 500ml d'éthanol dans chaque ballon. L'extraction a duré jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche (4h).



**Figure 8** : extraction éthanolique du matériel végétale

La séparation du solvant de l'extrait a été faite à l'aide de l'appareil Rotavapor, en réalisant une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide.



**Figure 9** : récupération de l'extrait végétale brute



➤ **Calcul du rendement**

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter (**Carré, 1953**). Le rendement qui est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante :  $R = PE/PA \times 100$ .

R= Rendement de l'extrait en pourcentage.

PE= Poids de l'extrait en gramme.

PA= Poids de la plante en gramme.

**II. 2.2. Etude de l'activité antioxydante *in vitro* des feuilles de *Moringa oleifera***

L'effet antioxydant de l'EEM 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 bleue et absorbe à 517nm. La recombinaison de ce radical entraîne une décoloration du bleu donc une absence d'absorption à 517nm. Ce test consiste donc à mesurer cette décoloration induite par la réduction du DPPH radicalaire (forme recombinaison) par les extraits végétaux.

Une gamme de concentrations de L'EEM est effectuée avec du méthanol comme diluant dans des puits d'une microplaque. A 100µl de chaque concentration d'extrait sont ajoutés 100µl de DPPH radicalaire d'une concentration de 0,04µg/ml (0,1 mM). Un témoin négatif est réalisé pour chaque concentration d'extrait (sans DPPH). La microplaque est ensuite incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 1 heure. Au bout de ce temps, la densité optique à 517 nm de chaque puits est enregistrée (**figure 10**). Les valeurs obtenues permettent de représenter le pourcentage de DPPH non réduit par l'extrait végétal en fonction du rapport concentration de l'extrait/ concentration DPPH radicalaire selon la formule suivante (**Sánchez-Moreno et al., 1998**) :  $\%DPPH = DO_i - DO_{ib} / DO_t \times 100$

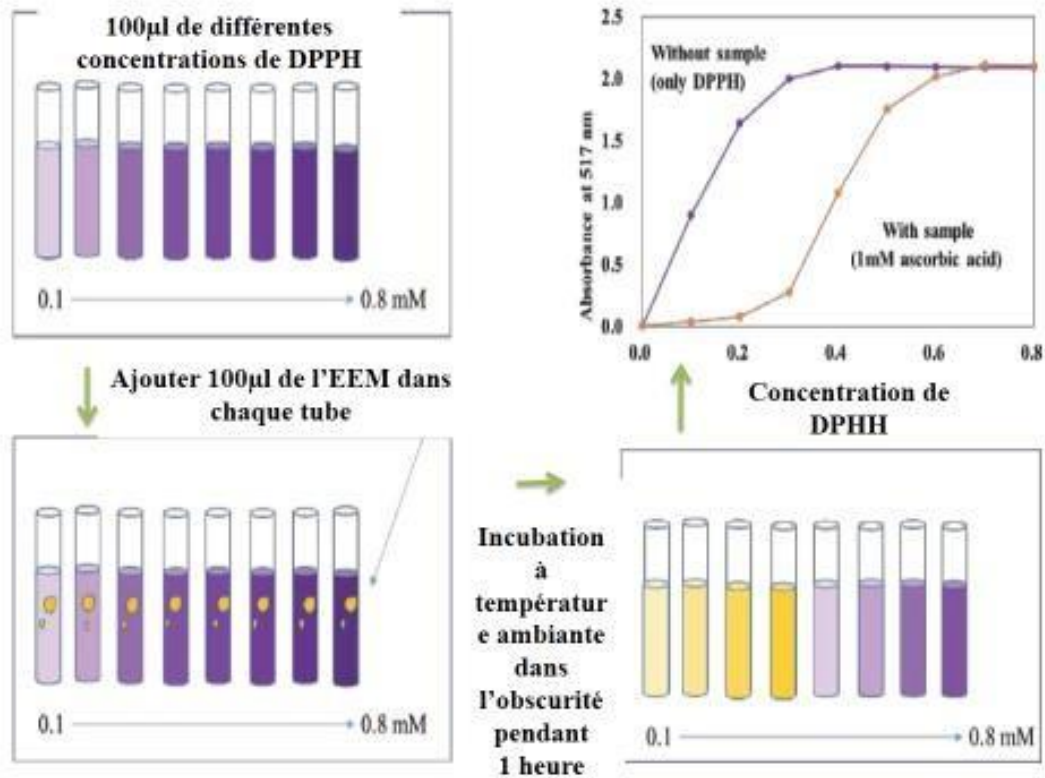
%DPPH° : pourcentage de DPPH radicalaire (non réduit par l'extrait végétal)

DO<sub>i</sub> : Densité optique à 517 nm pour chaque concentration de l'extrait végétal + DPPH

DO<sub>ib</sub> : Densité optique à 517 nm pour chaque concentration de l'extrait végétal sans DPPH

DO<sub>t</sub> : Densité optique à 517 nm du DPPH sans extrait végétal

Ceci va nous permettre de déterminer le rapport des concentrations d'extrait végétal/DPPH radicalaire réduisant à 50% le DPPH radicalaire (EC50). La comparaison des EC50 de chaque extrait permet de déterminer et de comparer leur pouvoir antioxydant.



**Figure 10** : étapes de la réalisation du test DPPH

### **II. 2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles 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  $10^8$  UFC/ml (Fertout-Mour et al., 2016).

#### **➤ Préparation des dilutions des extraits**

La solubilisation de l'EEM 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. Une solution mère à 100µg/ml est obtenue pour l'EEM. 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. Ces solutions filles ainsi que la solution mère 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  $10^6$  UFC/ml a été ensemencé 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.

En plus des souches sauvages objet de notre étude, nous avons aussi testé l'activité antimicrobienne sur des souches de référence *E. coli* ATCC 25922 ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dans les mêmes conditions.

➤ **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. 2. 4.Effet 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 sur la formation de biofilm est mesuré en incubant les bactéries de la microplaque en présence d'une concentration de 100µg/ml de l'EEM. Ainsi, nous recherchons si l'EEM a 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 sur ces souches a aussi été testé dans les mêmes conditions que les souches sauvages.

## II. 3. Etude de l'effet de l'extrait de feuille de *Moringa oleifera* sur le l'inflammation induite par sepsis :

### II. 3. 1. Modèle murin de sepsis monomicrobien :

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, développé dans une précédente étude.

### II. 3. 2. Protocole pharmacologique :

Les souris BALB/c ont été réparties en trois lots (Figure 11) :



**Figure 11** : répartition des souris en lots pour le protocole pharmacologique

- Lots contrôle (n=5) : n'ayant reçu aucun traitement.
- Lots septiques (n=5) : ont reçu en intrapéritonéale 100  $\mu$ L d'une suspension de *S. marsescens*, à dose sublétales de  $10^6$  UFC/ml, préparée dans de l'eau physiologique stérile.
- Lots septique traités à l'EEM (n=5) : ont reçu 2 doses de 500 mg/kg d'EEM, dissoute dans 5% de DMSO stérile, réparties comme suit (figure 12) :



**Figure 12 :** injection intrapéritonéale des souris

- Une première dose 30 min avant l'injection de *S. marsecens* (i.p),
- Une deuxième dose 30 min après l'injection de *S. marsecens* (i.p),

Les animaux ont été sacrifiés 24 h après l'injection bactérienne et les coeurs, les rates, les foies, les reins et les ganglions ont été rapidement prélevés, lavés dans une solution froide de NaCl à 0,9 % et préparés pour l'étude histologique.

### **II. 3. 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 (**Annexe 2**).

### **III. Etude statistique**

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

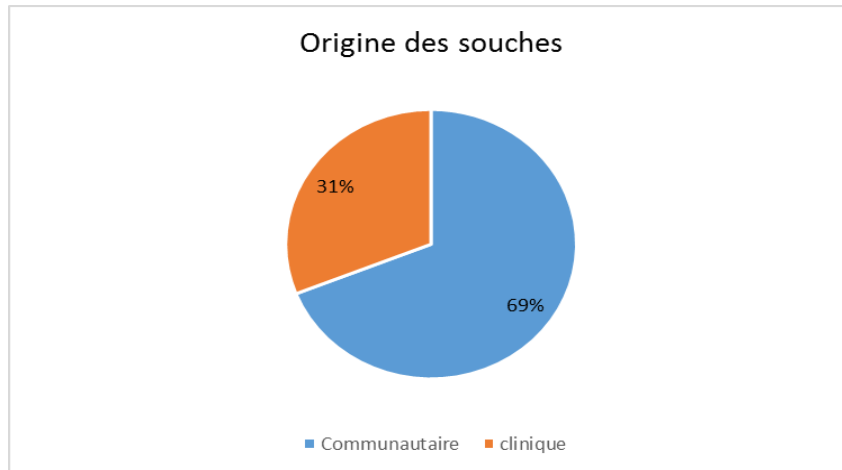
Le test ANOVA unidirectionnel avec un test *post hoc* de Tukey est utilisé pour comparer les différences entre les groupes expérimentaux, avec  $P < 0,05$  étant considéré comme statistiquement significatif.

## *Résultats et Discussion*

## 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 38 (69%) souches d'origine communautaire et 17 (31%) d'origine clinique (**Figure13**).



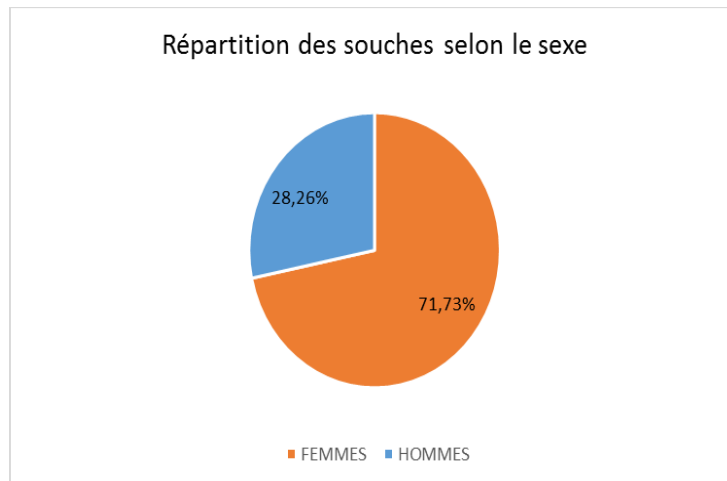
**Figure 13:** Répartition des souches isolées selon l'origine

Les infections à entérobactéries étaient, depuis longtemps, limitées au milieu hospitalier. Leur épidémiologie s'est considérablement modifiée depuis les années 2000. On assiste depuis à une diffusion pandémique de ce groupe bactérien en milieu communautaire. Ce phénomène épidémique est particulièrement inquiétant, du fait de la rapidité de cette diffusion et son étendue géographique. *Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée dans ce type d'infections (**Zahar et al., 2009**).

### I. 2. Répartition des souches bactériennes selon le sexe

Nous n'avons pu identifier le sexe pour 9 des patients prélevés. Ainsi, les résultats montrent que les souches objets de notre étude étaient prédominantes chez les femmes (n=33, 71.73%) comparés aux hommes (n=13,28.26%) avec un sexe ratio de 0.39 (**Figure 14**).





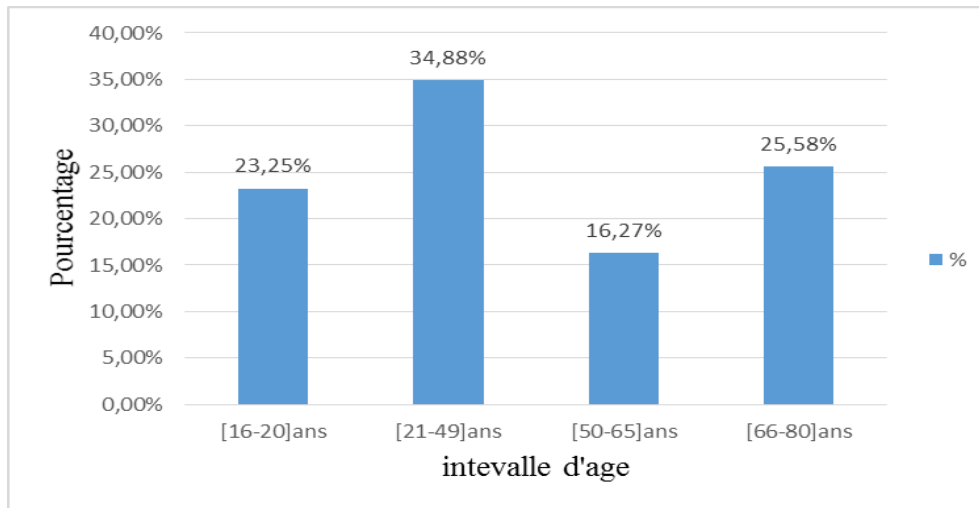
**Figure 14** : Répartition des souches isolées selon le sexe des patients prélevés

Les femmes sont plus sujettes aux infections urinaires (tout particulièrement à la cystite), causées par les entérobactéries, du fait d'une structure anatomique favorable à une contamination de l'épithélium urinaire par les entérobactéries provenant du tractus intestinal (*via* l'anus). Ce type d'infection est localisée au niveau de la vessie après passage de la bactérie de l'extérieure vers la vessie à travers l'urètre. Les femmes sont les plus touchées car leur urètre est plus court comparé aux Hommes. Environ 50 % des femmes en seront victimes au moins une fois dans leur vie (**Mouracade et saussine, 2008 ; Clere, 2017**).

Nos données concordent avec celles de **Cisse (2019)**. Une autre étude réalisée au Maroc par **Sbiti (2017)** a encore révélé une prédominance féminine et que le sexe féminin est un facteur de risque important pour contracter l'infection urinaire.

### **I. 3. Répartition des souches bactériennes selon l'âge**

La moyenne d'âge retrouvée chez les patients était de 43 ans. La tranche d'âge où l'on trouve une prédominance des souches est celle de 20 à 49 ans et 65 à 88 ans, avec un pourcentage de 34.88% et 25.58% respectivement (**Figure15**).



**Figure 15:**Répartition des souches bactériennes selon l'âge

La **figure 15** montre que les patients âgés entre 21-49 ans et entre 66-80 ans sont les plus touchés par les d'infections bactériennes avec un pourcentage de 34.88% et 25.58% respectivement. Tandis que les patients du jeune âge entre 16 et 20 ans sont moins exposés avec un pourcentage de 23.25%, en dernier les patients âgés de 50 à 65 ans sont les moins touchés avec un pourcentage de 16.27%.

#### I. 4. 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 API20E. 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, 55.5%) étaient de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Les autres espèces identifiées étaient *E. coli* (n=15 ; 27.77%), *Serratia marcescens* (n=4 ; 7.40%), *Citrobacter sp.* (n=3 ; 5.55%) et 2 *Enterobacter sp.* (n=2 ; 3.70%) (**Tableau I**).

**Tableau I:** Répartition des souches selon la fréquence d'isolement

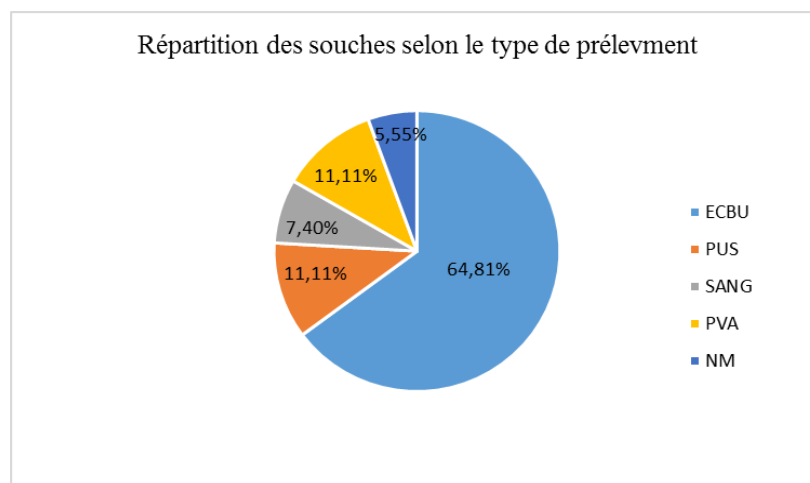
Espèce	BLSE (n)	NBLSE (n)	Total (n, %)
<i>K. pneumoniae</i>	18	12	30 (55.5)
<i>E. coli</i>	06	09	15 (27.77)
<i>S. marcescens</i>	/	04	04 (7.40)
<i>Citrobacterspp.</i>	/	03	03 (5.55)
<i>Enterobacaterspp.</i>	/	02	02 (3.70)

En termes de fréquence d'isolement, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* sont les souches les plus isolées, suivit de *Serratia marcescens* et *Citrobacter sp. Enterobacater sp* a un taux d'isolement faible.

Dans le cadre d'une étude rétrospective (2008-2018) sur la prévalence des infections du sang par *Klebsiella pneumoniae*, il a été trouvé que la prévalence de ces infections augmentait de 2.5% jusqu'à 15.8%. Ce type d'infection affectait particulièrement les patients âgés de plus de 60 ans. En 2020, le pourcentage d'isolement de cette espèce chez l'homme a augmenté de 15.8%, à 41.8% rapporte une étude complémentaire (Yanyan et al., 2018 ; Yuanyuan et al., 2020).

### I. 5. Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement

D'après les résultats obtenus, nous constatons que plus que la moitié des souches étaient isolées à partir des urines (n=35 ; 64.81%), dont 75.67% étaient d'origine communautaire. Les souches issues du pus (n=6 ; 11.11%) de la muqueuse anale (n=6 ; 11.11%) et du sang (n=4 ; 7.40%) étaient quasi-exclusivement d'origine clinique. Le type de prélèvement de 3 souches n'a pas été mentionné dans notre fiche symbolisé par NM (n=3; 5.55%) (Figure 16).



**Figure 16:** Répartition des souches bactériennes selon la nature de prélèvement

Ces résultats concordent avec de nombreuses études traitant de l'épidémiologie des infections à entérobactéries. Citons celle de **Gadou (2019)** en Côte d'Ivoire. Sur 153 souches d'entérobactéries, 72 ont été isolées des urines, 32 des suppurations, 20 du sang, 10 des bouts de sonde, 3 du crachat, et une seule souche du liquide d'ascite. Un résultat différent a été obtenu dans une étude faite en Togo où les pus ont contenus plus d'entérobactéries BLSE que les urines (Toudji et al., 2017).

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 (**TableauII**).

**TableauII:** Répartition des souches d'entérobactéries selon le type de prélèvement

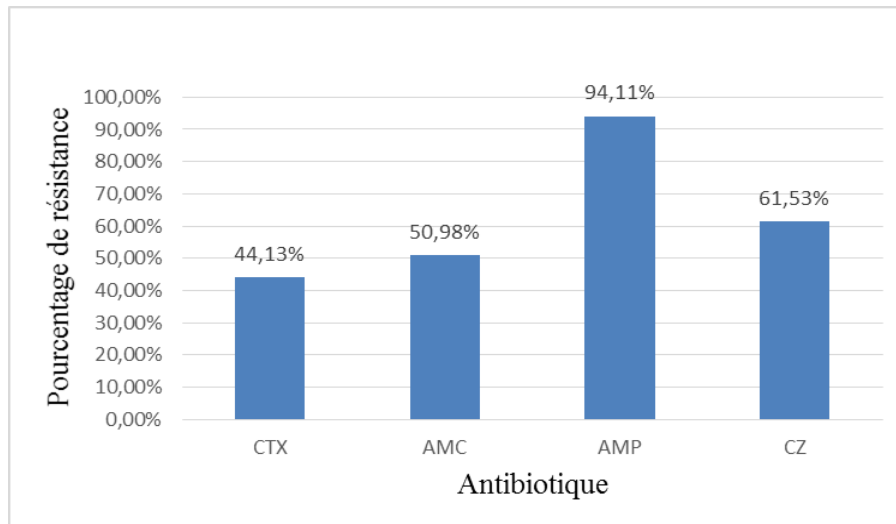
Souches	ECBU	Sang	Pus	Prélèvement anal	Non Motionné
<i>K. pneumoniae</i> (n=30)	16	4	4	5	1
<i>E. coli</i> (n=15)	13	0	0	1	1
<i>S. marcescens</i> (n=4)	1	0	2	0	1
<i>Citrobactersp</i> (n=3)	3	0	0	0	0
<i>Enterobacatersp</i> (n=2)	2	0	0	0	0

*K. pneumoniae* était l'espèce prédominante dans les échantillons urinaires, les prélèvements de la muqueuse anale ainsi que le sang et le pus. En deuxième position, nous retrouvons *E. coli*. En effet, sur 15 isolats 13 ont été isolées des urines et une de la muqueuse anale.

Les infections urinaires sont souvent causées par les bactéries à Gram négatif, tout particulièrement les entérobactéries, en tête de liste *Escherichia coli* et *K. pneumoniae*. En effet, dans une étude rétrospective qui a porté sur 239 malades ayant subi un ECBU entre janvier 2006 et décembre 2007 à l'hôpital d'Ain M'lila (l'est algérien), les entérobactéries représentaient 87 % des bactéries isolées avec prédominance d'*Escherichia coli* (71 %) suivie par *Klebsiella pneumoniae* (7.94%) (**Bouzenoune et al., 2009**).

## 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  $\beta$ -lactamines.



**Figure 17:** Pourcentage de résistance aux Antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines

Nous avons remarqué que les taux de résistance les plus élevés, dans la famille des  $\beta$ -lactamines, étaient vis-à-vis de l'ampicilline (AMP) ( 94.11%), suivi de la Céfazoline (CZ) (61,53%) , l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (50,98%), puis le céfotaxime (CTX) (44.13%) (**Figure 17**).La résistance aux antibiotiques est en constante augmentation dans le monde entier. Pendant longtemps, les hôpitaux et les institutions médicales étaient les seuls touchés. En revanche, aujourd'hui, les germes résistants sont de plus en plus détectés dans la communauté (**Emonet et al., 2014**).

Dans une étude qui s'est consacré à déterminer le profil de résistance aux antibiotiques de 569 souches d'entérobactéries, isolées dans les prélèvements urinaires dans un hôpital à Bamako(Mali), 83 % des souches avaient une résistance acquise à l'association (Amoxicilline + Acide clavulanique) (**Kalambry et al. 2019**).La résistance pourrait être due à l'utilisation abusive des antibiotiques, au non-respect des doses d'antibiotiques prescrits par le médecin et/ou à la diminution de la charge de ces antibiotiques (**Gbessoua, 2019**).

Par ailleurs, nous avons révélé la présence de souches productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. En effet, 24 souches d'entérobactéries, soit 43.13%, présentaient un phénotype BLSE, qui s'est traduit par une image de synergie entre le disque d'AMC et de CTX ou CRO (**Figure18**).



**Figure 18:** 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  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dites « BLSE » au nombre de 24 soit 44.44% des souches.
- Souches non productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dites « non BLSE » au nombre de 30 soit 55.56%.

Il est important de noter que la majorité des souches BLSE étaient d'origine clinique (n=14 ; 60.86%). La différence est très hautement significative avec les souches BLSE d'origine communautaire ( $P=0.0001$ ).

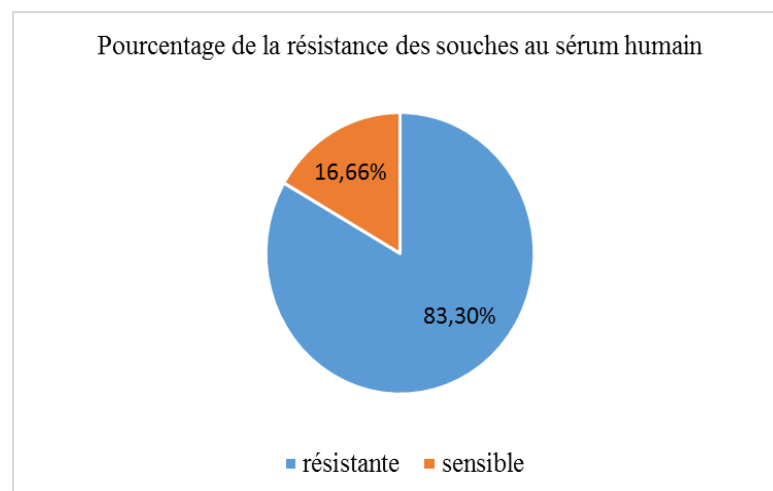
L'incidence des BLSE dans les isolats cliniques et communautaires a augmenté partout dans le monde depuis leur découverte. Il sont associés à une augmentation importante de la morbidité et de la mortalité (**Cherkaoui et al., 2014**). Le taux de résistance aux ciprofloxacines, un  $\beta$ -lactamine de la sous famille quinolones fréquemment utilisé pour traiter les infections des voies urinaires, variait de 8,4 % à 92,9 % pour *Escherichia coli* et de 4,1 % à 79,4 % pour *Klebsiella pneumoniae*. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques de dernier recours (les carbapénèmes) et 'E. coli aux fluoroquinolones, antibiotiques utilisés pour traiter les infections des voies urinaires s'est propagée dans toutes les régions du monde (**OMS, 2020**).**Mahfouz et al. (2020)** ont étudiés l'incidence de la résistance aux  $\beta$ -lactamine, en consultant des articles publiés entre janvier 2000 et février 2020, dans les pays arabes. Ce rapport conclut que les taux de résistance des espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoai*e ont augmenté envers plusieurs agents antibiotiques. La résistance aux céphalosporine a augmenté de 37 à 89.5%, les fluoroquinolones de 46.8 à 70.3%, les aminosides de 40.2 à 64.4%, les mono-

bactames de 30.6 à 73.6% et les carbapénèmes de 30.5 à 64.4%. Une moyenne de 36.9% des souches isolées avait un phénotype BLSE.

Dans l'étude de **Hawser et al. (2011)**, l'incidence des isolats producteurs de BLSE aux Etats-Unis était de 12,7% pour *K. pneumoniae*, 9,7% *E. coli*, 3,6% *P. mirabilis* et 3,1% *K. oxytoca*. Au Bénin, les résultats d'une étude ont montré que 35,5 % d'entérobactéries ont été productrices de BLSE (**Anago et al., 2015**).

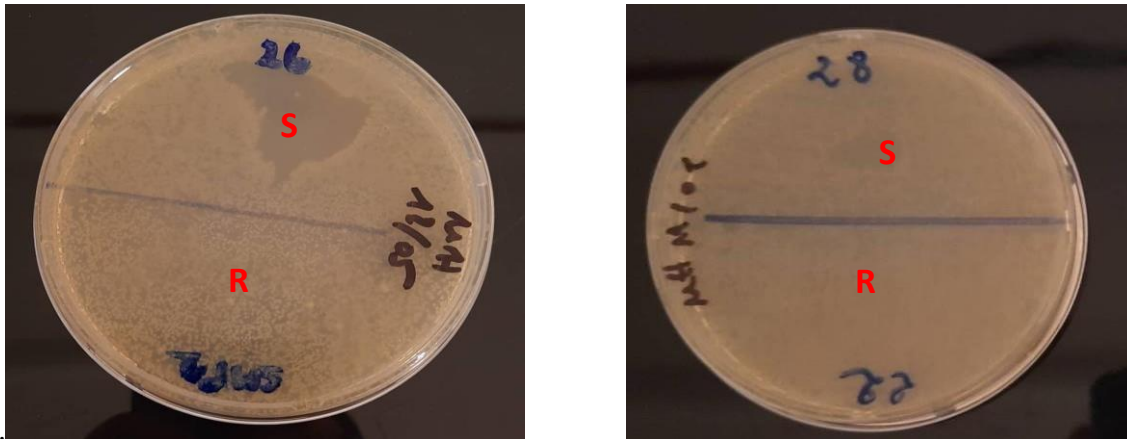
### III. Etude du potentiel de virulence des souches par leur culture en présence de sérum humain

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%) (**Figure19**).



**Figure 19:** Potentiel de virulence des souches en présence de sérum humain Dans notre collection, 93.3% des isolats de *Klebsiella pneumoniae*, 66.6% des *Escherichia coli*, et toutes les souches de *Serratia marcescens*, *Citrobacters sp.* et *Enetrobacters sp.* étaient résistantes au sérum humain.

Les souches résistantes ont donc échappé à l'action des protéines du complément présentes dans le sérum humain. Ces souches sont considérées comme étant résistantes au système du complément. 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  $P=0.2702$ .



**Figure 20** : Résultats test résistance au sérum humain.

En rouge. S : Sensible ; R : Résistante

Dans notre étude nous avons réalisé une technique qualitative. Il est possible, cependant, de réaliser un dosage turbidimétrique par spectrophotométrie, et avoir ainsi que appréciation quantitative de cette capacité à se multiplier en présence de sérum (Colman, 2019 ; Midinoudewa, 2020 ; Patinvoh, 2020).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par El Fertas – Aïssani et al. (2013), où la majorité des souches de *K. pneumoniae* étaient résistantes à l'effet bactéricide du sérum humain. Dans une étude réalisé au Bénin, trois facteurs de virulence à savoir, l'hémagglutination, la présence d'hémolysines et la résistance au sérum ont été recherchés. La résistance du sérum a été analysée à l'aide du dosage turbidimétrique. Les résultats ont montré que seulement 25% des isolats de *K. pneumoniae* et 11.11% pour les souches de *K. oxytoca* agglutinent le sang humain (Midinoudewa, 2020). La résistance au système du complément chez *K. pneumoniae* est souvent attribuée à sa capsule. En effet, la structure polysaccharidique de la capsule de *Klebsiella pneumoniae*, masque les épitopes d'anticorps à la surface bactérienne, bloquant entièrement l'activation du complément (Dennis et al., 2016). Les lipoprotéine associées au peptidoglycane (PAL) et les lipoprotéines muréiques (LppA) de la membrane externe assurent l'échappement à la phagocytose. *Klebsiella* peut également modifier son antigène O et son lipide A du LPS afin d'échapper à la reconnaissance par les TLR4 et au système du complément (Duyen thi Ngoc et al., 2015).



#### **IV. Effet antibactérien et anti-infectieux de l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa Oleifera***

##### **IV. 1. Rendement de l'extraction éthanolique des feuilles de *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 %.



**Figure 21:** Extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera*

Le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants pour extraire les composés antioxydants des feuilles de *Moringa oleifera*. Ils donnent un meilleur rendement d'extraction qui dépasse celui obtenu avec l'eau de sept fois (**Siddhuraju et Becker, 2003**).

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

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 160 µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8 µg/mL. L'activité antioxydante de l'extrait était proportionnellement liée à la composition de métabolite secondaire et liée de concentration de composés bioactifs.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'activité antioxydante du Moringa sont conformes à ce qui est retrouvé dans la littérature. L'EEM a un effet significatif sur le pouvoir réducteur, en captant les radicaux libres et ainsi empêchant leur prolifération qui cause des dégâts certains à long terme (**Boukellal et Boukoulla, 2021**). Les feuilles de Moringa oleifera possèdent le plus grand potentiel antioxydant comparé aux autres parties de la plante (**Jà et al., 2015 ; Sy et al., 2018 ; Mbaïhougadobe et al., 2018**). **Torees et al., (2013)** se sont intéressés au potentiel antioxydant des différentes parties de *Moringa oleifera* (feuilles, tiges, racines), en utilisant le test du DPPH, sur deux types d'extraits (aqueux en macération et éthanolique). Ils ont démontré que les feuilles possèdent la plus importante activité de piégeage des radicaux libres du DPPH comparé aux autres parties (83% pour l'extrait aqueux, et 89% pour l'extrait éthanolique). L'extraction au méthanol révèle des résultats similaires car les alcools donnent un meilleur rendement d'extraction dépassant celui obtenu avec l'eau de sept fois (**Siddhuraju et Becker, 2003**). Dans l'étude d'Awa **Ndiaye et al. (2018)**, une importante activité antioxydante de l'extrait éthanolique des feuilles de Moringa a été observée, avec une concentration inhibitrice 50 (CI50) de 87,86±1,80 µg/ml. **Yong-Bing et al. (2019)** ont, quant à eux, trouvé un IC50 de 1,02 ± 0,13 mg/mL.

De nombreuses études suggèrent que l'activité de piégeage des radicaux libres pourrait être due à la forte teneur, des feuilles de Moringa, en acides phénoliques et flavonoïdes. le β-sitostérol, la quercétine et la kaempférol Sont aussi retrouvés associés à cette activité (**Dharmendra et al., 2014 ; Benrima, 2021**).

### IV. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* sur les entérobactéries

Nous avons testé l'activité antibactérienne à différentes concentrations de l'EEM (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 22**). 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. Le diamètre d'inhibitions était supérieur ou égal à 8mm. Il est important de signaler que seules 32 souches ont été testées pour leur sensibilité à l'extrait brut.



**Figure 22** : résultats du test d'activité antibactérienne de différentes concentrations d'EEM

Les effets biologiques, *in vivo* et *in vitro*, d'un extrait végétal, peuvent être influencés par différents facteurs dont : l'origine géographique de l'échantillon végétale, le procédé d'extraction ainsi que les concentrations testées. En effet :

- Concernant l'origine géographique : *Moringa oleifera* est un arbre qui pousse en zone tropicale, où les conditions sont les plus favorables pour sa croissance. Notre échantillon végétale est issues de la région d'El Goléa en Algérie situé dans la zone subtropicale où la température, le taux d'humidité et les conditions du sol sont différents des tropiques, ce qui se traduira après comparaison des HPLC de la plante de ces deux régions par des teneurs différentes en vitamine, en minéraux et en biomolécules actives (flavonoïdes, alcaloïdes, fibres, glucides, acide aminé) à l'origine des divers activités biologiques. Dans le (**Tableau IV, annexe 3**), nous retrouvons une comparaison entre

les résultats HPLC des feuilles de *Moringa oleifera* du Burkina-Faso ((**Millogo et Hassanata, 2009**) et celle de la région de Bechar (région très proche d'El Goléa) (**Bardi et Fenni ,2015**) .

- Les méthodes d'extraction diffèrent d'un auteur à un autre. Nous avons utilisé l'extraction au Soxhlet parce qu'il était recommandé dans plusieurs articles (**Okeke et al., 2001 ; Houndji et al., 2013 ; Sy et al., 2016**). Certains l'accompagnent et le comparent avec d'autres types d'extraction tel que l'extraction aqueuse, le décocté, le macéré et l'infusé. Chaque méthode d'extraction permet d'avoir différentes biomolécules végétale à partir des feuilles. Les flavonoïdes, les polyphénols, et les terpénoïdes sont fortement présents dans les extraits alcooliques (éthanol, méthanol, Butanol,acétate d'éthyle) (**Boussoufa,2018 ; Ouladali et Hadjkouider, 2018**) (**Tableau v, annexe3**).
- Pour l'essai de l'activité antibactérienne, la dilution de l'extrait végétal dans du DMSO était recommandée dans de nombreuses études (**Mudasser et al., 2014**).A 5% le DMSO ne présente aucune activité antibactérienne, comme nous avons pu le constater dans notre étude en cultivant les bactéries en présence d'un disque imbibé d'une solution de DMSO à 5%. L'activité antimicrobienne *in vitro* des feuilles de *Moringa oleifera* fut testée par une équipe burkinabé. L'équipe en question a constaté que l'extrait éthanolique n'a pas donné de résultats concluant contrairement aux extraits obtenus par décoction et macération pour une concentration de 30mg/ml (**Millogo et Hassanat, 2012**). Dans une autre étude réalisée au Niger, des cultures pures de micro-organismes sont utilisés pour l'évaluation du potentiel antimicrobien des extraits de feuilles du Moringa (souches entéropathogènes, des souches isolées des plaies orthopédiques, et des isolats fongiques). Les activités antimicrobiennes de différents extraits de feuilles (aqueux, méthanolique, éthanolique) ont été évaluées. Tous les extraits de feuilles ont montrés peu d'effet inhibiteur sur les souches entéropathogènes, alors que les extraits aqueux et méthanoliques ont montrés des effets inhibiteurs appréciables sur les bactéries des plaies orthopédiques à 30mg/ml (**Oluduro, 2012**).

Plusieurs études se sont intéressées au Docking moléculaire des molécules bioactifs de *Moringa Oleifera* à l'origine de son effet antibactérien (Guilin et al., 2021 ; Sahabjada et al., 2021 ; Chigurupati et al., 2022 ). Le Docking est un outil bio-informatique qui vise à étudier les interactions entre les différentes molécules biologiques sur le plan tridimensionnel en utilisant des logiciels spécialisés (Chevrollier, 2019).

Les feuilles de *Moringa oleifera* se composent de plus de 64 molécules actives à l'origine de ses diverses activités thérapeutiques dont les composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénolique, les glucosinolates (GL) précurseurs des isothiocyanates (ITC), les caroténoïdes, les alcaloïdes et les stérols (Rani et al., 2018 ; Cirmi et al., 2019 ; Dahakad et al., 2019).

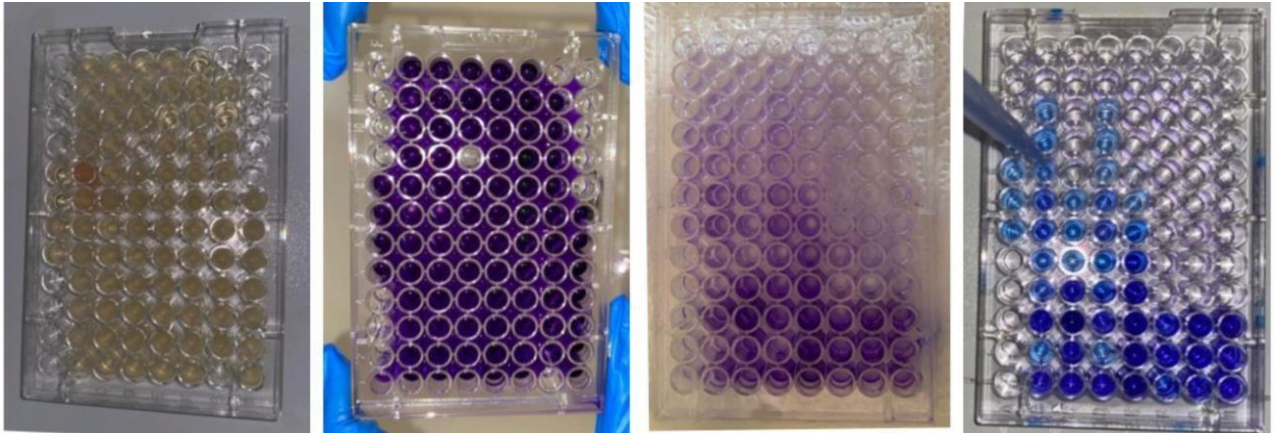
La Moringine est la principale molécule bioactive de Moringa. C'est une glucosinolates dérivé de glucomoringine (GL) trouvé principalement dans les feuilles et les tiges (Dieye et al., 2020 ; Siddiqui et al., 2021). Cette molécule a été largement étudié pour sa bio activité comme antimicrobien contre différents espèces bactériennes, le cas de l'étude (Rajan et al. 2016) qui s'est intéressé à l'interaction entre le Moringine et le LPS de *E. coli*.

#### **IV. 4. Résultats de l'effet de *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 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 III, figure 23). 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.

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

<b>Intensité du biofilm (n, %)</b>		
<b>Faible</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Forte</b>
0(0)	8 (44.44)	10 (55.55)



**Figure 23 :** Méthode spectrophotométrique pour la mesure de l'intensité du biofilm

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 quelques souches comme nous pouvons le constater dans le (**Tableau IV**).

**Tableau IV:** 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 (11.76)	8 (47.05)	7 (41.17)	2 (11.11)	7 (38.89)	9 (50)

Nous constatons d'après le (**tableau IV**) 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'augmentait pour 7 autres parmi les 18 souches testées.

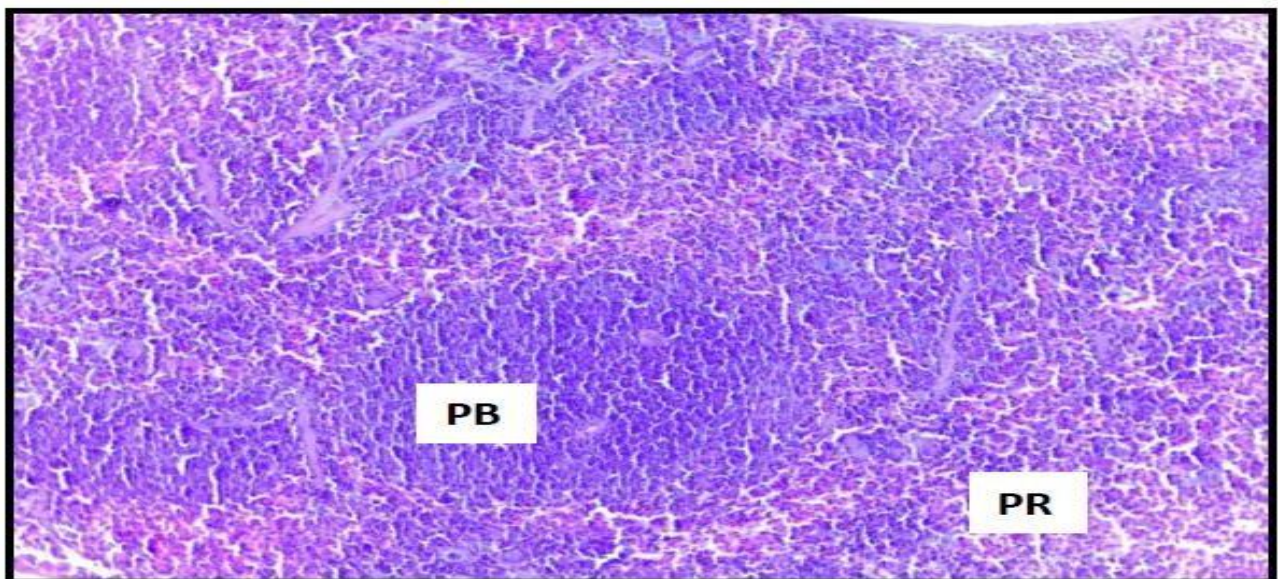
Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anti biofilm de *Moringa oleifera*. L'étude de **Dilawar et al. (2018)** indique que toutes les parties aériennes de cette plante peuvent être utilisées comme agent antibactérien et anti-biofilm, tout particulièrement les biofilm oraux dits cariogènes et certain biofilm intracellulaire. Le potentiel anti biofilm des flavonoïdes extraits de *Moringa oleifera* a été évalué par (**Onsare et Arora 2014**). Ils ont montré que les



flavonoïdes ont un effet contre les biofilms cariogènes car ils possèdent une action sur l'attachement cellulaire initial (première 4h phase d'adhérence). Moringa possède également une autre molécule à activité anti adhésif antibiofilm contre le biofilm formé par *Serratia marcescens*. Il s'agit de « Lectine » trouvé dans les feuilles et graines de Moringa, qui diminuent le taux d'adhésion entre les espèces de *Serratia* en provoquant des dommages à leur membrane. Selon l'étude de (Moura et al., 2017). *Moringa oleifera* peut même inhibée les biofilm à multiculture selon les expériences de (Zubair,2020). Une autre molécule intéressante de Moringa à activité anti biofilm était retrouvé , il s'agit de la « Nepine » une protéine à faible poids moléculaire, isolées des feuilles et les graines de Moringa par SDS-PAGE. Elle possède un potentielle antiadhésif, elle a était testé sur plusieurs biofilm bactérien à Gram+ et Gram-dont *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* , *Enterobacter.sp* (Chandrashekar et al., 2021).

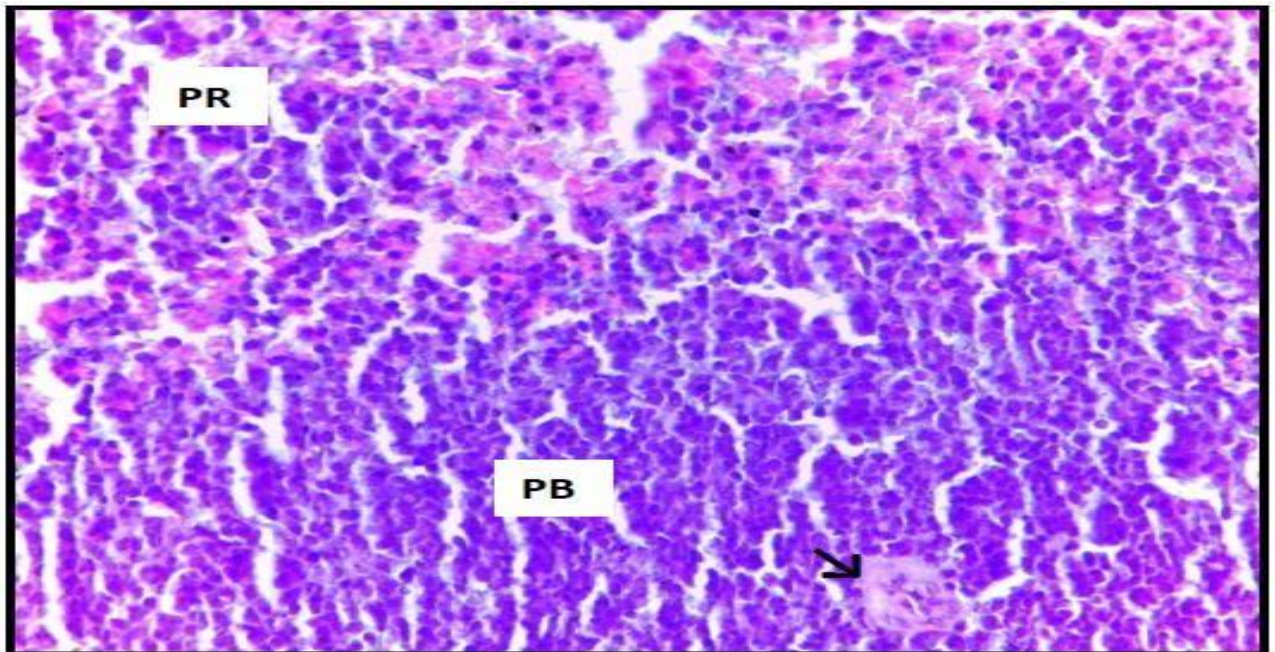
#### **V. Etude d'un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens* et de l'effet de l'extrait des feuilles de *Moringa oleifera* sur ce sepsis**

Les résultats histologiques du modèle infectieux que nous avons développé indiquent que certains organes, tels que le foie, le cœur, les poumons et la rate montrent des signes inflammatoires d'origine infectieuse. Un exemple de coupes Histologiques de la rate des souris BALB/c contrôle est mentionner dans les (figures 24, 25, 26). Les coupes histologiques des souris BALB/c septiques montrent une architecture riche en cellules inflammatoires comparée au contrôle (Figures 27, 28, 29,30).

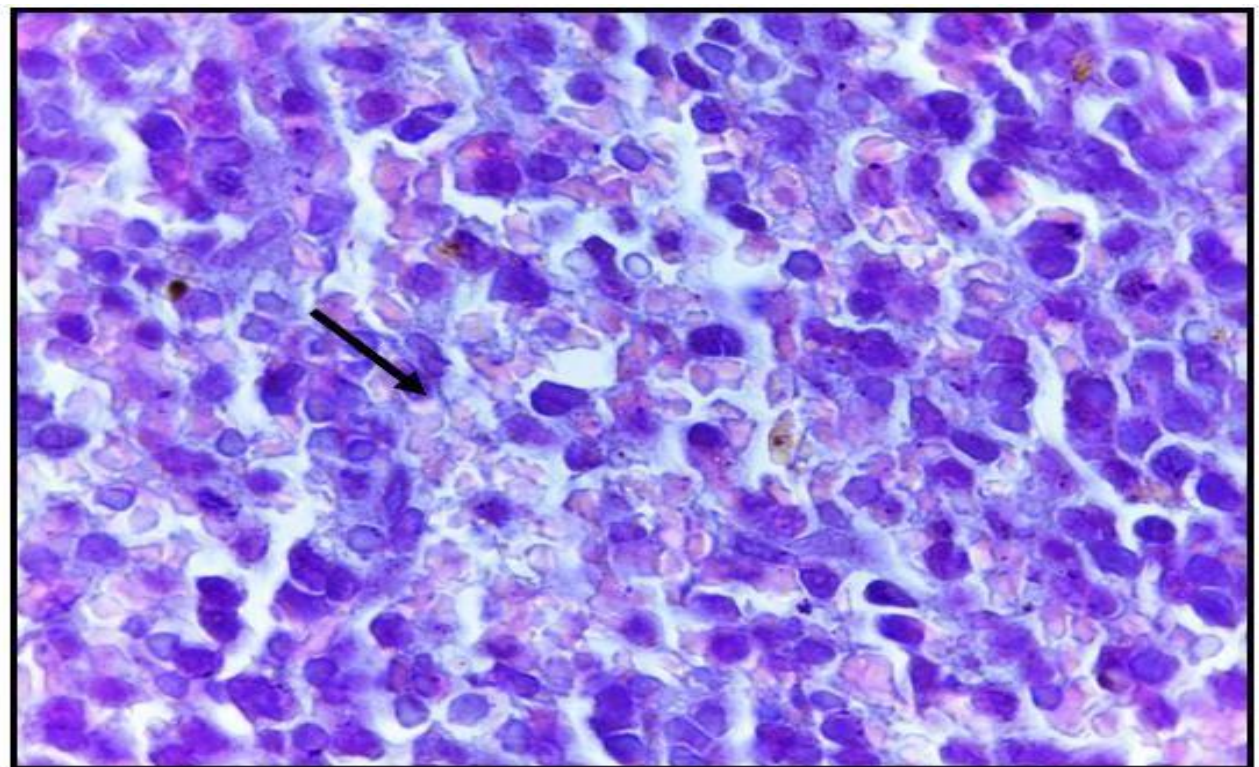


**Figure 24 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx100). Architecture normale de la rate avec pulpe blanche (PB) faite de follicules lymphoïdes centrés d'une artériole et entourés par la pulpe rouge (PR) faite de sinus



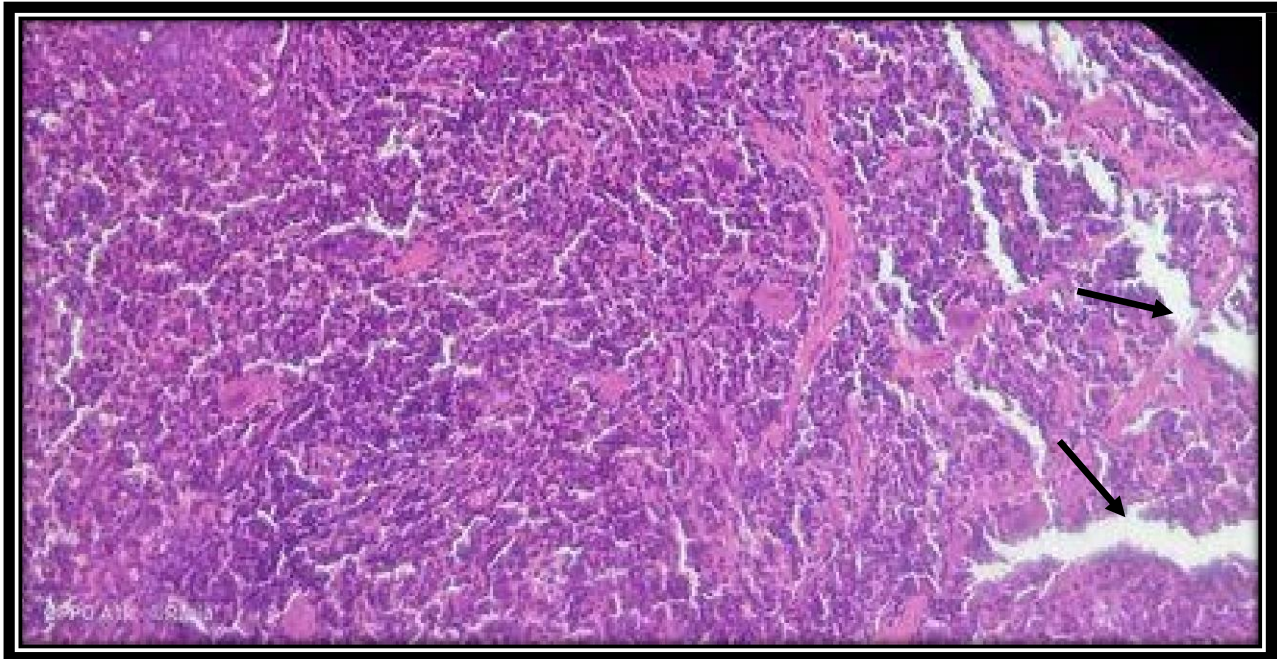


**Figure 25** : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx400). Architecture normale de la rate avec pulpe blanche (bas) faite d'un follicule lymphoïde centré d'une artériole (↘) et surmonté par la pulpe rouge ( haut) faite de sinus renfermant surtout des hématies et quelques éléments lymphoïdes.



**Figure 26** : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx1000). La pulpe rouge faite de sinusparsémés d'hématies (↘) surtout et de quelques éléments lymphoïdes. Pas de polynucléaires évidents.



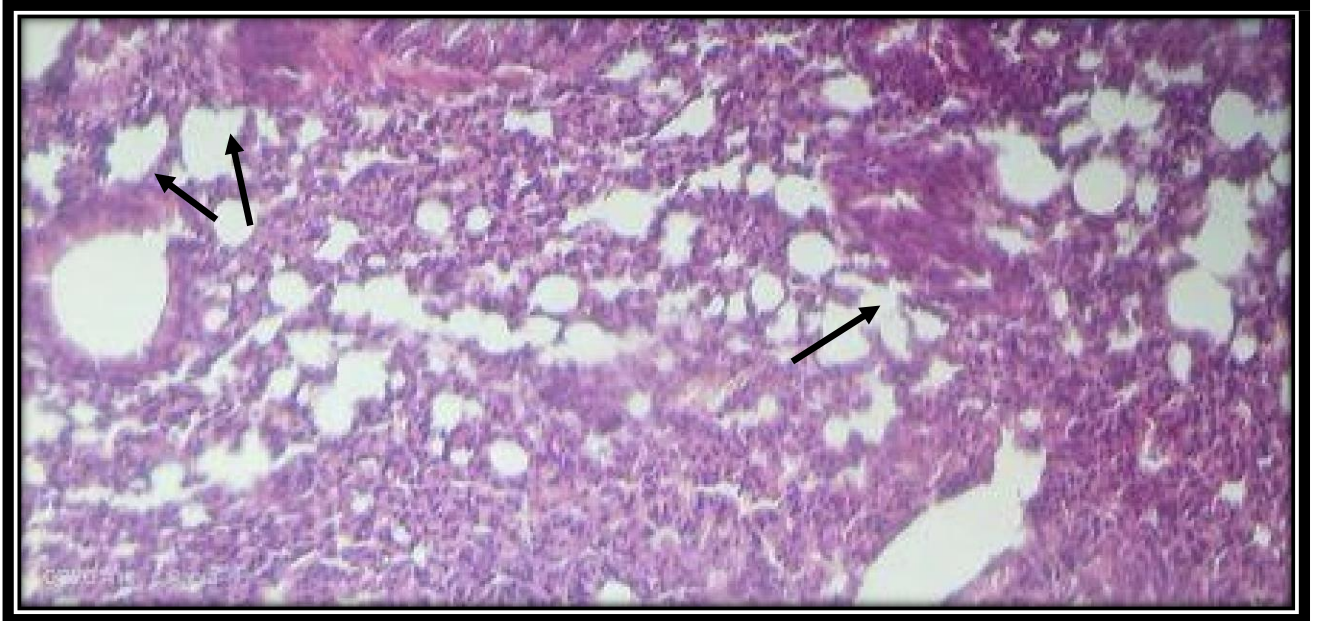


**Figure 27 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septique coloration HE (G x 1000) pulpe blanche riche en cellules de lignée myéloïdes , masse plus importante que pulpe rouge(↘)

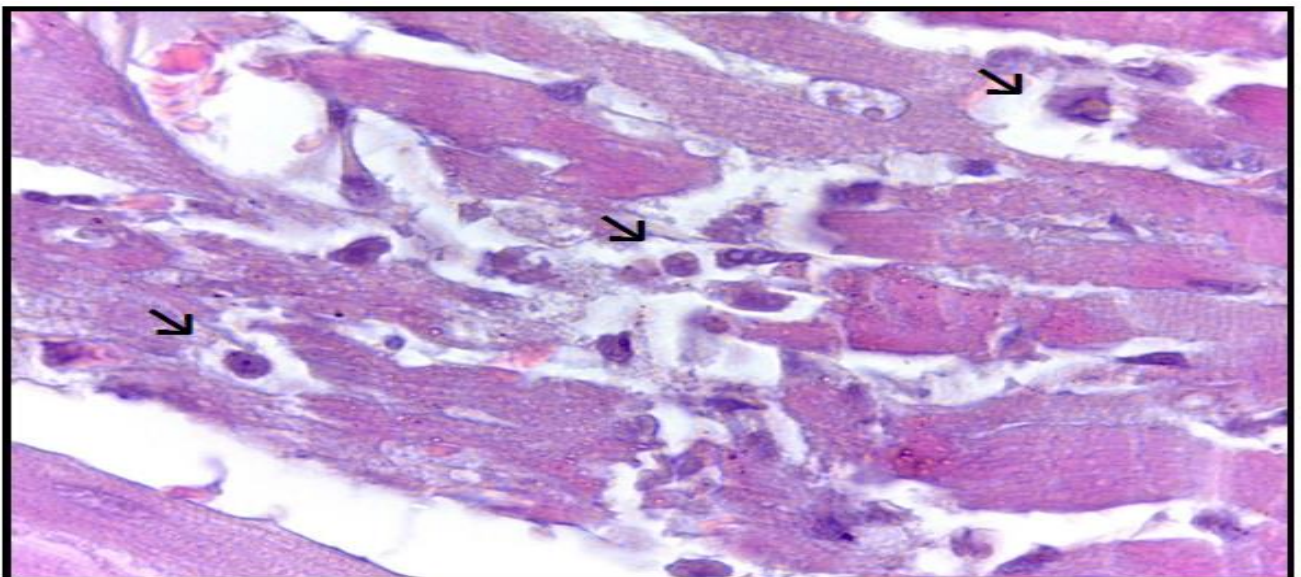


**Figure 28 :** micrographie d'une coupe transversale de foie des souris BALB/c septique coloration HE (G x1000) zone de nécrose des hépatocyte du au sepsis(↘)





**Figure 29** : micrographie d'une coupe transversale des poumons des souris BALB/c septique coloration HE (G x1000) épaissement de la paroi autour des alvéole et éclatement de certain alvéole à cause de l'infection (↘)



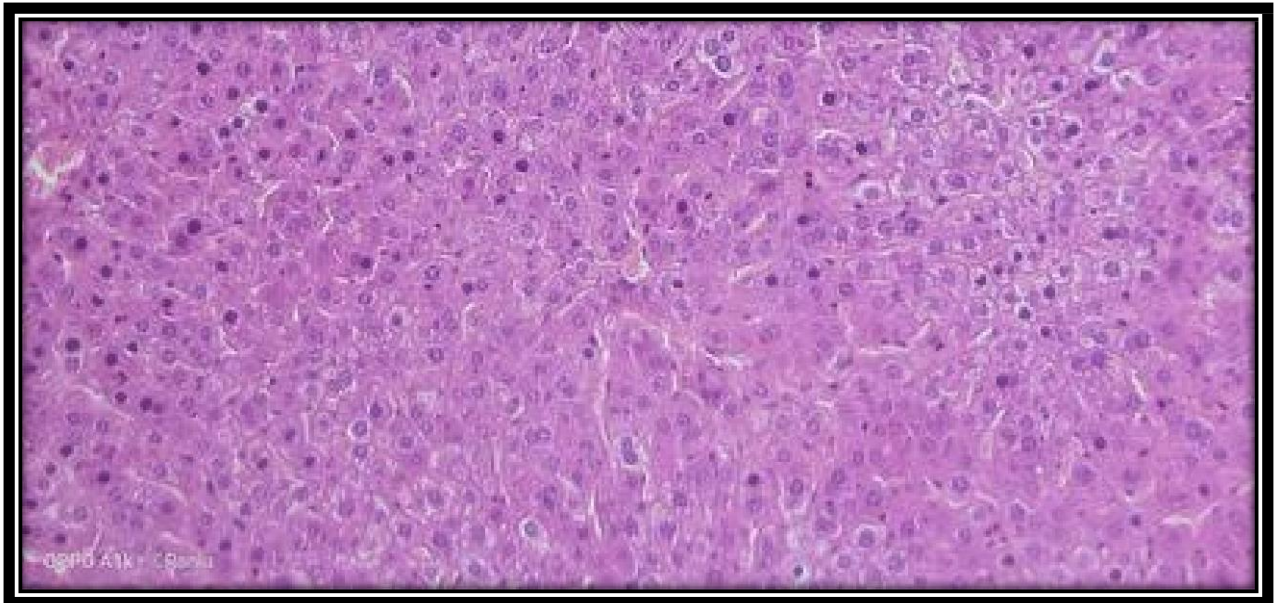
**Figure 30** : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de liquéfaction, au cytoplasme infiltré de macrophages (↘)

Le traitement des souris septiques avec une dose de 500mg/kg d'EEM avant et après induction du sepsis, semble avoir un effet bénéfique en atténuant l'inflammation induite par le sepsis. L'interprétation des observations microscopiques des coupes histologiques sont résumés dans le tableau (**Tableau V**) et illustrés dans les (**figure 31, 32, 33,34**) ainsi qu'en (**annexes 3**).

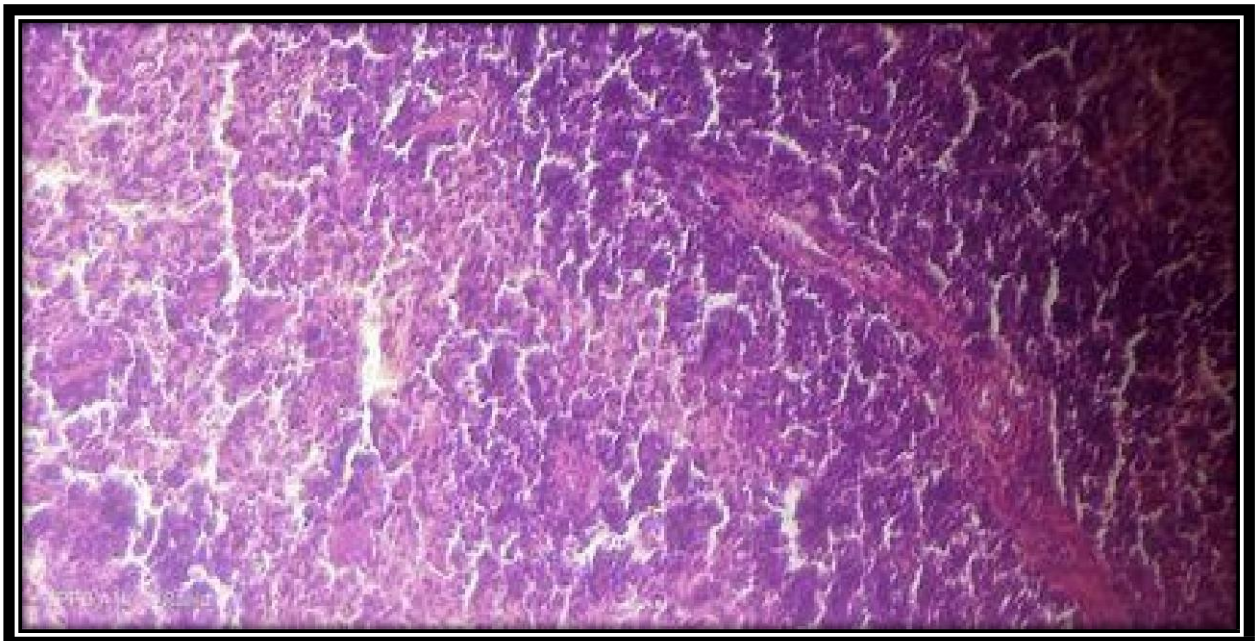
**Tableau V** : Comparaison des résultats de l'histologie entre lots sepsis et lot traité

<b>Organes</b>	<b>Lot sepsis</b>	<b>Lot traité</b>
<b>Foie</b>	Présence d'infiltrat, lésion discrète des hépatocytes (signe de nécrose cellulaire du au sepsis) à proximité de l'espace porte	Pas d'infiltrats, absence du signe de nécrose
<b>Cœur</b>	Dommages sévères caractérisés par une mort cellulaire par nécrose. Dégénérescence des fibres musculaires et augmentation de l'espace intercellulaire, un œdème et une infiltration leucocytaire. Une congestion de capillaires a été également observée traduisant une réponse inflammatoire au niveau cardiaque.	Noyaux de taille et forme normale, cellule musculaire cardiaque d'aspect normale, pas de signe de péricardite
<b>Poumons</b>	Alvéole vide, certain alvéole éclaté, épaississement de la paroi alvéolaire diamètre de la lumière diminué, présence d'infiltrats, apparence de quelque polynucléaires et lymphocyte, signe de pneumonie	Comparaison très subtile (d'autre test peuvent détecter la différence), présence des polynucléaire, paroi épaisse, alvéole claire, pratiquement la même remarque le lot sepsis
<b>Rate</b>	Masse de pulpe blanche plus importante que la pulpe rouge, la pulpe rouge moins apparente, possibilité hyperplasie myéloïde	Rate intacte, proportion pulpe rouge et blanche normale, absence d'infiltrats Pas atteinte d'infection
<b>Reins</b>	Absence d'infiltrats, pas de signe de néphrite, pas de signe de glomérulonéphrite, les deux reins sains	Les reins semblent pas atteints, absence d'infiltrats
<b>pancréas</b>	Pas de signe de pancréatite, aspect normale	Pas de signe de pancréatite aspect normale



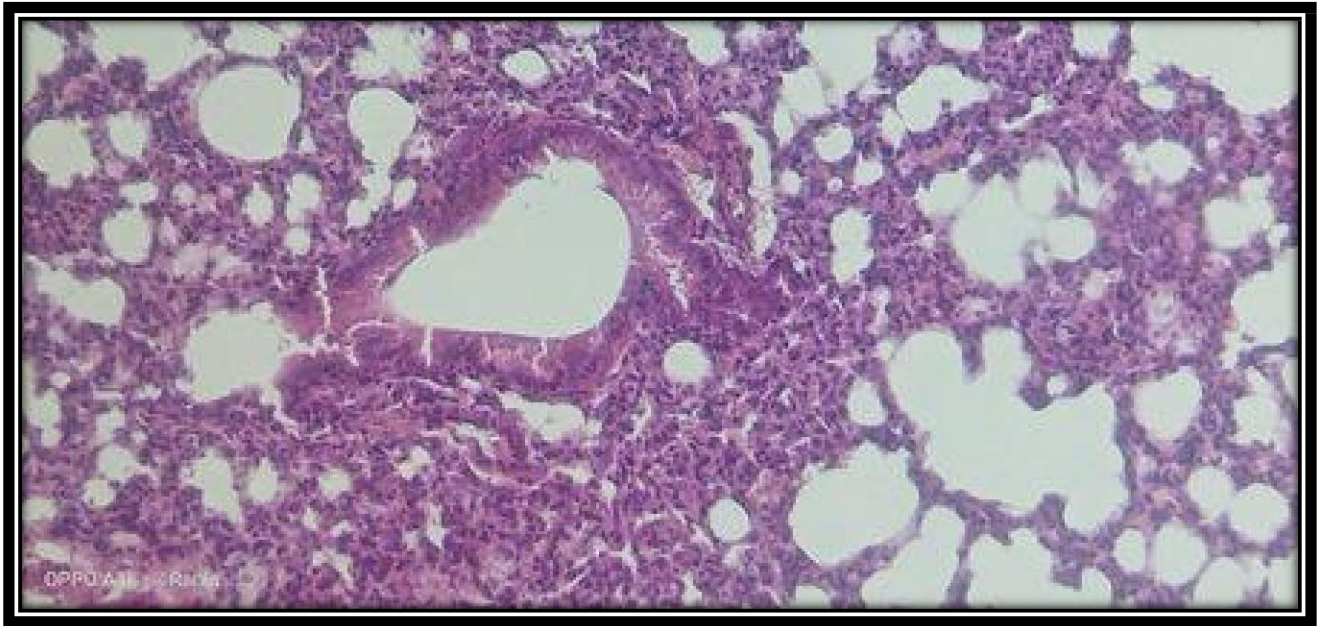


**Figure 31** : micrographie d'une coupe transversale de foie des souris BALB/c traité par *Moringa oleifera* coloration HE (G x500) , pas de signe d'hépatite cellules de tailles et forme normale , absence d'infiltrats d'infection

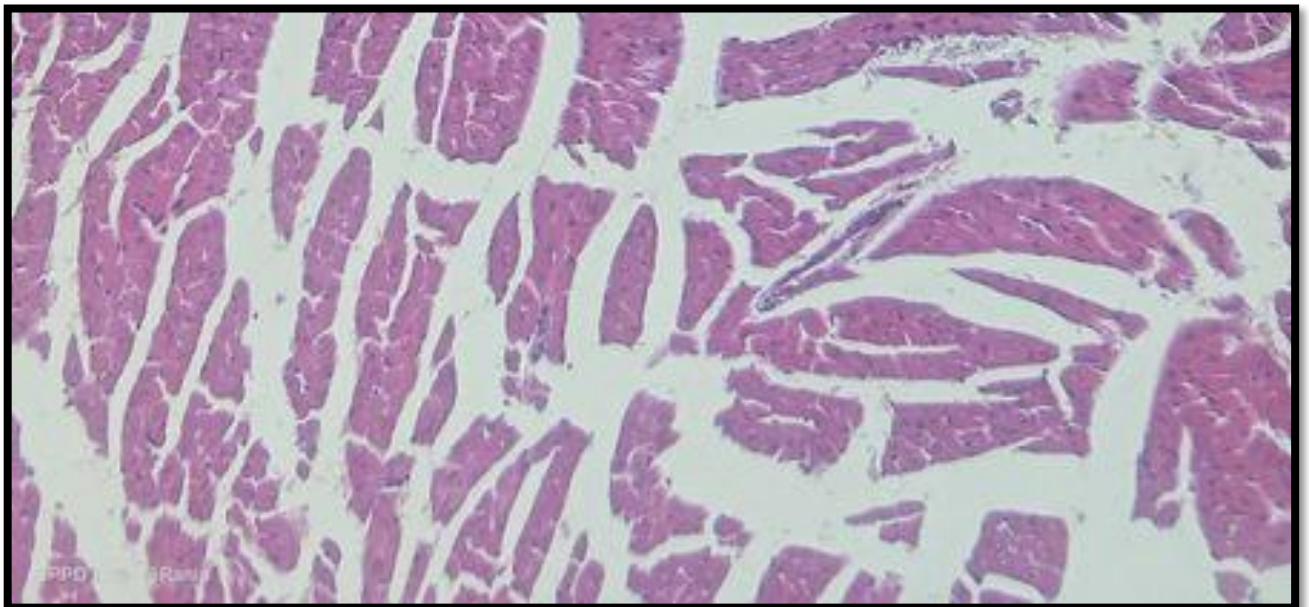


**Figure 32** : micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c traité par *Moringa oleifera* coloration HE (G x1000), morphologie intact semblable à celle des souris BALB/c contrôle, pas de signe d'infection





**Figure 33** : micrographie d'une coupe transversale de poumon des souris BALB/c traité par *Moringa oleifera* coloration HE (G x1000) , morphologie similaire à la **figure 29** , interprétation indéfinie



**Figure 34** : souris BALB/c traité par *Moringa oleifera* Noyaux de taille et forme normale, cellule musculaire cardiaque d'aspect normale, pas de signe de péricardite

L'inflammation avec son large éventail de cytokines pro\_inflammatoires, est une composante importante de la physiopathologie de nombreuses maladies dont le sepsis. Les extraits de feuilles de *M. oleifera* sont connues pour moduler la réponse immunitaire humorale et cellulaire chez les rats et les souris (Gupta et al., 2010 ; Sudha et al., 2010). Ces extraits ont montré de fortes propriétés anti-inflammatoires dans des modèles de rongeurs d'inflammation induite chimiquement (Sulaiman et al., 2008 ; Mahajan et Mehta, 2009). Ces les propriétés ont été plus largement étudiées avec les extraits des fruits et des graines (Cheenpracha et al., 2010 ; Mahajan et Mehta, 2010 ; Muangnoi et al., 2011).

Les études sur l'effet anti-inflammatoire des feuilles de *Moringa oleifera* sur modèle murin sont peu nombreuses. Nos recherches documentaires sur l'effet thérapeutique de l'EEM dans un modèle de sepsis induit par une entérobactérie (*S. marcescens*) ont été infructueuses. Il semblerait que cette étude expérimentale soit une première. Le protocole que nous avons suivi a été réfléchi et élaboré par nos encadreurs le Dr. AISSANI - EL FERTAS Radia et le Dr. Rahim Ibtissem.

**Gasmi et Bouguerra, 2019** (Etudiantes en master BMC encadré par nos encadreurs), ont réalisé une étude intitulée « Etude du sepsis monomicrobien induit par une entérobactérie pathogène opportuniste chez les souris blanches », dans laquelle plusieurs paramètres liés au sepsis ont été étudiés. Les résultats montrent que les coupes histologiques du cœur des souris BALB/c septiques, ont montrés des anomalies structurales ainsi que des images de nécrose avec une dégénérescence des fibres musculaires. Une augmentation de l'espace intracellulaire, la présence d'un œdème et une infiltration leucocytaire ont été observés. Pour la rate, les coupes ont montrées une architecture riche en cellules comparée au groupe contrôle. Les follicules lymphoïdes de la pulpe blanche étaient plus larges, tandis que la pulpe rouge présentait une infiltration massive de polynucléaires et macrophages. Une présence de mégacaryocytes qui justifie une transformation myéloïde de la rate a été également constatée.

Dans une autre étude qui a apporté sur l'effet de l'extrait aqueux des graines de *Moringa* sur modèle murin affecté par sepsis mono bactérien , il fut démontré que lors de l'administration orale de l'extrait après induction de sepsis, une réduction d'expression des marqueurs d'inflammation (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) dans le foie, les reins, la rate et le colon a été observé. En outre une augmentation de l'accumulation nucléaire du facteur nucléaire (Nrf2),

diminué l'accumulation du NF- $\kappa$ B, des cellules LB activés et des ROS dans le cytoplasme, ainsi que la teneur des mitochondries en super oxyde. Une restauration du potentiel de la membrane mitochondriale dans les macrophages (**Sailaja et al., 2021**)

Le potentiel anti-inflammatoire de Moringa s'explique par sa contenance en molécules anti-inflammatoires dans les sous-fractions méthanoliques des feuilles telles que la Niazirin, la Niazimisin, et la Moringine, comme le rapportent **Ndiaye Sy et al. (2016)** et **Houache et cherak (2021)**. L'effet de la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles de *Moringa oleifera* sur l'amélioration du dysfonctionnement hépatique chez les rats septiques a été évalué par **Riswanto et al. (2020)**. Leurs résultats ont montré qu'il y a eu une diminution du niveau de neutrophiles, de MDA et des SGOT et une amélioration du dysfonctionnement d'organes après l'administration de l'extrait de MO. Ce dernier semble être une option intéressante pour freiner la progression de la septicémie.

## *Conclusion*



La présente étude a concerné l'évaluation du potentiel antibactérien, antioxydant, anti biofilm et thérapeutique de l'extrait éthanolique des feuilles de *M. oleifera*, sur des souches d'entérobactéries responsables de diverses infections chez l'homme. Par ailleurs, nous avons aussi caractérisé phénotypique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence de ces souches.

Les souches objets de notre étude présentaient des profils de résistance aux antibiotiques hétérogènes. 44.44% étaient de phénotype BLSE. En plus de la résistance, nos souches présentaient un potentiel de virulence puisque la quasi-totalité était résistante à l'effet bactéricide du sérum humain.

L'extraction est l'étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs. Elle dépend de la méthode et du solvant utilisés, qui doivent préserver leurs propriétés biologiques. Pour cela, nous avons opté pour la technique d'extraction par soxhlet, en utilisant comme solvant l'éthanol. Le rendement de cette extraction était appréciable. L'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH, a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* possède une importante activité antioxydante à une IC50 de 160 mg/ml.

L'activité antibactérienne de l'EEM a été également testée par la méthode de diffusion sur gel. Les résultats ont montré que les différentes concentrations de l'EEM (30 µg/ml, 60 µg/ml, 100 µg/ml et extrait brute) ont inhibé la croissance bactérienne et que c'était dose dépendante. L'extrait brut de MO testé sur les souches de phénotype NBLSE a donné un meilleur effet antibactérien contrairement aux autres concentrations. Nos résultats ont révélé une activité anti-biofilm de l'EEM pour certaines souches. En effet, l'EEM a diminué l'intensité du biofilm formé chez 8 souches. Il l'a cependant, et l'augmenté pour 7 autres parmi les 18 souches testées.

L'interprétation des coupes histologiques réalisés a permis de prédire que le traitement des souris septiques avec une dose de 500µg/ml d'EEM avant et après induction du sepsis par *S. marcescens*, semble avoir un effet bénéfique en atténuant l'inflammation induite par le sepsis.

A la lumière de ces résultats, des stratégies thérapeutiques nouvelles peuvent être réfléchies afin d'améliorer la prise en charge des infections à entérobactéries potentiellement fatales. L'extrait des feuilles de *Moringa oleifera* semble être un bon candidat. Cependant, d'autres recherches doivent être complétées en tenant compte de plusieurs aspects liés à la plante, au germe infectieux ainsi qu'à l'hôte.

## *Références Bibliographiques*

I. référence d'Articles scientifiques

1. Abdel-Daim, M.M., Khalil, S.R., Awad, A., Abu Zeid, E.H., El-Aziz, R.A., El-Serehy, H.A., 2020. Ethanolic Extract of Moringa oleifera Leaves Influences NF- $\kappa$ B Signaling Pathway to Restore Kidney Tissue from Cobalt-Mediated Oxidative Injury and Inflammation in Rats. *Nutrients* 12, 1031. <https://doi.org/10.3390/nu12041031>
2. Abdel-Daim, M.M., Khalil, S.R., Awad, A., Abu Zeid, E.H., El-Aziz, R.A., El-Serehy, H.A., 2020. Ethanolic Extract of Moringa oleifera Leaves Influences NF- $\kappa$ B Signaling Pathway to Restore Kidney Tissue from Cobalt-Mediated Oxidative Injury and Inflammation in Rats. *Nutrients* 12, 1031. <https://doi.org/10.3390/nu12041031>
3. and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):144-53.
4. Becq-Giraudon, B., n.d. Les maladies infectieuses communautaires .
5. Bouzenoune, F., Boudersa, F., Bensaad, A., Harkat, F., Siad, N., 2009. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et Maladies Infectieuses* 39, 142–143. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.11.008>
6. Bouzid, A., Chadli, R., Bouzid, K., 2017. Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie* 15, 373–378. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1027-6>
7. Brahmamdam, P., Inoue, S., Unsinger, J., Chang, K.C., McDunn, J.E., Hotchkiss, R.S., 2010. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 233–240. <https://doi.org/10.1189/jlb.0110037>
8. Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence
9. Chandrashekar, S., Vijayakumar, R., Chelliah, R., Daliri, E.B.-M., Madar, I.H., Sultan, G., Rubab, M., Elahi, F., Yeon, S.-J., Oh, D.-H., 2021. In Vitro and In Silico Screening and Characterization of Antimicrobial Napin Bioactive Protein in *Brassica juncea* and *Moringa oleifera*. *Molecules* 26, 2080. <https://doi.org/10.3390/molecules26072080>
10. Chen, L., Li, J., Luo, C., Liu, H., Xu, W., Chen, G., Jiang, H. (2006). Binding interaction of quercetin-3- $\beta$ -galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CLpro:

11. Structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(24), 8295–8306.
12. Chigurupati, S., Al-murikhy, A., Almahmoud, S.A., Almoshari, Y., Ahmed, A.S., Vijayabalan, S., Felemban, S.G., Palanimuthu, V.R., 2022. Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Moringa oleifera* ethanolic leaves extract from Qassim region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29, 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.021>
13. Choo, S., Chin, V.K., Wong, E.H., Madhavan, P., Tay, S.T., Yong, P.V.C., Chong, P.P., 2020. Review: antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications. *Folia Microbiol* 65, 451–465. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00786-5>
14. Cirmi, S., Ferlazzo, N., Gugliandolo, A., Musumeci, L., Mazzon, E., Bramanti, A., Navarra, M., 2019. Moringin from *Moringa Oleifera* Seeds Inhibits Growth, Arrests Cell-Cycle, and Induces Apoptosis of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells through the Modulation of NF- $\kappa$ B and Apoptotic Related Factors. *IJMS* 20, 1930. <https://doi.org/10.3390/ijms20081930>
15. Clere, N., 2017. Prise en charge officinale des infections urinaires chez la femme. *Actualités Pharmaceutiques* 56, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2016.11.012>
16. Daugan, M., Noe, R., Herman Fridman, W., Sautes-Fridman, C., Roumenina, L.T., 2017. Le système du complément: Une épée à double tranchant dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* 33, 871–877. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310019>
17. Derbré, S., 2019. Phytothérapie et troubles urogénitaux, sélectionner des produits efficaces et sûrs. *Actualités Pharmaceutiques* 58, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.05.026>
18. Ducrot, C., Fric, D., Lalmanach, A.-C., Monnet, V., Sanders, P., Schouler, C., 2018. Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. *INRA Prod. Anim.* 30, 77–88. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2017.30.1.2234>
19. Duyen Thi Ngoc, H., Kim, A.-Y., Kim, Y.-R., 2017. Identification of Pathogenic Factors in *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. *Sensors* 17, 1406. <https://doi.org/10.3390/s17061406>
20. Duyen Thi Ngoc, H., Kim, A.-Y., Kim, Y.-R., 2017. Identification of Pathogenic Factors in *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. *Sensors* 17, 1406. <https://doi.org/10.3390/s17061406>

21. El Aziz, S., Haraj, N., Hassoune, S., Obbiba, A., Chadli, A., El Mdaghri, N., El Ghomari, H., Farouqi, A., 2014. Prévalence et facteurs associés à l'infection urinaire chez la femme diabétique au Centre hospitalo-universitaire de Casablanca, Maroc. *Médecine des Maladies Métaboliques* 8, 204–210. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(14\)70742-4](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(14)70742-4)
22. Elkharrat, D., Arrouy, L., Benhamou, F., Dray, A., Grenet, J., Corre, A.L. (2007). Épidémiologie de l'infection urinaire communautaire de l'adulte en France. In: *Les infections urinaires. Monographies en urologie*. Springer, Paris. [https://doi.org/10.1007/978-2-287-48617-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-2-287-48617-3_1)
23. Gamain, B., Brousse, C., Rainey, N.E., Diallo, B.K., Paquereau, C.-E., Desrames, A., Ceputyte, J., Semblat, J.-P., Bertrand, O., Gangnard, S., Teillaud, J.-L., Chêne, A., 2022. BMFPs, a versatile therapeutic tool for redirecting a preexisting Epstein-Barr virus antibody response toward defined target cells. *Sci. Adv.* 8, eabl4363. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl4363>
24. Hashem, H. (2020). *In Silico* Approach of Some Selected Honey Constituents as SARS-CoV-2 Main Protease (COVID-19) Inhibitors. ChemRxiv.
25. Hawser SP, Badal RE, Bouchillon SK, et al. Susceptibility of gram-negative aerobic bacilli from intra-abdominal pathogens to antimicrobial agents collected in the United States during 2011. *J Infect* 2014;68:71-6
26. Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Rooney, P.J., Loughrey, A., Rao, J.R., Moore, J.E., 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15, 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2008.10.002>
27. Hemaiswarya, S., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>
28. Hu, Y., Liu, C., Shen, Z., Zhou, H., Cao, J., Chen, S., Lv, H., Zhou, M., Wang, Q., Sun, L., Sun, Q., Hu, F., Wang, Y., Zhang, R., 2020. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008–2018. *Emerging Microbes & Infections* 9, 1771–1779 <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1799721>
29. Ilanko, P., McDonnell, P.A., van Vuuren, S., Cock, I.E., 2019. Interactive antibacterial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts and conventional antibiotics against bacterial

- triggers of some autoimmune inflammatory diseases. South African Journal of Botany 124, 420–435. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.008>
30. Johnston, Matthew et al. “Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview.” *AIMS microbiology* vol. 4,4 655-664. 27 Nov. 2018, doi:10.3934/microbiol.2018.4.655
31. Jourdain D (1997) Dictionnaire des plantes médicinales. In Les Quebecor (Ed). Québec, p. 195
32. Jwa, S.-K., 2019. Efficacy of Moringa oleifera Leaf Extracts against Cariogenic Biofilm. *pnf* 24, 308–312. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.308>
33. Kalambry, A., Gaudré, N., Drame, B.S., Poudiogo, A., Kassogué, A., Koné, H., Diarra, A., 2019. Profil de résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées des prélèvements urinaires à l’Hôpital du Mali. *Rev Mali Infectiol Microbiol* 14, 6–13. <https://doi.org/10.53597/remim.v14i2.1363>
34. Kus, J.V., 2014. Infections due to Citrobacter and Enterobacter☆, in: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, p. B9780128012383052000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05089-3>
35. Lachassinne, E., Letamendia-Richard, E., Gaudelus, J., 2004. Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Archives de Pédiatrie* 11, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2003.10.016>
36. Leroy, H., Tattevin, P., 2012. Infections urinaires. EMC - Traité de médecine AKOS 7, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1634-6939\(12\)45377-7](https://doi.org/10.1016/S1634-6939(12)45377-7)
37. Li, Y., Li, J., Hu, T. et al. Five-year change of prevalence and risk factors for infection and mortality of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bloodstream infection in a tertiary hospital in North China. *Antimicrob Resist Infect Control* 9, 79 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00728-3>
38. Lin, W.-H., Wang, M.-C., Liu, P.-Y., Chen, P.-S., Wen, L.-L., Teng, C.-H., Kao, C.-Y., 2022. Escherichia coli urinary tract infections: Host age-related differences in bacterial virulence factors and antimicrobial susceptibility. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 55, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.04.001>
39. Madushani, R.W.M.A., Patel, V., Loftus, T., Ren, Y., Li, H.J., Velez, L., Wu, Q., Adhikari, L., Efron, P., Segal, M., Ozrazgat Baslanti, T., Rashidi, P., Bihorac, A., 2022. Early Biomarker Signatures in Surgical Sepsis. *Journal of Surgical Research* 277, 372–383. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2022.04.052>

40. Mahfouz, Nasser., Palwe, S., Bhargava, R.N., Feuilloley, M.G.J., Kharat, A.S., 2020. Retrospective Analysis on Antimicrobial Resistance Trends and Prevalence of  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and ESKAPE Pathogens Isolated from Arabian Patients during 2000–2020. *Microorganisms* 8, 1626.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101626>
41. Marrakchi, C., Stahl, J.P., Berthelot, P., Squinazi, F., Audurier, A., Boudène, C., Bousquet, J., Lejeune, B., Morin, O., Aubry, M.C., Duhuot, D., Fleury, P., Cochet, C., 2002. La perception de l'hygiène domestique par les Françaises. *Médecine et Maladies Infectieuses* 32, 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(01\)00308-0](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(01)00308-0)
42. Meatherall, B.L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J.D.D., Laupland, K.B., 2009. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *The American Journal of Medicine* 122, 866–873.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.03.034>
43. Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria 37.
44. Millogo, D., Hassanata, K., n.d. Etudes de la phytochimie et de l'activité antimicrobienne in vitro des feuilles de *Moringa oleifera* (Moringaceae). 16.
45. Millogo, D., Hassanata, K., n.d. Etudes de la phytochimie et de l'activité antimicrobienne in vitro des feuilles de *Moringa oleifera* (Moringaceae). 16.
46. Moura, M., Trentin, D., Napoleão, T., Primon-Barros, M., Xavier, A., Carneiro, N., Paiva, P., Macedo, A. and Coelho, L. (2017), Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J Appl Microbiol*, 123: 861-874.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13556>
47. Moura, M.C., Trentin, D.S., Napoleão, T.H., Primon-Barros, M., Xavier, A.S., Carneiro, N.P., Paiva, P.M.G., Macedo, A.J., Coelho, L.C.B.B., 2017. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J Appl Microbiol* 123, 861–874.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13556>
48. Mouracade, P., Saussine, C., 2008. La cystite interstitielle en 2008. *Progrès en Urologie* 18, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2008.04.001>
49. Oberoi, L., 2013. ESBL, MBL and Ampc Lactamases Producing Superbugs – Havoc in the Intensive Care Units of Punjab India. *JCDR*.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/5016.2673>

50. Okeke MI, Iroegbu CU, Eze EN, Okoli AS and Esimone CO (2001). Evaluation of extracts of the root of *Londolphia owerrience* for antibacterial activity. *J.Ethanopharmacol.*, 78: 119-127.
51. Oluduro, A. O., 2012. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South-Western Nigeria. *MJM*.  
<https://doi.org/10.21161/mjm.02912>
52. Onsare, J. and Arora, D. (2015), Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*, 118: 313-325.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12701>
53. Onsare, J.G., Arora, D.S., 2015. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* 118, 313–325.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12701>
54. Pasricha J, Koessler T, Harbarth S, et al. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae among internal medicine patients in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013;2:20.
55. Pechère, J.-C., 2004. Présentation : Comment les bactéries résistent aux antibiotiques : une première forme d'intelligence collective ? *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 188, 1249–1256. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)33649-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)33649-0)
56. Perrin, M., Garzic, J.L., Tas, A., n.d. Infections urinaires communautaires et nosocomiales bacilles gram négatif en milieu gériatrique 6.
57. Philippon, A., 2008. Résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution. *EMC - Maladies infectieuses* 5, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1166-8598\(08\)26016-3](https://doi.org/10.1016/S1166-8598(08)26016-3)
58. Przybyłek, I., Karpiński, T.M., 2019. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24, 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
59. Riswanto, R., Sumandjar, T., Redhono, D., Kurniawan, R., Rahman, A., 2020. The effect of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* leaves on neutrophil and MDA levels in the improvement of liver dysfunction in male rats with sepsis model. *Bali Med J*. 9, 721. <https://doi.org/10.15562/bmj.v9i3.1850>
60. Rock, C., Donnenberg, M.S., 2014. Human Pathogenic Enterobacteriaceae, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7>



61. Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Paiva, P.M.G. and Coelho, L.C.B.B. (2012), Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Tissue Extracts. *Phytother. Res.*, 26: 1366-1370. <https://doi.org/10.1002/ptr.4591>
62. Scanvic, A., 1997. TEM-8: a paradoxical ceftazidimase that owes its uniqueness to the presence of serine residues at positions 164 and 238. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40, 303–304. <https://doi.org/10.1093/jac/40.2.303>
63. Siddiqui, S, Upadhyay, S, Ahmad, I, Hussain, A, Ahamed, M. Cytotoxicity of *Moringa oleifera* fruits on human liver cancer and molecular docking analysis of bioactive constituents against caspase-3 enzyme. *J Food Biochem.* 2021; 45:e13720. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13720>
64. Singh, D., Arya, P.V., Aggarwal, V.P., Gupta, R.S., 2014. Evaluation of Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats. *Antioxidants* 3, 569–591. <https://doi.org/10.3390/antiox3030569>
65. Sulaiman, M.R., Zakaria, Z.A., Bujarimin, A.S., Somchit, M.N., Israf, D.A., Moin, S., 2008. Evaluation of *Moringa oleifera* Aqueous Extract for Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities in Animal Models. *Pharmaceutical Biology* 46, 838–845. <https://doi.org/10.1080/13880200802366710>
66. Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., n.d. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique 7.
67. Ulasli, M., Gurses, S., A., Bayraktar, R., Yumrutas, O., Oztuzcu, S., Igci, M., Arslan, A. (2014). The effects of *Nigella sativa* (Ns), *Anthemis hyaline* (Ah) and *Citrus sinensis* (Cs) extracts on the replication of coronavirus and the expression of TRP genes family. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1703–1711.
68. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Ndong, M., W, S., D, N., T.G, A., Institut de technologie alimentaire, Sénégal, Dg, R., Institut de technologie alimentaire, Sénégal, 2007. Valeur Nutritionnelle du *Moringa Oleifera*, Étude de la Biodisponibilité du fer, Effet de L'enrichissement de Divers Plats Traditionnels Sénégalais Avec la Poudre des Feuilles. *AJFAND* 7, 01–17. <https://doi.org/10.18697/ajfand.14.IPGRI1-8>
69. Walter, A., Samuel, W., Peter, A., Joseph, O., n.d. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala* methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5.

70. Xu, Y.-B., Chen, G.-L., Guo, M.-Q., 2019. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080296>
71. Zaffer, M., Ahmad, S., Sharma, R., Mahajan, S., Gupta, A., Agnihotri, R.K., 2014. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.* 6.
72. Zahar, J.-R., Bille, E., Schnell, D., Lanternier, F., Mechai, F., Masse, V., Nassif, X., Lortholary, O., 2009. Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (EBLSE). *Med Sci (Paris)* 25, 939–944. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092511939>
73. Zaniyani, F.R., Meshkat, Z., Nasab, M.N., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M.S., Hoseini, D., n.d. The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta- Lactamases Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* 7.
74. Zubair M (December 28, 2020) Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of *Citrus sinensis* and *Moringa oleifera* Against the Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Cureus* 12(12): e12337. doi:10.7759/cureus.12337

II. lien site web :

Lien de Tous les articles consulté (entre mai-août 2022) sur le Site officiel de l'OMS :

<https://www.who.int/fr/news/item/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health>

<https://www.who.int/fr/news/item/16-11-2015-who-multi-country-survey-reveals-widespread-public-misunderstanding-about-antibiotic-resistance>

<https://www.who.int/fr/news/item/30-08-2016-growing-antibiotic-resistance-forces-updates-to-recommended-treatment-for-sexually-transmitted-infections>

<https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

<https://www.who.int/fr/health-topics/antimicrobial-resistance>

Autres site utiles :

<https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/antibiotiques/resistance-antibiotiques.html#:~:text=On%20parle%20de%20r%C3%A9sistance%20acquise,consommation%20d'antibiotiques%20en%20France.>

<https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/index>

## *Annexes*

**Annexe 1 :****Tableau I :** Entérobactéries responsable de la pathogénicité chez l'homme

GENRE	ESPECE
CITROBACTER	freundii koseri amalonaticus
EDWARDSIELLA	tarda
ENTEROBACTER	colacae aerogenes sakasakii
ESCHERICHIA	coli albertii
HAFNIA	alvei
KLEBSIELLA	pneumoniae oxytoca granulomatis
MORGANELLA	morganii
PANTOAE	aggiomerans
PLESIOMONAS	shigelloides
PROTEUS	mirabilis vulgaris
PROVIDONCIA	stuartii rettgeri
SALMONELLA	enterica
SERRATIA	marcescens
SHIGELLA	dysenteriae flexneri sonnel boydii
YERSINIA	pestis enterocolitica pseudotuberculosis

(Donnenberg et Rock, 2014).

**Tableau II :** classification botanique *Moringa oleifera*

<b>Règne</b>	Plantae.
<b>Sous-règne</b>	Tracheobiophyta.
<b>Division</b>	Magnoliophyta.
<b>Classe</b>	Mangoliopsida.
<b>Sous-classe</b>	Dilleniidae .
<b>Ordre</b>	Capparales.
<b>Famille</b>	Moringaceae.
<b>Genre</b>	<i>Moringa</i> .
<b>Espèce</b>	<i>Moringa oleifera</i> .

**Tableau III:** Composition nutritionnelle des feuilles de *Moringa oleifera*

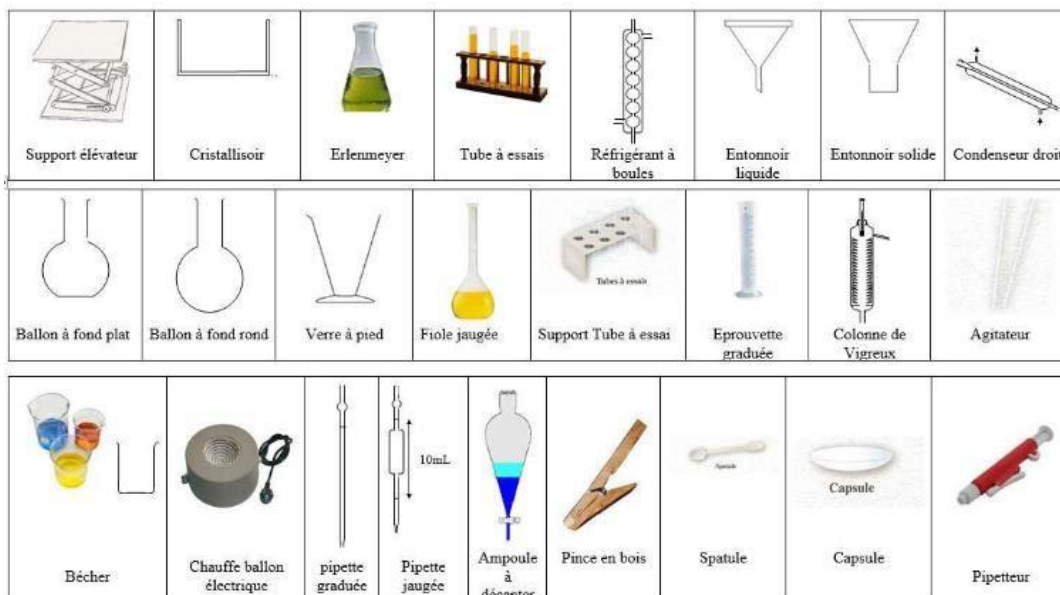
<b>Composition nutritionnelle des feuilles de <i>Moringa oleifera</i> Fraiches pour 100g de matière sèche</b>	
Calories (kcal)	300
Protéines (g)	25
Minéraux (g)	12
Glucides (g)	40
Lipides (g)	8
Fibres (g)	15
Calcium (mg)	2100
Fer (mg)	27
Potassium (mg)	1300
Magnésium (mg)	405
Manganèse (mg)	8
Zinc (mg)	2.6
Sodium(mg)	100
Vitamines A (UI)	14300
Vitamine C'(mg)	850

## Annexe 2 :



1. les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA- SFM-2013) :

[https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/07/CASFM\\_2013.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/07/CASFM_2013.pdf)

2. La verrerie :



3. Liste de l'appareillage utilisée :

Nom de l'appareilles	Image
Etuve	
Autoclave	

Spectromètre



Lecteur Elisa



Balance de précision



Plaque chauffante /Agitateur



Vortex

centrifugeuse







**4. milieux de culture :**

<b>Le milieu</b>	<b>La préparation</b>
Milieu Luria Bertanie LB :	500ml eau+5gNaCl+5gTreptone +2.5g extrait de levure
Gélose nutritive GN :	59g poudre GN+1.5L eau
Milieu Muller Hinton MH :	38g poudre MH +1L eau
Eau physiologique :	500ml eau +4.5g NaCl
Gélose de conservation GC :	1L eau +10g peptone+10g Agar+5g extrait de viande +5g NaCl

**5. Antibiotique :**




---

amoxicilline  
 amoxicilline – clavulanique  
 pipéracilline – tazobactrim  
 céfoxime  
 aztréonam  
 acide nalidixique  
 ofloxacinine  
 ciprofloxacine  
 nitrofurantoïne  
 tigécycline

---

## Annexe 3 :

**tableau IV** : comparaison HPLC feuilles Moringa oleifera de la région de Burkina Faso(1), et région de Bechar (2)

(1) : (Millogo et Hassanata,2009)

Éléments minéraux	g/kg matière sèche
Azote total	43,95 ± 2,24
Phosphore total	3,83 ± 0,21
Potassium total	28 ± 1,18
Sodium total	278,22 ± 10,95
Calcium total	15,08 ± 0,94
Magnésium total	6,88 ± 0,56
Cuivre total	8,13 ± 0,58
Fer total	677,77 ± 48,04
Manganèse total	62,93 ± 5,71
Zinc total	26,59 ± 0,90

Vitamines	mg/100g matière sèche
Vitamine A ( $\beta$ -carotène)	39
Vitamine C	210
Vitamine B1	3,10
Vitamine B2	10,2
Vitamine E	-

(2) : (Bardi et Fenni ,2015)

Paramètres	pH	MG (%)	EST (%)	Teneur en eau (%)	Taux de cendres(%)	Taux de protéines (%)	Sucre totaux %
Poudre de feuille du <i>M.oleifera</i>	7.10	2.6	91.4	08.6	11.26	25	52.54

Nutriments	Feuilles de Moringa
Vitamine A	6780 mg
Vitamine C	220 mg
Calcium	440 mg
Potassium	259 mg
Protéine	6.7 mg

Tableau V: différence selon type d'extraction (1) et selon solvant utilisée(2) :

(1) : (Ouledallaid et hadjkouder ,2018)

Métabolites		Résultats			
		Extrait chloroformique	Extrait méthanolique	Extrait infusé	Extrait décocté
Terpénoïdes		-	+++	+	++
Polyphénols		+	+++	++	++
Flavonoïdes		+/-	+++	++	+
Tanins galliques		-	-	-	-
Tanins condensés		-	++	++	++
Alcaloïdes (réactif de Mayer)		-	-	-	-
Alcaloïdes (réactif de Wagner)		-	+/-	+/-	+
Saponosides	1 <sup>ère</sup> méthode	/	/	-	+++
	2 <sup>e</sup> méthode	/	/	/	+
Sucres réducteurs		++	++	+	++

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+): Faiblement présent ;

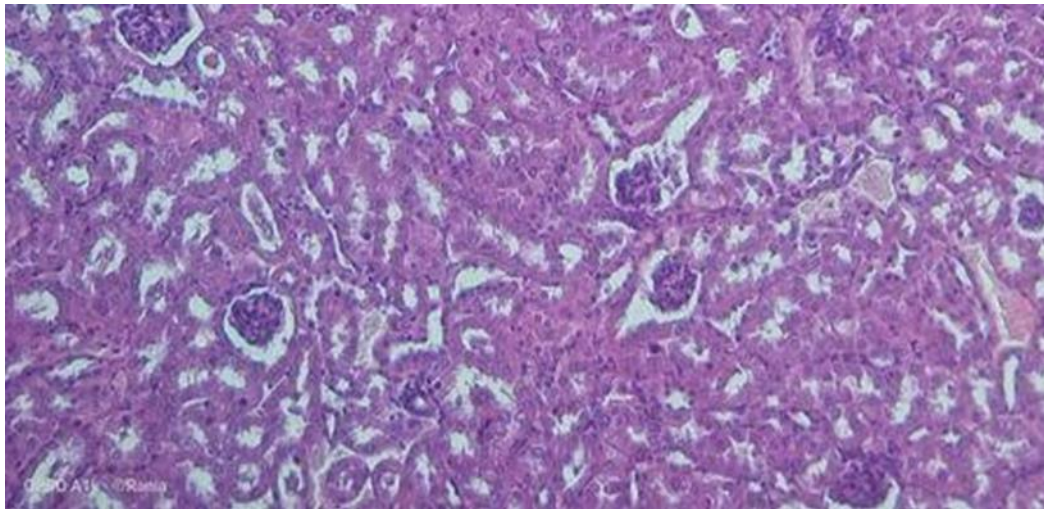
(-): Absence ; +/- Traces ; /: non déterminé.

(2) : (millogo et hassanatah ,2009)

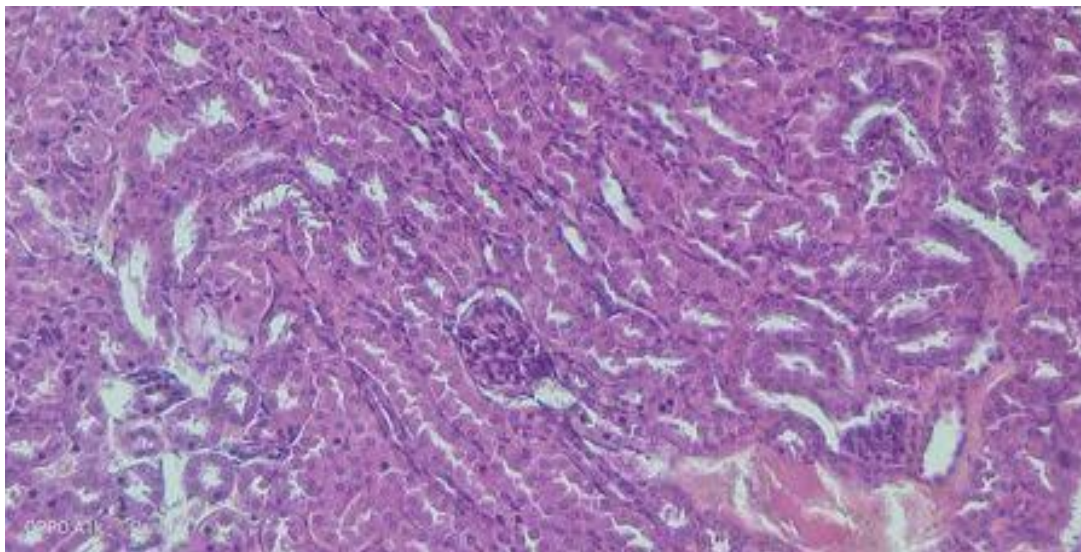
Groupes chimiques	Chlorure de méthylène	Ethanol-eau (non hydrolysé)	Ethanol-eau (hydrolysé)
Stérols et triterpènes	++		++
Aglycones flavoniques	+		
Alcaloïdes bases	-		
Coumarines	±	-	
Composés polyphénoliques (tanins)		++	
Flavonoïdes		++	
Saponosides		±	
Alcaloïdes sels		±	
Acides aminés		++	
Glucides		++	
Fibres		++	
Anthracénosides		+	
Dérivés coumariniques			+
Cardénolides			++
Anthocyanosides		+	-

- Signifie absent , + signifie présent, ++ signifie abondant et ± signifie traces

résultats test histologique des reins des souris BALB/c septique et BALB/c traité par *Moringa oleifera*



**Figure 1** : reins souris BALB/c septique pas affecter



**Figure 2** : reins souris BALB/c traité par *Moringa oleifera* pas affecter



