

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE  
DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT  
UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE SCIENCES  
DE LA VIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES  
IN LIFE, HEALTH &  
ENVIRONMENTAL SCIENCES  
UNIT FOR RESEARCH AND  
TRAINING GRADUATE STUDIES IN  
LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY*

LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE ET D'ETUDE DES PLANTES MEDICINALES  
*LABORATORY FOR PHYTOBIOCHEMISTRY AND MEDICINAL PLANTS STUDIES*

UNITE DES AGENTS ANTIMICROBIENS ET DE BIOCONTROLE  
*ANTIMICROBIAL AND BIOCONTROL AGENTS UNIT*

## Activités anti-salmonelle, antioxydante et modes d'action des extraits de *Callistemon rigidus* (Myrtaceae)

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Master  
en Biochimie

Spécialité : **Biotechnologie et développement**

Par :

**FITLIAVOM MOUANJI Manuella Chloé**

Matricule : 18L2016

*Licencié-es sciences*

Sous la co-direction de

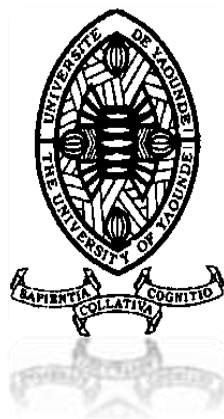


**NGOUANA Vincent, PhD**  
Chargé de Cours (FMSP, UD<sub>s</sub>)

**LUNGA KEILAH Paul, PhD**  
Maître de Conférences (UY1)

2023-2024

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT  
UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE SCIENCES DE  
LA VIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN  
LIFE, HEALTH &  
ENVIRONMENTAL SCIENCES  
UNIT FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE  
SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY*

LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE ET D'ETUDE DES PLANTES MEDICINALES

*LABORATORY FOR PHYTOBIOCHEMISTRY AND MEDICINAL PLANTS STUDIES*

UNITE DES AGENTS ANTIMICROBIENS ET DE BIOCONTROLE

*ANTIMICROBIAL AND BIOCONTROL AGENTS UNIT*

# Activités anti-salmonelle, antioxydante et modes d'action des extraits de *Callistemon rigidus* (Myrtaceae)

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Biochimie

Spécialité : **Biotechnologie et développement**

Par :

**FITLIAVOM MOUANJI Manuella Chloé**

Matricule : **18L2016**

*Licencié-es sciences*

Sous la co-direction de

**NGOUANA Vincent, PhD**  
Chargé de Cours (FMSP, UDs)

**LUNGA KEILAH Paul, PhD**  
Maître de Conférences (UY1)

2023-2024

## TABLE DES MATIERES

\_Toc182734849

DEDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS .....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ANNEXES.....	x
RESUME.....	xi
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
I.1. Généralités sur les salmonelloses.....	3
I.1.1. Définition, types et modes de transmission.....	3
I.1.2. Epidémiologie des salmonelloses.....	3
I.1.3. Facteurs et personnes à risque.....	4
I.2. Généralités sur le genre <i>Salmonella</i> .....	4
I.2.1. Classification et Nomenclature.....	4
I.2.2. Caractéristiques biochimiques.....	5
I.3. Pathogénèse et facteurs de virulence.....	6
I.4. Salmonelloses et stress oxydatif.....	7
I.5. Généralités sur le stress oxydatif.....	8
I.5.1. Définition.....	8
I.5.2. Les radicaux libres et espèces réactives oxygénées.....	8
I.5.3. Dommages des ROS sur les molécules biologiques.....	9
I.5.4. Les antioxydants et leurs modes d'action.....	9
I.6. Stratégies de lutte contre les salmonelloses.....	9
I.6.1. Lutte préventive.....	9
I.6.2. Traitement.....	10
I.6.3. Limites du traitement.....	10
I.7. Utilisation des plantes médicinales comme alternative.....	11
I.8. Généralités sur le genre <i>Callistemon</i> .....	12
I.8.1. Description botanique.....	12
I.8.2. Usage traditionnel et travaux antérieurs.....	12

I.9. Généralités sur <i>Callistemon rigidus</i> .....	12
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....	16
II.1. MATERIEL .....	16
II.1.1. Extraits de <i>C. rigidus</i> .....	16
II.1.2. Matériel microbiologique .....	16
II.2. METHODES .....	16
II.2.1. Activité anti-salmonelle .....	16
II.2.2. Dosage des composés phénoliques .....	20
II.2.3. Evaluation de la cytotoxicité des extraits bioactifs. ....	22
II.2.4. Exploration de quelques modes d'action des extraits bioactifs.....	23
II.2.5. Détermination de l'activité antioxydante des extraits bioactifs .....	28
II.2.6. Analyses statistiques.....	33
III.1. RESULTATS.....	34
III.1.1. Activité anti-salmonelle .....	34
III.1.2. Teneurs en composés phénoliques des extraits bioactifs .....	36
III.1.3. Cytotoxicité des extraits.....	37
III.1.4. Effet des extraits bioactifs sur la cinétique de mortalité bactérienne.....	37
III.1.5. Effet des extraits bioactifs sur la membrane .....	39
III.1.6. Effet des extraits bioactifs sur l'inhibition des pompes à efflux.....	41
III.1.7. Effet des extraits sur l'inhibition des pompes ATPases/H <sup>+</sup> .....	42
III.1.8. Effet des extraits sur l'inhibition de la motilité swarming.....	43
III.1.9. Activité Antioxydante .....	44
III-2 DISCUSSION .....	45
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	50
REFERENCES .....	51
ANNEXES .....	a

**DEDICACE**

Je dédie ce travail à :

Mes parents,

**M. MOUANJI HOSE**

Et

**Mme FITLIAVOM KPOUMIE MELANIE SUZANNE**

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, j'ai l'honneur et le plaisir d'exprimer ma sincère gratitude à :

**L'Éternel Dieu**, qui m'a gardé en bonne santé, m'a donné la force, le courage, l'inspiration et la persévérance nécessaire à la réalisation de ce travail.

**Pr. LUNGA Paul KEILAH** et **Dr NGOUANA Vincent**, mes encadreurs d'avoir accepté de diriger ce travail. Vos encouragements, votre confiance et votre rigueur scientifique m'ont guidé tout au long de ce travail. En témoignage de ma profonde gratitude, veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

**Pr. FEKAM BOYOM Fabrice**, Responsable du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales de l'Université de Yaoundé I, de m'avoir accueilli dans son unité de recherche et pour tout le soutien de toute nature qu'il ne cesse de nous apporter.

**Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour l'encadrement, le suivi et les conseils.

**Tous les enseignants** du Département de Biochimie, pour la qualité des enseignements, le suivi et les conseils.

**Au Centre Pasteur du Cameroun**, pour nous avoir offert les isolats bactériens.

**Noguchi Memorial Institute for Medecinal Research, University of Ghana**, pour nous avoir offert la lignée cellulaire RAW.

**Dr Pone Kamdem Boniface**, pour avoir apporté des corrections et suggestions critiques au présent mémoire.

Aux Docteurs du laboratoire : **Dr TSOUH FOKOU Patrick Valère**, **Dr ZEUKO'O Elisabeth**, **Dr MABOU Lile**, **Dr TCHATAT Brice**, **Dr DIZE Darline**, **Dr NYA Vanessa**.

**M. PINLAP Brice Rostan**, pour m'avoir initié et accompagné sur la paillasse tout au long de ce travail ainsi que pour tous ses conseils, son énergie et son temps fourni afin que ce travail se fasse dans les meilleures conditions.

**Mlle TOFAC ASONG Stella**, pour son énergie fournie, son temps libre, ses conseils et ses encouragements.

Tous mes aînés du laboratoire : **YIMGANG Lorette**, **NDZIE Marie Paule**, **MELOGMO YANICK**, **KEMZEU Raoul**, **SOUANA Emmanuel**, **WANDJI Yves**, **DONGMO Arlette**, **NOUMBOUE Bijou**, **WOUTOUOBA David** pour leurs contributions.

Mes camarades du laboratoire : **TCHUENDEM Diane**, **MEMADJI-LO Gerald**, **YANKAM Leticia**, **NTEP Céleste**, **BALEP Sandra**, **DONBOU Parfait**, **DJINGANG Hubert** pour leur esprit d'équipe et de travail, leur soutien, disponibilité et présence.

Tous les camarades de la promotion de **Master II biochimie 2022-2023**.

Mes cadets du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales, pour l'assistance et les encouragements.

Mes frères : **NGAH MOUANJI Jean Ollivier, NGAH MOUANJI Jean-Merveilleux**  
et sœurs : **PENTANE MOUANJI Mariane Aurélie, NGAMCHERA MOUANJI Isabelle Laure, MEFIRE MOUANJI Marceline, PENTANE MOUANJI Janet.**

Mes amis pour qui j'ai une sincère affection et un très grand respect : **FOUT NDAM Brinda, FEUMI BATCHANGA Myriam, NGO-MOULEN Marie-Céline, FITOUA'A Claude, GARGA Aliou, MOUDANG Jean-fredel, FOUPOUAPOUOGNIGNI Amza, MINKOUBE Carlos, HASSANA Elhadj** pour le soutien, les conseils et les encouragements.

Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ABTS	: Acide 2,2'-azino bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
CC <sub>50</sub>	: Concentration cytotoxique 50
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CN	: Contrôle négatif
CP	: Contrôle positif
CP <sub>50</sub>	: Concentration de piégeage 50
CR <sub>50</sub>	: Concentration de réduction 50
<i>C. rigidus</i>	: <i>Callistemon rigidus</i>
CRE	: Extrait aqueux du résidu obtenu après extraction des écorces de <i>C. rigidus</i> au H <sub>2</sub> O(DCM)
H <sub>2</sub> O(DCM)	dichlorométhane
CRE	: Extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction des écorces de <i>C. rigidus</i> au Me(DCM)
Me(DCM)	<i>rigidus</i> au dichlorométhane
CPC	: Centre Pasteur du Cameroun
DCM	: Dichlorométhane
DM	: Déstabilisation membranaire
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 2,2-Diphényl-1-PicrylHydrazyl
D.O.	: Densité optique
EAG	: Equivalent Acide Gallique
EC	: Equivalent Catéchine
ER	: Equivalent Rutine
EDTA	: Acide éthylène-diamine tétra acétique
ET	: Ethanol
ERO	: Espèce Réactive de l'Oxygène
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
FBS	: Fetal Bovine Serum
GC/MS	: Gas chromatography-mass spectrometry

HE	: Hydroéthanolique
HEX	: Hexane
IL	: Interleukine
LPS	: Lipopolysaccharides
Me	: Méthanol
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
NEA	: Non essential amino acids
NO	: Oxyde nitrique
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PI	: Pourcentage d'inhibition
PRRs	: Pattern recognition receptors
R. Br.	: Robert Brown
UFC	: Unité Formant Colonie
SSA	: <i>Salmonella Shigella</i> Agar
SST3	: Système de sécrétion de type III
Syn.	: Synonyme
TNF	: Tumor Necrosis Factor

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Nomenclature de <i>Salmonella spp.</i> .....	5
<b>Tableau II.</b> Principales familles d'antibiotiques utilisés dans le traitement des salmonelloses .....	10
<b>Tableau III.</b> Classification taxonomique de <i>Callistemon rigidus</i> .....	13
<b>Tableau IV.</b> Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits actifs sur les sérotypes du genre <i>Salmonella</i> .....	35
<b>Tableau V.</b> Teneurs en composés phénoliques des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H <sub>2</sub> O(DCM) .....	36
<b>Tableau VI.</b> Concentrations cytotoxiques 50 des extraits bioactifs de <i>C. rigidus</i> sur la lignée cellulaire RAW 264.7 .....	37
<b>Tableau VII.</b> Concentrations de piégeage 50 (CP <sub>50</sub> ) de DPPH, ABTS et du NO, et concentrations de réduction 50 (CR <sub>50</sub> ) du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O et du fer ferrique (Fe <sup>3+</sup> ) en fer ferreux (Fe <sup>2+</sup> ). .....	44

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Taxonomie de <i>Salmonella</i> .....	5
<b>Figure 2.</b> Culture de <i>Salmonella</i> sur XLD agar (a) et SSA (b) .....	6
<b>Figure 3.</b> Pathogénèse de l'infection à <i>Salmonella</i> au niveau de l'épithélium intestinal.....	7
<b>Figure 4.</b> Origine des espèces réactives de l'oxygène .....	8
<b>Figure 5.</b> Effet des EROs sur les molécules biologiques.....	9
<b>Figure 6.</b> Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques .....	11
<b>Figure 7.</b> <i>Callistemon rigidus</i> .....	13
<b>Figure 8.</b> Réduction de la résazurine en résorufine .....	18
<b>Figure 9.</b> Schéma illustratif montrant la chélation des cations bivalents par un agent chélateur. ....	24
<b>Figure 10.</b> Équation de la réaction de décoloration du DPPH en présence d'un antiradicalaire. ....	29
<b>Figure 11.</b> Equation de la réaction de décoloration du radical ABTS en présence d'un antiradicalaire. ....	30
<b>Figure 12.</b> Principe du test de piégeage du radical NO .....	32
<b>Figure 13.</b> Proportions d'inhibition des souches de salmonelles testées en présence des extraits de <i>C. rigidus</i> . ....	34
<b>Figure 14.</b> Effets des extraits CRE MeDCM et CRE H <sub>2</sub> ODCM sur la cinétique de mortalité de <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Salmonella typhi</i> CPC. ....	38
<b>Figure 15.</b> Pourcentages de déstabilisation de la membrane externe de <i>S. typhimurium</i> 13555 et <i>S. typhi</i> CPC en fonction des différentes concentrations des extraits CRE MeDCM et CRE H <sub>2</sub> ODCM.....	39
<b>Figure 16.</b> Effet des extraits CRE MeDCM et CRE H <sub>2</sub> ODCM sur la libération des acides nucléiques <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Salmonella typhi</i> CPC. en fonction du temps. ....	40
<b>Figure 17.</b> Effet des extraits CRE MeDCM et CRE H <sub>2</sub> ODCM sur l'inhibition des pompes à efflux de <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Salmonella typhi</i> CPC.....	41
<b>Figure 18.</b> Effet des extraits CRE MeDCM et CRE H <sub>2</sub> ODCM sur l'inhibition des pompes ATPases/H <sup>+</sup> de <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Salmonella typhi</i> CPC.....	42
<b>Figure 19.</b> Effets des extraits bioactifs sur l'inhibition de la motilité swarming chez <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Salmonella typhi</i> CPC. ....	43

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1</b> : Généralités sur les extraits des feuilles et écorce de <i>Callistemon rigidus</i> .....	a
<b>Annexe 2</b> : Composition des milieux de culture utilisés .....	c
<b>Annexe 3</b> : Préparation des milieux de culture utilisés .....	e
<b>Annexe 4</b> : Préparation des solutions .....	e
<b>Annexe 5</b> : Résultats du screening de l'activité anti-salmonelle des extraits de <i>C. rigidus</i> .....	g
<b>Annexe 6</b> . Microplaque de détermination des CMI's .....	h
<b>Annexe 7</b> . Courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine, et de l'acide tanique .....	h
<b>Annexe 8</b> : Microplaque du test de piégeage du radical DPPH.....	i
<b>Annexe 9</b> : Microplaque du test de piégeage du radical ABTS.....	i
<b>Annexe 10</b> : Microplaque du test de réduction du Fe <sup>3+</sup> en Fe <sup>2+</sup> .....	i

## RESUME

Les salmonelloses sont responsables d'environ 300 000 décès chaque année dans le monde. La situation devient de plus en plus préoccupante en raison de l'émergence de la résistance aux antibiotiques actuellement recommandés. Cela suscite l'urgence de rechercher de nouvelles molécules bioactives. Les plantes de la forêt tropicale camerounaise constituent une source riche et diversifiée de composés bioactifs vis-à-vis des souches bactériennes. *Callistemon rigidus* R. Br. est un exemple de plantes médicinales dont les feuilles et écorces sont utilisées en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner la toux, la bronchite et des infections du système digestif et respiratoire. La présente étude vise à évaluer les activités anti-salmonelle et antioxydante des extraits de *Callistemon rigidus*. L'extraction préalable des feuilles et écorces de *Callistemon rigidus* par macération successive dans divers solvants/système de solvants de polarité croissante a généré 38 extraits. L'activité anti-salmonelle de ces extraits a été évaluée sur quatre sérotypes (*S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* et *S. paratyphi B*) par la méthode de microdilution. L'analyse phytochimique quantitative (teneurs en phénols, flavonoïdes et tanins condensés) des extraits bioactifs a été évaluée par des méthodes standards. La cytotoxicité des extraits bioactifs a été évaluée sur les macrophages de la lignée RAW 264.7 par spectrophotométrie. Les modes d'action des extraits bioactifs ont été explorés à travers leurs effets sur la cinétique de mortalité bactérienne, l'intégrité membranaire, les pompes à efflux et ATPases/H<sup>+</sup> et la motilité bactérienne. L'activité antioxydante a été déterminée par les tests de DPPH, ABTS, FRAP, NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des 38 extraits testés, les plus actifs étaient CRE Me(DCM) (CMI = 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) (CMI = 250 et 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC, respectivement). Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés de ces extraits étaient de 126,763 et 192,40 mg EAG /g, de 130,98 et 186,583 mg EQ/g et de 135,398 mg et 284,043 mg EAT/g, respectivement. Ces extraits étaient non cytotoxiques sur la lignée cellulaire RAW (CC<sub>50</sub> : 76,285 µg/mL et 81,49 µg/mL, respectivement). La cinétique de mortalité de CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a montré un effet bactéricide dose dépendante observable à partir de 4 h d'incubation. Ces extraits ont déstabilisé la membrane externe (entre 40 et 50 % de déstabilisation à la CMI), perméabilisé la membrane interne et inhibé les pompes à efflux et ATPases/H<sup>+</sup>, et la motilité swarming (diamètre de motilité < 20 mm à la CMI) de *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC. CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont révélé une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres de DPPH (CP<sub>50</sub> de 18,65 et 46,48 µg/mL), ABTS (CP<sub>50</sub> de 5,438 et 6,677 µg/mL), et NO (CP<sub>50</sub> de 23,08 et 49,33 µg/mL) et en réduisant le fer ferreux en fer ferrique (CR<sub>50</sub> de 47,165 et 54,15 µg/mL), et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (CR<sub>50</sub> de 19,46 et 35,52 µg/mL). Ces résultats suggèrent que les extraits de *Callistemon rigidus* possèdent des activités anti-salmonelle et antioxydante, et pourraient constituer une source prometteuse de principes actifs à potentiel anti-salmonelle.

**Mots-clés :** *Callistemon rigidus* ; Activité anti-salmonelle ; Cytotoxicité ; Modes d'action ; Activité antioxydante.

## ABSTRACT

*Salmonella* infections are responsible for over 300 000 deaths worldwide annually. This situation is exacerbated by the development of resistance to currently available antibiotics. Thus, there is an urgent need to search for effective treatments against *Salmonella* infections. Medicinal plants, such as *Callistemon rigidus* R. Br. are traditionally used in Cameroon to treat bronchitis, cough, and digestive and respiratory infections. Therefore, the present study sought to investigate the anti-*Salmonella* and antioxidant activities of *Callistemon rigidus* extracts. To this end, thirty-eight (38) *Callistemon rigidus* extracts, which were prepared by using different solvents / solvent systems of increasing polarity, were evaluated for anti-*Salmonella* activity against four serotypes (*S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. paratyphi B*) using broth microdilution technique. The phytochemical analysis of the most promising extracts was evaluated using standard methods. Cytotoxicity of the most promising extracts was evaluated on macrophage cells RAW 264.7 by a spectrophotometric test. The effects of the most promising extracts were evaluated on growth kinetics, membrane stability, efflux and ATPases/H<sup>+</sup> pumps, and motility in the most sensitive bacteria. Antioxidant activity of the most promising extracts was evaluated by spectrophotometric methods using DPPH, ABTS, FRAP, NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assays. As a result, two extracts (CRE H<sub>2</sub>O(DCM) and CRE Me(DCM)) out of the 38 tested, revealed more pronounced activity on *S. typhimurium* with MIC values of 250 and 500 µg/mL, respectively. Against *S. typhi* CPC, CRE Me(DCM) and CRE H<sub>2</sub>O(DCM) showed a common MIC value of 500 µg/mL. The contents of phenols, flavonoids, and condensed tannins of CRE Me(DCM) and CRE H<sub>2</sub>O(DCM) were 126,763 and 192,40 mg EAG/g, 130,98 and 186,583 mg EQ /g, and 135,398 and 284,043 mg, EAT/g respectively. These bioactive extracts revealed no cytotoxicity when tested against RAW 264.7 cells, as evidenced by their CC<sub>50</sub> values (76.285 µg/mL and 81.49 µg/mL, respectively). At MICs, these extracts showed a bactericidal orientation after 4h of incubation with *S. typhimurium* and *S. typhi* CPC. Moreover, these extracts destabilized the outer membrane and reduced the permeability of the inner membrane of *S. typhimurium* and *S. typhi* CPC. CRE Me(DCM) and CRE H<sub>2</sub>O(DCM) significantly inhibited efflux and ATPases/H<sup>+</sup> pumps as well as the motility swarming of these two pathogens. CRE Me(DCM) and CRE H<sub>2</sub>O(DCM) showed antioxidant activity by scavenging free radicals of DPPH (SC<sub>50</sub> of 18.65 and 46.48 µg/mL) ABTS (SC<sub>50</sub> of 5.438 and 6.677 µg/mL), and NO (SC<sub>50</sub> of 23.08 and 49.33 µg/mL) and by reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O (RC<sub>50</sub> of 19.46 and 35.52 µg/mL) and Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> (RC<sub>50</sub> of 47.165 and 54.15 µg/mL). These results demonstrate the anti-*Salmonella* and antioxidant activities of *Callistemon rigidus* extracts, which can be further exploited as a promising source of potential compounds against *Salmonella* infections.

**Keywords :** *Callistemon rigidus* ; Anti-*Salmonella* activity ; Cytotoxicity ; Modes of action ; Antioxidant activity.

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Les salmonelloses sont des infections causées par des entérobactéries du genre *Salmonella* (Ed-dra *et al.*, 2017). Elles se manifestent principalement par la fièvre, la diarrhée et les crampes abdominales (Tariq *et al.*, 2022). Les infections à *Salmonella* varient selon le sérotype et l'hôte infecté. On distingue deux types: la salmonellose typhique ou «fièvre entérique» qui regroupe les fièvres typhoïde et paratyphoïde et la salmonellose non typhique encore appelée «gastroentérite» (Duff *et al.*, 2020).

On estime environ onze à vingt et un millions de cas de fièvre typhoïde et cinq millions de cas de fièvre paratyphoïde, avec 135 000 à 230 000 décès chaque année dans le monde. Par ailleurs, environ cent cinquante millions de cas de gastroentérite avec plus de 60 000 décès sont enregistrés chaque année dans le monde (CDC, 2024). *Salmonella* est à l'origine d'environ 28 % des décès dus aux infections alimentaires et est la troisième cause des maladies diarrhéiques dans le monde (Ruszel *et al.*, 2021; OMS, 2024a).

Une fois ingérées, les salmonelles adhèrent aux entérocytes puis envahissent les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale grâce à des facteurs de virulence (îlots de pathogénicité, opérons fimbriaires, de flagelles et de plasmides, lipopolysaccharides, et adhésines, etc.) (Lorkowski, 2014). En réponse à l'infection, les cellules immunitaires (macrophages et neutrophiles) libèrent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , etc.), qui stimulent en plus des substances microbicides la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Aubry, 2018; Loredana et Mircea, 2021). L'accumulation des EROs conduit à un stress oxydatif (déséquilibre entre la production des espèces radicalaires ou réactives de l'oxygène (ERO) et la quantité d'antioxydants disponibles et utilisables par l'organisme) (Frombaum *et al.*, 2011), susceptible d'endommager les biomolécules essentielles (ADN, protéines, lipides) (Rastaldo *et al.*, 2007; Baudin, 2020).

Le traitement des salmonelloses repose sur l'usage des antibiotiques. A cet effet, les fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine, etc.) sont recommandés en première ligne, tandis que les céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone et céfotaxime, etc.) et les macrolides (azithromycine et érythromycine, etc.) sont utilisés en seconde intention (OMS, 2023a; Galán-Relaño *et al.*, 2023). Cependant l'usage de ces antibiotiques fait face à de nombreuses limites telles que l'émergence des phénomènes de résistance et multirésistance conduisant à de nombreux échecs thérapeutiques (Cuypers *et al.*, 2018; CDC, 2023). En effet, selon un rapport publié récemment par l'Organisation Mondiale de la Santé, *Salmonella* fait partie de la liste de douze bactéries les plus menaçantes pour la santé publique en raison de leur forte résistance aux antibiotiques. De plus, les effets toxiques (hépatotoxicité, néphrotoxicité

et neurotoxicité) causés par ces antibiotiques (Michalak *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2020) suscitent le besoin urgent de rechercher de nouveaux principes actifs dotés d'activité anti-salmonelle.

La phytothérapie désigne l'utilisation des plantes médicinales, de leurs extraits et de leurs principes actifs pour des objectifs thérapeutiques, tels que la prévention ou le traitement des maladies (Zimmermann-Klemd *et al.*, 2022). En raison du coût et de ses effets non toxiques potentiels, elle constitue pour une grande majorité de la population mondiale une solution de choix pour traiter diverses maladies (Esteves *et al.*, 2020). En se référant à des éléments scientifiques probants, notamment l'identification de l'artémisinine et de la quinine, respectivement de *Artemisia annua* et du quinquina (*Cinchona officinalis*), l'organisation mondiale de la santé soutient la médecine traditionnelle à base de plantes médicinales (OMS, 2023b). En effet, les plantes médicinales constituent une source de biomolécules à usage thérapeutique contre les agents pathogènes (Suntar, 2020; Vaou *et al.*, 2021). *Callistemon rigidus* R. Br. est un exemple de plantes médicinales dont les feuilles et écorces sont utilisées en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner la toux, la bronchite et les infections du système digestif et respiratoire (Saxena et Gomber, 2006; Goyal *et al.*, 2012). Un nombre important de plantes du genre *Callistemon* a fait l'objet d'études scientifiques avec des résultats probants, notamment leurs effets inhibiteurs contre les microorganismes tels que les salmonelles (Salem *et al.*, 2013; Sutar *et al.*, 2014; Arora *et al.*, 2016; Fayemi *et al.*, 2019; Abdelmalek *et al.*, 2021). Cependant, l'activité antibactérienne de *Callistemon rigidus* contre les espèces du genre *Salmonella* n'a pas encore fait l'objet d'une étude scientifique.

De ce qui précède, l'hypothèse de recherche est élaborée comme suit : *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) contient des métabolites secondaires doués d'activités anti-salmonelle et antioxydante.

Par conséquent, l'objectif général de ce travail était d'évaluer les activités anti-salmonelle et antioxydante des extraits de *Callistemon rigidus*. Spécifiquement, il s'agissait de :

- Déterminer l'activité anti-salmonelle des extraits de *Callistemon rigidus* et la cytotoxicité des extraits les plus actifs ;
- Explorer les modes d'action potentiels des extraits bioactifs de *C. rigidus* ;
- Déterminer l'activité antioxydante des extraits bioactifs de *C. rigidus*.

# **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I.1. Généralités sur les salmonelloses

#### I.1.1. Définition, types et modes de transmission

Les salmonelloses sont des infections causées par des entérobactéries du genre *Salmonella* (Ed-dra *et al.*, 2017) qui se manifestent principalement par la fièvre, la diarrhée et les crampes abdominales (Tariq *et al.*, 2022). Cependant, des symptômes secondaires tels que les vomissements, les maux de tête et les nausées peuvent également être enregistrés (Crump *et al.*, 2023). Ces infections varient selon le sérotype et l'hôte infecté, on distingue la salmonellose typhique ou «fièvre entérique» qui regroupe les fièvres typhoïde et paratyphoïde et la salmonellose non typhique encore appelée «gastroentérite» (Duff *et al.*, 2020). La transmission des salmonelles se fait principalement par voie féco-orale à travers la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Dyson *et al.*, 2019). Toutefois, le contact direct avec les animaux (chats et chiens, etc.) constitue aussi une source de contamination (Oludairo *et al.*, 2022).

#### I.1.2. Épidémiologie des salmonelloses

On estime environ onze à vingt et un millions de cas de fièvre typhoïde et cinq millions de cas de fièvre paratyphoïde, avec 135 000 à 230 000 décès chaque année dans le monde. (CDC, 2024). Plus de la moitié de ces cas et de ces décès sont enregistrés sur le continent africain (Stanaway *et al.*, 2019). En Afrique sub-saharienne, environ 1,2 millions de cas de fièvre typhoïde ont été enregistrés en 2017 avec plus de 29 000 morts (Kim *et al.*, 2024). Au Cameroun, les données concernant la prévalence de la fièvre typhoïde sont limitées et varient d'une zone à l'autre, néanmoins on a noté une prévalence de 16,29 % à Yaoundé en 2021, 62,5 % à Bafoussam en 2021, 64,3 % à Ngaoundéré en 2019 (Netongo *et al.*, 2022; Sohanang *et al.*, 2023; Yemeli *et al.*, 2024).

D'autres part, environ 150 millions de cas de gastroentérite avec plus de 60 000 décès sont enregistrés annuellement dans le monde (CDC, 2024; Hughson *et al.*, 2024). En Afrique sub-saharienne, l'incidence de la gastroentérite est de 34,5 cas pour 100 000 personnes, avec un taux de létalité de 20,6 % (Piccini et Montomoli, 2020).

*Salmonella* est à l'origine d'environ 28 % des décès dus aux infections alimentaires et est la troisième cause des maladies diarrhéiques dans le monde (Ruszel *et al.*, 2021; OMS, 2024a). C'est un pathogène zoonotique important qui entraîne de lourdes pertes socio-économiques à travers le monde soit environ 3,7 milliards de dollars par an (Abd El-Ghany, 2020).

### I.1.3. Facteurs et personnes à risque

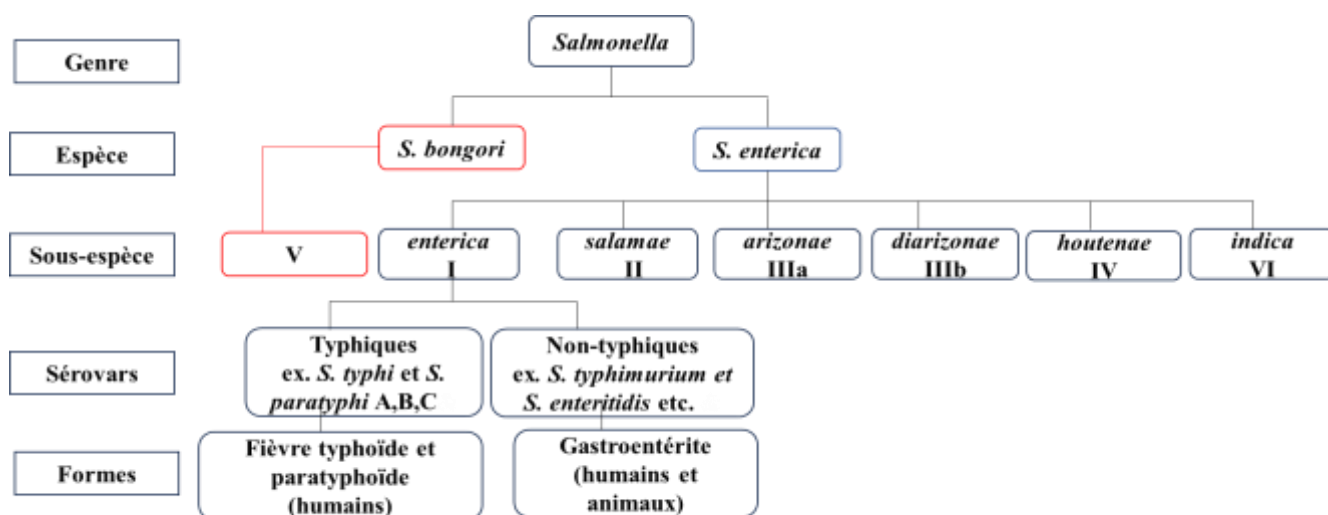
Les conditions de vie précaires, une mauvaise hygiène ainsi qu'une mauvaise cuisson des aliments favorisent la survenue des salmonelloses (**Lamichhane et al., 2024**). Les personnes à risques d'infections graves et de complications sont les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et immunodéprimées (**Cavestri, 2019**).

## I.2. Généralités sur le genre *Salmonella*

Le genre *Salmonella* regroupe des bacilles (2-3 µm de longueur et 0,4-0,6 µm de largeur) Gram-négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulants et mobiles appartenant à la famille des Enterobacteriaceae (**Oludairo et al., 2022**).

### I.2.1. Classification et Nomenclature

Les espèces du genre *Salmonella* appartiennent au règne de Eubactéries, à l'embranchement des Protéobactéries, classe des Gammaprotéobactéries, ordre des Entérobactéries et à la famille des Enterobacteriaceae (**Martins, 2014**). Le genre *Salmonella* comprend 02 espèces dont *S. bongori* et *S. enterica* (**Eng et al., 2015**). *Salmonella bongori* est prédominant dans l'environnement et chez les espèces à sang-froid tandis que *Salmonella enterica* est responsable de 99 % d'infections chez l'Homme et les animaux à sang chaud (**Eng et al., 2015**). La classification de Kauffmann-White a permis de distinguer les différents sérotypes de *Salmonella enterica* basée sur leurs antigènes de surface O (somatiques ou lipopolysaccharides), H (flagellaires) et Vi (capsulaires) (**Bula-Rudas et al., 2015**). Ainsi, il existe plus de 2659 sérotypes (**Fabre et al., 2014**) qui peuvent être classés selon trois types de spectres d'hôtes: les généralistes, tels que les sérotypes *S. typhimurium* et *S. enteritidis* (responsables d'environ 70% des infections humaines), qui ont la capacité d'infecter une large gamme d'hôtes; les adaptés à un hôte, tels que les sérotypes *S. dublin* (bovins) et *S. choleraesuis* (porcs), qui possèdent un hôte préférentiel mais peuvent occasionnellement infecter d'autres hôtes de manière asymptomatique; et les restreints, tels que les sérotypes *S. typhi* et *S. paratyphi* (humain) ou encore *S. gallinarum* (volaille), qui n'affectent qu'un seul type d'hôte (**Cavestri, 2019**).



**Figure 1.** Taxonomie de *Salmonella* (Martins, 2014)

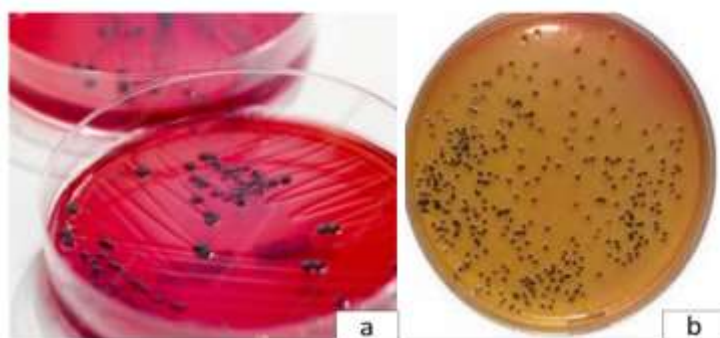
Etant donné la complexité de la nomenclature de *Salmonella* et pour une meilleure clarification, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) a publié une terminologie facilitant l'interprétation pour l'utilisation clinique et épidémiologique, comme indiqué dans le Tableau I.

**Tableau I.** Nomenclature de *Salmonella* spp.

Nom complet	Désignation CDC Désignation CDC	Autres désignations
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> ser Typhi	<i>Salmonella enterica</i> ser Typhi	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> Ser Paratyphi A, B, C	<i>Salmonella enterica</i> Ser Paratyphi A, B, C	<i>Salmonella paratyphi</i> A, B, C
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> Ser Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> Ser Typhimurium	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> Ser Enteritidis	<i>Salmonella enterica</i> Ser Enteritidis	<i>Salmonella enteritidis</i>

### I.2.2. Caractéristiques biochimiques

La plupart des sérotypes de salmonelles produisent du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et ne fermentent pas le lactose; cette propriété a servi de base pour la conception des milieux de cultures sélectifs et différentiels pour leur identification (Figure 2) (Lee *et al.*, 2015). Presque tous les sérotypes de salmonelles ne produisent pas d'indole, hydrolysent l'urée, réduisent le nitrate en nitrite et fermentent une variété de sucres avec production d'acides. Les salmonelles sont oxydase négative et catalase positive (Andino et Hanning, 2015; Lee *et al.*, 2015). La température optimale de croissance varie de 35 à 37 °C et le pH de 6,5 à 7,5 (Matches et Liston, 1972).



**Figure 2.** Culture de *Salmonella* sur XLD agar (a) et SSA (b) (Tankeshwar, 2015)

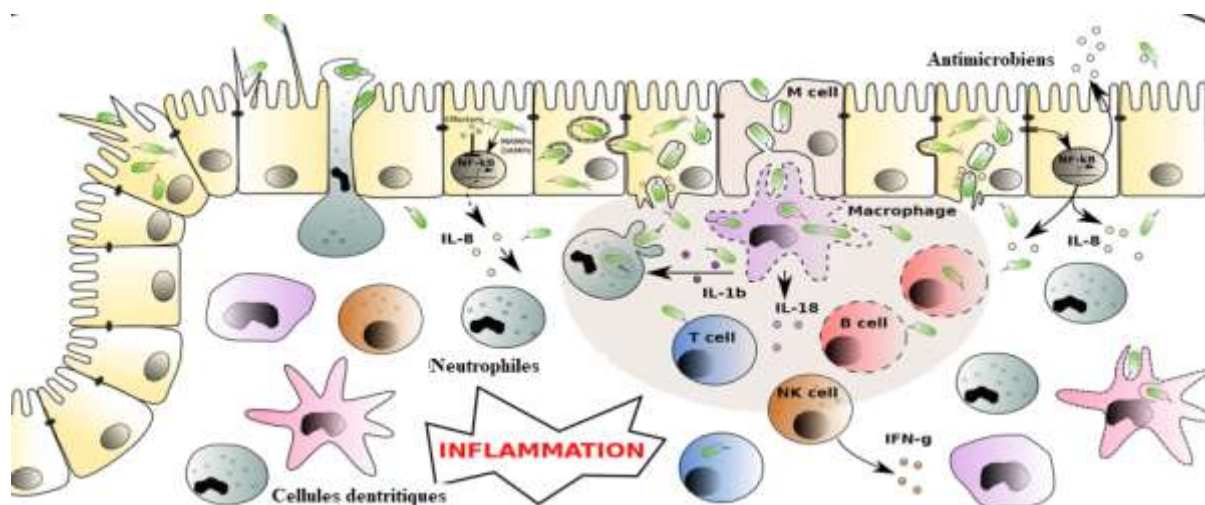
SSA : *Salmonella Shigella* agar ; XLD : Xylose Lysine Deoxycholate.

### I.3. Pathogénèse et facteurs de virulence

Une fois ingérées, les salmonelles survivent à un pH acide de l'estomac puis adhèrent aux entérocytes grâce à des facteurs de virulence (îlots de pathogénicité, opérons fimbriaires, de flagelles et de plasmides, lipopolysaccharides, et adhésines, etc.) (Lorkowski, 2014). Afin de pénétrer les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, les salmonelles sécrètent des protéines effectrices (Sip A, Sip C, Spt P, Sop B et Sop E) via un système de sécrétion de type III (SST3). Ces protéines modifient la structure du cytosquelette de la cellule hôte pour induire l'internalisation des salmonelles par endocytose dans un compartiment spécial nommé vacuole contenant *Salmonella* (VCS), leur permettant de se répliquer efficacement, de se propager à travers la muqueuse intestinale et d'envahir les tissus sous-jacents (lympe, foie et rate) (McWhorter et Chousalkar, 2015 ; Cavestri, 2019).

L'hôte à son tour, se défend contre l'infection via les cellules du système immunitaire (macrophages) qui détectent des structures spécifiques (lipopolysaccharides et antigènes flagellaire, etc.) sur les salmonelles via des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs). Une fois ces motifs reconnus, elles sont phagocytées et détruites dans les phagosomes. Les cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles) libèrent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-15 et IL-18) dans le but de recruter d'autres cellules immunitaires (lymphocytes T et B). Ces cytokines circulent dans le sang, atteignent l'hypothalamus et se lient à des récepteurs spécifiques sur les neurones hypothalamiques. L'activation des récepteurs dans l'hypothalamus entraîne la synthèse des prostaglandines, en particulier la prostaglandine E2 (PGE2), médiateur clé dans le processus de thermorégulation. La PGE2 agit sur les neurones hypothalamiques en modifiant le point de consigne thermique, conduisant ainsi à une augmentation de la température corporelle qui va provoquer la fièvre. Les cellules épithéliales endommagées libèrent des médiateurs

inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes), qui induisent des contractions musculaires douloureuses dans la paroi intestinale. Ces contractions augmentent la perméabilité entraînant ainsi une sécrétion accrue d'eau et d'électrolytes, qui va causer la diarrhée (Aubry, 2018; Loredana et Mircea, 2021).



**Figure 3.** Pathogénèse de l'infection à *Salmonella* au niveau de l'épithélium intestinal (Sansonetti, 2019).

#### I.4. Salmonelloses et stress oxydatif

Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-15 et IL-18) produites par les cellules immunitaires (macrophages et neutrophiles) en réponse aux salmonelles stimulent en plus des substances microbicides la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) via un processus appelé « explosion respiratoire ». Ce processus est médié par les NADPH oxydases, situés dans les membranes des phagosomes qui convertissent l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) en radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), qui est ensuite converti en d'autres EROs (peroxyde d'hydrogène : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et hydroxyle : OH). Le radical superoxyde réagit avec le radical NO (oxyde nitrique) pour former le peroxyde nitrite, un puissant radical diffusible (Popoff et Norel, 1992).

La surproduction des EROs est à l'origine d'un stress oxydatif (déséquilibre entre la production des espèces radicalaires ou réactives de l'oxygène (ERO) et la quantité d'antioxydants disponibles et utilisables par l'organisme) (Frombaum *et al.*, 2011), susceptible d'endommager les biomolécules essentielles (ADN, protéines, et lipides) (Rastaldo *et al.*, 2007; Baudin, 2020).

## I.5. Généralités sur le stress oxydatif

### I.5.1. Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires ou réactives de l'oxygène (ERO) et la quantité d'antioxydants disponibles et utilisables par l'organisme (Frombaum *et al.*, 2011). Cette production est importante dans le mécanisme de signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie cellulaire. Cependant, elle peut s'avérer néfaste en cas de production excessive due à une situation pathologique (infections microbiennes et mauvaises habitudes alimentaires) ou d'insuffisance d'antioxydants disponibles et utilisables par l'organisme (Belaïch et Boujraf, 2016). Ce déséquilibre contribue à l'apparition de diverses pathologies (cancer, maladies cardiovasculaires, Alzheimer, maladie de Parkinson etc.) (Jomova *et al.*, 2023) et d'anomalies biologiques (mutations, carcinogénèse et malformation de fœtus, etc.) (Klaunig, 2019).

### I.5.2. Les radicaux libres et espèces réactives oxygénées

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électrons non appariés sur une orbitale), ce qui lui confère un fort degré de réactivité; il aura donc tendance à capter un électron selon un mécanisme d'oxydation pour devenir plus stable (Finaud *et al.*, 2006; Migdal et Serres, 2011). Il est symbolisé par un point qui indique la position de l'électron libre (exemple : •OH). Une ERO est soit un radical libre, soit un dérivé radicalaire à toxicité élevée (Goto *et al.*, 2008).

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes aussi bien endogènes qu'exogènes. Au cours du métabolisme normal de production d'énergie sous forme d'ATP, la réduction tétravalente de l'oxygène en eau par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire donne naissance à des intermédiaires potentiellement réduits appelés espèces réactives de l'oxygène (radicaux primaires) (Figure 4) car ces dernières sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance (Migdal et Serres, 2011).

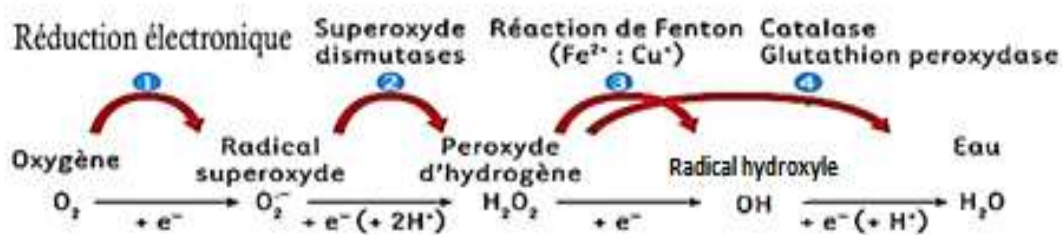


Figure 4. Origine des espèces réactives de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011).

Les ROS sont également produits par une variété d'enzymes comme la NADPH oxydase, l'oxyde nitrique synthase et les constituants du peroxysome lors des réactions inflammatoires et la régulation des fonctions cellulaires létales comme l'apoptose (Valko *et al.*, 2006).

Les espèces réactives oxygénées peuvent aussi avoir une origine exogène à travers certaines radiations ionisantes, l'alcool, certains médicaments anticancéreux et certains antibiotiques (Favier, 2003).

### I.5.3. Dommages des ROS sur les molécules biologiques

Les effets nocifs des EROs dans la cellule incluent des changements irréversibles (mutations) sur l'ADN ou l'ARN; la peroxydation lipidique; l'oxydation des protéines à l'origine de modifications fonctionnelles importantes (Langasco *et al.*, 2019) (Figure 5).

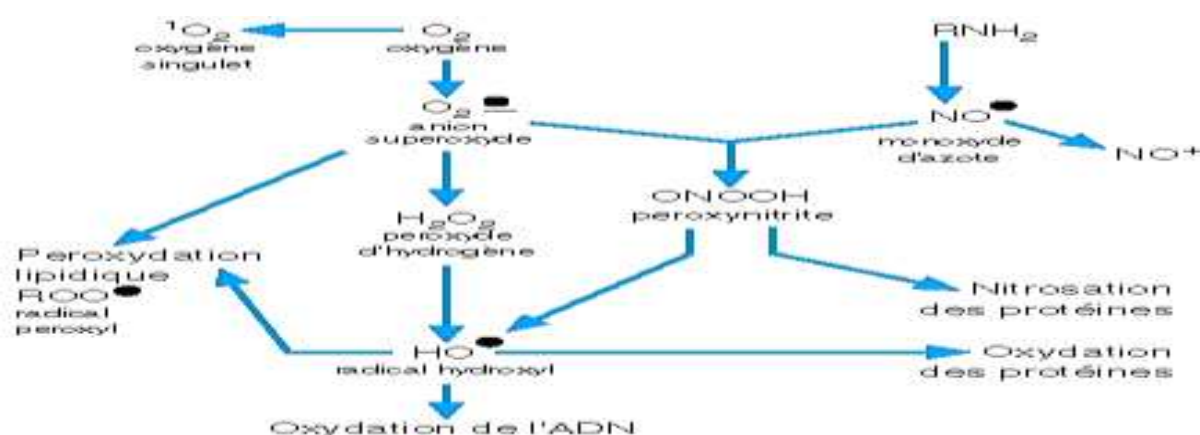


Figure 5. Effets des EROs sur les molécules biologiques (Migdal et Serres, 2011).

### I.5.4. Les antioxydants et leurs modes d'action

Un antioxydant est une substance qui a la capacité d'inhiber ou de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible en piégeant les radicaux libres, réduisant ainsi le risque de maladies dégénératives (Chima, 2023).

Dans le but de contrôler le niveau des espèces réactives de l'oxygène et minimiser le dommage oxydatif, la cellule fait appel à des systèmes de défense antioxydants qui peuvent être enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, et glutathion peroxydase) ou non (vitamines E et C, glutathion, caroténoïdes et oligoéléments) (Gutteridge et Halliwell, 2010).

## I.6. Stratégies de lutte contre les salmonelloses

### I.6.1. Lutte préventive

La prévention des salmonelloses repose sur la vaccination et la consommation d'eau potable et d'aliments sains. De plus, l'impulsion du respect de l'hygiène et des bonnes pratiques

dans les ménages et les industries alimentaires est indispensable (Elsbeth *et al.*, 2014). Deux vaccins sont recommandés, le Ty21a, un vaccin vivant atténué, disponible dans 56 pays situés dans les cinq continents et le Vi CPS fait à base de la capsule polysaccharidique Vi de *S. typhi*, et disponible dans 92 pays (Elsbeth *et al.*, 2014; Tennant *et al.*, 2016; Sears *et al.*, 2021). Cependant, ces vaccins sont peu utilisés dans la population en raison de leur faible immunogénicité et leur forte réactogénicité chez les enfants de moins de deux ans. En outre, les vaccins Ty21a et Vi CPS sont utilisés contre *S. typhi*, tandis qu'il n'existe pas de vaccins contre les autres sérovars chez l'Homme (Tennant *et al.*, 2016).

### I.6.2. Traitement

Le traitement des salmonelloses repose sur l'usage des antibiotiques. Auparavant, les antibiotiques de première nécessité étaient le chloramphénicol, ampicilline, et cotrimoxazole, etc., cependant, le développement de la résistance a conduit plus tard à l'usage des fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine, etc.) en première ligne, les céphalosporines de troisième de génération (ceftriaxone et céfotaxime, etc.) et les macrolides (azithromycine, érythromycine, etc.) en seconde intention. (OMS, 2023a; Galán-Relaño *et al.*, 2023).

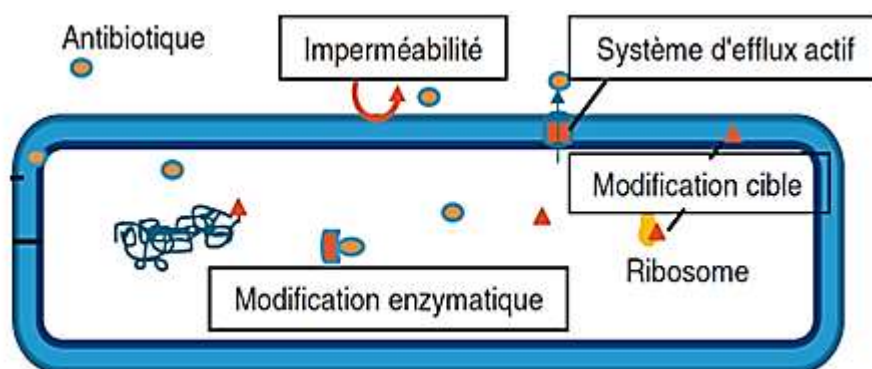
**Tableau II.** Principales familles d'antibiotiques utilisés dans le traitement des salmonelloses (Sahu et Khare, 2023).

Familles	Exemples	Cibles potentielles	Mécanismes d'action
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine, Lévofloxacine	ADN gyrase, topoisomérase IV	Inhibition de la gyrase et de la topoisomérase IV, indispensables à la réplication de l'ADN bactérien
<b>Céphalosporines de troisième génération</b>	Ceftriaxone, Céfotaxime	« Penicillin Binding Proteins (PBPs)»	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne par liaison aux PBPs
<b>Macrolides</b>	Azithromycine, Erythromycine	Sous-unité 50 S du chromosome bactérien	Liaison à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens, inhibant la synthèse protéique

### I.6.3. Limites du traitement

De nombreux effets secondaires indésirables à l'instar de l'hépatotoxicité, néphrotoxicité, et neurotoxicité sont engendrés par les antibiotiques couramment utilisés dans

le traitement des infections à *Salmonella* (Bourgeois *et al.*, 2016; Michalak *et al.*, 2017). En outre, le développement de la résistance et multirésistance aux antibiotiques qui a conduit aux échecs thérapeutiques constitue un véritable problème de santé publique (Wójcicki *et al.*, 2021). Selon un rapport publié récemment par l'Organisation Mondiale de la Santé, *Salmonella* fait partie de la liste de douze bactéries les plus menaçantes pour la santé publique en raison de leur forte résistance aux antibiotiques (OMS, 2024b). Les principaux mécanismes de résistance bactérienne (Figure 6) incluent l'inactivation des antibiotiques par les enzymes bactériennes qui modifient ou détruisent la structure des antibiotiques, l'altération de la cible via les mutations spontanées, la diminution de la perméabilité membranaire empêchant l'entrée des antibiotiques, et l'expulsion des antibiotiques par les pompes à efflux réduisant de façon exponentielle leur concentration afin de les rendre inefficaces (Abdi *et al.*, 2020).



**Figure 6.** Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (Kornelsen et Kumar, 2021).

### I.7. Utilisation des plantes médicinales comme alternative

La phytothérapie désigne l'utilisation des plantes médicinales, de leurs extraits et de leurs principes actifs pour des objectifs thérapeutiques, tels que la prévention ou le traitement des maladies (Zimmermann-Klemd *et al.*, 2022). En raison du coût et de ses effets non toxiques potentiels, elle constitue pour une grande majorité de la population mondiale une solution de choix pour traiter diverses maladies (Esteves *et al.*, 2020). En se référant à des éléments scientifiques probants, notamment l'identification de l'artémisinine et de la quinine, respectivement de *Artemisia annua* et du quinquina (*Cinchona officinalis*), l'organisation mondiale de la santé soutient la médecine traditionnelle à base de plantes médicinales (OMS, 2023b). En effet, les plantes médicinales constituent une source de biomolécules à usage thérapeutique contre les agents pathogènes (Suntar, 2020; Vaou *et al.*, 2021). *Callistemon rigidus* R. Br. est un exemple de plantes médicinales dont les feuilles et écorces sont utilisées en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner la toux, la bronchite et des infections du système digestif et respiratoire (Saxena et Gomber, 2006; Goyal *et al.*, 2012).

En plus de leurs propriétés antimicrobiennes, les plantes médicinales contribuent à l'éradication des radicaux libres de l'organisme hôte. Les plantes médicinales représentent une source non négligeable de substances pouvant neutraliser les radicaux libres (EROs) produites lors de la pathogenèse d'un nombre important de maladies, contribuant ainsi à la réduction du stress oxydatif (Petruk *et al.*, 2018).

## I.8. Généralités sur le genre *Callistemon*

### I.8.1. Description botanique

Le genre *Callistemon* appartient à la famille des Myrtaceae, et contient environ 34 espèces de magnifiques arbustes à feuilles denses et attrayantes (Rathore et Rai, 2022). Les espèces du genre *Callistemon* possèdent de jolies feuilles lancéolées et des épis floraux en forme de groupillon avec des étamines rouges, d'où leur nom communément appelé « groupillon ». Le membre le plus représenté de ce genre est *C. citrinus* (Gad *et al.*, 2019).

### I.8.2. Usage traditionnel et travaux antérieurs

Les parties aériennes et les écorces de tronc de plusieurs espèces du genre *Callistemon* sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée, la fièvre, la dysenterie, le paludisme le rhumatisme et plusieurs infections des voies respiratoires (Larayetani *et al.*, 2024).. Les plantes du genre *Callistemon* ont largement été étudiées pour leurs propriétés pharmacologiques notamment antibactériennes, antifongiques, antipaludiques, antioxydantes, antivirales, et antidiabétiques (Abdelmalek *et al.*, 2021). En effet, un nombre important de plantes du genre *Callistemon* a fait l'objet d'études scientifiques avec des résultats probants, notamment leurs effets inhibiteurs contre les microorganismes tels que les salmonelles (Salem *et al.*, 2013; Sutar *et al.*, 2014; Arora *et al.*, 2016; Fayemi *et al.*, 2019; Abdelmalek *et al.*, 2021). Ces propriétés pharmacologiques sont généralement attribuées à la présence de divers métabolites secondaires présents dans les espèces du genre *Callistemon*, notamment les phénols, flavonoïdes, tanins, terpènes, anthocyanes, et les alcaloïdes, etc. (Abdelmalek *et al.*, 2021; Rathore et Rai, 2022).

## I.9. Généralités sur *Callistemon rigidus*

### I.9.1. Taxonomie

*Callistemon rigidus* (syn. : *Melaleuca linearis* var. *linearis*) appartient au règne des Plantae, division de Magnoliophyta, classe des Magnoliopsida, sous classe des Rosidae, ordre de Myrtales, famille des Myrtaceae, sous famille des Myrtoideae, et du genre *Callistemon* (Tableau III) (Tropicos, 2024).

**Tableau I.** Classification taxonomique de *Callistemon rigidus*

Nom Botanique	<i>Callistemon rigidus</i>
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Sous-famille	Myrtoideae
Genre	<i>Callistemon</i>
Espèce	<i>Callistemon rigidus</i>
Noms communs	Groupillon, rince-bouteille, balai de sorcière
Synonyme	<i>Melaleuca linearis</i>

### I.9.2. Description botanique

*Callistemon rigidus* est un arbuste rigide à port érigé, légèrement évasé avec une écorce grise, dure et fibreuse ; ce dernier a une hauteur atteignant 3 m et une largeur de 1,50 m. Il possède des rameaux raides qui sont garnis d'un feuillage persistant étroit, effilé et coriace de couleur vert-sombre lorsqu'il est en maturité (**Figure 7**). Il possède de magnifiques goupillons rouges pourprés poudrés de pollen jaune d'or lorsque la floraison est abondante (**Abdelmalek et al., 2021**).



**Figure 7.** Photographie de *Callistemon rigidus* à Ngoa-Ekellé, Yaoundé 3, Centre, Cameroun (filmée par Fitliavom en 2024).

### I.9.3. Répartition géographique

*Callistemon rigidus*, est une plante originaire d'Australie, mais elle a été introduite dans diverses régions tropicales et subtropicales, y compris en Afrique (**Saxena et Gomber, 2008**). Au Cameroun, elle peut être retrouvée principalement dans les régions du Centre (Yaoundé), l'Est (Bertoua), et du Littoral (Douala).

#### I.9.4. Usage traditionnel

Les feuilles et écorces de *Callistemon rigidus* sont utilisées en médecine traditionnelle au Cameroun, en Australie, et en Chine pour soigner la toux, la bronchite et des infections du système digestif et respiratoire (Saxena et Gomber, 2006; Goyal *et al.*, 2012).

#### I.9.5. Travaux antérieurs

Gilbert *et al.* (2020) ont démontré que l'extrait éthanolique des tiges de *Callistemon rigidus* contient des polyphénols (56.801 mg EAG/g), flavonoïdes (8,628 mg ER/g), tanins (20,93 mg EC/g) et des saponines (548 EAG/g). Cet extrait a démontré une activité anthelminthique *in vivo* sur *Haemonchus contortus* chez les chèvres.

Younoussa *et al.* (2020) ont montré que la combinaison (3 : 1) de l'extrait méthanolique des feuilles de *C. rigidus* et de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* possède une activité synergique contre les larves d'*Anopheles gambiae*.

Gad *et al.* (2019) ont montré par GC/MS que les monoterpènes oxygénés étaient les principaux composants (69,15 % à 81,70 %) de l'huile essentielle de *C. rigidus* et l'eucalyptol (syn. 1,8-cinéole) était le composé majoritaire.

Cao *et al.* (2016) ont isolé les premiers hybrides tricétone-phloroglucinol-monoterpéniques, les callistrilones A et B, ainsi qu'un intermédiaire biosynthétique à partir des feuilles de *Callistemon rigidus*. Les callistrilones A et B présentaient un nouveau squelette de carbone avec un système pentacyclique [1]benzofuro[2,3-a]xanthène ou [1]benzofuro[3,2-b]xanthène composé de trois types de blocs de construction.

Pierre *et al.* (2014) ont démontré les activités larvicides et pupicides des huiles essentielles de *Callistemon rigidus* contre les larves du quatrième stade et les pupes précoces d'*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*.

Gomber et Saxena (2013) ont démontré le potentiel anti-staphylococcique des alcaloïdes isolés des feuilles de *C. rigidus* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 80 µg/mL.

Gomber et Saxena (2007) ont montré par les méthodes de diffusion de puits sur milieu gélosé et de microdilution que l'extrait méthanolique des feuilles de *Callistemon rigidus* a la capacité d'inhiber 93 % des isolats de *S. aureus* testés. Les diamètres d'inhibitions étaient ≤ 20 mm à 199,8 µg/mL et les CMIs variaient de 1,25 à 80 µg/mL.

Saxena et Gomber (2006) ont montré par la méthode de diffusion de puits sur milieu gélosé que l'extrait méthanolique des feuilles de *Callistemon rigidus* inhibe la croissance des isolats de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* avec des

diamètres d'inhibition  $\geq 20$  mm à 199,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ;  $\geq 15$  mm à 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ;  $\geq 10$  mm à 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivement.

**Kobayashi *et al.* (2006)** ont montré que le piceatannol et la scirpusine, isolés de l'extrait méthanolique des écorces de *C. rigidus* inhibent l'activité de l' $\alpha$ -amylase du tractus-gastro-intestinal chez la souris.

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### II.1. MATERIEL

#### II.1.1. Extraits de *C. rigidus*

Trente-huit (38) extraits (**Annexe 1**) ont été préalablement obtenus par macération successive des poudres de feuilles et écorces de *Callistemon rigidus* (18564/SRFCam), dans divers solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol, solution hydroéthanolique 70/30, méthanol, eau) (**Tchuendem, 2024**). Ces extraits étaient conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation pour les tests antibactériens.

#### II.1.2. Matériel microbiologique

L'activité anti-salmonelle a été évaluée sur deux souches de références (*Salmonella enterica* ATCC 14028, et *Salmonella enterica* NR 13555) gracieusement offertes par BEI ressources «Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository», <https://www.beiresources.org/>), et quatre isolats cliniques (*Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella paratyphi B*) reçues gratuitement du Centre Pasteur du Cameroun (CPC). Ces souches bactériennes ont été conservées dans des tubes contenant de la gélose Mueller Hinton coulée en pente à 4 °C au Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales.

L'innocuité des extraits bioactifs a été évaluée sur la lignée cellulaire RAW 264.7 (macrophages murins) provenant du Département de Pathologie Clinique de l'Institut Mémorial Noguchi pour la Recherche Médicale de l'Université du Ghana. Ces cellules étaient maintenues en culture continue dans le milieu de culture DMEM complet à 37 °C, dans l'unité antiparasitaire du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales, Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I.

### II.2. METHODES

#### II.2.1. Activité anti-salmonelle

##### II.2.1.1. Préparation des solutions stocks d'extraits et antibiotique de référence

Les solutions stocks d'extraits ont été préparées à 100 mg/mL en dissolvant séparément 100 mg de chaque extrait brut dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) 100 %, puis conservées à 4 °C pour la réalisation des tests biologiques. La ciprofloxacine, utilisée comme antibiotique de référence, a été préparée dans les mêmes conditions à une concentration de 50 µg/mL dans de l'eau distillée acidifiée au HCl (0,025 N).

### II.2.1.2. Préparation des inocula bactériens

Les inocula bactériens ont été préparés selon le standard 0,5 McFarland (**McFarland, 1907**). Pour cela, quelques colonies issues de cultures de 24 heures sur gélose Mueller Hinton (MH) (**Annexe 3**) ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et introduites dans un tube à essai contenant 10 mL d'eau physiologique puis calibré au 0,5 McFarland (**Annexe 4**) par comparaison de la turbidité pour obtenir un inoculum de charge bactérienne de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

### II.2.1.3. Screening de l'activité anti-salmonelle

#### ➤ Méthode

L'activité anti-salmonelle des extraits de *Callistemon rigidus* a été déterminée en milieu liquide selon le protocole M07-A09 décrit suivant les lignes directives du «Clinical and Laboratory Standards Institute» (**CLSI, 2012**).

#### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité d'un microorganisme à croître ou non en milieu supplémenté en substances antimicrobiennes potentielles. L'inhibition a été révélée par colorimétrie qui est basée sur la réduction de la résazurine de couleur bleue en résorufine de couleur rose par les déshydrogénases membranaires des cellules viables (**Figure 8**).

#### ➤ Protocole

Le screening préliminaire des extraits a été effectué à une seule concentration (1000 µg/mL). A cet effet, 98 µL de milieu de culture MHB (**Annexe 3**) ont été introduits dans chaque cupule d'une microplaque de 96 puits, ensuite 2 µL de solution stock d'extraits (100 mg/mL) ont été ajoutés. Par la suite, 100 µL d'une suspension bactérienne à la charge  $10^6$  UFC/mL (obtenue à partir du standard 0,5 McFarland) ont été répartis dans tous les puits exceptés ceux du contrôle de stérilité où seul le milieu de culture MHB était introduit. Les microplaques ont été scellées puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. A la fin de la période d'incubation, 20 µL d'une solution de résazurine (0,15 mg/mL) (**Annexe 4**) fraîchement préparée ont été ajoutés dans tous les puits et les plaques ont encore été incubées dans les mêmes conditions pendant 30 minutes. Le contrôle positif était constitué du milieu de culture, de l'inoculum et de la ciprofloxacine tandis que le contrôle négatif était constitué du milieu de culture et de l'inoculum. L'inhibition a été révélée par la persistance d'une coloration bleue dans les puits.

À l'issue du screening préliminaire, les extraits ayant inhibé au moins 50 % des souches bactériennes testées (proportion d'inhibition) ont été sélectionnés et retenus pour la

détermination des paramètres d'activité antibactérienne (concentrations minimales inhibitrices-CMIs et bactéricides-CMBs).

## II.2.1.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

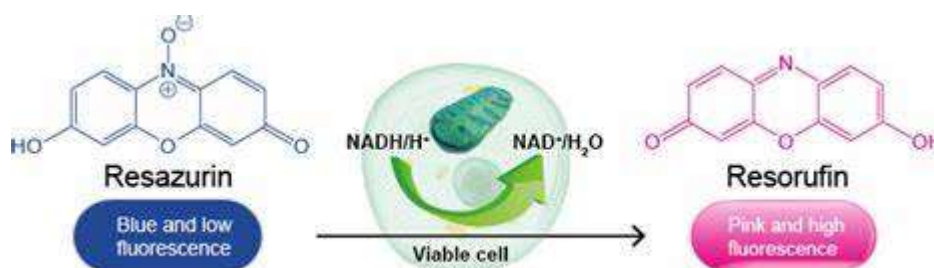
### II.2.1.4.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

#### ➤ Méthode

Les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) des extraits de *Callistemon rigidus* ont été déterminées par microdilution selon le protocole M07-A09 décrit suivant les lignes directives du «Clinical and Laboratory Standards Institute» (CLSI, 2012).

#### ➤ Principe

La détermination des concentrations minimales inhibitrices des extraits de *Callistemon rigidus* est basée sur le même principe tel que décrit au II.2.1.3. pour le screening préliminaire de l'activité anti-salmonelle (**Figure 8**).



**Figure 8.** Equation de réduction de la résazurine en résorufine (Cortés, 2017).

#### ➤ Protocole

Les essais ont été effectués en duplicata dans des microplaques stériles de 96 puits. En effet, 196  $\mu\text{L}$  de milieu de culture MHB (**Annexe 3**) ont été introduits dans les puits de la colonne A et 100  $\mu\text{L}$  dans le reste des puits de la plaque. Par la suite, 4  $\mu\text{L}$  d'une solution de chaque extrait (100 mg/mL) ont été prélevés et introduits dans les puits correspondants, suivis d'une série de 5 dilutions de raison géométrique d'ordre 2. Enfin, 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension bactérienne à la charge  $10^6$  UFC/mL (obtenue à partir du standard 0,5 McFarland) ont été répartis dans tous les puits exceptés ceux du contrôle de stérilité. Les concentrations d'extraits et de ciprofloxacine variaient de 1000 à 31,25  $\mu\text{g/mL}$  et de 0,25 à 0,0078  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. La charge finale bactérienne dans chaque cupule était de  $5 \times 10^5$  UFC/mL dans un volume total de 200  $\mu\text{L}$ . Le contrôle de stérilité était constitué uniquement du milieu de culture. Le contrôle positif était constitué du milieu de culture, l'inoculum et la ciprofloxacine tandis que le contrôle négatif était constitué du milieu de culture et la suspension bactérienne.

Les microplaques ont été scellées puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. A l'issue de cette période d'incubation, les plaques ont été traitées tel que précédemment décrit au II.2.1.3.

➤ **Expression des résultats**

La plus petite concentration à laquelle aucun changement de coloration du bleu au rose n'était observé correspondait à la CMI, exprimée en µg/mL.

Afin d'évaluer l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits, les concentrations minimales bactéricides ont été déterminées.

#### **II.2.1.4.2. Détermination des concentrations minimales bactéricides**

➤ **Méthode**

Les concentrations minimales bactéricides (CMBs) des extraits de *Callistemon rigidus* ont été déterminées par sous-culture en milieu liquide des préparations prélevées des microplaques ayant servi à la détermination des CMI. Les tests ont été effectués en duplicata. En effet à l'issue du temps d'incubation des plaques issues de la détermination des CMI, 25 µL d'aliquotes de cupules inhibitrices (n'ayant pas été traités à la résazurine) ont été prélevés de façon aseptique et transférés dans des cupules correspondantes d'une autre microplaque stérile contenant 175 µL de MHB. Par la suite, le contenu des différentes cupules a été dilué 8 fois afin de lever l'effet inhibiteur des extraits présents. Le contrôle de stérilité était constitué uniquement du milieu de culture, tandis que le contrôle négatif comprenait l'inoculum bactérien et le milieu de culture. Ensuite, les microplaques ont été scellées puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. A l'issue de cette période d'incubation, les plaques ont été traitées tel que précédemment décrit au II.2.1.3.

➤ **Expression des résultats**

La plus petite concentration de l'extrait n'ayant montré aucune croissance bactérienne marquée par la persistance de la coloration bleue était considérée comme la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait.

L'effet bactéricide ou bactériostatique des extraits a été estimé par le rapport CMB/CMI. Selon **Traoré et al. (2012)**, lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre ( $\leq 4$ ), elle est dite bactéricide, cependant si le rapport CMB/CMI est supérieur à quatre ( $> 4$ ), la substance est dite bactériostatique.

Les activités antimicrobiennes des extraits de plantes sont attribuées à la présence de divers métabolites secondaires en particulier les composés phénoliques (phénols, flavonoïdes et tanins, etc.) (**Montessano et al., 2020; Almuzaini, 2023**). Pour avoir une idée des métabolites secondaires pouvant être responsables des activités anti-salmonelle évaluées et d'un potentiel

antioxydant, nous nous sommes proposés de quantifier quelques groupes de composés phénoliques d'intérêt des extraits bioactifs (extraits ayant une CMI  $\leq 500$   $\mu\text{g/mL}$  sur au moins deux des souches bactériennes testées). Ainsi les teneurs en polyphénols solubles totaux, flavonoïdes solubles et tanins ont été déterminés.

## II.2.2. Dosage des composés phénoliques

### II.2.4.1. Dosage des polyphénols solubles totaux

#### ➤ Méthode

Le dosage des polyphénols solubles totaux a été effectué par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu telle que décrite par **Singleton et al. (1999)** avec quelques modifications.

#### ➤ Principe

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) qui se réduit, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). Cette réaction développe une coloration bleue qui est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans les extraits végétaux et qui peut être dosée par spectrophotométrie UV-visible dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 780 nm.

#### ➤ Procédure

Dans une plaque stérile de 96 puits, 20  $\mu\text{L}$  de chaque extrait (100  $\text{mg/mL}$ ) ont été ajoutés à 80  $\mu\text{L}$  de carbonate de sodium (7,5 %) fraîchement préparée. Après cinq minutes d'incubation, 100  $\mu\text{L}$  du réactif de Folin-Ciocalteu (10 %) ont été ajoutés au mélange, le tout a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante, et l'absorbance été mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN Infinite M200. Une gamme étalon à base de l'acide gallique a été également préparée à des concentrations allant de 0 à 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Les teneurs en polyphénols totaux des extraits ont alors été exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g Ext).

### II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes solubles

#### ➤ Méthode

La teneur en flavonoïdes solubles des extraits a été déterminée par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium telle que décrite par **Kim et al. (2003)**.

➤ **Principe**

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe coloré très stable de couleur jaunâtre entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Ce dernier peut être dosé par un spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde de 510 nm.

➤ **Procédure**

Dans une microplaque stérile de 96 puits, 20 µL de NaNO<sub>2</sub> (5 %) et 60 µL de chaque extrait (100 mg/mL) ont été introduits respectivement. Après 5 minutes d'incubation, 60 µL de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) (10 %) ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée contre le blanc à 510 nm. La teneur en flavonoïdes a été calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de quercétine (1000 à 0 µg/mL) et les résultats exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g Ext).

#### II.2.4.3. Dosage des tanins condensés

➤ **Méthode**

Le dosage des tanins a été réalisé par la méthode spectrophotométrique utilisant la vanilline acidifiée telle que décrite par **Bainbridge et al. (1996)**.

➤ **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le carbone 6 du cycle A des tanins pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 550 nm.

➤ **Procédure**

En effet, 5 µL de chaque extrait concentré à 100 mg/mL ont été introduits dans une plaque stérile de 96 puits, puis 150 µL d'une solution vanilline/méthanol (4%) a été introduite dans les cupules. Ensuite, 75 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ont été ajoutés dans les cupules. La plaque a été incubée à température ambiante pendant 20 minutes et l'absorbance a été lue à 550 nm contre le blanc (contenant le mélange vanilline + HCl sans extrait). La teneur en tannins a été déterminée à l'aide d'un étalon de catéchine (200 à 0 µg/mL) et les résultats ont été exprimés en milligrammes de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g Ext).

Pour vérifier l'innocuité des extraits bioactifs sur les cellules, leur cytotoxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire RAW.

### II.2.3. Evaluation de la cytotoxicité des extraits bioactifs

#### ➤ Méthode

L'innocuité des extraits bioactifs (extraits ayant une CMI  $\leq 500\mu\text{g/mL}$  sur au moins deux des souches bactériennes testées) a été évaluée vis-à-vis des macrophages murins (RAW-264.7) par la méthode spectrophotométrique telle que décrite par **Bowling *et al.* (2012)**.

#### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la réduction de la résazurine de couleur bleu peu fluorescente en résorufine de couleur rose fortement fluorescente (**Figure 8**) consécutive à l'activité métabolique mitochondriale des cellules viables, détectable à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm.

#### II.2.3.1. Culture *in vitro* de la lignée cellulaire RAW

La lignée cellulaire RAW a été maintenue en culture dans le milieu DMEM complet (1 % antibiotique et 10 % FBS) (**Annexe 3**) et conservé dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> (T-Flask) sous conditions standard, 5 % CO<sub>2</sub> à 37 °C. Le milieu de culture était renouvelé toutes les 72 heures après la mise en culture. Une fois la confluence (70-90%) cellulaire atteinte, les cellules ont été détachées par traitement avec 1 mL de trypsine-EDTA 0,05 % pendant 5 min. Après inactivation de la trypsine par ajout de 9 mL de DMEM complet, les cellules détachées ont été centrifugées à 1800 trs/min pendant 5 minutes. Le culot obtenu a été suspendu dans 1 mL de milieu puis la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du bleu de Trypan pour calibrer la charge cellulaire sur l'hématimètre de Neubauer.

#### II.2.3.2. Mode opératoire

Le test a été effectué en duplicata dans des microplaques traitées de 96 puits. En effet, 100  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire à la charge de 10<sup>4</sup> cellules/cupules, préparée dans le milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (**Annexe 3**), ont été introduits dans tous les puits d'une plaque, suivi d'une incubation à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) pendant 18 heures pour s'assurer de l'adhésion cellulaire. Après adhésion, le milieu de culture a été renouvelé à l'aide de 90  $\mu\text{L}$  du milieu fraîchement préparé suivi d'une addition de 10  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations (issus des plaques intermédiaires préalablement préparées) dans toutes les cupules exceptées celles des colonnes 6 et 12 qui servaient de contrôle positif (DMSO 100%) et négatif (suspension cellulaire sans extrait). Les plaques ont été incubées à 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) pendant 48 heures à l'issue desquelles 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de résazurine (0,15 mg/mL) fraîchement préparée ont été introduits dans chaque puits et l'ensemble incubé pendant 4 heures dans les mêmes conditions. Les concentrations finales des extraits étaient de 1000 ; 500 ; 250 ;

125 ; 62,5 et 31,25  $\mu\text{g/mL}$ . Ensuite, la fluorescence de chaque puits a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm à l'aide du lecteur de plaque TECAN Infinite M200. Les données obtenues ont été utilisées pour calculer les pourcentages d'inhibition à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016. Ces valeurs ont servi à la détermination des concentrations cytotoxiques 50 ( $\text{CC}_{50\text{s}}$ ) à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 8.0.1.

Pour comprendre les mécanismes par lesquels les extraits bioactifs (extraits ayant une  $\text{CMI} \leq 500 \mu\text{g/mL}$  sur au moins deux des souches bactériennes testées) exercent leurs effets antibactériens, l'activité de ces extraits sur la cinétique de mortalité bactérienne, l'intégrité membranaire (externe et interne), les pompes à efflux et ATPases/ $\text{H}^+$ , ainsi que sur la motilité bactérienne (swarming) a été évaluée.

## **II.2.4. Exploration de quelques modes d'action des extraits bioactifs.**

### **II.2.4.1. Evaluation de l'effet des extraits bioactifs sur la cinétique de mortalité bactérienne**

La cinétique de mortalité bactérienne a été évaluée en présence des extraits bioactifs à des concentrations sous-inhibitrices, inhibitrices et supra-inhibitrices (de  $\text{CMI}/4$  à  $4 \text{ CMI}$ ).

#### **➤ Méthode**

La cinétique de mortalité bactérienne a été étudiée selon le protocole décrit par **Klepser et al. (1998)** avec quelques modifications, notamment la turbidité des suspensions cellulaires en fonction de la charge plutôt que le comptage des colonies sur la gélose.

#### **➤ Principe**

Cette méthode est basée sur l'évolution de la mortalité bactérienne en fonction du temps en présence d'une substance antimicrobienne.

#### **➤ Mode opératoire**

Les essais ont été réalisés en triplicata dans des microplaques stériles de 96 puits. En effet, les extraits bioactifs ont été dilués (microdilution géométrique d'ordre 2) pour générer des concentrations allant de  $4 \text{ CMI}$  à  $\text{CMI}/4$ . Ensuite,  $100 \mu\text{L}$  d'inoculum bactérien à la charge de  $10^6 \text{ UFC/mL}$  ont été introduits dans chaque cupule exceptées celles du contrôle de stérilité, pour avoir une charge de  $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ . La ciprofloxacine ( $\text{CMI}$ ) était utilisée comme contrôle positif. Les plaques ont été scellées et incubées à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. L'évolution de la charge bactérienne a été suivie en mesurant les densités optiques à 620 nm à différents intervalles de temps (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 heures) à l'aide d'un lecteur de microplaques TECAN Infinite M 200.

### ➤ Expression des résultats

Les valeurs des densités optiques obtenues ont permis de tracer les courbes des densités optiques en fonction des temps d'incubation. Ceci a permis de déterminer le temps minimal où l'effet inhibiteur de l'extrait est observé, ainsi que les effets bactéricides ou bactériostatiques.

Le phénomène de résistance observée chez les sérotypes du genre *Salmonella* est due en grande partie à leur membrane externe qui est une barrière aux antibiotiques (**Kawasaki, 2012; Guo et al., 2023**). La déstabilisation de la membrane externe pourrait compromettre l'intégrité de la membrane interne, entraînant ainsi la fuite du contenu intracellulaire à travers les pores (**Doorduyn et al., 2019**).

La capacité des extraits à chélater les cations bivalents qui relient les lipopolysaccharides (LPS) afin de désorganiser la membrane externe, suivie d'un test de libération du contenu intracellulaire, dont les acides nucléiques, qui absorbent à 260 nm, ont été évalués.

## II.2.4.2. Evaluation de l'effet des extraits bioactifs sur l'intégrité membranaire

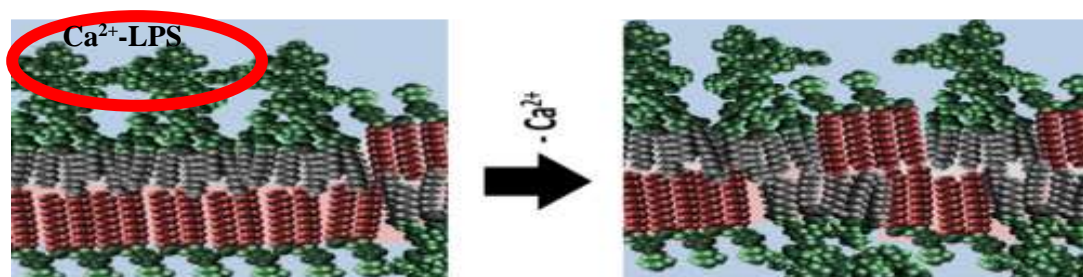
### II.2.4.2.1. Evaluation de l'effet des extraits bioactifs sur la déstabilisation membranaire externe

#### ➤ Méthode

L'effet des extraits bioactifs sur la déstabilisation de la membrane externe des souches bactériennes les plus sensibles a été déterminé par la méthode décrite par **Oliveira et al. (2015)**.

#### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité de l'extrait à chélater les cations bivalents de la membrane externe afin de déstabiliser son intégrité (**Figure 9**). Cet effet se manifeste par une diminution de la densité optique mesurée à 405 nm (longueur d'onde d'absorption des complexes cations bivalents et des LPS), et inversement proportionnelle aux concentrations de l'extrait.



**Figure 9.** Schéma illustratif montrant la chélation des cations bivalents par un agent chélateur (**Luke et al., 2017**).

➤ **Mode opératoire**

Les essais ont été réalisés en triplicata dans une microplaque de 96 puits. A cet effet, les extraits ont été dilués dans 100 µL de milieu MHB de façon à obtenir des concentrations variant de 4 CMI à CMI/4. Par la suite, 100 µL de suspension bactérienne préparée à  $2 \times 10^7$  UFC/mL ont été ajoutés dans chaque cupule pour avoir une charge finale de  $10^7 \times$  UFC/mL. L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) à 30 µg/mL a été utilisé comme contrôle positif. Ensuite, les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures, puis les densités optiques des puits ont été mesurées à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN infinite M200.

➤ **Expression des résultats**

Les densités optiques obtenues ont permis de calculer les pourcentages de déstabilisation membranaire (% DM) à l'aide du logiciel Excel en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ DM} = \frac{\text{DO contrôle négatif} - \text{DO test}}{\text{DO contrôle négatif}} \times 100$$

DM : déstabilisation membranaire, DO : Densité optique.

Ces pourcentages de déstabilisation membranaire ont servi au tracé des histogrammes (% DM en fonction des concentrations en extrait) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.1.

#### **II.2.4.2.2. Evaluation de l'effet des extraits bioactifs sur la libération des acides nucléiques.**

L'effet des extraits bioactifs sur la perméabilité membranaire interne des souches bactériennes les plus sensibles a été réalisé selon le protocole décrit par **Tang *et al.* (2008)**

➤ **Principe**

Ce test est basé sur la capacité qu'ont les extraits à perméabiliser et/ou lyser la membrane interne des bactéries avec libération du contenu cellulaire dans le milieu, notamment les acides nucléiques qui absorbent à 260 nm.

➤ **Mode opératoire**

Les essais ont été réalisés en duplicata dans des tubes Eppendorf de 2 mL. En effet des colonies bactériennes issues des cultures de 24 heures ont été lavées au PBS (10 mM), puis suspendues de nouveau dans le PBS (10 mM) et calibrées au 0,5 McFarland. Par la suite, l'inoculum bactérien ( $10^7$  UFC/mL) a été introduit dans 1 mL de PBS (10 mM) contenant l'extrait préparé à différentes concentrations (4 CMI à CMI/4) puis les tubes ont été incubés à 37 °C à différents temps (0, 2, 4, 6, 8, et 12h). Après chaque période d'incubation, les solutions ont été centrifugées à 10 000 trs/min pendant 10 min. Le surnageant a été collecté et les densités optiques ont été mesurées à 260 nm à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN infinite M200.

### ➤ Expression des résultats

Les densités optiques obtenues ont permis de tracer la courbe de densité optique en fonction du temps. Cette courbe illustre la libération des acides nucléiques (augmentation des D.O.) en fonction du temps indiquant ainsi l'augmentation de la perméabilité membranaire.

Les pompes à efflux sont responsables de l'extrusion des xénobiotiques (antibiotiques) vers le milieu extérieur. Elles assurent un niveau de concentration intracellulaire faible, en dessous du seuil d'efficacité et sont principalement retrouvées au niveau de la membrane interne (Nishino *et al.*, 2021). Ainsi, des dommages provoqués au niveau de cette dernière pourraient affecter l'activité des pompes à efflux. La capacité des extraits bioactifs à inhiber l'activité des pompes à efflux a été ensuite évaluée.

#### II.2.4.3. Evaluation de l'effet inhibiteur des extraits bioactifs sur les pompes à efflux

L'effet inhibiteur des extraits bioactifs prometteurs sur les pompes à efflux a été évalué par la méthode du bromure d'éthidium comme décrit par Mehta *et al.* (2022).

### ➤ Principe

Ce test est basé sur l'accumulation intracellulaire du bromure d'éthidium, substrat des pompes à efflux qui s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN bactérien suite à un traitement avec une substance antimicrobienne. Cela se matérialise par une augmentation de la fluorescence mesurée à 530 et 600 nm (longueur d'onde d'excitation et d'émission, respectivement) au cours du temps.

### ➤ Mode opératoire

Les essais ont été réalisés en triplicata dans une microplaque de 96 puits stériles. Pour cela, les extraits ont été dilués dans 100  $\mu$ L de milieu MHB de façon à obtenir des concentrations variant de 4 CMI à CMI/4. Par la suite, 20  $\mu$ L de bromure d'éthidium (0,1 mM) ont été ajoutés dans chaque cupule suivi d'une addition de 80  $\mu$ L de suspension bactérienne ( $2 \times 10^7$  UFC/mL) pour obtenir une charge finale de  $10^7$  UFC/mL. La quercétine (10  $\mu$ g/mL) a été utilisée comme contrôle positif, tandis que le contrôle négatif était constitué du milieu de culture MHB, du bromure d'éthidium et de l'inoculum bactérien. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN infinite M200 aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 530 nm et 600 nm, respectivement et à des intervalles de 05 minutes pendant 60 minutes.

### ➤ Expression des résultats

Les unités de fluorescence relative obtenues ont permis de tracer la courbe de fluorescence pour chaque échantillon test en fonction du temps.

Tout comme les pompes à efflux, les pompes ATPases/H<sup>+</sup> utilisent aussi l'énergie dérivée de l'hydrolyse l'ATP pour le transport des protons du cytoplasme vers l'espace

extracellulaire. Ce transport permet aux salmonelles de maintenir un pH intracellulaire stable, crucial pour leur croissance et leur survie (**Kobayashi, 1985**). La capacité des extraits prometteurs à inhiber l'activité des pompes ATPases/H<sup>+</sup> a été évaluée.

#### **II.2.4.4. Evaluation de l'effet inhibiteur des extraits bioactifs sur les pompes ATPases/H<sup>+</sup>**

##### ➤ **Méthode**

L'effet inhibiteur des extraits bioactifs sur les pompes à protons a été évalué en suivant l'évolution du pH extracellulaire en fonction du temps (**Manavathu, 2001**).

##### ➤ **Principe**

Ce test est basé sur l'inhibition de la sortie des protons H<sup>+</sup> par les pompes ATPases/H<sup>+</sup> en présence d'une substance antimicrobienne, entraînant ainsi une réduction de l'acidification du milieu extracellulaire.

##### ➤ **Protocole**

En bref, quelques colonies bactériennes issues des cultures datant de 24 heures ont été prélevées et introduites dans 20 mL de Bouillon Mueller Hinton. Ensuite, cette préparation a été incubée à 37 °C pendant 24 heures, et les aliquotes de cette culture bactérienne ont été diluées au 1 :100 (v/v dans du MHB), puis incubées de nouveau dans les mêmes conditions et centrifugés à 4500 tr/min pendant 30 minutes à 4 °C. Le culot a été lavé avec l'eau distillée, puis avec une solution de KCl (50 mM), dans laquelle il a été finalement maintenu. La suspension a été conservée à 4 °C pendant 24 heures (pour la privation en glucose). Pour 4 mL de cette solution, 0,5 mL d'extrait préalablement dissous dans le DMSO pour obtenir des concentrations finales variant de 4 CMI à CMI/4. Le pH a été ajusté à 6,48 en ajoutant du HCl. Après 10 minutes d'incubation à 37 °C, l'acidification du milieu a été déclenchée par l'ajout de 0,5 mL d'une solution de glucose (20 %) dont le catabolisme rapide s'accompagne d'une libération de protons dans le milieu. Par la suite, le pH du milieu a été mesuré toutes les 10 minutes à l'aide d'un pH-mètre pendant 60 minutes. Le contrôle négatif était constitué du DMSO (2 %).

##### ➤ **Expression des résultats**

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de courbes de variation du pH en fonction du temps. Toute réduction de l'acidification du milieu a été attribuée à un effet inhibiteur du fonctionnement des pompes ATPases/H<sup>+</sup> par les extraits.

La capacité des extraits à inhiber la motilité (swarming), facteur clé dans la colonisation et la survie des salmonelles dans des environnements hostiles a été évaluée également.

#### II.2.4.5. Evaluation de l'effet des extraits bioactifs sur la motilité bactérienne

##### ➤ Méthode

L'activité des extraits bioactifs sur la motilité bactérienne (swarming) a été évaluée selon le protocole décrit par **O'May et Tufenkji (2011)**.

##### ➤ Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un microorganisme à se mouvoir dans un milieu faiblement gélosé en présence d'une substance antimicrobienne se matérialisant par la présence d'une zone diffuse de croissance autour du point d'inoculation.

##### ➤ Mode opératoire

Les essais ont été effectués en duplicata dans des boîtes de pétri contenant de la gélose (0,6 % d'agar) Mueller Hinton supplémentée aux extraits à différentes concentrations (de 4 CMI à CMI/4). Brièvement, 5 µL de suspension bactérienne ( $10^7$  UFC/mL) ont été inoculées par introduction directe au centre de la gélose, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

##### ➤ Expression des résultats

Au terme du temps d'incubation, la visualisation des zones diffuses à travers la surface de la gélose a permis de mesurer les diamètres de motilités, exprimés en millimètres.

Les salmonelloses induisent la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (**Popoff et Norel, 1992**) dont l'accumulation conduit à un stress oxydatif causant des dommages importants sur les biomolécules essentielles (ADN, des protéines, lipides) (**Rastaldo et al., 2007; Baudin, 2020**).

L'activité antioxydante des extraits bioactifs a été évaluée par les méthodes de piégeage des radicaux de DPPH, ABTS, et NO et de réduction de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$

#### II.2.5. Détermination de l'activité antioxydante des extraits bioactifs

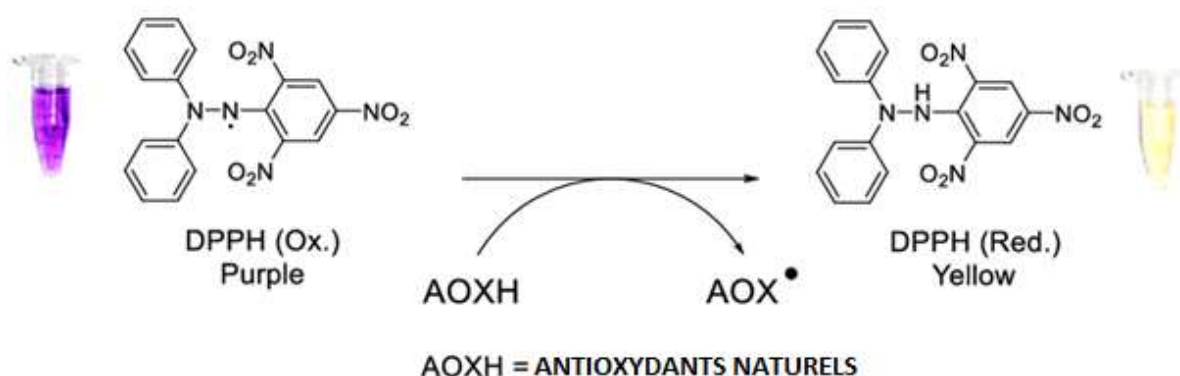
##### II.2.5.1. Test de piégeage du radical DPPH

##### ➤ Méthode

L'activité antiradicalaire a été évaluée en mesurant la capacité des extraits à piéger le radical DPPH• (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) suivant le protocole décrit par **Bassene (2012)**.

##### ➤ Principe

Cette méthode repose sur la capacité de l'extrait à fournir des protons au radical DPPH afin de le stabiliser. En effet, le DPPH est une molécule instable, de couleur violette qui absorbe la lumière à 517 nm. En présence d'une substance antiradicalaire, il est réduit en un composé stable jaune (**Figure 10**) dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à céder des protons (**Bassene, 2012**).



**Figure 10.** Équation de la réaction de décoloration du DPPH en présence d'un antiradicalaire.

### ➤ Procédure

Pour ce test, les extraits ont été préalablement dilués dans les microplaques de 96 puits pour obtenir des concentrations finales de 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 et 15,625  $\mu\text{g/mL}$ . Par la suite, 25  $\mu\text{L}$  de chaque extrait ont été introduits dans 75  $\mu\text{L}$  de DPPH préparé à 0,02 % (**Annexe 4**) pour obtenir des concentrations finales variant de 250 à 3,90625  $\mu\text{g/mL}$ . Les mélanges réactionnels ont été conservés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre le blanc (DPPH dissous dans le méthanol) à l'aide du lecteur de plaque TECAN Infinite M200. Le témoin positif était constitué de l'acide gallique traité dans les mêmes conditions que les extraits avec des concentrations finales de 25 à 0,195  $\mu\text{g/mL}$ . Le test a été effectué en duplicata.

### ➤ Expression des résultats

Le potentiel de piégeage du radical DPPH, exprimé en pourcentage d'inhibition (PI), a été calculé.

$$\text{PI} = \frac{\text{Absorbance contrôle} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance contrôle}} \times 100$$

La  $\text{CP}_{50}$  qui est la concentration de l'extrait nécessaire pour neutraliser 50 % des radicaux libres a été obtenue en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8.0.1.

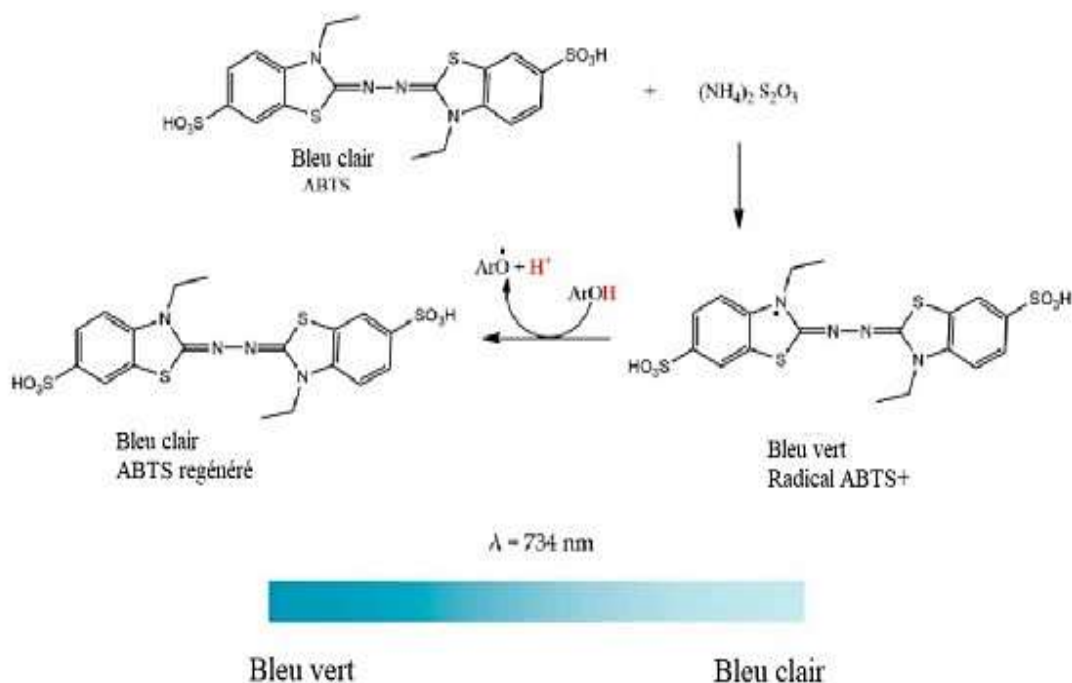
#### II.2.5.2. Test de piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

L'activité antiradicalaire a également été déterminée à travers le test de décoloration du cation  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  selon la méthode décrite par **Khan et al. (2012)**.

### ➤ Principe

Le radical cationique  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  est formé par perte d'un électron ( $e^-$ ) d'un atome d'azote de l'ABTS en présence du persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Cette méthode est basée sur la capacité de l'antioxydant contenu dans l'échantillon à donner son proton  $\text{H}^+$  au radical

cationique  $ABTS^{+\bullet}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-Azino-bis (3-ethyl benzo-thiazoline-6-sulfonique) tout en le décolorant du bleu-vert à incolore (**Figure 11**). La décoloration du radical, mesurée par spectrométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants présents dans la solution.



**Figure 11.** Equation de la réaction de décoloration du radical ABTS en présence d'un antiradicalaire.

### ➤ Protocole

Les extraits ont été dilués de façon à obtenir des concentrations finales de 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 et 31,25  $\mu\text{g/mL}$ . En effet, 25  $\mu\text{L}$  de chaque solution d'extrait ont été introduits dans différents puits. Ensuite, 75  $\mu\text{L}$  de la solution d'ABTS (0,175 mM) (**Annexe 4**) ont été ajoutés, suivis d'une incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après incubation, les densités optiques ont été lues à 734 nm à l'aide du lecteur de plaque TECAN Infinite M200. Le contrôle négatif était constitué du réactif ABTS sans traitement à l'extrait, tandis que le contrôle positif considéré était l'acide gallique à des concentrations finales variant de 25 à 0,195  $\mu\text{g/mL}$ . Les tests ont été réalisés en duplicata.

### ➤ Expression des résultats

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical  $ABTS^{\bullet}$  a été déterminée tel que décrit précédemment au II.2.5.1.

### II.2.5.3. Effet des extraits bioactifs sur la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>

#### ➤ Méthode

Le protocole décrit par **Moffatt *et al.* (1994)** a été utilisé pour évaluer l'activité des extraits sur la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>.

#### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à réduire (en cédant des électrons) les ions Fe<sup>3+</sup> en ions Fe<sup>2+</sup>, qui en présence du 1,10-phénanthroline forment un complexe rouge-orangé dont la densité optique peut être mesurée à 505 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ions Fe<sup>3+</sup> convertis par l'extrait.

#### ➤ Procédure

En bref, les extraits bioactifs ont été préparés de façon à obtenir des concentrations finales de 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 et 31,25 µg/mL. Vingt-cinq microlitres (25 µL) de chaque extrait ont été introduits dans différents puits d'une microplaque contenant au préalable 25 µL de solution de Fe<sup>3+</sup> (1,2 mg/ml) (**Annexe 4**). Les plaques ont été pré-incubées pendant 15 minutes à température ambiante, ensuite 50 µL de solution d'orthophénantroline (0,2 %) (**Annexe 4**) ont été ajoutés pour obtenir des concentrations finales d'extrait de 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 ; 15,625 ; et 7,8125 µg/mL. Ensuite, les préparations ont été incubés pendant 20 min à température ambiante, puis l'absorbance de chaque préparation a été mesurée à 505 nm à l'aide du lecteur de microplaques Infinite M200 (TECAN) contre le blanc (25 µL de méthanol + 25 µL de solution de Fe<sup>3+</sup> + 50 µL d'orthophénantroline). L'acide gallique a été utilisé comme contrôle positif et traité de la même manière que les extraits à des concentrations finales variant de 25 à 0,390 µg/mL. Le test a été effectué en duplicata.

#### ➤ Expression des résultats

L'activité antioxydante liée au pouvoir réducteur des extraits est exprimée en pourcentage de réduction à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Réduction (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

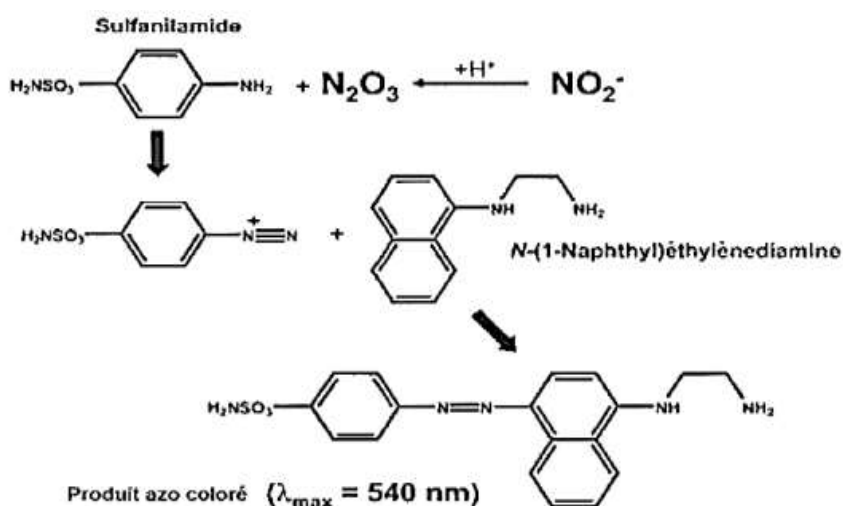
**A<sub>0</sub>** : Absorbance de l'extrait et **A<sub>1</sub>** : Absorbance du blanc

### II.2.5.4. Test de piégeage de l'oxyde nitrique

Le test de piégeage de l'oxyde nitrique par les extraits bioactifs a été effectué en utilisant le réactif de Griess tel que décrit par **Marcocci *et al.* (1994)**.

### ➤ Principe

En milieu aérobie, les molécules libératrices de NO, le nitroprussiate de sodium qui sont susceptibles de se réduire en une espèce paramagnétique produisent en solution aqueuse les radicaux NO• qui réagissent avec l'O<sub>2</sub> pour produire les ions nitrate (NO<sup>3-</sup>) et nitrites (**Figure 12**), qui sont des produits stables pouvant être quantifiés en utilisant le réactif de Griess. Le produit ainsi formé est un chromophore stable de coloration pourpre/magenta qui absorbe fortement à 540 nm.



**Figure 12.** Principe du test de piégeage du radical NO

### ➤ Mode opératoire

Vingt-cinq microlitres (25  $\mu\text{L}$ ) de chaque concentration d'extrait (1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 et 31,25  $\mu\text{g/mL}$ ) ont été ajoutés à 100  $\mu\text{L}$  de nitroprussiate de sodium (10 mM) préparé dans du tampon Phosphate (30 mM, pH 7,2) Le mélange réactionnel a été pré-incubé à température ambiante pendant 10 min. Après cela, 75  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess (**Annexe 4**) ont été introduits dans chaque puits. L'ensemble a de nouveau été incubé dans les mêmes conditions pendant 150 min. La concentration finale de chaque extrait variait de 300 à 0,001  $\mu\text{g/mL}$ . La solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) a été utilisée comme étalon et traitée dans les mêmes conditions. L'absorbance du chromophore (colorant azoïque violet) formé lors de la diazotation des ions nitrite avec la sulfanilamide et du couplage avec le dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine a été mesurée à 540 nm. Le nitrite généré en présence ou en l'absence de l'extrait a été estimé en calculant le pourcentage de piégeage (PI) comme suit :

$$\text{PI (\%)} = \frac{(\mathbf{A}_0 - \mathbf{A}_1)}{\mathbf{A}_0} \times 100$$

Avec  $\mathbf{A}_0$  = absorbance du contrôle et  $\mathbf{A}_1$  = absorbance de l'extrait

### II.2.5.5. Réduction du radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ce test a été effectué selon la méthode spectrophotométrique décrite par **Khaled-Khodja et al. (2014)**

#### ➤ Principe

Il est basé sur la capacité des composés antioxydants à réduire le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) d'hydrogène en eau par transfert d'électrons. Ce qui entraîne une diminution de sa concentration, se manifestant par une réduction de l'absorbance mesurée à 230 nm.

#### ➤ Mode opératoire

En bref, trente-trois microlitres (33 µL) de chaque extrait (concentration : 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 et 31,25 µg/mL) ont été ajoutés à 67 µL de peroxyde d'hydrogène (40 mM) dans du tampon Phosphate (50 mM, pH 7,4). Les concentrations finales des extraits varient de 500 à 31,25 µg/ml. L'acide gallique a été utilisé comme contrôle positif et traitée dans les mêmes conditions. Le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 10 min. Ensuite, l'absorbance de chaque préparation a été mesurée à 230 nm contre du blanc (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + tampon phosphate). Les pourcentages d'inhibition ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$PI (\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

**A<sub>0</sub>** : Absorbance du contrôle ; **A<sub>1</sub>** : Absorbance de l'extrait.

Les valeurs des pourcentages d'inhibition obtenues ont été utilisées pour déterminer les concentrations de réduction 50 (CR<sub>50</sub>) à partir de la courbe de régression tracée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.1.

### II.2.6. Analyses statistiques

Les pourcentages d'inhibition, de déstabilisation et de piégeage ont été calculés à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016 et les CC<sub>50</sub>, CP<sub>50</sub> et CR<sub>50</sub> et déterminés sur GraphPad Prism 8.0.1 en utilisant la courbe dose réponse. Les valeurs ont été représentées sous forme de moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test d'analyse de la variance à un facteur à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.1. et les différences entre les moyennes ont été comparées par le test de Dunnett. Les échantillons présentant une P-value ≤ 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

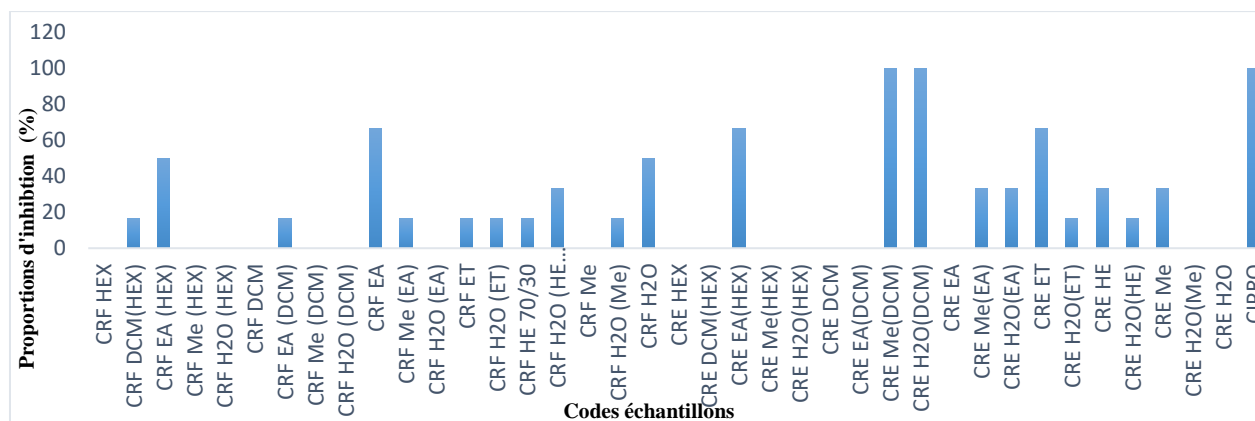
## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. RESULTATS

#### III.1.1. Activité anti-salmonelle

##### III.1.1.1. Screening préliminaire de l'activité anti-salmonelle

A l'issue du screening préliminaire, les résultats détaillés obtenus ont été présentés dans le Tableau A (**Annexe 5**) et les proportions d'inhibition des différents extraits sur l'ensemble des souches de salmonelles testées regroupés sur la Figure 13.



**Figure 13.** Proportions d'inhibition des différents extraits sur l'ensemble des souches de salmonelles testées.

**CRF** : *C. rigidus* feuilles ; **CRE** : *C. rigidus* écorces ; **HEX** : Hexane ; **DCM** : Dichlorométhane ; **EA** : Acétate d'éthyle ; **HE** : Hydroéthanolique ; **HE 70/30** : Ethanol (70%) -eau (30 %) ; **ET** : Ethanol ; **Me** : Méthanol ; **Cipro** : Ciprofloxacine.

Suite au screening préliminaire de 38 extraits de feuilles et écorces de *C. rigidus* contre six souches de salmonelles, 21 extraits ont inhibé au moins une souche de salmonelles à la concentration de 1000 µg/mL. Les extraits des écorces de *C. rigidus* ont inhibé un plus grand nombre de souches bactériennes (de 0 à 100 %) comparativement aux extraits issus des feuilles (de 0 à 66,6 %), ce qui suggère une activité antibactérienne plus marquée dans les écorces. Les extraits méthanolique et aqueux du résidu obtenu après extraction des écorces de *C. rigidus* au dichlorométhane [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont inhibé l'ensemble des souches de salmonelles testées (100 %). En revanche, la ciprofloxacine (contrôle positif) a inhibé l'ensemble des souches testées (100%) à la concentration de 0,5 µg/mL. Sept (07) extraits ont inhibé au moins 50 % des souches bactériennes testées, et ont été retenus pour la détermination des paramètres d'activité antibactérienne, notamment les concentrations bactériennes inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

##### III.1.1.2. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

Le Tableau IV récapitule les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits ayant montré une activité inhibitrice sur au moins 50 % des souches bactériennes testées.

**Tableau II.** Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits actifs sur les sérotypes du genre *Salmonella*.

Extraits	Paramètres	SE	SE	<i>S. typhi</i> CPC	<i>S. tm</i> CPC	<i>S. enteritidis</i> CPC	<i>S. Pb</i> CPC
		ATCC 14028	NR 13555				
CRF EA(HEX)	CMI	/	1000	/	1000	1000	/
	CMB	/	/	/	/	/	/
	CMB/CMI	/	/	/	/	/	/
CRF EA	CMI	/	1000	1000	1000	1000	/
	CMB	/	/	/	/	/	/
	CMB/CMI	/	/	/	/	/	/
CRF H <sub>2</sub> O	CMI	/	1000	1000	/	1000	/
	CMB	/	/	/	/	/	/
	CMB/CMI	/	/	/	/	/	/
CRE Me(HEX)	CMI	1000	/	1000	500	/	1000
	CMB	/	/	/	1000	/	/
	CMB/CMI	/	/	/	2	/	/
CRE Me(DCM)	CMI	/	500	500	1000	1000	1000
	CMB	/	1000	1000	/	/	/
	CMB/CMI	/	2	2	/	/	/
CRE H <sub>2</sub> O(DCM)	CMI	1000	250	500	/	1000	1000
	CMB	1000	500	1000			
	CMB/CMI	1	2	2	/	/	/
CRE H <sub>2</sub> O(ET)	CMI	1000	500	1000	1000	/	/
	CMB	/	1000	/	/	/	/
	CMB/CMI	/	2	/	/	/	/
Ciprofloxacine	CMI	0,0156	0,0156	0,0156	0,0156	0,0156	0,0156
	CMB	0,0312	0,0312	0,0312	0,0312	0,0312	0,0312
	CMB/CMI	2	2	2	2	2	2

CMI: Concentration minimale inhibitrice ; CMB: Concentration minimale bactéricide ; SE-NR 13555: *Salmonella typhimurium* 13555; SPb: *Salmonella paratyphi B* ; SE ATCC 14028: *Salmonella typhimurium* 14028; *S.tm* CPC: *Salmonella typhimurium*; /: > 1000 (non déterminé); CRF: *C. rigidus* feuilles; CRE: *C. rigidus* écorces; HEX: Hexane; DCM: Dichlorométhane EA: Acétate d'éthyle; HE: Hydroéthanolique; HE 70/30: Ethanol (70%)-Eau (30 %) ; ET: Ethanol; Me: Méthanol.

L'incubation de sept extraits [CRF EA(HEX) ; CRF EA ; CRF H<sub>2</sub>O ; CRE Me(HEX) ; CRE Me(DCM) ; CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ; et CRE H<sub>2</sub>O(ET)] préalablement issus des feuilles et écorces de *C. rigidus* avec six souches de salmonelles a donné des valeurs de CMI variant de 250 à 1000 µg/mL (Tableau IV). L'extrait CRE H<sub>2</sub>O(DCM) (extrait aqueux du résidu obtenu après extraction des écorces de *C. rigidus* au dichlorométhane) était le plus actif avec des CMI de 250 et 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC respectivement, suivi de l'extrait CRE Me(DCM) (CMI : 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC). De manière générale, *S. typhimurium* s'est montrée la souche la plus sensible (CMI ≤ 250 µg/mL) et *Salmonella Paratyphi B* la moins sensible (CMI ≤ 1000 µg/mL). D'après les critères de classification de

**Tamokou et al. (2017)**, un extrait est considéré comme très actif si sa CMI < 100 µg/mL ; significativement actif si  $100 \leq \text{CMI} \leq 512$  µg/mL ; modérément actif si  $512 \leq \text{CMI} \leq 2048$  µg/mL ; faiblement actif si CMI > 2048 µg/mL ; et non actif si CMI > 10 mg/mL. Ainsi, les extraits méthanolique et aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *Callistemon rigidus* [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] sont significativement actifs sur *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC. Les concentrations minimales bactéricides obtenues (CMBs) varient de 500 à 1000 µg/mL. Selon **Traoré et al. (2012)**, lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre ( $\leq 4$ ), elle est dite substance bactéricide, cependant si CMB/CMI est supérieur à quatre ( $> 4$ ), alors la substance est dite bactériostatique. Par conséquent, les extraits [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont montré une activité bactéricide vis-à-vis de *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC.

Pour identifier les métabolites secondaires potentiellement responsables de l'activité anti-salmonelle évaluées et d'un potentiel antioxydant des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM), nous avons choisi de quantifier certains groupes de composés phénoliques d'intérêt. Ainsi, les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins ont été déterminées.

### III.1.2. Teneurs en composés phénoliques des extraits bioactifs

Les teneurs en polyphénols solubles totaux, flavonoïdes solubles et tanins condensés des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont été déterminés et les résultats exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique/g d'extrait (mg EAG/g Ext), mg d'équivalent de quercétine/g d'extrait (mg EQ/g Ext), mg d'équivalent d'acide tannique/g (mg EAT/g Ext), respectivement et présentés dans le Tableau V.

**Tableau III.** Teneurs en composés phénoliques des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)

Extraits	Phénols solubles totaux (mg EAG/g Ext)	Flavonoïdes solubles (mg EQ/g Ext)	Tanins condensés (mg EAT/g Ext)
CRE Me(DCM)	126,763 ± 0,75	130,98 ± 0,32	135,398 ± 2,20
CRE H <sub>2</sub> O(DCM)	192,403 ± 6,57	186,583 ± 6,78	284,043 ± 5,85

CRE Me(DCM) : extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus* ; CRE H<sub>2</sub>O(DCM) : extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus* ; EAG : équivalent d'acide gallique ; EQ : équivalent gramme de quercétine ; EAT : équivalent gramme d'acide tannique.

Le dosage des phénols solubles totaux, flavonoïdes solubles et tanins condensés a permis d'obtenir des valeurs de 126,763 et 192,40 mg d'équivalent d'acide gallique/g d'extrait,

de 130,98 et 186,583 mg d'équivalent de quercétine /g d'extrait et de 135,398 mg et 284,043 d'équivalent d'acide tannique/g d'extrait, respectivement. Globalement l'extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus* CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a présenté de meilleures teneurs en composés phénoliques d'intérêt par rapport à l'extrait méthanolique du résidu au dichlorométhane CRE Me(DCM).

Pour vérifier l'innocuité des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] sur les cellules, leur cytotoxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire RAW.

### III.1.3. Cytotoxicité des extraits

Pour vérifier l'innocuité des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)], leur cytotoxicité a été évaluée sur les cellules RAW 264.7 et les résultats ont été exprimés en concentrations cytotoxiques 50 (CC<sub>50s</sub>) et présentés dans le Tableau VI.

**Tableau IVI.** Concentrations cytotoxiques 50 des extraits bioactifs de *C. rigidus* sur la lignée cellulaire RAW 264.7

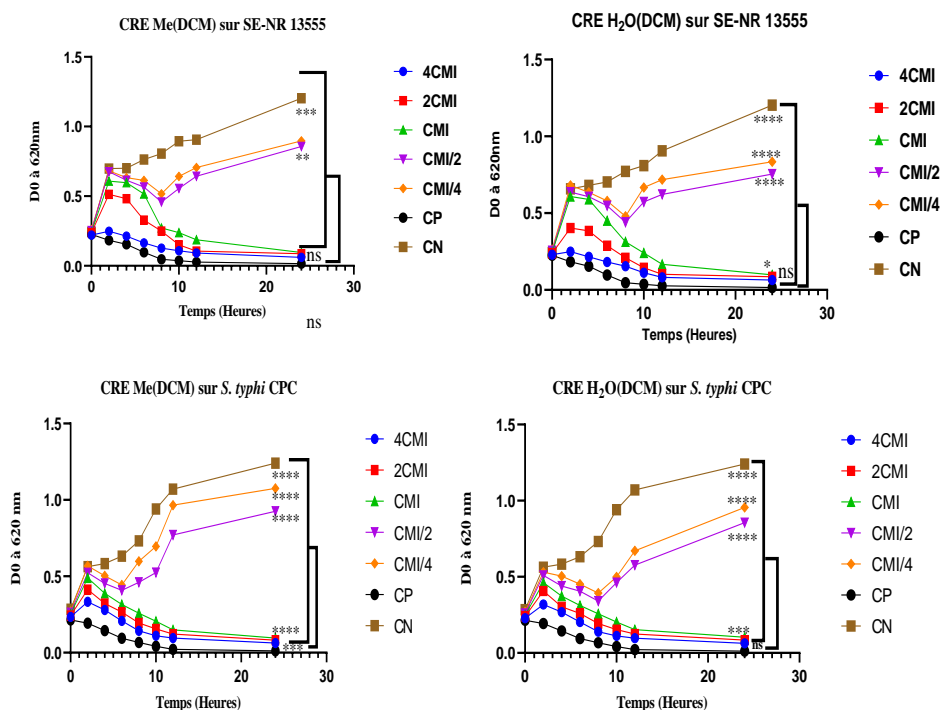
Extraits/DMSO	Concentrations cytotoxiques 50 sur RAW-264.7 (µg/mL)
CRE MeDCM	76,28 ± 8,215**
CRE H <sub>2</sub> ODCM	81,49 ± 9,94**
DMSO	0,05962 ± 0,007

Pour chaque colonne, les valeurs affectées d'un nombre différent de \* sont significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ) ; CC<sub>50</sub> : concentration cytotoxique 50 ; CRE Me(DCM): extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; CRE H<sub>2</sub>O(DCM): extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*, DMSO: Diméthylsulfoxyde

L'incubation des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] avec les cellules RAW 264.7 a permis d'obtenir les valeurs de CC<sub>50s</sub> (concentrations cytotoxiques 50) de 76,28 µg/mL et 81,49 µg/mL, respectivement. Ces valeurs sont largement supérieures à celle du DMSO (0,05962 µg/mL) qui est un solvant organique cytotoxique généralement utilisé comme contrôle positif dans les tests de cytotoxicité.

### III.1.4. Effet des extraits bioactifs sur la cinétique de mortalité bactérienne

La cinétique de mortalité des bactéries (*S. typhimurium*, *S. typhi* CPC) a été étudiée en présence des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)]. La Figure 14 illustre la cinétique de mortalité bactérienne en fonction du temps d'incubation.



**Figure 14.** Effets des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur la cinétique de mortalité de *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice ; **CP** : ciprofloxacine (0,125 µg/mL) ; **CN** : contrôle négatif. **SE-NR 13555** : *Salmonella typhimurium* ; **CRE Me(DCM)**: extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM)**: extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*. . Les courbes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ).

D'après les courbes d'évolution de la mortalité bactérienne en fonction du temps en présence des extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)], il en ressort que l'inhibition est dose-dépendante. Le temps minimal pour lequel on observe l'inhibition est de 4 heures. A des concentrations de 4 CMI, 2 CMI et CMI, on note une décroissance progressive des courbes jusqu'à 24 heures traduisant une diminution de la population bactérienne. L'activité est comparable à celle de la ciprofloxacine (contrôle positif) et connue pour son effet bactéricide (Mason *et al.*, 1995; Askoura et Hegazy, 2020), par conséquent les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) pourraient avoir un effet bactéricide. Après 10 h d'incubation des souches de salmonelles avec CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM), on observe une décroissance de la population bactérienne matérialisée par l'inclinaison de la courbe qui coupe l'axe des abscisses. La non reprise de la croissance bactérienne entre 10h et 24h de temps d'incubation prouve l'absence de bactéries dans le milieu, validant ainsi l'effet bactéricide des extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) obtenu plus haut après calcul des rapports CMB/CMI ( $\leq 4$ ).

Le phénomène de résistance observée chez les sérotypes du genre *Salmonella* est due en grande partie à leur membrane externe qui est une barrière aux antibiotiques (Clifton *et al.*, 2015). La déstabilisation de la membrane externe pourrait compromettre l'intégrité de la

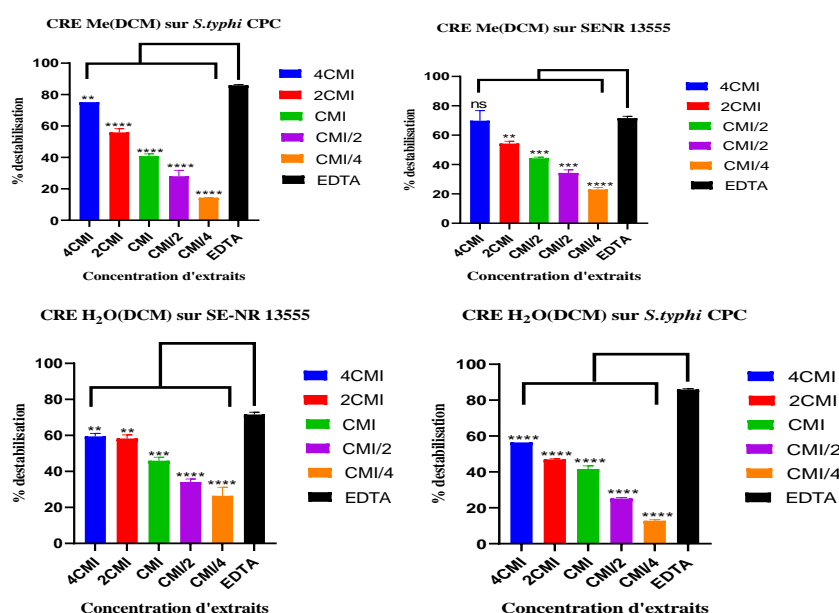
membrane interne, entraînant ainsi la fuite du contenu intracellulaire à travers les pores (Doorduyn *et al.*, 2019).

La capacité des extraits à chélater les cations bivalents qui relient les lipopolysaccharides (LPS) afin de désorganiser la membrane externe, suivie d'un test de libération du contenu intracellulaire, dont les acides nucléiques, qui absorbent à 260 nm, ont été évalués.

### III.1.5. Effet des extraits bioactifs sur la membrane

#### III.1.5.1. Effet des extraits sur la déstabilisation de la membrane externe

Les extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont été évalués pour leur capacité à déstabiliser la membrane externe des bactéries les plus sensibles (*S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC) et les pourcentages de déstabilisation en fonction des concentrations des extraits (de 4 CMI à CMI/4) sont présentés sur la Figure 15.



**Figure 15.** Pourcentages de déstabilisation de la membrane externe de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC en fonction des différentes concentrations des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM).

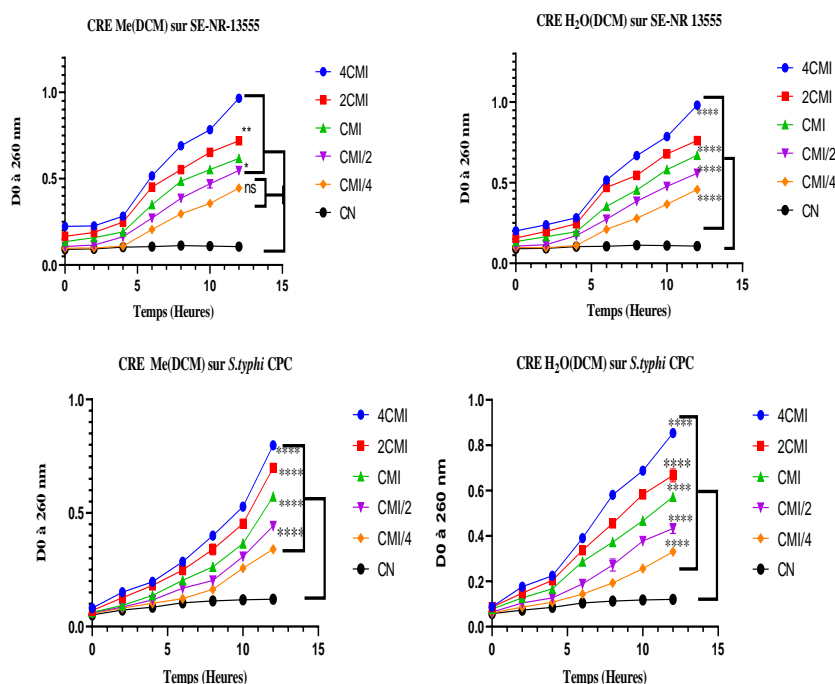
CMI : Concentration minimale inhibitrice ; EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique (30 µg/mL) ; CRE Me(DCM): extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; CRE H<sub>2</sub>O(DCM): extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*.; SENR 13555 : *Salmonella typhimurium*. Les histogrammes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ).

Il ressort de la Figure 15 que les extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] testés ont la capacité de déstabiliser la membrane externe de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC. Les pourcentages de déstabilisation de la membrane varient de 12,82 à 75,17 % et cette variation est concentration dépendante. Aux concentrations de 4 CMI et 2 CMI, les extraits ont présenté des pourcentages de déstabilisation supérieurs à 50 % vis-à-vis de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC. L'extrait CRE Me(DCM) à 4 CMI était plus actif sur *S. typhi* CPC (75,17

%) et *S. typhimurium* 13555 (69,84 %). Cependant, l'activité de déstabilisation membranaire présentée par l'EDTA (contrôle positif) était supérieure à celle observée avec les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM).

### III.1.5.2. Effet des extraits sur la perméabilité membranaire interne

Les extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont été évalués pour leur capacité à lyser la membrane interne de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC, afin de libérer le contenu cellulaire. A cet effet, les acides nucléiques libérés ont été quantifiés par méthode spectrophotométrique et les résultats sont présentés sur la Figure 16.



**Figure 16.** Effet des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur la libération des acides nucléiques en fonction du temps.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice ; **CRE Me(DCM)**: extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM)**: extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **SENR 13555**: *Salmonella typhimurium*. Les courbes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ).

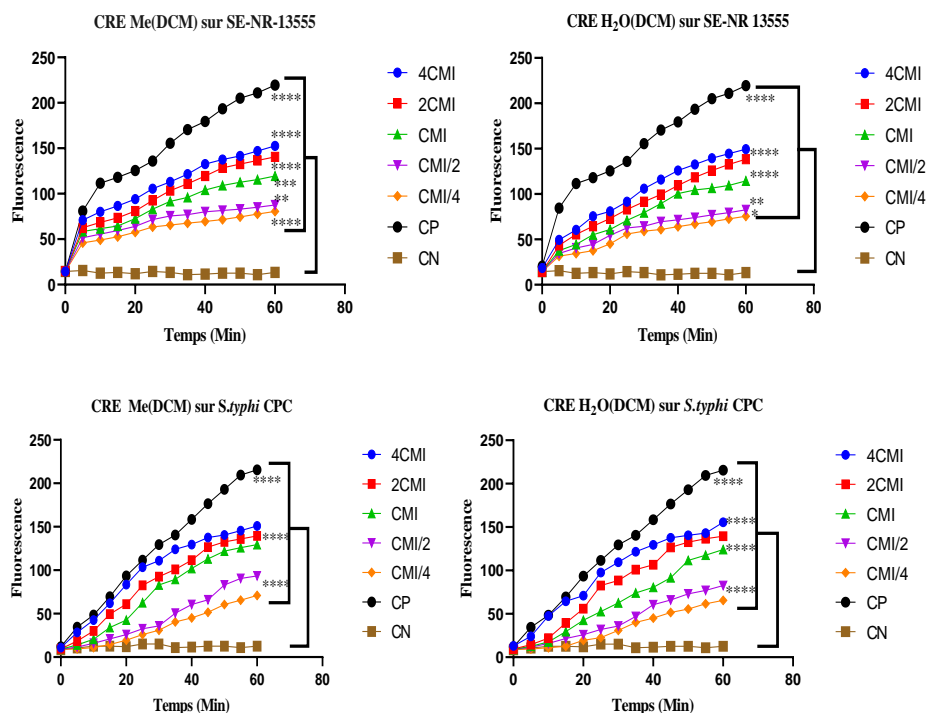
Les extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont perméabilisé la membrane interne de *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC, libérant ainsi le contenu intracellulaire dont les acides nucléiques. Cette libération d'acides nucléiques des cellules bactériennes mesurée à 260 nm, se traduit par une évolution ascendante des courbes au cours du temps et avec l'augmentation de la concentration en extrait.

La libération des acides nucléiques dans le milieu extracellulaire témoigne le fait que la membrane interne a été perméabilisée suite au traitement par les extraits. Les pompes à efflux sont principalement retrouvées au niveau de la membrane interne (Nishino *et al.*, 2021), par

conséquent des dommages provoqués au niveau de cette dernière pourraient affecter les pompes à efflux. La capacité de ces extraits à inhiber les pompes à efflux a été évaluée.

### III.1.6. Effet des extraits bioactifs sur l'inhibition des pompes à efflux

La Figure 17 illustre l'effet des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur l'inhibition des pompes à efflux.



**Figure 17.** Effet des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur l'inhibition des pompes à efflux de *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC

**CRE Me(DCM):** extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM):** extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; ; **SE-NR 13555 :** *Salmonella typhimurium* ; **CMI :** Concentration minimale inhibitrice **CP :** Quercétine (10 µg/ml) ; **CN :** contrôle négatif. Les courbes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ).

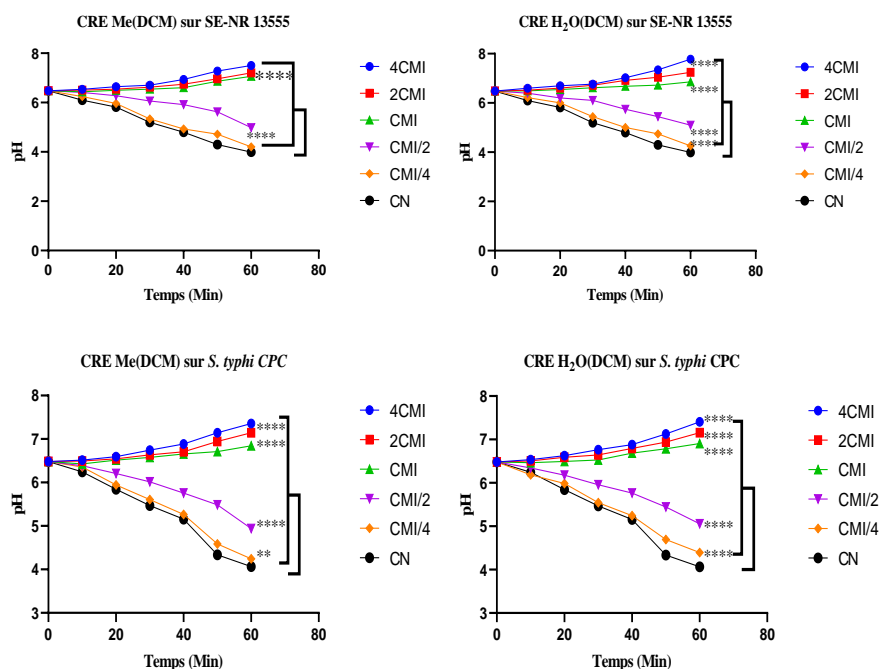
De la Figure 17, il ressort que les extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont inhibé concentration dépendante l'activité des pompes à efflux de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC. La variation de la fluorescence mesurée à 530 nm et 600 nm (excitation et émission respectivement) au cours du temps entre les extraits testés, le contrôle négatif, et le contrôle positif pourrait suggérer une augmentation de la fluorescence du bromure d'éthidium, substrat des pompes à efflux aux différentes concentrations d'extraits (4CMI à CMI/4).

Tout comme les pompes à efflux, les pompes ATPases/H<sup>+</sup> utilisent l'énergie dérivée de l'hydrolyse l'ATP pour le transport des protons du cytoplasme vers l'espace extracellulaire. Ce transport permet aux salmonelles de maintenir un pH intracellulaire stable, crucial pour leur

croissance et leur survie (Kobayashi, 1985). La capacité des extraits prometteurs à inhiber l'activité des pompes ATPases/H<sup>+</sup> a été évaluée.

### III.1.7. Effet des extraits sur l'inhibition des pompes ATPases/H<sup>+</sup>

La figure 18 montre l'effet des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur l'activité des pompes ATPases/H<sup>+</sup> chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC. L'effet inhibiteur des extraits est marqué par l'augmentation du pH au cours du temps.



**Figure 18.** Effet des extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sur l'inhibition des pompes ATPases/H<sup>+</sup> de *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC.

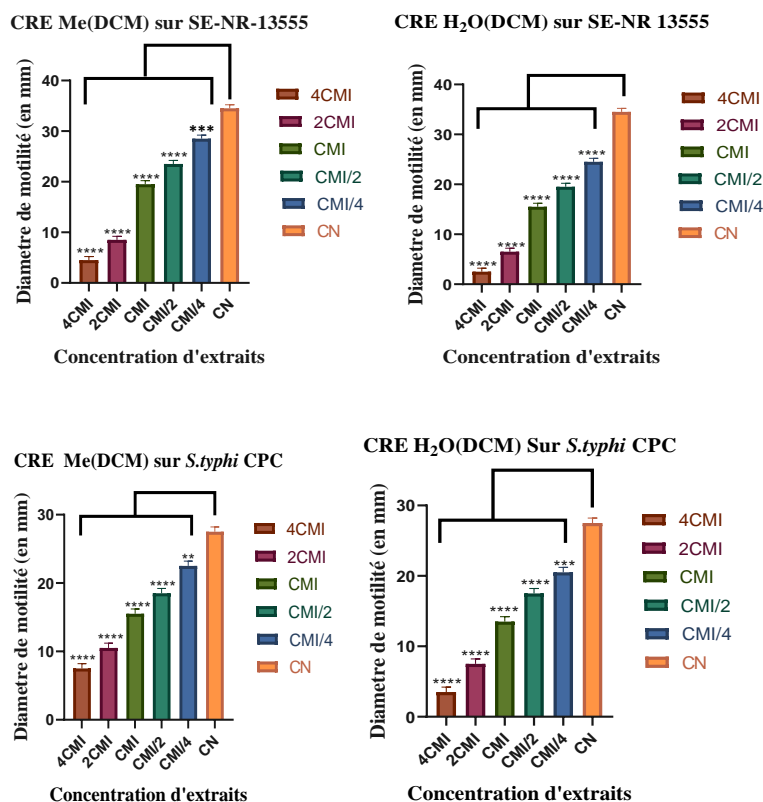
**CRE Me(DCM):** extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM):** extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **SE-NR 13555 :** *Salmonella typhimurium* ; **CMI :** Concentration minimale inhibitrice ; **CN :** contrôle négatif. Les courbes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différentes ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ ).

A des concentrations CMI, 2 CMI et 4 CMI des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM), on assiste à une évolution croissante des courbes en fonction du temps, traduisant ainsi une augmentation du pH dans le milieu réactionnel, comparativement au groupe n'ayant reçu aucun traitement. Cette augmentation de pH du milieu réactionnel aurait induit une réduction progressive de l'acidification du milieu extracellulaire qui serait conséquente à l'inhibition de l'activité des pompes ATPases/H<sup>+</sup>.

De plus, la capacité des extraits bioactifs à inhiber la motilité swarming chez *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC a été évaluée.

### III.1.8. Effet des extraits sur l'inhibition de la motilité (swarming)

Les extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont également été testés pour leur capacité à inhiber la motilité swarming et les diamètres de motilité bactérienne en fonction des concentrations des extraits sont présentés sur la Figure 19.



**Figure 19.** Effet des extraits bioactifs sur l'inhibition de la motilité swarming chez *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice ; **CRE Me(DCM)**: extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM)**: extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*. Les histogrammes ayant les mêmes symboles \* ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ , Test de Dunnett). \*( $P=0,01$ ) ; \*\*( $P=0,003$ ) ; \*\*\*( $P=0,007$ ) ; \*\*\*\*( $P<0,0001$ )

Il ressort de la Figure 19 que les extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont inhibé la motilité swarming chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC. L'inhibition était concentration dépendante et inversement proportionnelle aux concentrations en extraits. La réduction du diamètre de motilité comparativement au contrôle négatif suggère une inhibition de la motilité swarming chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC. A des concentrations de 4 CMI et 2 CMI, les extraits ont présenté des diamètres de motilité inférieurs à 10 mm chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC. À 4 CMI, l'extrait CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a présenté la plus grande inhibition de la motilité swarming chez *S. typhi* CPC (4,5 cm) et *S. typhimurium* 13555 (2,5 mm).

Les infections comme les salmonelloses entraînent la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (Popoff et Norel, 1992) dont l'accumulation conduit à un stress oxydatif

(Rastaldo *et al.*, 2007; Baudin, 2020). Il serait très bénéfique pour une substance ayant des propriétés anti-salmonelle d'être également capable de piéger les radicaux libres. Ainsi la capacité des extraits à piéger les radicaux de DPPH, ABTS et du NO et à réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

### III.1.9. Activité Antioxydante

L'activité antioxydante des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a été évaluée par leur capacité à piéger les radicaux libres de DPPH, ABTS, et du NO et à réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Le tableau VII résume les concentrations de piégeage 50 (CP<sub>50</sub>) de DPPH, ABTS, et du NO, ainsi que les concentrations de réduction 50 (CR<sub>50</sub>) du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

**Tableau VII.** Concentrations de piégeage 50 (CP<sub>50</sub>) de DPPH, ABTS et du NO, et concentrations de réduction 50 (CR<sub>50</sub>) du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

Echantillons	Concentrations de piégeage 50 (CP <sub>50</sub> ) (µg/mL)			Concentrations de réduction 50 (CR <sub>50</sub> ) (µg/mL)	
	DPPH	ABTS	NO	FRAP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>CRE</b>	46,48 ±	6,677 ±	49,33 ±	54,15 ±	35,52 ±
<b>Me(DCM)</b>	0,25****	0,14***	0,09****	1,11****	0,72****
<b>CRE</b>	18,65 ±	5,438 ±	23,08 ±	47,165 ±	19,46*** ±
<b>H<sub>2</sub>O(DCM)</b>	0,62***	0,016***	0,07***	0,77****	0,092
<b>Acide gallique</b>	2,50 ± 0,26	1,099 ± 0,081	2,23 ± 0,17	4,482 ± 0,007	1,51 ± 0,087

Pour chaque colonne, les valeurs affectées d'un nombre différent de \* sont significativement différents (P ≤ 0,05, Test de Dunnett) : \*(P=0,01); \*\*(P=0,003); \*\*\* (P=0,007); \*\*\*\* (P<0,0001); **CP<sub>50</sub>** : Concentration de piégeage 50 ; **CR<sub>50</sub>** : Concentration de réduction 50 ; **CRE Me(DCM)**: extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*; **CRE H<sub>2</sub>O(DCM)**: extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*.

L'incubation des solutions de DPPH, ABTS et NO avec les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a entraîné un piégeage significatif des radicaux libres produits par ces réactifs donnant ainsi des concentrations de piégeage 50 de 46,48 et 18,65 µg/mL, 6,677 et 5,438 µg/mL et de 49,33 et 23,08 µg/mL sur DPPH, ABTS et NO, respectivement (Tableau VII). D'autre part, le traitement des solutions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) avec les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a entraîné une réduction de ces entités chimiques. Les concentrations de réductions 50 étaient de 35,52 et 19,46 µg/mL et de 54,15 et 47,165 µg/mL pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Fe<sup>3+</sup>, respectivement. Toutefois, l'activité antioxydante de l'acide gallique (contrôle positif) était supérieure à celle des extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM).

L'activité antiradicalaire/réductrice d'un échantillon est d'autant plus élevée que sa concentration de piégeage ou de réduction 50 (CP<sub>50</sub> ou CR<sub>50</sub>) est faible. Ce qui suggère que l'extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus* CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a présenté une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus* CRE Me(DCM).

### III-2 DISCUSSION

La résistance des salmonelles, y compris au traitement de première ligne par les fluoroquinolones émerge à travers le monde, ce qui pose le problème de leur prise en charge (Yang *et al.*, 2023; Lamichhane *et al.*, 2024). Il devient impératif de rechercher de nouveaux principes actifs pouvant contribuer à la découverte des médicaments anti-salmonelloses.

Les plantes médicinales sont utilisées dans diverses communautés depuis des millénaires pour traiter de nombreuses infections, en raison de leur disponibilité, leur efficacité et leur faible toxicité (Gyawali et Ibrahim, 2014). Un exemple de ces plantes inclut *Callistemon rigidus* qui est utilisée en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner la toux, la bronchite et des infections du système digestif et respiratoire (Saxena et Gomber, 2006; Goyal *et al.*, 2012). La présente étude vise à évaluer les activités anti-salmonelle et antioxydante des extraits de *Callistemon rigidus*.

L'extraction préalable par macération successive des feuilles et écorces de *C. rigidus* dans divers solvants de polarité croissante, notamment l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le méthanol, et l'eau a généré 38 extraits comme l'indique l'annexe 1. Ces extraits ont été évalués pour leur effet inhibiteur contre six souches de salmonelles à travers un screening préliminaire à une seule concentration (1000 µg/mL). Parmi ces extraits testés, sept (7) ont inhibé la croissance d'au moins 50 % des bactéries testées et ont été sélectionnés pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides. Ainsi, ces extraits ont présenté des valeurs de CMI variant de 250 à 1000 µg/mL, les plus actifs étant CRE Me(DCM) (extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*) (CMI = 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) (extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*) (CMI = 250 et 500 µg/mL sur *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC respectivement). Ces extraits [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont présenté une activité bactéricide (Traoré *et al.*, 2012) vis-à-vis de *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC et les concentrations minimales bactéricides (CMBs) variaient de 500 à 1000 µg/mL. Ainsi, ces activités pourraient se justifier par la présence de divers métabolites secondaires dans les extraits, notamment les composés

phénoliques connus pour leur potentiel anti-salmonelle (**Almuzaini, 2023**). En effet, l'analyse phytochimique quantitative des extraits les plus actifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a révélé leur richesse en phénols solubles totaux, flavonoïdes solubles et tanins condensés. Plusieurs études scientifiques démontrent le pouvoir inhibiteur de ces métabolites vis-à-vis de plusieurs bactéries Gram négatives dont les salmonelles (**Fayemi et al., 2019; Abdelmalek et al., 2021**). Il serait donc raisonnable de spéculer que la présence des métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques dans les extraits de *Callistemon rigidus* auraient significativement contribué à l'activité antibactérienne observée dans cette étude. Par ailleurs, la différence d'activité observée avec un même extrait serait due à la diversité des constituants biochimiques et l'identité génétique de la bactérie (**Becker et Cooper, 2013**). D'autre part, les différences d'activités observées sur la même bactérie avec différents extraits pourraient être dues à la composition en métabolites secondaires qui diffère quantitativement et qualitativement en fonction de l'organe et du solvant d'extraction utilisés (**Bambeke et al., 2008**).

L'innocuité des extraits bioactifs a été évaluée sur la lignée cellulaire RAW et les concentrations cytotoxiques 50 (CC<sub>50</sub>) des extraits étaient de 76,285 µg/mL (CRE Me(DCM)) et 81,49 µg/mL (CRE H<sub>2</sub>O(DCM)). D'après les critères de classification établis par l'American National Cancer Institute (NCI), une substance est considérée comme non cytotoxique et admise pour des études supplémentaires si la CC<sub>50</sub> sur les cellules normales est supérieure à 30 µg/mL (**Momtazi-borojeni et al., 2013; Serrano-Vega et al., 2021**). Ainsi, CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) sont non cytotoxiques vis-à-vis des cellules RAW 264.7. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Larayetan et al. (2019)** qui ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. citrinus*, plante du même genre que *C. rigidus* est non cytotoxique sur les cellules HELA avec une concentration cytotoxique 50 (CC<sub>50</sub>) de 33,66 µg/mL.

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels les extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ont exercé leurs effets antibactériens vis-à-vis de *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC, la cinétique de mortalité a été évaluée ; validant ainsi l'effet bactéricide précédemment révélé à partir des valeurs calculées (CMB/CMI ≤ 4). En outre, les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) à 2 CMI et 4 CMI ont déstabilisé la membrane externe de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC avec des pourcentages de déstabilisation supérieurs à 50 %. **Lobiuc et al. (2023)** ont révélé dans un article publié dans un journal à comité de lecture "Molecules" que les composés phénoliques sont impliqués dans la déstabilisation membranaire chez les bactéries. De plus, plusieurs chercheurs ont démontré que les effets antibactériens d'un nombre important de flavonoïdes résultent de la déstabilisation de la membrane externe bactérienne

(Ollila *et al.*, 2002; Hendrich, 2006). Cette déstabilisation membranaire serait consécutive à la désorganisation des lipopolysaccharides (LPS) qui constituent une composante essentielle de la membrane externe qui renforce son intégrité et son imperméabilité (Kawasaki, 2012; Guo *et al.*, 2023). En effet, ces métabolites auraient induit une diminution des interactions entre les lipopolysaccharides en chélatant les cations divalents qui serviraient de pontage entre les structures primaires de cette composante membranaire (Firdich et Whitfield, 2005). En outre, l'incubation de *S. typhimurium* 13555 et *S. typhi* CPC avec les extraits CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a entraîné une perméabilisation de leur membrane interne. Yan *et al.* (2024) ont démontré que les flavonoïdes pouvaient inhiber la croissance bactérienne en réduisant la perméabilité et l'intégrité de la membrane bactérienne. Ce qui entraînerait un déséquilibre osmotique puis une mort cellulaire suite à une augmentation de la pression de turgescence (Doorduyn *et al.*, 2019). Plusieurs auteurs ont également démontré que les extraits des plantes du genre *Callistemon* augmentent la fluidité et la perméabilité membranaire (Kaur et Singh, 2008; Chitemerere et Mukanganyama, 2014).

Il est important de noter que la déstabilisation de la membrane externe et l'augmentation de la perméabilité membranaire sont des phénomènes étroitement liés car ces derniers contribueraient indirectement à l'altération de l'homéostasie ionique, et à une osmorégulation défectueuse qui entraîne la fuite du contenu intracellulaire dont les acides nucléiques à travers les pores membranaires (Silhavy *et al.*, 2010; Miller et Salama, 2018).

En plus de l'effet des extraits bioactifs sur la cinétique de mortalité bactérienne, la déstabilisation et la perméabilité respectivement de la membrane externe et interne chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC, l'activité inhibitrice sur les pompes à efflux (par suivi de l'effet des extraits sur l'accumulation intracellulaire du bromure d'éthidium, substrat des pompes à efflux qui s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN bactérien) et ATPases/H<sup>+</sup> (par suivi de l'effet des extraits sur l'acidification du milieu externe des bactéries en présence du glucose à l'aide d'une électrode à pH) chez ces bactéries a été également démontrée dans cette étude.

Il est important de noter que l'extrusion des antibiotiques par les pompes à efflux est le mécanisme commun de résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones, assurant ainsi un niveau de concentration intracellulaire faible, en dessous du seuil d'efficacité (Kornelsen et Kumar, 2021). Cette propriété à inhiber les pompes à efflux a déjà été révélée chez les extraits d'autres plantes médicinales (Seukep *et al.*, 2020). Par exemple, Chitemerere et Mukanganyama, (2014) ont montré que les extraits de feuilles de *Callistemon citrinus* inhibent la pompe à efflux ABC dépendante de l'ATP de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'inhibition des pompes à efflux est attribué à un ensemble de mécanismes, notamment (i) l'inhibition de la source d'énergie (ATP) ; (ii) l'inhibition de la voie de transcription des gènes codant pour les pompes à efflux; (iii) la dissipation du gradient ionique à travers la membrane; (iv) l'inhibition de l'assemblage des unités des pompes à efflux; et (v) l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe chez les bactéries Gram négatives (**Pagès et Amaral, 2009; Thakur et al., 2021**).

Par ailleurs, les pompes ATPases/H<sup>+</sup> assurent le transport des protons H<sup>+</sup> du cytoplasme vers l'espace extracellulaire. Ce transport permet aux salmonelles de maintenir un pH intracellulaire stable, crucial pour leur croissance et leur survie (**Kobayashi, 1985**). Les pompes ATPases/H<sup>+</sup> utilisent l'énergie sous forme d'ATP pour transporter des ions H<sup>+</sup> à travers la membrane cellulaire, acidifiant ainsi le milieu environnant. L'inhibition de l'activité des pompes à protons conduit à une diminution des protons H<sup>+</sup> extracellulaires et l'augmentation du pH (**Andrés et Fierro, 2010**).

Il a été démontré que les polyphénols ont la propriété de privation d'utilisation des substrats (glucose) en empêchant ces derniers de traverser la paroi cellulaire de la bactérie. La non utilisation du glucose empêche la production de l'énergie sous forme d'ATP nécessaire pour l'expulsion des protons H<sup>+</sup> d'où la réduction de l'acidification du milieu extérieur (**Cowan, 1999**).

Le swarming ou essaimage est un mouvement collectif concerté des bactéries vers une destination commune leur conférant une colonisation rapide des environnements (**Lai et al., 2009; Coleman et al., 2020**). L'analyse comparative des gènes exprimés dans les cellules en swarming et les cellules planctoniques montrent que les gènes associés à la virulence sont surexprimés dans la première condition (**Tremblay et Déziel, 2010**).

A des concentrations de 4 CMI et 2 CMI, les extraits bioactifs [CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM)] ont inhibé la motilité swarming, présentant ainsi des diamètres de motilité inférieurs à 10 mm chez *S. typhimurium* et *S. typhi* CPC. Des études antérieures ont démontré l'effet inhibiteur des métabolites tels que les tanins sur deux mécanismes indissociables et indispensables pour l'effectivité de la motilité swarming chez les bactéries, notamment l'efficacité de l'action des flagelles et la production d'un agent tensioactif attaché à la surface bactérienne que sont les lipopolysaccharides (**Partridge et Harshey, 2013**).

Les extraits de *Callistemon rigidus* auraient inhibé la motilité swarming à travers au moins un de ces mécanismes, vus que ces extraits contiendraient des tanins.

Les infections à *Salmonella* entraînent la surproduction par les cellules du système immunitaire des espèces réactives d'oxygène dont l'accumulation conduit à un stress oxydatif,

susceptible de conduire à l'endommagement des biomolécules essentielles (lipides, protéines, ADN) ( **Rastaldo et al., 2007; Baudin, 2020**). L'activité antioxydante des extraits bioactifs CRE Me(DCM) et CRE H<sub>2</sub>O(DCM) a été démontré par leur capacité à piéger les radicaux libres de DPPH, ABTS, et du NO et à réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Globalement l'extrait CRE H<sub>2</sub>O(DCM) ayant présenté les meilleures teneurs en composés phénoliques a eu la meilleure activité antioxydante avec des concentrations de piégeage 50 de 18,65 µg/mL, 5,438 µg/mL et 23,08 µg/mL sur DPPH, ABTS et NO, respectivement et de réductions 50 de 19,46 µg/mL et 47,165 µg/mL pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Fe<sup>3+</sup>. En effet, il a été démontré que les flavonoïdes et les tannins de par leur richesse en groupements hydroxyles ont la capacité de céder un hydrogène afin de stabiliser les radicaux libres (**Montessano et al., 2020**). Par ailleurs, il a été démontré que l'extrait méthanolique des écorces de *C. citrinus* possède une activité antioxydante sur les radicaux libres de DPPH, ABTS, NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Sowndarya et al., 2012**).

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Parvenu au terme de ce travail dont l'objectif général était d'évaluer les activités anti-salmonelle et antioxydante des extraits de *Callistemon rigidus*, Il en ressort que :

- ❖ Des 38 extraits préalablement obtenus des feuilles et écorces de *C. rigidus*, deux [CRE H<sub>2</sub>O(DCM) (extrait aqueux du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*) et CRE Me(DCM) (extrait méthanolique du résidu obtenu après extraction au dichlorométhane des écorces de *C. rigidus*)] ont présenté une activité anti-salmonelle remarquable contre *S. typhi* CPC et *S. typhimurium* ; ces extraits étaient non cytotoxiques sur les cellules RAW 264.7;
- ❖ Les extraits bioactifs CRE H<sub>2</sub>O(DCM) et CRE Me(DCM) ont déstabilisé la membrane externe, perméabilisé la membrane interne, inhibé les pompes à efflux et ATPases/H<sup>+</sup>, et réduit la motilité swarming chez *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* CPC ;
- ❖ Les extraits bioactifs CRE H<sub>2</sub>O(DCM) et CRE Me(DCM) ont montré une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres de DPPH, ABTS et NO et en réduisant l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

Ces résultats suggèrent que les extraits de *Callistemon rigidus* possèdent des activités anti-salmonelle et antioxydante, et pourraient constituer une source prometteuse de principes actifs à potentiel anti-salmonelle.

Ce travail n'étant que le début d'un vaste chantier de recherche, nous envisageons dans un futur proche :

- ❖ Réaliser un isolement bioguidé des composés à partir des extraits bioactifs de *Callistemon rigidus* ;
- ❖ Explorer les mécanismes d'action des composés actifs potentiels au niveau moléculaire ;
- ❖ Evaluer l'activité anti-salmonelle des composés actifs potentiels de *Callistemon rigidus* *in vivo* sur un modèle animal de laboratoire.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES

- Abd El-Ghany, W. A. (2020). Salmonellosis : A food borne zoonotic and public health disease in Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 14(07), 674-678. <https://doi.org/10.3855/jidc.12739>.
- Abdelmalek, E. M., Ramadan, M. A., Darwish, F. M., Assaf, M. H., Mohamed, N. M., & Ross, S. A. (2021). *Callistemon* genus- a review on phytochemistry and biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 30(5), 1031-1055. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02703-y>.
- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 423-434. <https://doi.org/10.2147/IDR.S228089>.
- Ahmed, N. J., Fouda, M. I., Fouda, D. I., & Foudah, A. I. (2020). The Adverse Effect Reporting for the Most Commonly Used Antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 22-28. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i830467>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica* : Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015(1), 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>.
- Andrés, M. T., & Fierro, J. F. (2010). Antimicrobial Mechanism of Action of Transferrins : Selective Inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4335-4342. <https://doi.org/10.1128/AAC.01620-09>.
- Arora, D. S., Nim, L., & Kaur, H. (2016). Antimicrobial potential of *Callistemon lanceolatus* seed extract and its statistical optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(2), 289-305. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2099-3>
- Aubry P. & Bernard A.G. (2022). Salmonellose. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux (France) ; *Médecine tropicale*. P-2 ;1-7.
- Almuzaini, A. M. (2023). Phytochemicals : Potential alternative strategy to fight *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1188752>
- Bambeke, V., Mingeot-Leclercq, M., Struelens, M., & Tulkens, P. (2008). The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(3). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.12.004>.
- Bassene, E. (2012). Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction-analyse-essais biologiques. *Presses Universitaires de Dakar*.

- Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(20\)30159-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30159-3).
- Becker, B., & Cooper, C. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chemical Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1021/cb3005116>.
- Belaïch, R., & Boujraf, S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : Effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(1), 38-42. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(16\)30009-8](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(16)30009-8).
- Bourgeois, T., Delezoide, A.-L., Zhao, W., Guimiot, F., Adle-Biassette, H., Durand, E., Ringot, M., Gallego, J., Storme, T., Le Guellec, C., Kassai, B., Turner, M. A., Jacqz-Aigrain, E., & Matrot, B. (2016). Safety study of Ciprofloxacin in newborn mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 74, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.002>.
- Bowling, T., Mercer, L., Don, R., Jacobs, R., & Nare, B. (2012). Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human african trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.02.002>.
- Brown. (1841). *Callistemon R. Brown, 1814*. <https://www.gbif.org/species/181181804>.
- Bula-Rudas, F. J., Rathore, M. H., & Maraqa, N. F. (2015). *Salmonella* Infections in Childhood. *Advances in Pediatrics*, 62(1), 29-58. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2015.04.005>.
- Cao, J.-Q., Huang, X.-J., Li, Y.-T., Wang, Y., Wang, L., Jiang, R.-W., & Ye, W.-C. (2016). Callistrilones A and B, triketone–phloroglucinol–monoterpene hybrids with a new skeleton from *Callistemon rigidus*. *Organic Letters*, 18(1), 120-123. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b03360>.
- Cars, O., & Craig, W. A. (1990). Pharmacodynamics of antibiotics-consequences for dosing : proceedings of a symposium held in Stockholm, June 7–9, 1990. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 22(sup74), 1-284. <https://doi.org/10.3109/inf.1990.22.suppl-74.01>.
- Cavestri. (2019). Étude de la survie et de la virulence de *Salmonella enterica ssp* dans des modèles gastro- intestinaux humains.
- CDC. (2023). Information for Healthcare Professionals, *Salmonella*. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html> consulté le 2024-07-12 à 15:33:30.
- CDC. (2024). Yellow Book 2024 : Health Information for International Travel | *Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/book/45769> consulté le 2024-07-23 à 06 :52 :50.

- Chima, B. (2023). L'effet antioxydant des plantes médicinales sur le stress oxydatif. [Thesis, university center of abdalhafid boussouf - MILA]. <http://dspace.centre-univ-mila.dz/jspui/handle/123456789/2673>.
- Chitemerere, T. A., & Mukanganyama, S. (2014). Evaluation of cell membrane integrity as a potential antimicrobial target for plant products. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(1), 278. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-278>.
- CLSI. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard. *Ninth Edition*, M07-A09, 88p.
- Coleman, S. R., Blimkie, T., Falsafi, R., & Hancock, R. E. W. (2020). Multidrug adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* swarming cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(3), 10.1128/aac.01999-19. <https://doi.org/10.1128/aac.01999-19>.
- Cortés, E. del C. C. (2017). Synthèse de nanogels biocompatibles et multi-stimulables pour la libération contrôlée d'une molécule modèle par hyperthermie magnétique et photothermie [Phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI]. <https://theses.hal.science/tel-01820615>.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.
- Crump, J. A., Nyirenda, T. S., Kalonji, L. M., Phoba, M.-F., Tack, B., Platts-Mills, J. A., Gordon, M. A., & Kariuki, S. M. (2023). Non-typhoidal *Salmonella* invasive disease : Challenges and solutions. *Open Forum Infectious Diseases*, S32-S37. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad020>
- Cuypers, W. L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E. J., Deborggraeve, S., & Van Puyvelde, S. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: Insights by whole-genome sequencing. *Microbial Genomics*, *4*(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>
- Doorduyn, D. J., Rooijackers, S. H. M., & Heesterbeek, D. A. C. (2019). How the membrane attack complex damages the bacterial cell envelope and kills Gram-negative bacteria. *BioEssays*, *41*(10), 1900074. <https://doi.org/10.1002/bies.201900074>.
- Driessen, M., Postma, P. W., & Van Dam, K. (1987). Energetics of glucose uptake in *Salmonella typhimurium*. *Archives of Microbiology*, *146*(4), 358-361. <https://doi.org/10.1007/BF00410936>.
- Duff, N., Steele, A. D., & Garrett, D. (2020). Global Action for Local Impact : The 11th International Conference on Typhoid and Other Invasive Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(Supplement 2), S59-S63. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa236>.

- Dyson, Z. A., Klemm, E. J., Palmer, S., & Dougan, G. (2019). Antibiotic Resistance and Typhoid. *Clinical Infectious Diseases*, S165-S170. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1111>.
- Ed-dra, A., Filali, F. R., Karraouan, B., El Allaoui, A., Aboukacem, A., & Bouchrif, B. (2017). Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Morocco. *Microbial Pathogenesis*, 105, 340-345. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.042>
- Elspeith, Goldberg, Fraser, AcostaMical, PaulLeonard, & Leibovici. (2014). *Vaccines for preventing typhoid fever—Anwar, E - 2014 | Cochrane Library*. <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001261>.
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Esteves, C. O., Rodrigues, R. M., Martins, A. L. D., Vieira, R. D. A., Barbosa, J. L., & Vilela, J. B. F. (2020). Medicamentos fitoterápicos : Prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. *Revista de Medicina*, 99(5), 463-472. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i5p463-472>
- Fabre, L., Le Hello, S., Roux, C., Issenhuth-Jeanjean, S., & Weill, F.-X. (2014). CRISPR Is an Optimal Target for the Design of Specific PCR Assays for *Salmonella enterica* Serotypes *typhi* and *paratyphi* A. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002671>
- Favier, A. (2003). *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*.
- Fayemi, P. O., Ozturk, I., Kaan, D., Özcan, S., Yerer, M. B., Dokumaci, A. H., Özcan, C., Uwaya, G. E., Fayemi, O. E., & Yetim, H. (2019). Bioactivities of phytochemicals in *Callistemon citrinus* against multi-resistant foodborne pathogens, alpha glucosidase inhibition and MCF-7 cancer cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 764-778. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1616615>
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative Stress. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>.
- Firdich, E., & Whitfield, C. (2005). Review : Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *Journal of Endotoxin Research*, 11(3), 133-144. <https://doi.org/10.1177/09680519050110030201>.

- Frombaum, M., Therond, P., Djelidi, R., Beaudeau, J.-L., Bonnefont-Rousselot, D., & Borderie, D. (2011). Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress. *Free Radical Research*, 45(3), 293-302. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.527337>
- Gad, H. A., Ayoub, I. M., & Wink, M. (2019). Phytochemical profiling and seasonal variation of essential oils of three *Callistemon* species cultivated in Egypt. *PLOS ONE*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219571>.
- Galán-Relaño, Á., Valero Díaz, A., Huerta Lorenzo, B., Gómez-Gascón, L., Mena Rodríguez, M. Á., Carrasco Jiménez, E., Pérez Rodríguez, F., & Astorga Márquez, R. J. (2023). *Salmonella* and Salmonellosis : An Update on Public Health Implications and Control Strategies. *Animals*, 13(23), 3666. <https://doi.org/10.3390/ani13233666>.
- Gilbert, Y., Dieudonné, N., & Francois Ngnodandi, B. F. N. (2020a). *In vivo* anthelmintic activity of *Callistemon rigidus* ethanolic extract on *Haemonchus contortus* in goats. *African Journal of Biological Sciences*, 02(03), 103. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.2.3.2020.103-112>.
- Gomber, C., & Saxena, S. (2007). Anti-staphylococcal potential of *Callistemon rigidus*. *Open Medicine*, 2(1), 79-88. <https://doi.org/10.2478/s11536-007-0004-8>.
- Gomber, C., & Saxena, S. (2013). *In Vitro* Anti-Staphylococcal Activity of Alkaloids from the Leaves of *Callistemon Rigidus*.
- Goto, Y., Murakami, H., & Suga, H. (2008). Initiating translation with D-amino acids. *RNA*, 14(7), 1390-1398. <https://doi.org/10.1261/rna.1020708>.
- Goyal, P. K., Jain, R., Jain, S., & Sharma, A. (2012). A Review on biological and phytochemical investigation of plant genus *Callistemon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1906-S1909. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60519-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60519-X)
- Guo, N., Bai, X., Shen, Y., & Zhang, T. (2023). Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), 2216-2230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1972280>.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants : Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>.

- Hendrich, A. B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1), 27-40. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x>
- Hugho, E. A., Kumburu, H. H., Thomas, K., Lukumbagire, A. S., Wadugu, B., Amani, N., Kinabo, G., Hald, T., & Mmbaga, B. T. (2024). High diversity of *Salmonella spp.* from children with diarrhea, food, and environmental sources in Kilimanjaro – Tanzania: One health approach. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1277019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1277019>.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>.
- Kaur, G., & Singh, R. P. (2008). Antibacterial and membrane damaging activity of *Livistona chinensis* fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2429-2434. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.026>.
- Kawasaki, K. (2012). Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. *Food Research International*, 45(2), 493-501. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.026>.
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.037>.
- Khan, M., Yi, F., Rasul, A., Li, T., Wang, N., Gao, H., Gao, R., & Ma, T. (2012). Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation, and mitochondrial dysfunction. *IUBMB Life*, 64(9), 783-794. <https://doi.org/10.1002/iub.1068>.
- Kim, D.-O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5).
- Kim, J.-H., Choi, J., Kim, C., Pak, G. D., Parajulee, P., Haselbeck, A., Park, S. E., Mogasale, V., Jeon, H. J., Browne, A. J., Owusu-Dabo, E., Rakotozandrainy, R., Bassiahi, A. S., Teferi, M., Lunguya-Metila, O., Dolecek, C., Pitzer, V. E., Crump, J. A., Hay, S. I., & Marks, F. (2024). Mapping the incidence rate of typhoid fever in sub-Saharan Africa.

- PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(2), e0011902.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011902>
- Klaunig, J. E. (2019). Oxidative stress and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(40), 4771-4778. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>.
- Klepser. (1998). Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results : Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.42.5.1207>.
- Kobayashi, H. (1985). A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 260(1), 72-76. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89694-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89694-6).
- Kobayashi, K., Ishihara, T., Khono, E., Miyase, T., & Yoshizaki, F. (2006). Constituents of Stem Bark of *Callistemon rigidus* Showing Inhibitory Effects on Mouse  $\alpha$ -Amylase Activity.
- Kornelsen, V., & Kumar, A. (2021). Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), e00514-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00514-21>.
- Lai, S., Tremblay, J., & Déziel, E. (2009). Swarming motility: A multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, 11(1), 126-136. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01747>.
- Lamichhane, B., Mawad, A. M. M., Saleh, M., Kelley, W. G., Harrington, P. J., Lovestad, C. W., Amezcua, J., Sarhan, M. M., El Zowalaty, M. E., Ramadan, H., Morgan, M., & Helmy, Y. A. (2024). Salmonellosis : An overview of epidemiology, pathogenesis, and innovative approaches to mitigate the antimicrobial resistant infections. *Antibiotics*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076>
- Langasco, R., Fancello, S., Rasso, G., Cossu, M., Cavalli, R., Galleri, G., Giunchedi, P., Migheli, R., & Gavini, E. (2019). Increasing protective activity of genistein by loading into transfersomes: A new potential adjuvant in the oxidative stress-related neurodegenerative diseases? *Phytomedicine*, 52, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.207>.
- Larayetán, R., Olisah, C., Gideon, A., Ocheme, W., Omale, S., Ilenikhena, A., Balogun, S., & Ajayi, A. (2024). Research Evolution on Medicinal Plant from Myrtaceae Family (*Callistemon* genus): Five Decades of Research. *a Bibliometric Review* 13, 32. <https://doi.org/10.33263/131.032>.

- Larayetan, R., Ololade, Z. S., Ogunmola, O. O., & Ladokun, A. (2019). Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, antitrypanosomal, and antimalarial potentials of the crude extracts of *Callistemon citrinus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(1), 5410923. <https://doi.org/10.1155/2019/5410923>.
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods : Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>.
- Lobiuc, A., Pavăl, N.-E., Mangalagiu, I. I., Gheorghită, R., Teliban, G.-C., Amăriucăi-Mantu, D., & Stoleru, V. (2023). Future Antimicrobials : Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*, 28(3), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- Loredana & Mircea. (2021). *Salmonella spp. Infection—A continuous threat worldwide—PMC*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8057844/>.
- Lorkowski, M., Felipe-López, A., Danzer, C. A., Hansmeier, N., & Hensel, M. (2014). *Salmonella enterica* : invasion of polarized epithelial cells is a highly cooperative effort. *Journal of American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/iai.00023-14>.
- Luke, Jick ben, & Carson. (2017). *Les cations divalents [les interactions médicaments/aliments/alimentation et boissons]*. <https://services-numeriques.unistra.fr/Module%20Formation%20Interactions/co/cations.html>.
- Manavathu, E. K. (2001). Inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase-mediated proton pumping in *Cryptococcus neoformans* by a novel conjugated styryl ketone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(4), 491-494. <https://doi.org/10.1093/jac/47.4.491>.
- Marcocci, L., Maguire, J. J., Droylefaix, M. T., & Packer, L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo Biloba* Extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(2), 748-755. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1764>.
- Martins, M. (2014). *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>.
- Matches, J. R., & Liston, J. (1972). Effect of pH on low temperature growth of *Salmonella*. *Journal of Milk and Food Technology*, 35(1), 49-52. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-35.1.49>.
- McFARLAND, J. (1907). The nephelometer: An instrusement for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001>.

- McWhorter, A. R., & Chousalkar, K. K. (2015). Comparative phenotypic and genotypic virulence of *Salmonella* strains isolated from Australian layer farms. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00012>.
- Mehta, J., Rolta, R., & Dev, K. (2022). Role of medicinal plants from north western Himalayas as an efflux pump inhibitor against MDR AcrAB-TolC *Salmonella enterica* serovar typhimurium: *In vitro* and *In silico* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114589. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114589>.
- Michalak, Bogusław, Aleksandra, Marcin, Sobolewska, & Woźniak, (2017). Treatment of the fluoroquinolone-associated disability: The pathobiochemical implications. *Journal of Medicine and Cellular Longevity*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2017/8023935>.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.
- Miller, S. I., & Salama, N. R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLOS Biology*, 16(1), e2004935. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004935>.
- Moffatt, M. E. K., Longstaffe, S., Besant, J., & Dureski, C. (1994). Prevention of iron deficiency and psychomotor decline in high-risk infants through use of iron-fortified infant formula: A randomized clinical trial. *The Journal of Pediatrics*, 125(4), 527-534. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(94\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(94)70003-6).
- Momtazi-borojeni, A. abbas, Behbahani, M., & Sadeghi-aliabadi, H. (2013). Antiproliferative activity and apoptosis induction of crude extract and fractions of *Avicennia Marina*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(11), 1203-1208.
- Montessano, Bibi saader, & Stefano. (2020). Antioxidants: the versatility of antioxidant assays in food science and safety. *Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations*. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/8/709>.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>.
- Netongo, P., Bin Eric, M., Chedjou, J. P., Kamdem, S. D., Achonduh-Atijegbe, O., & Mbacham, W. (2022). Malaria and Typhoid fever co-infection amongst febrile patients in Yaoundé, Cameroon: Implication in the Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry and Molecular Biology*, 7, 47-53. <https://doi.org/10.11648/j.bmb.20220702.15>.

- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 737288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>.
- Oliveira, D. M., Melo, F. G., Balogun, S. O., Flach, A., De Souza, E. C. A., De Souza, G. P., Rocha, I. D. N. A., Da Costa, L. A. M. A., Soares, I. M., Da Silva, L. I., Ascêncio, S. D., & De Oliveira Martins, D. T. (2015). Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. Involves bacterial membrane perturbations. *Journal of Ethnopharmacology*, *172*, 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.027>.
- Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H., & Slotte, J. P. (2002). Characterization of flavonoid–biomembrane interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *399*(1), 103-108. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2759>.
- Oludairo, O., Kwaga, J., Kabir, J., Abdu, P., Gitanjali, A., Perrets, A., Cibin, V., Lettini, A., & Aiyedun, J. (2022). Review of *Salmonella* characteristics, history, taxonomy, nomenclature, non-typhoidal salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). *Zagazig Veterinary Journal*, *50*(2), 160-171. <https://doi.org/10.21608/zvjz.2022.137946.1179>.
- O'May, C., & Tufenkji, N. (2011). The Swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(9), 3061-3067. <https://doi.org/10.1128/AEM.02677-10>.
- OMS. (2023a) Typhoïde. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>. consulté le 2024-07-22 à 03:42:43.
- OMS. (2023b). *Médecine traditionnelle*. <https://www.who.int/fr/news/item/> consulté le 2024-07-24 à 11 :31 :54.
- OMS. (2024a). Diarrhoeal disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> consulté le 2024-07-21 à 21 :17 :09.
- OMS. (2024b). Bacterial priority pathogens list, 2024 : Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/978924009346> consulté le 2024-09-18 à 12 :14 :54.
- Pagès, J.-M., & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them : Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - *Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826-833.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011>.
- Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). More than Motility : *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. *Journal of Bacteriology*, 195(5), 919-929. <https://doi.org/10.1128/jb.02064-12>.
- Petruk, G., Del Giudice, R., Rigano, M. M., & Monti, D. M. (2018). Antioxidants from plants protect against Skin photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1), 1454936. <https://doi.org/10.1155/2018/1454936>.
- Piccini, G., & Montomoli, E. (2020). Pathogenic signature of invasive non-typhoidal *Salmonella* in Africa: Implications for vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(9), 2056-2071.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1785791>
- Pierre, D. Y. S., Nchiwan, N. E., Okechukwu, E. C., & Lame, Y. (2014). Larvicidal and pupicidal toxicities of *Plectranthus glandulosus* and *Callistemon rigidus* leaf essential oils against three mosquito species. *Journal of Mosquito Research*, 4(1).  
<https://emtoscipublisher.com/index.php/jmr/article/view/1223>.
- Popoff, M. Y., & Norel, F. (1992). Bases moléculaires de la pathogénicité de *Salmonella*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 22, 310-324. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(05\)80136-2](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(05)80136-2).
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N., & Losano, G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life Sciences*, 81(10), 779-793.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.019>.
- Rathore, R., & Rai, N. (2022). Pharmacological action and underlying molecular mechanism of *Callistemon* : A genus of promising medicinal herbs. *Phytomedicine*, 99, 154013.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154013>.
- Ruszel, K., Dubel, R., Chodun, W., & Nieradko-Iwanicka, B. (2021). *Salmonella* – still a threat? Epidemiological analysis of infection. *Journal of Education, Health and Sport*, 11(8), 38-43. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.08.004>
- Sahu, U., et Khare, P. (2023). Antibiotics: action mechanism and modern challenge. *Developments in Applied Microbiology and Biotechnology*, Chapter 16 (p. 281-292).  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91643-1.00004-1>.
- Salem, M. Z., Ali, H. M., El-Shanhorey, N. A., et Abdel-Megeed, A. (2013). Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and

- antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(10), 785-791. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60139-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60139-X)
- Sansonetti. (2004). Bacterial Invasion : The Paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242–248 / 10.1126/science.1090124. <https://sci-hub.st/10.1126/science.1090124>.
- Saxena, S., et Gomber, C. (2006). Antimicrobial Potential of *Callistemon rigidus*. *Pharmaceutical Biology*, 44(3), 194-201. <https://doi.org/10.1080/13880200600685899>.
- Saxena, et Gomber. (2008). Antimicrobial Potential of *Callistemon rigidus*. <https://doi.org/10.1080/13880200600685899>.
- Sears, K. T., Galen, J. E., et Tennant, S. M. (2021). Advances in the development of *Salmonella*-based vaccine strategies for protection against salmonellosis in humans. *Journal of Applied Microbiology*, 131(6), 2640-2658. <https://doi.org/10.1111/jam.15055>.
- Serrano-Vega, R., Pérez-Gutiérrez, S., Alarcón-Aguilar, F., Almanza-Pérez, J., Pérez-González, C., & González-Chávez, M. M. (2021). Phytochemical Composition, anti-Inflammatory and cytotoxic activities of chloroform extract of *Senna crotalarioides* Kunth. *American Journal of Plant Sciences*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.126059>.
- Seukep, A. J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S. D., & Guo, M. (2020). Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(4), 277-290. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414-a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Elsevier*. (Vol. 299, p. 152-178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Sohanang Nodem, F. S., Ymele, D., Fadimatou, M., & Fodouop, S.-P. C. (2023). Malaria and Typhoid fever coinfection among febrile patients in Ngaoundéré (Adamawa, Cameroon): A cross-sectional study. *Journal of Parasitology Research*, 2023(1), 5334813. <https://doi.org/10.1155/2023/5334813>
- Sowndarya, S., Balasaraswathi, K., Vidhya, V., Sridevi, J., Asit Baran Mandal, & Chellan. (2012). Évaluation des activités antioxydantes totales et de piégeage des radicaux libres des extraits de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels par analyses biochimiques et par

- résonance paramagnétique électronique—RSC Advances* (RSC Publishing).  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra24410b/unauth>.
- Stanaway, J. D., Reiner, R. C., Blacker, B. F., Goldberg, E. M., Khalil, I. A., Troeger, C. E., Andrews, J. R., Bhutta, Z. A., Crump, J. A., Im, J., Marks, F., Mintz, E., Park, S. E., Zaidi, A. K. M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Adedeji, I. A., Ali, B. A., Amare, A. T., & Hay, S. I. (2019). The global burden of typhoid and paratyphoid fevers : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(4), 369-381. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30685-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30685-6)
- Suntar. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: Role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, <https://link.springer.com/article/10.1007/S11101-019-09629-9>.
- Sutar, N., Sutar, R., et Kumar, M. (2014). *Callistemon citrinus* (Bottle-brush) An important medicinal plant : A review of its traditionnal uses, phytoconstituents and pharmacological properties. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 1, 68-77.
- Tamokou, J. D. D., Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). Antimicrobial Activities of african medicinal spices and vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (p. 207-237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X>.
- Tang, Y.-L., Shi, Y.-H., Zhao, W., Hao, G., & Le, G.-W. (2008). Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(4), 1187-1194. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.006>.
- Tankeshwar, A. (2015). Culture media for *Salmonella typhi* and *paratyphi* • *Microbe Online*. <https://microbeonline.com/media-used-culture-identification-salmonella> consulté le 2024-09-11 16:24:04.
- Tariq, S., Samad, A., Hamza, M., Ahmer, A., Muazzam, A., Ahmad, S., & Amhabj, A. M. A. (2022). *Salmonella* in Poultry; An Overview. *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Arts*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.47709/ijmdsa.v1i1.1706>.
- Tchuendem Diane (2024). Antibiofilm properties of *Callistemon rigidus* leaves and stem bark (Myrtaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mémoire de Master en Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1 soutenu publiquement le 07/08/24. 98 pages.

- Tennant, S. M., MacLennan, C. A., Simon, R., Martin, L. B., & Khan, M. I. (2016). Nontyphoidal *salmonella* disease : Current status of vaccine research and development. *Vaccine*, 34(26), 2907-2910. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.072>.
- Thakur, V., Uniyal, A., & Tiwari, V. (2021). A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. *European Journal of Pharmacology*, 903, 174151. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174151>.
- Traoré, Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I., & Coulibaly A. (2012) “Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d’ *Annona Senegalensis* Pers. (Annonaceae)”.
- Tremblay, J., & Déziel, E. (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics*, 11(1), 587. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-587>.
- TROPICOS, 2024 ; <https://tropicos.org/name/22107362>, consulté le 25 Octobre 2024).
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3), 395-411. <https://doi.org/10.1128/mr.56.3.395-411.1992>.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Vordarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity : A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Journal of Microorganisms* <https://doi.org/10.3390/9102041>.
- Wójcicki, M., Świder, O., Daniluk, K. J., Średnicka, P., Akimowicz, M., Roszko, M. Ł., Sokołowska, B., & Juszczuk-Kubiak, E. (2021). Transcriptional regulation of the multiple resistance mechanisms in *Salmonella*. *Pathogens*, 10(7), 801. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070801>.
- Yang, C., Xiang, Y., & Qiu, S. (2023). Resistance in enteric *Shigella* and nontyphoidal *Salmonella* : Emerging concepts. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 36(5), 360. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000960>.
- Yemeli Piankeu, A. D., Fodouop, S. P. C., Noubom, M., Gomseu Djoumsie, E. B., Ful Kuh, G., & Gatsing, D. (2024). Epidemiology and performances of Typhidot Immunoassay and Widal slide agglutination in the diagnosis of Typhoid fever in febrile patients in Bafoussam city, Cameroon : A cross-sectional comparative study. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2024(1), 6635067. <https://doi.org/10.1155/2024/6635067>.

- Younoussa, L., Kenmoe, F., Oumarou, M. K., Batti, A. C. S., Tamesse, J. L., & Nukenine, E. N. (2020). Combined Effect of Methanol Extracts and Essential Oils of *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) and *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) against *Anopheles gambiae* giles larvae (Diptera : Culicidae). *International Journal of Zoology*, 2020(1), 4952041. <https://doi.org/10.1155/2020/4952041>.
- Zimmermann-Klemd, A. M., Reinhardt, J. K., Winker, M., & Gründemann, C. (2022). Phytotherapy in Integrative Oncology—An Update of Promising Treatment Options. *Molecules*, 27(10), 3209. <https://doi.org/10.3390/molecules27103209>.

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### **Annexe 1 : Généralités sur les extraits des feuilles et écorces de *Callistemon rigidus***

#### **❖ Matériel végétal**

Le matériel végétal était constitué des écorces, feuilles de *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) récolté le 30 Août 2023 à Nkolbisson, Yaoundé, Région du Centre, Cameroun. Elle a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun (HNC) par comparaison aux spécimens précédemment enregistrés sous le numéro de référence N 18564/SRFCam. Cette plante a été transportée au Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etudes des plantes médicinales, où elle a été prétraitée, séchée à l'ombre à température ambiante durant 2 semaines, puis broyée afin d'obtenir les poudres fines.

#### **❖ Obtention des extraits bruts de *Callistemon rigidus***

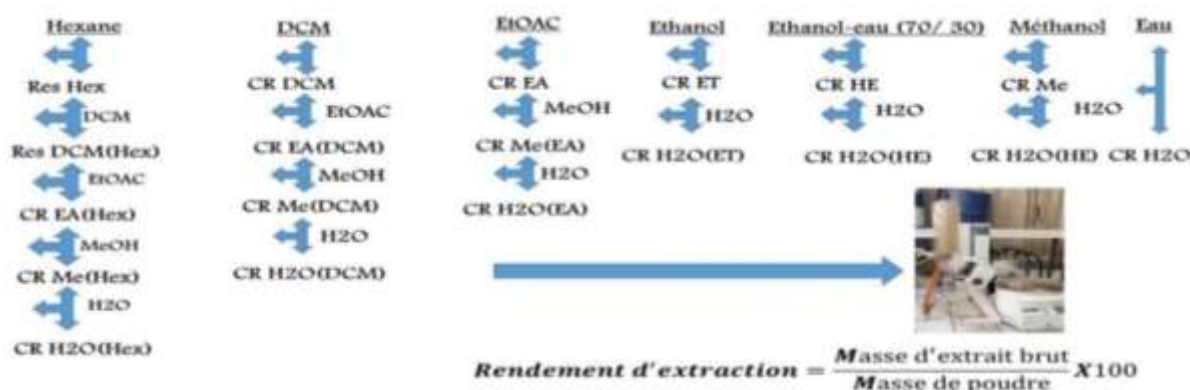
Les extraits bruts ont été obtenus par la macération successive des poudres des feuilles et écorces de *C. rigidus* en utilisant sept solvants/systèmes de solvant de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol, solution hydroéthanolique 30/70 v/v, méthanol et eau distillée).

##### **➤ Principe**

La macération successive est basée sur la capacité des métabolites secondaires à solubiliser dans des solvants de polarité croissante, ceci en vue de l'obtention d'une large gamme de composés.

##### **➤ Méthode**

Vingt (20) grammes de chaque poudre de matériel végétal ont été ajoutés à 200 mL de chaque solvant (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol, eau-éthanol (30/70) et l'eau distillée) et agité pendant 72 heures dans différents erlenmeyers. Le résidu de l'extraction de l'hexane était extrait successivement avec l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau, le résidu d'acétate d'éthyle était extrait avec le méthanol et l'eau cependant les résidus du méthanol, éthanol et d'hydro-éthanol étaient extrait seulement avec l'eau. Les solutions étaient filtrées en utilisant du coton hydrophile et les filtrats obtenus ont été concentrés au rotavapor **BUCHI R-100** à 65 °C (pour l'hydro-éthanol), 60 °C (pour le méthanol et l'éthanol), et 40 °C (pour l'hexane, l'acétate d'éthyle) sous pression réduite, puis séchés sous ventilation réduite à température ambiante. Le filtrat aqueux a été séché sous ventilation à température ambiante et les rendements d'extraction ont été déterminés en utilisant la formule ci-dessous. Le processus a été répété trois fois jusqu'à épuisement et les extraits bruts obtenus ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C pour utilisation ultérieure.



**Figure A.** Schéma récapitulatif du procédé d'extraction des feuilles et écorce de *C. rigidus*

**CR:** *C. rigidus* feuilles ; **HEX** : Hexane ; **DCM** : Dichlorométhane ; **EA**: Acétate d'éthyle ; **HE**: Hydroéthanolique ; **HE 70/30**: Ethanol (70%) -eau (30 %) ; **ET**: Ethanol ; **Me**: Méthanol.

**Tableau A.** Parties, solvants, codes et rendement d'extractions des extraits de *C. rigidus*

Parties	Solvants/Système de solvants	Codes	Rendements en %
Feuilles	Hexane	CRF HEX	7,15
	Dichlorométhane (Hexane)	CRF DCM(HEX)	2,7
	Acétate d'éthyle (Hexane)	CRF EA(HEX)	4,815
	Méthanol (Hexane)	CRF Me(HEX)	6,5
	Eau (Hexane)	CRF H <sub>2</sub> O(HEX)	1,85
	Dichlorométhane	CRF DCM	7,1
	Acétate d'éthyle (Dichlorométhane)	CRF EA(DCM)	6,5
	Méthanol (Dichlorométhane)	CRF Me(DCM)	10
	Eau (Dichlorométhane)	CRF H <sub>2</sub> O(DCM)	6,95
	Acétate d'éthyle	CRF EA	14,25
	Méthanol (Acétate d'éthyle)	CRF Me(EA)	14,5
	Eau (Acétate d'éthyle)	CRF H <sub>2</sub> O(EA)	10
	Ethanol	CRF ET	21,47
	Eau (Ethanol)	CRF H <sub>2</sub> O(ET)	5
	Ethanol/Eau 70%	CRF HE 70/30	11,895
	Eau (Ethanol/Eau 70%)	CRF H <sub>2</sub> O(HE 70/30)	5,45
	Méthanol	CRF Me	23,665
	Eau (Méthanol)	CRF H <sub>2</sub> O(Me)	6,5
	Eau	CRF H <sub>2</sub> O	5,5
	Ecorces	Hexane	CRE HEX
Dichlorométhane (Hex)		CRE DCM(HEX)	10
Acétate d'éthyle		CRE EA(HEX)	9,5
Méthanol (Hexane)		CRE Me(HEX)	4,9
Eau (Hexane)		CRE H <sub>2</sub> O(HEX)	7,5
Dichlorométhane		CRE DCM	10
Acétate d'éthyle (Dichlorométhane)		CRE EA(DCM)	0,3
Méthanol (Dichlorométhane)		CRE Me(DCM)	9,5
Eau (Dichlorométhane)		CRE H <sub>2</sub> O(DCM)	5

Acétate d'éthyle	CRE EA	1,255
Méthanol (Acétate d'éthyle)	CRE Me(EA)	9,36
Eau (Acétate d'éthyle)	CRE H <sub>2</sub> O(EA)	5,95
Ethanol	CRE ET	8,7
Eau (Ethanol)	CRE H <sub>2</sub> O(ET)	7,719
Ethanol/Eau 70%	CRE HE	7,345
Eau (Ethanol/Eau 70%)	CRE H <sub>2</sub> O(HE)	1,554
Méthanol	CRE Me	11,95
Eau (Méthanol)	CRE H <sub>2</sub> O(Me)	4,5
Eau	CRE H <sub>2</sub> O	6,55

**Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés**
**Tableau B.** Composition des milieux de culture

Milieux	Composition	Quantité
<b>Mueller Hinton Agar (MHA)</b>	Peptone de caséine	17,5 g/L
	Amidon de maïs	1,5 g/L
	Agar	17,0 g/L
<b>Mueller Hinton Broth (MHB)</b>	Peptone de caséine	17,5 g/L
	Amidon de maïs	1,5 g/L
<b>Salmonella Shighella Agar (SSA)</b>	Extrait de bœuf	5 g/L
	Enzymatic digest of casein	2.5 g/L
	Enzymatic digest of animal tissue	2.5 g/L
	Lactose	10 g/L
	Sel biliaire	10 g/L
	Citrate de sodium	8.5 g/L
	Thiosulfate de sodium	8.5 g/L
	Citrate de fer	1 g/L
	Brillant green	0.00033 g/L
	Rouge neuter	0.025 g/L
Agar	13.5 g/L	

DMEM	Chlorure de calcium hydraté	265.000 mg/L
	L Nitrate de fer nanohydraté	0.100 mg/L
	Sulfate de magnésium anhydre	97.720 mg/L
	Chlorure de potassium	400.000 mg/L
	Chlorure de sodium	6400.000 mg/L
	Glycine	30.000 mg/L
	Hydrochlorure de L-Arginine	84.000 mg/L
	Dihydrochlorure de L-cystine	62.570 mg/L
	L-Glutamine	584.000 mg/L
	Hydrochlorure de L-Histidine nomohydraté	42.000 mg/L
	L-Isoleucine	105.000 mg/L
	Hydrochlorure de L-Lysine	146.000 mg/L
	Methionine	30.000 mg/L
	L-Phénylalanine	66.000 mg/L
	L-Serine	42.000 mg/L
	L-Threonine	95.000 mg/L
	L-Tryptophan	16.000 mg/L
	sel de L-tyrosine disodique	103.790 mg/L
	L-Valine	94.000 mg/L
	chlorure de choline	4.000 mg/L
	D-Ca-Pantothénate	4.000 mg/L
	acide folique	4.000 mg/L
	Nicotinamide	4.000 mg/L
	hydrochlorure pyridoxal	4.000 mg/L
	Riboflavine 0.400 mg/L hydrochlorure de thiamine 4.000	0.400 mg/L
	hydrochlorure de thiamine	4.000 mg/L
	i-Inositol	7.200 mg/L
	D-Glucose	4500.000 mg/L
sel de rouge phénol sodique	15.900 mg/L	

### Annexe 3 : Préparation des milieux de culture utilisés

#### ✓ **Bouillon de Mueller Hinton**

Le milieu MHB a été préparé selon les instructions du fabricant. En effet, 21g de poudre de milieu ont été pesés et dissous dans 1 L d'eau distillée puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur électrique en présence du barreau aimanté. Par la suite, le milieu a été autoclavé à 121 °C pendant 30 min.

#### ✓ **Gélose de Mueller Hinton**

Le milieu MHA a été préparé selon les instructions du fabricant. Pour cela, 38 g de poudre de milieu de culture ont été pesés et dissous dans 1 L d'eau distillé, porté à ébullition à 100 °C, puis autoclavé pendant 30 min à 121 °C.

#### ✓ **Gélose *Shigella-salmonella***

Peser 63 g du milieu de culture et dissoudre dans 1 L d'eau distillée. Cuire le milieu de culture pendant 30 min à 100 °C sur agitation mécanique via un barreau aimanté.

- ✓ **Milieu DMEM** : Un volume de 500 ml de DMEM complet a été préparé en supplémentant 440 mL de milieu DMEM incomplet, avec 5 mL (1%) d'antibiotique Pénicilline/Streptomycine et 50 mL (10%) de FBS inactivé (au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes) et 5ml de NEA 100 %. Le mélange a été homogénéisé, filtré à l'aide d'un filtre millipore de 0,22 µM, puis aliquoté dans des tubes de 50 mL et conservé à 4 °C pour utilisation ultérieure.

### Annexe 4 : Préparation des solutions

- Préparation de 0.5; 1 ; 2 ; 3 McF
- Préparation de 1 % BaCl<sub>2</sub> pour 10 mL : peser 0.1g de BaCl<sub>2</sub> et dissoudre dans 10 mL d'eau distillée.
- Préparation de 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour 10 mL : diluer 100 µL d'acide sulfurique concentré dans 9.9 mL d'eau distillée.

Prélever 50 µL de BaCl<sub>2</sub> préparer à 1 % et introduire dans 9.950 µL d'acide sulfurique 1 % puis homogénéiser. La D.O. à 600 nm est comprise entre 0.08 et 0.12.

#### ✓ **Préparation de l'eau physiologique.**

Peser 0.9 g de NaCl et dissoudre dans 100 mL d'eau distillée puis homogénéiser. Autoclaver à 121 °C pendant 30 min.

#### ✓ **Préparation de la résazurine (0,15 g/L)**

4,5 mg de la poudre de résazurine ont été pesés et dissous dans 30 mL d'eau distillée stérile puis l'ensemble a été homogénéisé.

✓ **Préparation de la solution d'ABTS**

La solution ABTS était obtenue par mélange de l'ABTS, un oxydant avec le persulfate de potassium. En effet, le radical ABTS<sup>+</sup> a été préparé en mélangeant à volume égale une solution de 4,9 mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> et une solution stock d'ABTS à 7 mM, puis conservé à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15 h avant utilisation.

✓ **Préparation de la solution de DPPH.**

La solution de DPPH 0,02 % a été préparée en dissolvant 0,2 g de poudre de DPPH dans de l'éthanol pur, puis conservée dans un bocal opaque hermétiquement fermé à l'abri de la lumière.

✓ **Préparation du réactif de Griess.**

Le réactif de Griess était constitué de deux réactifs (Réactif A et Réactif B) fraîchement préparé indépendamment, puis mélange pour former une seule solution appelé « Réactif de Griess ». En effet, le réactif de Griess est préparé en associant le réactif A qui est constitué de l'acide orthophosphorique 3 % et du sulfanilamide 1 % préparé dans de l'eau distillé avec le réactif B constitué de Naphtyléthylène diamine 0,1 % dans de l'eau distillé.

✓ **Préparation de la Solution de Fer <sup>3+</sup>**

La solution de fer était préparée à une concentration de 1,2 mg/ml en dissolvant 1.2 mg poudre de FeCl<sub>3</sub> dans 1 mL d'eau distillé.

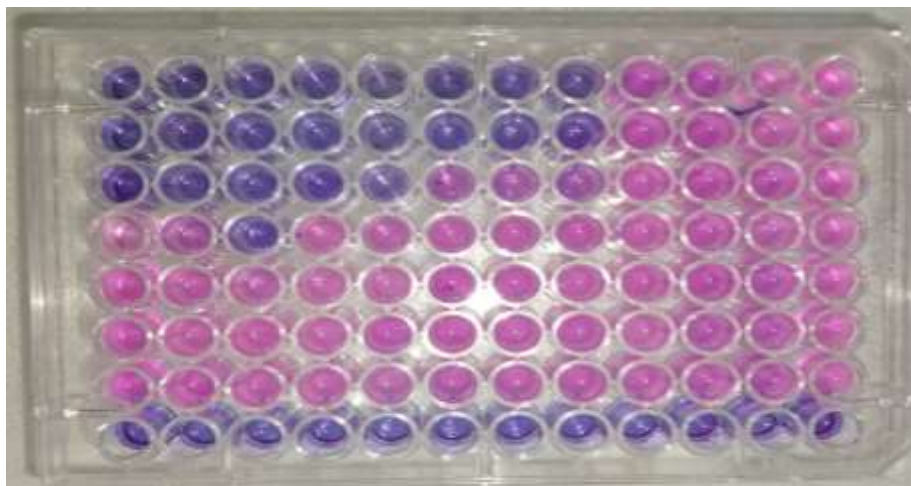
✓ **Préparation de la solution d'orthophénantroline**

La solution d'orthophénantroline a été préparée à une concentration de 0,2 % dans du méthanol. En effet, 2 mg de cristaux d'orthophénantroline ont été dissouts dans 1mL de méthanol pur et conservé à 4 °C.

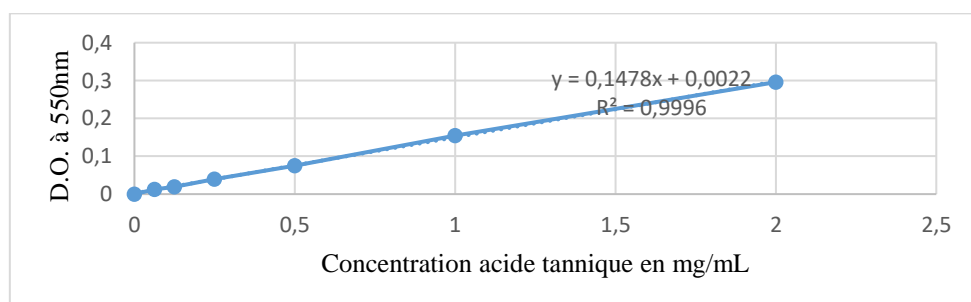
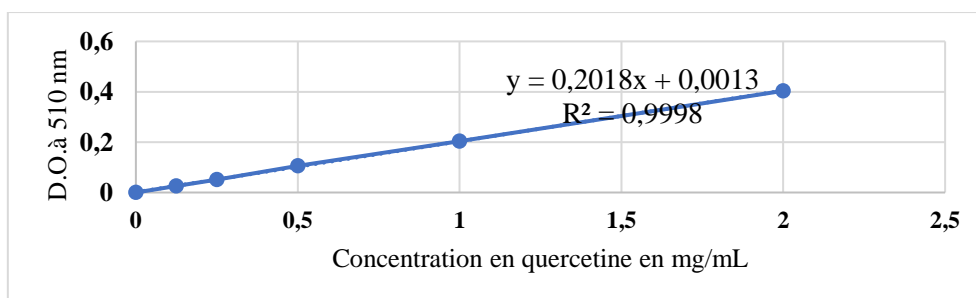
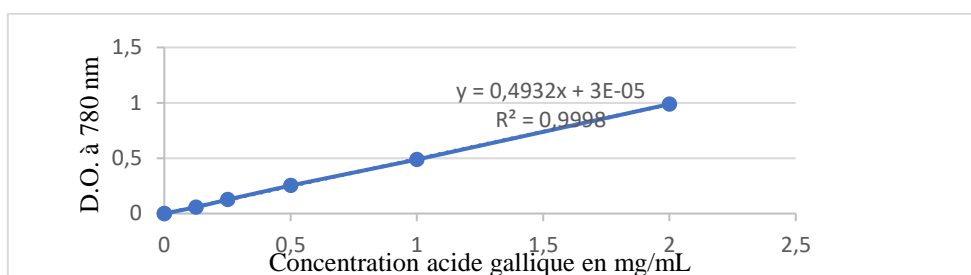
**Annexe 5** : Screening de l'activité anti-salmonelle des extraits de *C. rigidus*
**Tableau C.** Résultats du screening de l'activité anti-salmonelle des extraits de *C. rigidus*

EXTRAITS	SE ATCC 14028	SE NR 13555	S. <i>enteritidis</i> CPC	S. <i>typhi</i> CPC	<i>S.tm</i> CPC	<i>S. Pb</i> CPC	Inhibition (%)
CRF HEX	-	-	-	-	-	-	0
CRF DCM(HEX)	-	-	+	-	-	-	16,6
<b>CRF EA (HEX)</b>	-	+	-	+	+	-	<b>50</b>
CRF Me (HEX)	-	-	-	-	-	-	0
CRF H <sub>2</sub> O (HEX)	-	-	-	-	-	-	0
CRF DCM	-	-	-	-	-	-	0
CRF EA (DCM)	-	-	-	+	-	-	16,6
CRF Me (DCM)	-	-	-	-	-	-	0
CRF H <sub>2</sub> O (DCM)	-	-	-	-	-	-	0
<b>CRF EA</b>	-	+	+	+	+	-	<b>66,6</b>
CRF Me (EA)	-	+	-	-	-	-	16,6
CRF H <sub>2</sub> O (EA)	-	-	-	-	-	-	0
CRF ET	-	-	-	+	-	-	16,6
CRF H <sub>2</sub> O (ET)	-	-	+	-	-	-	16,6
CRF HE 70/30	-	-	+	-	-	-	16,6
CRF H <sub>2</sub> O (HE70/30)	-	-	+	+	-	-	33,33
CRF Me	-	-	-	-	-	-	0
CRF H <sub>2</sub> O (Me)	-	-	+	-	-	-	16,6
<b>CRF H<sub>2</sub>O</b>	-	+	+	+	-	-	<b>50</b>
CRE HEX	-	-	-	-	-	-	0
CRE DCM(HEX)	-	-	-	-	-	-	0
CRE EA(HEX)	-	-	-	-	-	-	0
<b>CRE Me(HEX)</b>	-	-	-	+	+	+	<b>66,66</b>
CRE H <sub>2</sub> O(HEX)	-	-	-	-	-	-	0
CRE DCM	-	-	-	-	-	-	0
CRE EA(DCM)	-	-	-	-	-	-	0
<b>CRE Me(DCM)</b>	+	+	+	+	+	+	<b>100</b>
<b>CRE H<sub>2</sub>O(DCM)</b>	+	+	+	+	+	+	<b>100</b>
CRE EA	-	-	-	-	-	-	0
CRE Me(EA)	+	-	-	-	+	-	33,3
CRE H <sub>2</sub> O(EA)	-	+	-	+	-	-	33,3
<b>CRE ET</b>	+	+	-	+	+	-	<b>66,6</b>
CRE H <sub>2</sub> O(ET)	-	-	+	-	-	-	16,6
CRE HE	-	+	+	-	-	-	33,3
CRE H <sub>2</sub> O(HE)	-	-	+	-	-	-	16,6
CRE Me	-	+	-	+	-	-	33,3
CRE H <sub>2</sub> O(Me)	-	-	-	-	-	-	0
CRE H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	0
<b>CIPROFLOXACINE</b>	+	+	+	+	+	+	<b>100</b>

**Annexe 6.** Microplaque de détermination des CMI



**Annexe 7.** Courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine, et de l'acide tannique



**Annexe 8:** Microplaque du test de piégeage du radical DPPH



**Annexe 9:** Microplaque du test de piégeage du radical ABTS



**Annexe 10 :** Microplaque du test de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$

