

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة
UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : science de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

**Effet antibactérien de la plante *Buxus dioïca* L.(le katam) sur les
bactéries β -lactamase positives**

Présentées Par :Belabed Nada ,Bourekba Hiem ,Sehhoul Wafa

Membre de Jury

Dr. AGGOUNE Asma (MCB)	Président	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Pr. CHEKROUD Zohra (professeur)	Promoteur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Dr. MELOUKA Hadda (MAB)	Examineur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2023/2024

Remerciement

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail et qui nous a éclairé vers le bon chemin.

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements à notre encadrante Professeur **Chekroud Zohra** pour avoir accepté de diriger ce travail et pour ses conseils judicieux tout le long de la réalisation de ce mémoire.*

*Pour la même occasion, nous tenons à remercier Dr. **Aggoune Asma** la présidente et Dr. **Melouka Hadda** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Mme **Bougouizi Amina** pour son aide, sa confiance et son soutien moral, on la remercie vivement ses commentaires éclairés ont été d'une valeur inestimable pour la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude à Mme **Bouzana Amina** pour son aide, ses encouragements et ses conseils.*

*Nous remercions tous les membres de l'équipe du centre de recherche en biotechnologies pour leur aide précieuse bien évidemment, nous tenons aussi à remercier Mr **Bensuici Chaouki** responsable du laboratoire de pharmacologie et toxicologie au CRBT.*

*Nous tenons à remercier toutes l'équipe du laboratoire d'hôpital de Tamalous et surtout Mr **Chekrida Wahab** et Mme **Kriba Samira** qui nous ont accueillis, et surtout pour leur générosité et de nous avoir offert l'occasion de vivre cette expérience professionnelle et d'effectuer notre travail de fin d'étude.*

*Un grand merci pour Mr **Djilani AbdelKarim** qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et pour leur encouragement nous tenons de remercier aussi les ingénieurs de laboratoire de hall technologique.*

Nous exprimons nos remerciements à tous les enseignants du département de science de la nature et de la vie pour avoir fortement contribué à enrichir nos connaissances. Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

Je dédie ce modeste travail :

*À **ma mère** qui ma a quitté avant de voir mon succès comme elle le Souhaitait, que dieu le tout puissant les accueille dans son vaste paradis.*

*À mon **père** Pour leur sacrifice, leur soutien, leurs encouragements toute au long de mes études que dieu vous procure bonheur, santé et longue vie.*

*A **mamie pour** ses Douaa qui ne m'ont jamais quitté.*

*À ma sœur **Sana** Pour ses irremplaçable et inconditionnel Soutien, Pour ses encouragements, ses conseils , Pour avoir cru en moi.*

*À mon chère frère **Anis** et ma belle-sœur **Amira** pour leurs encouragements et leurs soutiens.*

*À mon trinôme **Hiem** et **Wafa** Pour tous les moments de joie et de peine qu'on a passés ensemble.*

*À mes chers oncles ,mes chères tantes et **sihem** .*

*À mes cousine **Selma, Maroua, Meriem, Wissem, Yasmine et Bouchra.***

*À ma meilleure amie **khaoula** .*

*A ma copine de chambre **kater el nada.***

*À mes meilleure amies **Wiam, Aya, Rahma et Hadjer** .*

À tous mes amies et à tous ceux qui m'aiment.

Enfin a tous les membres de ma famille petit et grand .

Nada

DEDICACE

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah de m 'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédier cet humble travail à :

*A ma tendre yemma **Zakia** et les mémoires de baba **Ammar** que je n'oublierai jamais, my lovely **mère** et mon très cher **père**.*

*A mes butterflies sœurs **Hadil** et **Rihab**, mon bras droit **Zinou**.*

*A mes chères tantes et mon dos mes oncles et leurs enfants du **Nada** jusqu'à **Misk** ce qu'elle arrive bientôt inch'allah ,love u all one by one.*

A l'esprit de mes grands-parents mes cousin et cousines.

*Mon positif energy : **Mm amina**.*

A mon bonheur mes souvenir et la moitié de ma vie en groupe pv03/45.

*A mon équipe et mes bru **Nada** et **Wafa**.*

*A mes amis proches, mes amies d'enfance et mon confiance :**Samah,Romaissa** et **Nesserine** .*

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Hiem

DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce travail à :

A mes chers parents : Il n'y a pas de mots pour exprimer l'étendue de mon amour pour vous et ma gratitude pour tous les efforts que vous avez déployés pour moi et pour mes études... Même si les mots que j'écris ici ne seront pas à la hauteur de l'amour que vous m'avez donné, alors merci pour votre amour, votre soutien et vos encouragements dans chaque petite chose que j'ai traversée pour arriver à ce moment. Puisse dieu tout puissant vous garder et vous procurer santé et bonheur.

*A mon cher frère : **Rida.***

*A mes chères sœurs : **Imen, Aya el Rahman***

*A mes chers Amis : **Hadjer, Maïssa***

*A mes chers trinômes : **Hiem et Nada** pour votre soutien moral, votre patience, et votre compréhension tout au long de ce travail.*

A tous mes enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

« Merci pour votre amour et encouragement ».

Wafa

Sommaire

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
1 Généralités sur la plante	3
1.1 Les plantes médicinales	3
1.2 La phytothérapie	3
1.3 Distribution géographique de la plante <i>Buxus dioïca</i> L.	3
1.4 Classification botanique de la plante <i>Buxus dioïca</i> L.	4
1.5 Propriétés biologiques de la plante	5
1.6 Composition chimique de la plante	5
2 Principes actifs	5
2.1 Polyphénols	6
2.2 Flavonoïdes	6
3 Activités biologiques	7
3.1 Activité antimicrobienne	7
3.2 Activité antioxydante	7
4 Antibiotiques	8
4.1 Classification des antibiotiques	8
4.2 Les β -lactamines	9
4.3 Résistance bactérienne	9
Matériel et Méthodes	
1 Présentation du site d'accueil	11
1.1 Plante testée	11
1.2 Souches bactériennes	12
1.3 Matériel du laboratoire	14
1.4 Produits chimiques, solvants et milieu de culture	15
2 Extraction des principes actifs	16
2.1 Extraction solide /liquide (macération)	16

2.2 Extraction liquide /liquide (fractionnement)	16
2.3 Détermination du rendement de l'extraction	18
3 Dosage des principes actifs	19
3.1 Dosage des polyphénols totaux	19
3.2 Dosage des flavonoïdes	20
4 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante <i>Buxus dioïca</i> L. par la méthode de diffusion en milieu solide	21
4.1 Revivification des souches	21
4.2 Préparation des dilutions des extraits de la plante	22
4.3 Préparation d'inoculum	22
4.4 Antibiogramme	22
4.5 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide (CMI)	23
4.6 Détermination de la Concentration Minimale bactéricide (CMB)	24
5 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante par équivalence en Trolox	25
5.1 Activité de piégeage de DPPH	25
5.2 Activité de piégeage de 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)	26
5.3 Activité de Phénanthroline	26
5.4 Activité de pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP)	27
Résultats et Discussion	
1 Les rendements d'extraction	31
2 Taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes	31
3 Activité antibactérienne	33
3.1 Zones d'inhibition	33
3.1.1 Souches pathogènes	33
3.1.2 Souches de référence	34
3.2 Résultats de la CMI	38
3.2.1 Souches pathogènes	40
3.2.2 Souches de référence	41
3.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide des extraits	42
3.3.1 Souches pathogènes	42
3.3.2 Souches de référence	43

4 Activité antioxydante45

conclusion

Référence bibliographique

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
°C	Degré Celsius
μl	Microlitre
ABTS	L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
BLSE	β -lactamase à spectre étendu
CMB	Concentration minimale bactericide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DMSO	Diméthylesulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
H	Heure
Mg	Milligramme
MH	Muller- Hinton
Mm	Millimètre
Nm	Nanomètre
QE	Equivalent de Qurecitin
UFC	Unités formant colonies
CR	Filon-ciocalteu réactif
Antibiotiques	
AUG	Augmentin
AMP	Ampicilline
CIP	Ciprofloxacine
CTX	Céfotaxime
CZ	Céfazolin
FOX	Céfoxitin
GEN	Gentamicine
IMP	Imipeneme
SXT	Trimethoprime sulfamethoxazol

Liste de figures

Figure 1 :Buxus dioïca L.	4	
Figure 2 : Structure chimique des différentes classes de polyphénols	6	
Figure 3 :structure chimique des différentes classes de flavonoïdes	7	
Figure 4 :la structure des β -lactamines (site 4)	9	
Figure 5 : Position géographique de la zone de récolte (Site5).....	11	
Figure 6 : Poudre de la plante Buxus dioïca L.	12	
Figure 7 :Evaporation	Figure 8:Décantation.....	17
Figure 9 :Protocole de l'extraction des principes actifs	18	
Figure 10 :courbe d'étalonnage (acide gallique).....	32	
Figure 11 :courbe d'étalonnage (Quercetine).....	32	
Figure 12 :zones d'inhibition des souches pathogènes	35	
Figure 13 :zones d'inhibition des souches de référence	35	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique du genre <i>Buxus</i>	4
Tableau 2 : Familles d'antibiotiques et leur spectre d'action (Site3).....	8
Tableau 3 : Origine des prélèvements des souches bactériennes pathogènes.....	12
Tableau 4 : Profil de résistance aux antibiotiques des souches bactérienne pathogène	13
Tableau 5 : liste du Matériel utilisé	14
Tableau 6 : Produits chimiques, solvants et milieux de culture	15
Tableau 7 : Classification de la sensibilité aux extraits selon le diamètre des zones d'inhibition.	23
Tableau 8 : les rendements des extraits	31
Tableau 9 : Teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes	33
Tableau 10 : Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait méthanolique de <i>Buxus dioïca</i> L.	36
Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait hexanolique de <i>Buxus dioïca</i> L.	37
Tableau 12 : Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait Butanolique de <i>Buxus dioïca</i> L.	38
Tableau 13 : Les CMI obtenues des souches.....	39
Tableau 14 : Résultats de la CMB.....	44
Tableau 15 : Activités anti-oxydante des extraits de la plante <i>Buxus dioïca</i> L.	46

Résumé

Dans la présente étude nous avons évalué l'activité antibactérienne de la plante *Buxus dioïca* L. vis-à-vis des entérobactéries productrices de β -lactamase ainsi que son activité antioxydante. Trois extraits ont été préparés : méthanolique, hexanolique et butanolique. Le dosage des composés phénoliques a été déterminé par le réactif de Folin-Ciocalteu et celui des flavonoïdes par la méthode de nitrates d'aluminium l'activité antibactérienne a été évaluée par la technique de diffusion sur milieu solide et a été confirmée par la CMI en milieu liquide. L'activité antioxydante a été démontrée en utilisant les tests DPPH, ABTS, FRAP et phénanthroline. L'extrait butanolique a enregistré le rendement d'extraction le plus élevé (14 %), en revanche, l'extrait hexanolique est le plus riche en polyphénols ($221,35 \pm 3,05 \mu\text{g GAE/ml}$), alors que l'extrait méthanolique est le plus riche en flavonoïdes ($98,75 \pm 5,00 \mu\text{g QE/ml}$). La majorité des souches testées étaient sensibles à en moins un extrait avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 8mm (souches sensibles) et 30mm (souche extrêmement sensible). Les CMI obtenues sont de 0,78 mg/ml à >100 mg/ml pour les souches résistantes. Les trois extraits sont dotés d'un effet bactéricide ($\text{CMB/CMI} \leq 4$) et d'une activité antioxydante supérieure à celle des standards utilisés (Trolox, et acide ascorbique).

Mots clés : Activité antibactérienne, Activité antioxydante, *Buxus L.*, CMI Polyphénols, Flavonoïdes.

Abstract

In the present study, we evaluated the antibacterial activity of *Buxus dioica L.* against β -lactamase-producing enterobacteria, as well as its antioxidant activity. Three extracts were prepared: methanolic, hexanolic, and butanolic. The quantification of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, while flavonoids were measured by the aluminum nitrate method. Antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method on solid medium and confirmed by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in liquid medium. Antioxidant activity was demonstrated using DPPH, ABTS, FRAP, and phenanthroline assays. The butanolic extract exhibited the highest extraction yield (14%). Conversely, the hexanolic extract showed the highest concentration of polyphenols ($221.35 \pm 3.05 \mu\text{g GAE/ml}$), whereas the methanolic extract was the richest in flavonoids ($98.75 \pm 5.00 \mu\text{g QE/ml}$). Most of the tested strains were susceptible to at least one extract, with inhibition zone diameters ranging from 8 mm (for sensitive strains) to 30 mm (for extremely sensitive strain). MIC values ranged from 0.78 mg/ml to >100 mg/ml for resistant strains. All the three extracts demonstrated bactericidal effect ($\text{MBC/MIC} \leq 4$) and significant antioxidant activity compared with the tested standards (Trolox and ascorbic acid).

Keywords: Antibacterial activity, Antioxidant activity, *Buxus dioica L.*, MIC, Polyphenols, Flavonoids.

الملخص

في الدراسة الحالية، قمنا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لنبات *Buxus dioica* L. ضد البكتيريا معوية المنتجة لببتا لاكتاماز، بالإضافة إلى نشاطه المضاد للأكسدة. تم تحضير ثلاث مستخلصات: الميثانولي، الهكسانولي، والبيوتانولي. تم تحديد كمية المركبات الفينولية باستخدام مستحضر فولين-سيوكالتيو، بينما تم قياس الفلافونويدات بواسطة طريقة نترات الألمونيوم. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة انتشار القرص على وسط صلب وتم تأكيده بتحديد التركيز المثبط الأدنى CMI في وسط سائل تم عرض النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبارات FRAP, ABTS, DPPH و فينانثرولين. سجل مستخلص الميثانولي أعلى نسبة استخلاص (14%) بينما أظهر المستخلص الهكسانولي أعلى تركيز للبولىفينولات ($221.35 \pm 3.05 \mu\text{g GAE/ml}$) وأظهر المستخلص الميثانولي أعلى تركيز للفلافونويدات حيث كانت معظم السلالات التي تم اختبارها حساسة على الأقل لأحد المستخلصات مع اقطار مناطق التنشيط تتراوح بين 8 ملم للسلالات الحساسة إلى 30 ملم للسلالات شديدة الحساسية. كانت قيم الحد الأدنى للتركيز تتراوح بين 0.78 ملغ/مل إلى أكبر من مئة ملغ للسلالات المقاومة فقد أظهرت جميع المستخلصات اثارا بكتيرية ونشاطاً مضاداً للأكسدة متفوقاً مقارنة بالمعايير المستخدمة لترولوكس وحمض الأسكوربيك

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، البوكسوس ديويكا، تركيز الحد الأدنى المثبط، البولىفينولات، الفلافونويدات

Introduction

Depuis près de 7 000 ans, les populations humaines ont utilisé les plantes médicinales à des fins thérapeutiques, une pratique qui se reflète également chez certains animaux **(Velmud et Bortoluzzi, 2022)**. En raison de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, antiseptiques et anti-inflammatoires, les plantes médicinales ont non seulement joué un rôle crucial dans l'évolution des civilisations, mais elles ont aussi été la base des pratiques systématiques de la médecine traditionnelle à travers le monde pendant plusieurs siècles pour lutter contre diverses affections **(Clair et al., 2023)**. Aujourd'hui, environ 35 000 espèces de plantes sont exploitées dans le monde pour leurs propriétés médicinales **(Marmitt et Shahrabian, 2021)**.

Les plantes médicinales sont de plus en plus connues pour leur pouvoir de compléter les antibiotiques pour renforcer le système immunitaire et lutter contre les infections bactériennes. La recherche met en évidence les divers métabolites secondaires présents dans les plantes médicinales, tels que les alcaloïdes, les tanins et les polyphénols, qui possèdent des propriétés antimicrobiennes et peuvent servir de sources alternatives d'agents modifiant la résistance **(Ríos et Recio, 2005)**.

Les entérobactéries, une famille de bactéries gram-négatives incluant des pathogènes bien connus comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, sont courantes et peuvent affecter divers systèmes du corps humain. Elles peuvent induire plusieurs types d'infections, principalement les infections urinaires, mais aussi des infections respiratoires, des infections de la peau et des tissus mous, et des septicémies **(Abdel Hadi et al., 2024)**. L'une des plus grandes menaces auxquelles le monde fait face aujourd'hui est le problème de la multirésistance de ces agents, qui est souvent à l'origine de mécanismes enzymatiques, notamment la production de β -lactamases. Ces enzymes inactivent plusieurs types d'antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, rendant ainsi ces micro-organismes résistants à de nombreux traitements aux antibiotiques **(Perez-Llarena et Bou, 2009)**.

L'Algérie est dotée d'une flore diversifiée, avec environ 6,3 % des espèces végétales connues étant des taxons endémiques stricts, particulièrement concentrés dans les régions montagneuses du nord **(Belik et Mekhoukh, 2023)**. Cette riche végétation comprend diverses plantes qui ont démontré des activités antimicrobienne significatives, notamment contre des entérobactéries comme *Escherichia coli* **(Taïbi et al., 2021)**.

La plante *Buxus dioica* L. a déjà été étudiée en Algérie et a démontré une efficacité antibactérienne contre des souches de référence : *Escherichia coli* ATCC25922, *Listeria*

monocytogenes ATCC19115, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, et *Klebsiella pneumoniae*. Elle est aussi ainsi qu'une excellentes propriétés antioxydante (**Zehouf et Zaoui, 2020**). En revanche, elle n'a jamais été testée sur des entérobactéries cliniques pathogènes multirésistantes.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude, dont l'objectif principal est d'évaluer l'activité antibactérienne de trois extraits des feuilles de la plante *Buxus dioïca L.*, méthanolique, hexanolique et butanolique, contre des entérobactéries cliniques pathogènes multirésistantes et productrices de bêta-lactamase ainsi que de confirmer leur activité antioxydante via quatre tests (DPPH, ABTS, FRAP et Phénanthroline).

Pour cela notre travail a été structuré en quatre parties :

- La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique où sont exposées des généralités sur les plantes médicinales et sur l'espèce *Buxus dioïca L.*, les activités biologiques de la plante et enfin la résistance des antibiotiques.
- La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour l'extraction des principes actifs des feuilles de plante, dosage des polyphénols et des flavonoïdes et évaluation de l'activité bactérienne et antioxydante des extraits.
- La troisième partie relate et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.
- La quatrième partie synthétise les conclusions tirées de notre recherche et met en avant les perspectives futures.

Synthèse bibliographique

1 Généralités sur la plante

1.1 Les plantes médicinales

Les plantes médicinales, connues pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, sont utilisées de diverses manières telles que la décoction, la macération et l'infusion, en utilisant différentes parties de la plante telles que la racine, la feuille ou la fleur (**Ravichandran et al., 2023**), leur utilisation remonte à près de 7000 ans, et même certains animaux les consomment à des fins thérapeutiques. Environ 35 000 espèces de plantes sont exploitées à travers le monde pour leurs vertus médicinales.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes médicinales reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments conventionnels décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et résistent de plus en plus. Le coût est faible par rapport aux traitements standardisés et qu'elle est donc plus accessible au pays du tiers monde (**Chaughule et Barve, 2023**).

1.2 La phytothérapie

La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits des plantes, comme la plupart de ces derniers possèdent des effets thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs naturels (polyphénols, flavonoïdes...) qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise en médecine classique aussi bien qu'en phytothérapie elles présentent des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Begum et al., 2023**).

En Algérie, on a longtemps eu recours à la médecine traditionnelle grâce à la richesse et la diversité de sa flore qui compte environ 3000 espèces, appartenant à plusieurs familles botaniques (**Bouzabata, 2016**). Ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains telle que la plante de *Buxus dioïca* L.

1.3 Distribution géographique de la plante *Buxus dioïca* L.

Buxus dioïca L. également connue sous le nom de Katam (**Figure 1**), est originaire du Yémen et d'Asie occidentale, où elle est largement répandue. En Europe, elle s'étend du sud de la Scandinavie jusqu'au nord de l'Espagne et de l'Italie. Elle est également présente dans certaines parties de l'Asie, telles que la Turquie et le Caucase. En Algérie, on la trouve principalement dans

les régions montagneuses et forestières du nord du pays, notamment dans les massifs de l'Atlas et les régions côtières du Tell (**Guillot *et al.*, 2008**).



Figure 1:*Buxus dioica L.*

1.4 Classification botanique de la plante *Buxus dioica L.*

Elle appartient à la famille des Buxacées (**Tableau 1**), qui compte 6 genres répartis en 123 espèces différentes (**Shipunov *et al.*, 2020**).

Tableau 1: Classification botanique du genre Buxus

Règne	Plante
Embranchement	Spermatophyta (Angiospermae)
Classe	Dicotylédones
Ordre	Celastrales
Famille	Buxaceae
Genre	Buxus

1.5. Caractéristiques de la plante

Les buis sont principalement des arbustes (ou de petits arbres) à feuillage persistant, mesurant de 2 à 12 mètres de haut, avec des dimensions pouvant atteindre une quinzaine de mètres. Leur feuillage coriace d'un vert foncé brillant est opposé et écussonné sur les rameaux. Ces plantes sont arrondies ou ovales à lancéolées. Elles mesurent entre 1,5 et 11 centimètres de long sur 0,3 et 5 centimètres de large. Elles ont un contour entier et une nervation pennée, courtement pétiolée (**Site 1**).

1.5 Propriétés biologiques de la plante

Le *Buxus dioïca* L. a présente une robustesse remarquable face aux environnements difficiles, y compris les sols peu fertiles et arides, et il peut s'adapter à une gamme variée de climats. Les fleurs du buis sont petites, discrètes et généralement unisexuées, attirant les insectes pollinisateurs pour assurer la reproduction. Néanmoins, les feuilles persistantes du buis contiennent des alcaloïdes, et de la buxine, qui peuvent être toxiques pour certains animaux en cas de consommation excessive. Par ailleurs, le buis est vulnérable aux maladies fongiques telles que le dépérissement du buis, ce qui peut compromettre sa santé et sa croissance, et elle est permet de foncer les teintes obtenues avec le henné et de donner de l'éclat aux cheveux, il a la particularité de couvrir les cheveux blancs (**Kaur,2020**).

1.6 Composition chimique de la plante

Le *Buxus dioïca* L. renferme une variété de composés chimiques tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpénoïdes et des phénols. Ces composés, comprenant la cyclovirobuxine D, la cyclovirobuxine E, la buxamine B, la buxine C et la buxine D, sont responsables des nombreuses propriétés pharmacologiques et médicinales de la plante. Parmi celles-ci, on compte des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antiparasitaires. La combinaison de ces divers composés confère au *Buxus dioïca* L. un potentiel thérapeutique prometteur, en tant que plante d'intérêt pour la médecine traditionnelle et la recherche pharmaceutique (**Ginko et al ., 2023**).

2 Principes actifs

Des recherches modernes ont montré que l'action des plantes médicinales est due à quelques constituants élaborés par la plante que nous appelons « principes actifs », appelés aussi **métabolites secondaires**. Avec des fonctions différentes, les principes actifs peuvent être un moyen de défense contre des parasites ou des micro-organismes pathogènes ou une technique pour empêcher la croissance d'autres plantes à proximité et donc lui assurer une bonne nutrition, comme moyen de croissance ou pour le renouvellement de l'espèce (**site2**).

La concentration en principes actifs d'une plante varie en fonction de l'âge du végétal, de la saison, du climat et de l'environnement en général (sécheresse, pollution, etc.). C'est pourquoi il est important de bien connaître le meilleur moment de l'année, et même du jour (matin, journée, soir, nuit), pour récolter la plante. Parmi ces principes actifs les phénols et les flavonoïdes constituent la

plus grande famille des métabolites secondaires synthétisés par les plantes (Reverchon et Baldino, 2023).

2.1 Polyphénols

Ce sont des métabolites secondaires présents dans les différentes parties des plantes, des molécules bioactives ayant la capacité de piéger les radicaux libres (Figure2). Quand ils sont ingérés dans les aliments, ils renforcent les défenses naturelles qui protègent les cellules et les tissus contre le stress oxydant (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018). Ils sont capables d'empêcher les dommages oxydants par différents mécanismes d'action (Sule *et al.*, 2022).

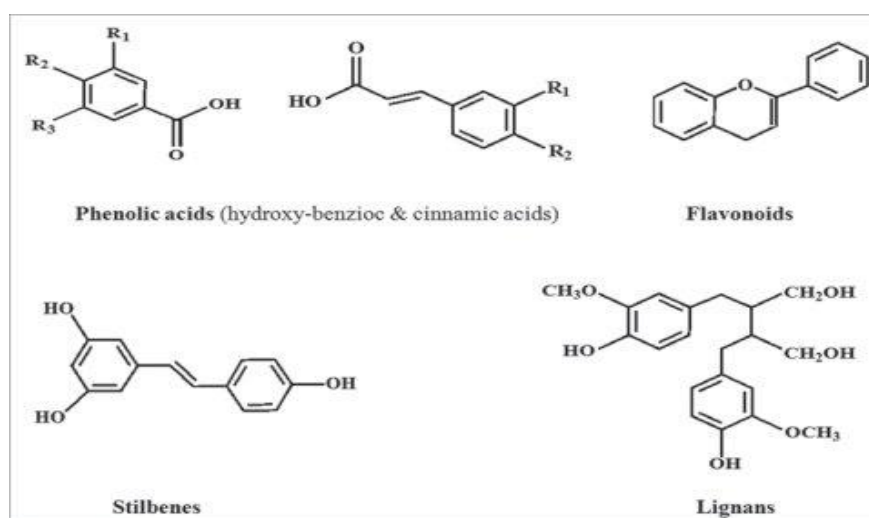


Figure 2: Structure chimique des différentes classes de polyphénols

2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de polyphénols très abondante dans le règne végétale (Figure3). Ils sont des pigments végétaux de qui sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils donnent souvent une coloration jaune. Les flavonoïdes ont la capacité de neutraliser les radicaux libres qui provoquent un stress oxydatif, endommagent nos cellules et accélèrent leur vieillissement. Ajouté à cela ses effets antioxydants qui aident notre corps à combattre les molécules potentiellement dangereuses, la consommation régulière des aliments riches en flavonoïdes, c'est offrir à notre corps une possibilité de lutter naturellement contre les maladies cardiovasculaires, réduire la possibilité de développer du diabète et ralentir considérablement le vieillissement de notre peau (Ajila et Prasada,2008). D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres

comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (Linani *et al.*, 2023).

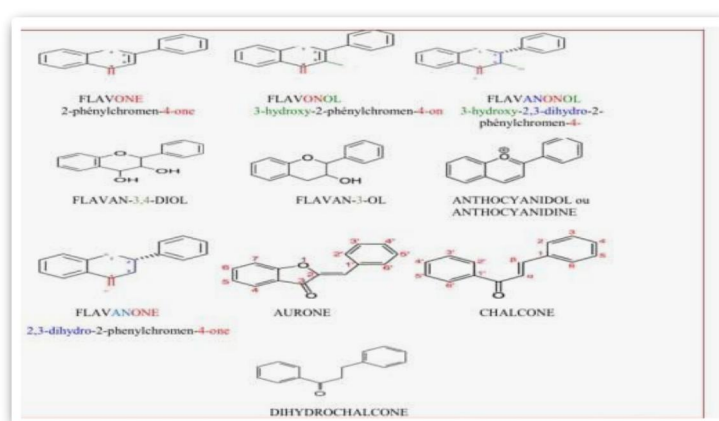


Figure 3:structure chimique des différentes classes de flavonoïdes

3 Activités biologiques

3.1 Activité antimicrobienne

Les extraits de *Buxus dioïca L.* peuvent renfermer divers composés tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tannins et d'autres substances phénoliques reconnues pour leurs effets antibactériens. Ces composés pourraient potentiellement entraver la croissance des bactéries pathogènes, y compris celles responsables des infections urinaires telles que *Escherichia coli*, ainsi que des infections diarrhéiques telles que celles causées par *Salmonella spp.* et *Shigella spp.* Ces caractéristiques font du *Buxus dioïca L.* une source prometteuse de nouveaux agents antimicrobiens pour le traitement de ces types d'infections (Volpe *et al.*, 2023).

3.2 Activité antioxydante

Du fait de leur haute réactivité, les espèces oxygénées réactives (EOR) telles que des radicaux libres, sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires. Cette production d'espèces délétères est généralement équilibrée par leur consommation à vitesse égale par le système antioxydant endogène. La rupture de l'équilibre entre espèces pro- et antioxydant est désignée par le terme de stress oxydant. Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Ce sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Kiran *et al.*, 2023). Les antioxydants qu'ils naturels ou synthétiques, sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et

neurodégénératives, inflammation, diabète...) ainsi que le vieillissement, dus à la formation exagérée des radicaux libres.

4 Antibiotiques

Les antibiotiques, qu'ils soient naturels ou synthétiques, sont des composés chimiques utilisés pour combattre les infections bactériennes. Les antibiotiques naturels sont dérivés de sources telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes, tandis que les antibiotiques synthétiques sont produits chimiquement en laboratoire (Zhai *et al.*, 2023). Ils peuvent soit tuer les bactéries (antibiotiques bactéricides) soit inhiber leur croissance (antibiotiques bactériostatiques) (Sannidhan *et al.*, 2023)

4.1 Classification des antibiotiques

La classification par famille regroupe les antibiotiques par leur structure chimique leur mode d'action, leur spectre antibactérien, leur pharmacocinétique et leurs effets secondaires. Les familles d'antibiotiques sont représentées dans le **tableau 2** :

Tableau 2: Familles d'antibiotiques et leur spectre d'action (Site3)

Famille	Antibiotique	Gram +	Gram-
β_lactamines	Benzylpénicilline	+	-
	Oxaciline	+	-
	Ampicilline	+	+
	Imipénème	+	+
Aminosides	Gentamicine	+	+
	Tobramycine	+	+
Phénicolés	Chloramphénicole	+	+
Tétracycline	Doxycycline	+	+
Macrolides	Eeythromycine	+	-
Glycopeptide	Vancomycine	+	-

Quinolones	Acide nalidixique	-	+
Autres	Acide fusidique	+	-

4.2 Les β -lactamines

Elles constituent la famille la plus riche de molécules à activité antimicrobienne. Elles sont caractérisées par une fonction amine cyclique (le noyau bêta-lactame qui est responsable de l'activité antimicrobienne). Ce sont des antibiotiques bactéricides qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne chez les bactéries en voie de multiplication. Les bêta-lactamines sont fixées de manière covalente sur les transpeptidases et les transcarboxypeptidases (enzymes associées à la membrane cytoplasmique) à cause de leur analogie structurale avec le substrat naturel l'acyl-D-alanyl-D-alanine. La conséquence de cette fixation est le blocage de toute activité de ces enzymes (Aguilar,2016). La structure des β -lactamines indiquées dans la **figure 4** :

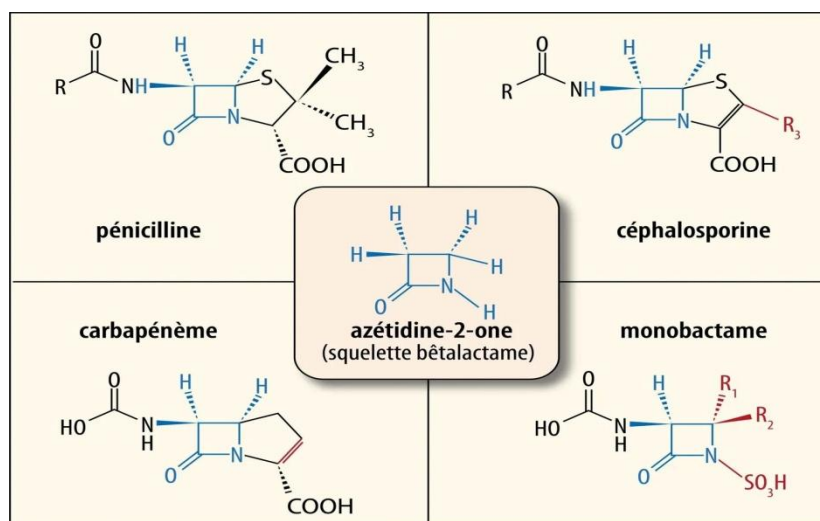


Figure 4: la structure des β -lactamines (site 4)

4.3 Résistance bactérienne

➤ β -lactamases et défis de Santé

Parmi les mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne aux β -lactamines, la production d'enzymes inactivatrices qui constitue le plus important mécanisme de résistance notamment chez les bacilles à Gram négatif (BGN). Parmi ces enzymes inactivatrices, les β -lactamases, (Poole,2004). Ces dernières sont des enzymes produites par les entérobactéries qui dégradent les antibiotiques β -lactamines et les rendant inefficaces. Elles hydrolysent le noyau β -

lactamine responsable de l'activité antibactérienne. La diminution de la stabilité des β -lactamines en présence des β -lactamases limite donc leur efficacité dans le traitement des maladies infectieuses. **(Shungube *et al.*, 2023).**

L'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant. Ce phénomène touche les établissements de soins aigus et chroniques et on assiste en particulier à une augmentation des bactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) **(Sreeja *et al.*, 2017).**

Matériel et Méthodes

1 Présentation du site d'accueil

Notre travail a été réalisé au niveau de trois sites d'accueil pendant une période qui s'étale du mois de février jusqu'à la fin du mois de mai. L'extraction des composés polyphénoliques a été effectuée au laboratoire de chimie de la faculté de technologie de l'université du 20 août 1955, Skikda. L'activité antibactérienne des extraits a été testée au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Tamalous. Le dosage des polyphénols ainsi que l'activité antioxydante des extraits ont été réalisées au laboratoire de pharmacologie et toxicologie du Centre de Recherche en Biotechnologique, Constantine (CRBt).

1.1 Plante testée

La matière végétale utilisée comme matière première dans notre étude est constituée des feuilles de la plante *Buxus dioïca L.* connue par le nom de « KATAM ». La récolte a été effectuée à la région de Gergoura située à la commune de Beni zide, la daïra de Collo, le mois de janvier 2024 (**Figure 5**). Les feuilles sont séchées à l'air libre et à l'abri du soleil dans une chambre ouverte pendant une durée de 15 à 20 jours. Les feuilles séchées sont par la suite broyées avec un broyeur électrique afin d'obtenir une poudre très fine. La poudre est conservée dans des sachets en plastique à l'abri de l'humidité (**Figure 6**).

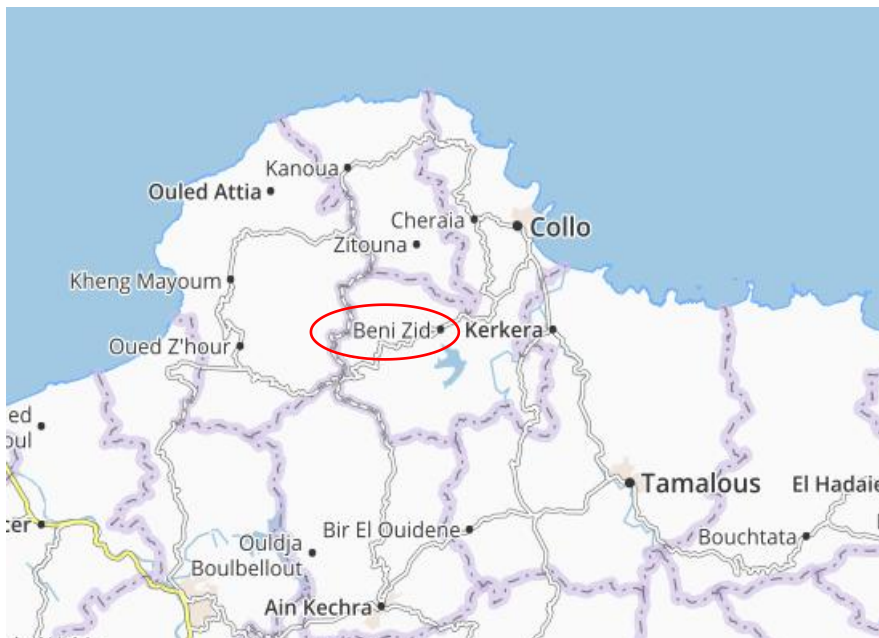


Figure 5: Position géographique de la zone de récolte (Site5)



Figure 6: Poudre de la plante *Buxus dioïca L.*

1.2 Souches bactériennes

Nous avons testé l'effet antibactérien des composés phénoliques des feuilles de la plante *Buxus dioïca L.* sur 17 souches entérobactéries : 15 souches pathogènes et deux souches de référence : *Escherichia. Coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 obtenues de l'institut Pasteur, Algérie (**Tableau 3**). Les souches pathogènes ont été fournies par la doctorante Bouguizi A. Le système VITEK 2® Compact (BioMérieux) a été employé pour vérifier leur identification ainsi que pour confirmer leur résistance aux antibiotiques de la classe des β -lactamines (**Tableau 4**).

Tableau 3: Origine des prélèvements des souches bactériennes pathogènes

Espèce	Code	Origine
<i>Escherichia coli</i>	924	Urine
<i>Escherichia coli</i>	21	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	Pus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	353	Pus
<i>Escherichia coli</i>	579	Urine
<i>Escherichia coli</i>	660	Pus
<i>Escherichia coli</i>	730	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	340	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	Pus

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	107	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	192	Urine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	237	Pus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	Urine
<i>Escherichia coli</i>	38	Urine

Tableau 4: Profil de résistance aux antibiotiques des souches bactérienne pathogène

Code	Espèce	AMP	AUG	CZ	FOX	CTX	IMP	GE N	CIP	SXT
924	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R
21	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
353	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
579	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R
660	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S
730	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S
340	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S
107	<i>Klebsiella</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R

	<i>pneumoniae</i>									
192	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
237	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	I	S	S	S
38	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	I	S	S	R

R=Résistante S=Sensible I= Intermédiaire

1.3 Matériel du laboratoire

Le Matériel du laboratoire utilisé dans ce travail est mentionné dans le tableau 5

Tableau 5: liste du Matériel utilisé

Matériel	Utilisation
-Balance de précision	-Mesurer des poids
-Agitateur électrique	-L'agitation
-Entonnoir, Papier filtre	-La filtration
-Rota-vapeur	-Évaporer le solvant
-La hotte de protection et le bec bunsen	-Assurer la stérilisation de la zone de travail
-Étuve	-Incubation des cultures bactériennes
-Bain marie, Autoclave.	-Fusion des géloses et stérilisation du matériel
-Spectrophotomètre	-Permet de mesurer la densité de l'inoculum
-Microplaques 96 puits, Micropipette 100 µl	-Réaliser CMI CMB et le dosage des

500 µl et 1000 µl. -Écouvillons, pipettes Pasteur -Des disques en papier filtre -Lecteur microplaques	polyphénols et flavonoïde -Ensemencement -Tester l'activité antimicrobienne -Lecture des microplaques
Verrerie	Utilisation
-Ampoule à décanter -Boîte de Pétri en verre -Éprouvette gradué -Boîte de Pétri -Tubes à essai	-Décantation des solvants -Conservation des extraits -Mésuser les volumes des solutions -Faire les cultures bactériennes -Réalisation des dilutions

1.4 Produits chimiques, solvants et milieu de culture

Les produits chimiques, les solvants ainsi que les milieux de culture utilisés au cours de cette étude sont indiqués dans le **tableau 6**.

Tableau 6: Produits chimiques, solvants et milieux de culture

Produit	Utilisation
-Méthanol, butanol, hexane -Diméthyle sulfoxyde DMSO, l'eau distillée et le méthanol -L'eau physiologique -L'eau distillée	-Solvants qui permettent l'extraction des polyphénols -Dilution des extraits - Préparation des solutions bactériennes - Étalonnage du spectrophotomètre. -Bouillon et Gélose Muller Hinton, Gélose

<p>-Milieux de culture non sélectifs</p> <p>-CR (Filon-ciocalteu réactif), Acide gallique, Na₂CO₃ de 7.5% (Carbonate de sodium).</p> <p>-Nitrate d'aluminium à 10% (Al(NO₃)₃·9H₂O), 1 M Potassium acétate (CH₃COOK), Quercétin</p> <p>-DPPH, Atocopherol, BHA, BHT, Quercétine /catéchine, Phenanthroline, Ferrie chloride FeCl₃, MeOH, TCA, K₃Fe(CN)₆, FeCl₃, Phosphate buffer, K₂S₂O₈, ABTS</p>	<p>Nutritive</p> <p>-Dosage des polyphénols</p> <p>-Dosage des flavonoïdes</p> <p>-Tester l'activité antioxydante</p>
--	---

2 Extraction des principes actifs

Les principes actifs ont été extraits des feuilles de la plante *Buxus dioïca* L. selon la méthode de (Upson *et al.*, 2000) avec quelques modifications

2.1 Extraction solide /liquide (macération)

La macération, également appelée extraction solide-liquide, implique de laisser la matière végétale (broyat) séjourner dans le méthanol aqueux afin d'extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes) (Mukhametov *et al.*, 2023). Elle consiste à :

- Peser 10 g de poudre de la plante *Buxus dioïca* L.
- Ajouter 150 ml de méthanol 70%
- Mettre sur l'agitateur et recouvrir avec un papier aluminium, laissé macérer 24 h
- Filtrer le macérât sur papier filtre Whatman n°1
- Faire passer le filtrat au rota-vapeur rotatif à 60 °C pour obtenir l'extrait hydrométhanolique (Figure 7).

2.2 Extraction liquide /liquide (fractionnement)

L'objectif de cette étape est d'obtenir les molécules polaires en utilisant l'hexane et le butanol comme des solvants :

- Diluer l'extrait hydrométhanolique obtenu dans 50ml d'eau distillée tiède.

- Placer l'extrait dans une ampoule à décanter (**Figure 8**).
- Ajouter 50ml d'hexane et agiter énergiquement le solvant avec la phase aqueuse puis laisser au repos pendant une heure.
- Après une heure, récupérer la phase limpide riche en molécules actives près 1h dans un bécher.
- Répété la même procédure en remplaçant l'hexane par le butanol.
- Placer les solutions obtenues dans des boîtes et laisser les dans l'étuve à une température de 30c° pendant 48 h pour faire évaporer les solvants.
- Les boites sont conservées à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

Les extraits hydrométhanolique, hexanolique et butanolique ont été utilisés pour tester les activités biologiques des feuilles de la plante *Buxus dioïca* L.

Les étapes de l'extraction des molécules actives sont illustrées dans le diagramme indiqué dans la **Figure 9**.



Figure 7:Evaporation



Figure 8:Décantation

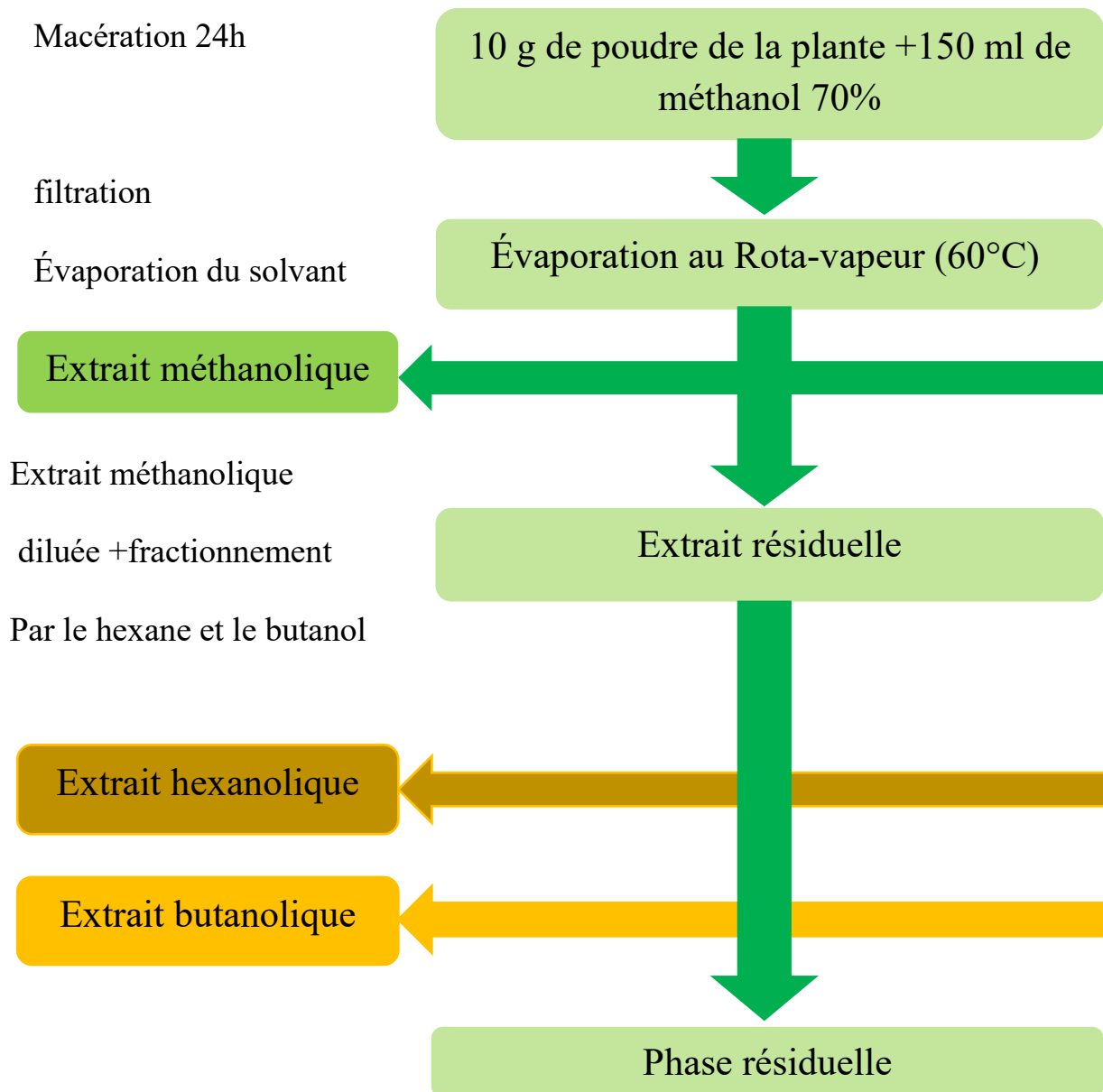


Figure 9: Protocole de l'extraction des principes actifs

2.3 Détermination du rendement de l'extraction

Les rendements en extraits secs sont calculés par la formule suivante (Harborne, 1998):

$$\text{Rnd\%} = (\text{Mf} * \text{Mi}) / 100$$

Rnd% : Le rendement en %.

Mf : Masse final de l'extrait brut après évaporation du solvant.

Mi : Masse de la matière végétale initiale sèche utilisée

3 Dosage des principes actifs

3.1 Dosage des polyphénols totaux

● Principe

Le taux des polyphénols totaux dans les trois extraits a été évaluées par le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi,1965**) en utilisant une technique de dosage en microplaque (**Muller *et al.*,2010**).

Le réactif Folin-ciocalteu (FCR) de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), en réagissant avec les polyphénols ils les réduisent en oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleue. La production de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité totale de phénols et elle est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm (**Bonnaillie *et al.*, 2012**).

● Protocole

La technique de dosage des polyphénols consiste à mélanger 20 µl d'extrait de la plante (1mg/ml), 100µl de FCR dilué (1 :10) et 80%l de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est laissé à température ambiante à l'obscurité pendant 2h. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). L'absorbance a été lue à 765 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (Perkin Elmer, Enspire). L'acide gallique est utilisé comme standard et les résultats sont exprimés d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait (GAEµg/mg) en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage suivante :

$$Y=0,0034+0,2205 \text{ avec } R^2=0,9624$$

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Une courbe d'étalonnage est tracée à partir des dilutions de l'acide gallique. Une solution mère de l'acide gallique (S1) est préparée en diluant 0,5 mg dans 5 ml du méthanol pour avoir une concentration de (0,2mg/ml). Une série de dilutions allant de 25µg/ml à 200 µg/ml est par la suite préparée comme suit :

25 µg/ml → 25µl de S 1 + 175µl de MeOH

50 µg/ml → 50 µl de S1 + 150 µl de MeOH

75 µg/ml → 75 µl de S1 + 125 µl de MeOH

100 µg/ml → 100 µl de S1 + 100 µl de MeOH

125 µg/ml → 125 µl de S1 + 75 µl de MeOH

150 µg/ml → 150 µl de S1 + 50 µl de MeOH

175 µg/ml → 175 µl de S1 + 25 µl de MeOH

200 µg/ml → 200 µl de S1

Nous mesurons l'absorbance de chaque dilution de la même manière du dosage des polyphénols contenus dans les extraits. Une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique est tracée.

3.2 Dosage des flavonoïdes

● Principe

Le taux des flavonoïdes dans les trois extraits testés : extrait hydrométhanolique hexanolique et butanolique est mesuré par la méthode de microplaques à 96 puits (**Topcu et al., 2006**) avec quelques modifications, en utilisant le réactif nitrate d'aluminium (AlCl_3). Le principe de la technique repose sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes de couleur jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes mesurable au spectrophotomètre à 415 nm.

● Protocole

La technique de dosage flavonoïdes consiste à mélanger 50 µl d'extrait de la plante (1 mg/ml), 130 µl de méthanol, 10 µl de potassium d'acétate 1M (CH_3COOK) et 10 µl de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 40 min. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). L'absorbance a été lue à 415 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (Perkin Elmer, Enspire). L'acide gallique est utilisé comme standard et les résultats sont exprimés d'équivalents Quercétin par mg d'extrait (µg QE/mg) en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage suivante :

$$Y = 0,0048x \text{ avec } R^2 = 0,997$$

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage est tracée à partir des dilutions de l'acide gallique. Une solution mère de la Quercétin (S2) est préparée en diluant 0,5 mg dans 5 ml du méthanol pour avoir une concentration de (0,2mg/ml). Une série de dilutions allant de 25µg/ml à 200 µg/ml est préparée comme suit :

Quercétin 25µg/ml → 25µl de S2 + 175µl de MeOH

Quercétin 50µg/ml → 50µl de S2 + 150µl de MeOH

Quercétin 75µg/ml → 75µl de S2 + 125 µl de MeOH

Quercétin 100µg/ml → 100µl de S2 + 100µl de MeOH

Quercétin 125µg/ml → 125µl de S2 + 75µl de MeOH

Quercétin 150µg/ml → 150µl de S2 + 50µl de MeOH

Quercétin 175µg/ml → 175µl de S2 + 25µl de MeOH

Quercétin 200µg/ml → 200 µl S2 + 0µl MeOH

Nous mesurons l'absorbance de chaque dilution de la même manière du dosage des flavonoïdes contenus dans les extraits. Une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de la Quercétin est tracée.

4 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante *Buxus dioica* L. par la méthode de diffusion en milieu solide

La technique utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits est la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles. Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice d'agents microbiens, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque imprégné de l'extrait à tester (Cavallo *et al.*, 2005).

4.1 Revivification des souches

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 24 heures à une température de 37°C pour obtenir des cultures jeunes avec des colonies isolées qui seront utilisées pour préparer l'inoculum (Moroh *et al.*, 2008).

4.2 Préparation des dilutions des extraits de la plante

Une solution mère à une concentration de 100mg/ml a été préparée par dissolution de 200 mg de l'extrait dans 2ml de DMSO. Une série de dilutions a été réalisée par le transfert de 1ml de la solution mère à 1 ml de DMSO pour avoir la première dilution puis des transferts successifs de 1ml d'un tube en tube ont été faits. Pour le dernier tube, après avoir fait le transfert de 1 ml et bien mélangé avec le DMSO, jeter 1 ml afin d'obtenir 1 ml dans chaque tube. Cinq concentrations sont obtenues allant de 6,25 mg/ml jusqu'à 100mg/ml.

4.3 Préparation d'inoculum

De chaque souche préalablement revivifiée nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et les ont déposés dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0,95% NaCl). Cette suspension est ajustée au standard McFarland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique (DO) entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ ml (CA-SFM, 2012).

4.4 Antibiogramme

● Principe

Cette méthode repose sur la diffusion d'un composé antimicrobienne dans un milieu solide, à partir d'un point spécifique. Après un certain temps de contact entre l'extrait et le micro-organisme, un gradient de concentration est créé (DeBillerbeck,2007). La mesure d'une zone d'inhibition permet d'évaluer l'effet de la substance antimicrobienne sur la souche cible (Karabay-Yavasoglu *et al.* ,2007).

● Ensemencement

A l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, nous réalisons des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélose de MH. Nous répétons l'opération quatre fois en tournant la boîte et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

Des disques de papier filtre, de 6 mm de diamètre, sont préparés et stérilisés. Ils sont ensuite imprégnés de 20 µl des extraits testés dilués dans du DMSO pur, et déposés à la surface de la boîte de pétri ensemencée. Trois répliquas ont été réalisés pour chaque souche.

Un disque témoin est déposé sur la même boîte contenant 10 µl de DMSO pur. Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse au moins 15 minutes pour une pré-diffusion de l'extrait avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h (Bouneb et Saouda, 2016).

● Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des trois essais effectués (Gulluce *et al.*, 2007). La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition (Moreira *et al.*, 2005) comme indiquée dans le tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7: Classification de la sensibilité aux extraits selon le diamètre des zones d'inhibition.

Le diamètre	<8mm	9-14mm	15-19mm	>20mm
La signification	non sensible (-)	Sensible (+)	Très sensible (+ +)	Extrêmement sensible (+++)

4.5 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) consiste à évaluer la concentration très faible d'un agent antimicrobienne, qui est indispensable pour inhiber la croissance d'un micro-organisme (Bousseboua *et al.*, 2001). Elle a été déterminée selon les recommandations de (EUCAST, 2003).

-Dans une microplaque de 96 puits (8x12), nous déposons 200 µl de la solution mère préalablement préparée (100mg/ml).

- Ajouter 100 µl du DMSO au reste des puits

-Transférer 100µl de la solution mère au premier puits contenant le DMSO

-Faire des transferts successifs à raison de ½ d'un puits à l'autre pour avoir des concentrations de 0,78 mg/ml jusqu'à 100mg/ml.

-Ajouter 100µl de bouillon MH dans tous les puits

-Déposer 100 μ l de l'inoculum préalablement préparé d'une densité optique de 0,08-0,1 lue à 620nm

-Faire un contrôle négatif avec 100 μ l du milieu MH qui sert pour vérifier la stérilité du milieu Muller Hinton et un contrôle négatif avec 100 μ l DMSO.

-Incuber les plaques à 37°C pendant 24 h

La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de l'extrait à laquelle aucun trouble n'est observé (EUCAST, 2003).

4.6 Détermination de la Concentration Minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration de substance la plus basse qui laisse au moins 0,01% de germes survivants (Yomeh *et al.*, 2020). Elle a été déterminée selon la méthode décrite par (Moroh *et al.*, 2008 ;Konan *et al.*, 2015; Kouadio *et al.*, 2015) et a été réalisée en deux étapes d'une durée de deux jours .

● Le premier jour

-L'inoculum utilisé pour évaluer la CMI a été dilué à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . Il s'agit de 100%, 10%, 1%, 0,1% et 0,01% de survivants à partir de l'inoculum initial, respectivement.

➤ L'inoculum initial et chaque dilution a étéensemencé en stries de 5 cm sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton.

-Les boites ont été incubées à une température de 37 °C pendant 18 à 24 heures (boîte A).

● Le deuxième jour

-Le lendemain, suite à la lecture de la CMI, un ensemencement en stries de 5 cm chacune a été refait à partir des puits où il n'y avait pas de croissance visible à l'œil nu.

-Les boites ont été incubées à une température de 37 °C pendant 18 à 24 heures (boîte B).

-Le nombre de germes obtenus sur une strie de 5 cm de long de la dilution 10^{-4} a été comparé à celui du contenu de chaque puits expérimental.

-La concentration du premier puits expérimental dont le nombre de germes présente sur la strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB.

✓ En outre, les extraits végétaux testés ont été considérés comme bactéricides ou bactériostatiques en fonction du rapport CMB/CMI (**Berche ,2002;Kamanzi *et al.*, 1991**).

-Ainsi, si le rapport CMB/CMI est :

- Inférieur à 4, la substance est considérée comme bactéricide.
- Supérieur à 4, la substance est considérée comme bactériostatique

5 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante par équivalence en Trolox

L'activité antioxydante des trois extraits hydrométhanolique, hexanolique et butanolique a été déterminée par quatre méthodes : activité de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), le radical cation ABTS, le pouvoir réducteur (FRAP) et la phénanthroline.

5.1 Activité de piégeage de DPPH

● Principe de la réaction

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (donneur de protons), conduit à l'apparition d'une couleur jaunâtre dont l'intensité est proportionnelle à l'activité antioxydante. La réaction est quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotomètre à 517 nm (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).

● Protocol

L'activité anti-radicalaire libre a été déterminée par la méthode de **Blois (1958)**, la technique consiste à :

-Dissoudre 4mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol et garder la solution à -20°C à l'abri de la lumière.

-Rajouter 160µl de la solution DPPH à 40µl de chaque extrait dilué à 800; 400; 200; 100; 50; 25 et 12,5µg/ml .

-Incuber le mélange à 30 minutes.

-Lire l'absorbance du mélange à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (PerkinElmer, EnSpire Multimode Plate Reader).

-Préparer le blanc en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Trolox par mg d'extrait (mg TE/mg Ex) en utilisant la courbe d'étalonnage du Trolox.

5.2 Activité de piégeage de 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)

● Principe de la réaction

La réaction est basée sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de couleur vert bleu en le transformant en ABTS incolore. L'intensité de la réaction est quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotomètre à 734 nm (Chen et Ho, 1997).

Protocole

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al.,(1999)**. Elle consiste à :

-Préparer une solution de l'ABTS avec le persulfate de potassium($K_2S_2O_8$) en mélangeant 19,2mg de ABTS(7mM) ; 5ml H_2O ; 3,3mg ($K_2S_2O_8$) (2,45mM) et 5ml K_2O .

-Garder la solution à l'abri de la lumière pendant 12-16h.

-Rajouter 160 μ l de la solution DPPH à 40 μ l de chaque extrait dilué à 800; 400; 200; 100; 50; 25 et 12,5 μ g/mL .

-Incuber le mélange 10minutes à température ambiante à l'obscurité .

-Lire l'absorbance du mélange à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (PerkinElmer, EnSpire Multimode Plate Reader).

-Préparer un blanc en remplaçant l'extrait par le méthanol.Préparer un blanc en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Trolox par mg d'extrait (mg TE/mg extrait) en utilisant la courbe d'étalonnage du Trolox

5.3 Activité de Phénanthroline

● Principe de la réaction

La mesure de l'Activité antioxydante par la méthode de Phénanthroline est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox. L'ion Fe^{2+} ainsi formé réagit avec l'ortho-

phénanthroline pour donner un complexe de couleur rouge-orange. L'intensité de la réaction est quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotomètre à 510 nm (Yefrida *et al.*, 2023).

● Protocole

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de (Szydłowska-Czerniaka *et al.*, 2008). Elle consiste à :

- Préparer une solution de phénanthroline à 0,5% en ajoutant 0,05g de phénanthroline à 10ml de méthanol et une solution de Ferric chloride FeCl_3 (0,2%) en ajoutant 0,02g de FeCl_3 dans 10ml de H_2O
- Mélanger un volume de 10 μL de chaque extrait (MeOH, EtOAc et n-BuOH) à différentes concentrations (800; 400; 200; 100; 50; 25 et 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avec 50 μL de chlorure de fer (FeCl_3) (0,2 %), 30 μL de solution de phénanthroline (0,5 %) et 110 μL de méthanol.
- Les mélanges obtenus ont été incubés à 30 °C pendant 20 min.
- Préparer un blanc est de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol)
- Lire l'absorbance des mélanges à 510 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Trolox par mg d'extrait (mg TE/mg extrait) en utilisant la courbe d'étalonnage du Trolox

5.4 Activité de pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP)

● Principe de la réaction

Cette méthode est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) du ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{+2}) en formant le ferrocyanure de potassium $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. La réaction aboutit au virage du couleur jaune du Fe^{+3} en couleur bleu vert du Fe^{+2} . L'intensité de la réaction est quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotomètre à 700 nm (Pellegrini *et al.*, 2003).

● Protocole

L'activité antioxydante des trois extraits par la méthode du pouvoir réducteur est déterminée par la méthode de **Oyaizu (1986)** avec quelques modifications. Elle consiste à :

-Mélanger 10 µl de chaque extrait dilué à 800; 400; 200; 100; 50; 25 e 12,5µg/ml avec 40 µL de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1 %)

-Incuber la plaque à 50 °C pendant 20 min

-Ajouter 50 µl d'acide trichloroacétique TCA (10 %), 40 µl d'eau distillée et 10 µl de chlorure de fer $FeCl_3$ (0,1 %)

-Lire l'absorbance du mélange obtenu à 700 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Trolox par mg d'extrait (mg TE/mg extrait) en utilisant la courbe d'étalonnage du Trolox.

4.5. Préparation de la courbe d'étalonnage du Trolox

Une courbe d'étalonnage est tracée à partir des dilutions du Trolox. Une solution mère du Trolox (S2) est préparée par faire dissoudre 1mg du Trolox dans 5 ml du méthanol pour avoir une concentration de (0,2mg/ml). Une série de dilutions allant de 25ug/ml à 200 ug/ml est préparée comme suit :

Trolox (25 µg/ml) → 25 µl Sm + 175 µl MeOH

Trolox (50 µg/ml) → 50 µl Sm+ 150µl MeOH

Trolox (75 µg/ml) → 75 µl Sm + 125µl MeOH

Trolox (100 µg/ml) → 100 µl Sm + 100µl MeOH

Trolox (125 µg/ml) → 125 µl Sm + 75µl MeOH

Trolox (150 µg/ml) → 150 µl Sm + 50µl MeOH

Trolox (175 µg/ml) → 175µl Sm + 25µl MeOH

Trolox (200 µg/ml) → 200µl Sm + 0 MeOH

A noter qu'il faut tester les extraits et voir si leurs valeurs d'absorbance sont incluses dans la courbe d'étalonnage ou non. Si les valeurs d'absorbance ne sont pas incluses dans la courbe

d'étalonnage, une nouvelle courbe doit se faire avec une dilution de 1/10 de la concentration mère. Une série de dilutions à partir de la dilution 1/10 est par la suite préparée pour avoir des concentrations de 2,5ug/ml jusqu'à 20ug/ml.




Nous mesurons l'absorbance de chaque dilution de la même manière que les extraits. Une courbe d'étalonnage de l'absorbance est tracée en fonction de la concentration du Trolox.

Résultats et Discussion

1 Les rendements d'extraction

le taux d'extraction varie en fonction de la partie utilisée de la plante (**Oould El Hadj et al., 2018**). Les rendements en extraits secs après évaporation des solvants sont présentés dans le **tableau 8**. Il est évident d'après ces résultats que le taux d'extraction est proportionnel à la polarité des solvants utilisés. Effectivement, l'extrait butanolique a enregistré le taux le plus élevé, atteignant 14 %, suivi par l'extrait hexanolique avec 5,58% ; tandis que le taux le plus faible est de l'extrait méthanolique, avec une valeur de 4,56%.

Tableau 8:les rendements des extraits

Matière végétale sèche	30g		
Extrait	Hydro-méthanolique	Butanolique	Hexanolique
Masse (g)	15,2	47	19,51
Rendement (%)	4,56	14,1	5,58
Couleur	Vert bouteille	Maron claire	Maron foncé
Photo			

Zehouf et Zaoui (2022) ont enregistré un rendement de 9,3% avec l'extrait aqueux de *Buxus dioïca L.* récoltée de la région de Boughtob, wilaya d'Elbyadh, Algérie. De l'autre côté, **Oulebsir-Mohandkaci et al.(2015)** ont rapporté des taux en polyphénols totaux de 29% et 17% pour les extraits aqueux et méthanolique, respectivement de plante *Buxus sempervirens* récoltée du jardin de la faculté des sciences de l'université de Boumerdes, Algérie.

Cette différence peut être due à la nature de la matière végétale (**Smith-Palmer et al., 2001**). Elle varie en fonction de l'organe récolté ; de la période ainsi qu'au mode de la récolte. Elle est étroitement liée aux facteurs édaphoclimatiques du milieu (pluviométrie, altitude, latitude et la nature du sol) (**Boukemaya et Messaoudi, 2016**) .Le mode de stockage et le conditionnement influent aussi sur le rendement (**Lee et al.,2003**).

2 Taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les taux des polyphénols et des flavonoïdes ont été déterminés à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage indiquées dans les figures **10 et 11**.

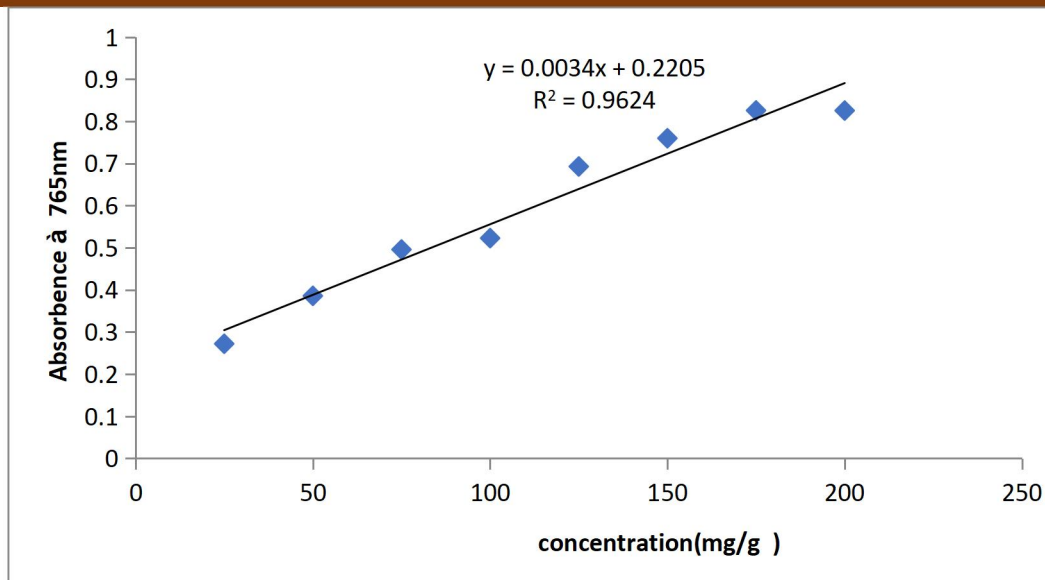


Figure 10: courbe d'étalonnage (acide gallique)

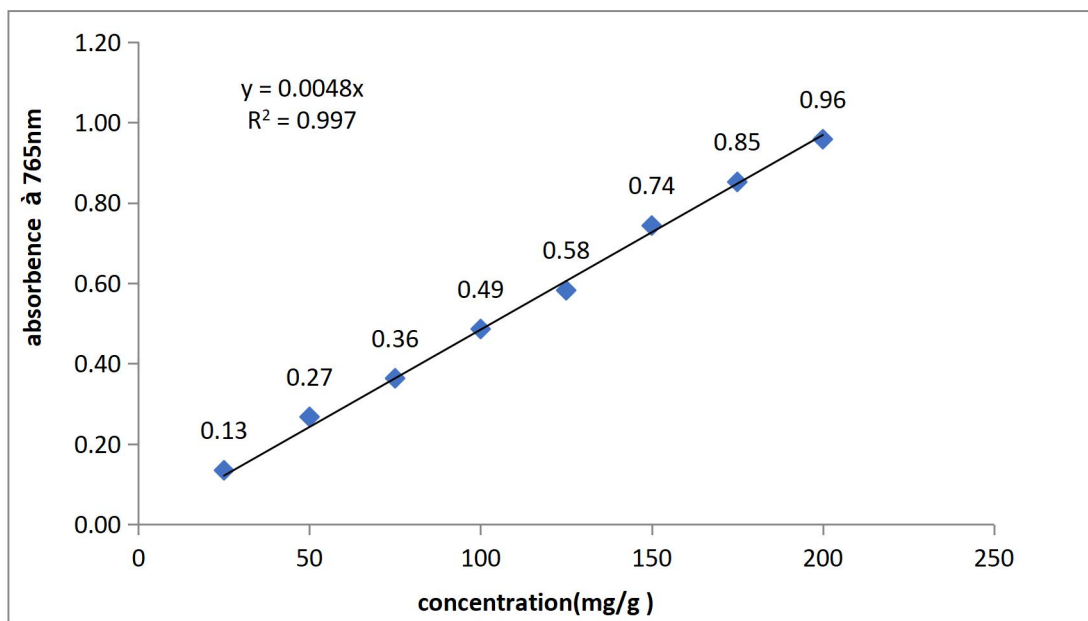


Figure 11: courbe d'étalonnage (Quercetine)

Les résultats obtenus (**Tableau9**) montrent que le taux des polyphénols le plus élevé a été obtenu avec l'extrait hexanolique ($221,35 \pm 3,05 \mu\text{g GAE/ml}$), suivi par l'extrait butanolique ($145,66 \pm 21,22 \mu\text{g GAE/ml}$) et finalement l'extrait méthanolique ($60,56 \pm 4, \mu\text{g GAE/ml}$). Le taux des polyphénols dans l'extrait hexanolique est proche de celui de l'extrait aqueux de la plante *Buxus sempervirens* ($230 \mu\text{g/ GAE/ml}$) (**Oulebsir-Mohandkaci et al .,2015**). Il est à noter que le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols et qu'il peut réagir avec d'autres composés, ce qui aboutit à une surestimation de la quantité réelle de polyphénols (**Tawaha et al., 2007**) .

Tableau 9: Teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes

Extrait	Contenu Flavonoïdes ($\mu\text{g QE/ml}$)	Total phénolique ($\mu\text{g QE/ml}$)
Hydrométhanolique	98,75 \pm 5,00	60,56 \pm 4,75
Hexanolique	87,22 \pm 5,59	221,35 \pm 3,05
Butanolique	44,79 \pm 6,62	145,66 \pm 21,22

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SD (n = 3).

L'extrait hydrométhanolique s'est révélé le plus riche en flavonoïdes (98,75 \pm 5,00 $\mu\text{g QE/ml}$) (**Tableau 9**) par rapport aux extraits hexanolique (87,22 \pm 5,59 $\mu\text{g QE/ml}$) et butanolique (44,79 \pm 6,62 $\mu\text{g QE/ml}$). Ceci peut être expliqué par le fait que le contenu en polyphénols et en flavonoïdes, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction (**Ali-Rachedi et al., 2018; Falleh et al., 2021**).

3 Activité antibactérienne

Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne des trois extraits des feuilles de la plante *Buxus dioïca* L. sur 15 souches d'entérobactéries productrices de la β -Lactamase, en plus de deux souches de référence. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée en utilisant deux paramètres : le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI.

3.1 Zones d'inhibition

Les résultats obtenus dans **les figures 12 et 13** ainsi que **les tableaux 10, 11 et 12**, montrent que la sensibilité des souches testées dépend de l'espèce bactérienne, la souche testée, de la nature de l'extrait et de sa concentration.

3.1.1 Souches pathogènes

- ✓ ***Proteus mirabilis*** : il s'est avéré que la souche de *Proteus mirabilis* (237) était extrêmement sensible à la solution mère de l'extrait méthanolique, avec un diamètre de zone d'inhibition de 20mm. Elle était par contre très sensible à la solution mère des extraits hexanolique et butanolique avec des diamètres des zones d'inhibition de 16 et 14 mm, respectivement.
- ✓ ***Escherichia coli*** : La souche d'*Escherichia coli* 660 était sensible à la solution mère de l'extrait méthanolique (14mm) et résistante aux extraits hexanolique et butanolique. La souche 21 s'est

avérée résistante aux extraits méthanolique et butanolique et sensible à l'extrait hexanolique (9mm avec l'extrait mère). La troisième souche *Escherichia coli* (38) était résistante aux extraits méthanolique et hexanolique et sensible à l'extrait butanolique avec un diamètre de zone d'inhibition de 10mm pour la solution mère. La souche 924 était sensible aux trois extraits avec des diamètres de zones d'inhibition de 14mm à la concentration 50mg/ml de l'extrait méthanolique, 12 mm aux concentrations 50 et 12,5 mg/ml de l'extrait hexanolique et 10mm avec la solution mère et la concentration 6,25 mg/ml de l'extrait butanolique. La souche *Escherichia coli* (730) s'est avérée résistante aux extraits méthanolique et butanolique. Elle était par contre sensible à l'extrait hexanolique avec un diamètre de zone d'inhibition de 13mm, enregistré avec la concentration 6,25mg/ml.

- ✓ *Klebsiella pneumoniae* : Trois souches de *Klebsiella pneumoniae* 31,100 et 340 étaient sensibles à l'extrait méthanolique de la plante *Buxus dioïca* L. avec des diamètres de zones d'inhibition de 8,12 et 10 mm respectivement obtenus avec la solution mère et la concentration 50mg/ml pour la souche 31, la solution mère et la concentration 25 mg/ml pour la souche 100; la concentration 6,25mg/ml pour la souche 340. Les souches restantes étaient par contre résistantes à l'extrait méthanolique. L'extrait hexanolique a exhibé une activité antibactérienne vis-à-vis toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae*, à l'exception de la souche *Klebsiella pneumoniae* 39. D'ailleurs la souche 31 étaient extrêmement sensible à la concentration 25,5mg/ml de cet extrait avec un diamètre de zone d'inhibition de 30mm. Les autres souches étaient sensibles à l'extrait hexanolique avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient entre 8 et 12 mm obtenus aux différentes concentrations. Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* étaient par contre résistantes à l'extrait butanolique sauf les deux souches *K. pneumoniae* 32 et 340 qui étaient sensibles avec un diamètre de zones d'inhibition de 8mm obtenu avec la solution mère pour la souche 32 et les concentrations de 50mg/ à 12,5mg/ml pour la souche 340. La souche *Klebsiella pneumoniae* (192) était sensible à la concentration 50mg/ml de l'extrait méthanolique et de l'extrait butanolique avec des diamètres de zones d'inhibition de 13mm et 12 mm respectivement. Elle était de l'autre côté très sensible à la solution mère de l'extrait hexanolique de la plante (17mm).

3.1.2 Souches de référence

- ✓ *Escherichia coli* ATCC25922 : était très sensible à la solution mère et la concentration 50mg/ml de l'extrait méthanolique (17mm). Elle était de l'autre côté extrêmement sensible à l'extrait hexanolique (29mm avec la concentration 50mg/ml) et résistante à l'extrait butanolique.

✓ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 : était très sensible à l'extrait méthanolique avec un diamètre de zone d'inhibition de 18mm obtenu aux concentrations 50 et 25 mg/ml, tandis qu'elle était sensible aux solutions mères des extraits hexanolique et butanolique avec des diamètres de zone d'inhibition de 13 et 12mm respectivement.

Il est à noter que le DMSO utilise comme témoin négatif n'a exhibé aucune activité antibactérienne vis-à-vis toutes les souches bactériennes testées.

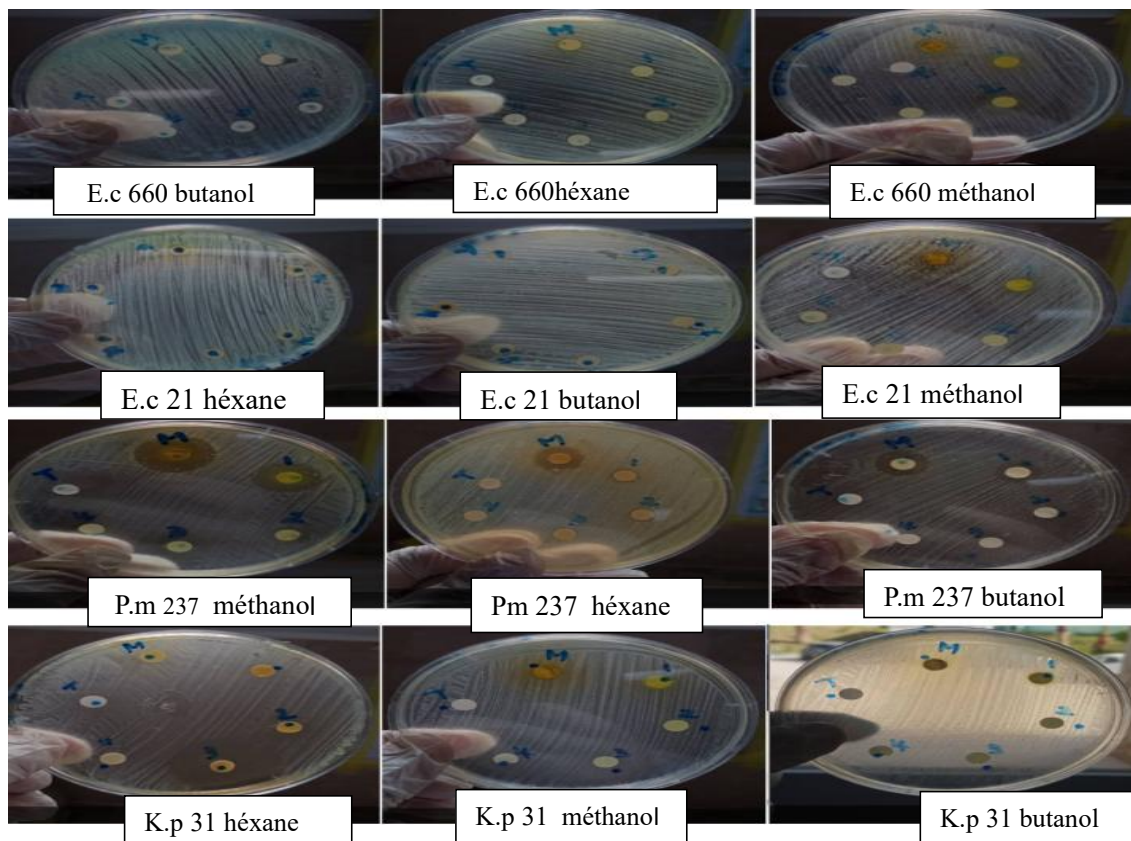


Figure 12: zones d'inhibition des souches pathogènes

E.c: *Escherichia coli*; P.m: *Proteus mirabilis*; K.p: *Klebsiella pneumoniae*

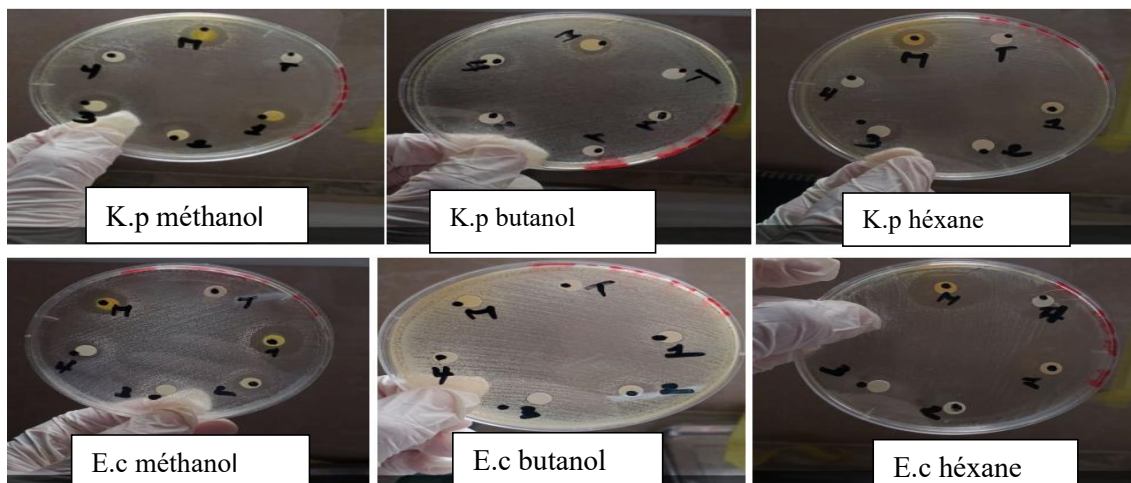


Figure 13: zones d'inhibition des souches de référence

E.c: *Escherichia coli* ; K.p: *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 10: Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait méthanolique de *Buxus dioïca L.*

Souche	Code	Concentration mg/ml						Sensibilité
		Diamètre des zones inhibition en mm						
		100	50	25	12.5	6.25	T (-)	
<i>Proteus mirabilis</i>	237	20 ± 1	16 ± 0,8	12 ± 0,5	12 ± 0,6	6	-	+++
<i>Escherichia coli</i>	730	6 ± 0,3	6	6	7 ± 0	6	-	-
	660	14 ± 0,4	10 ± 0,2	10 ± 0,1	6	6	-	+
	21	6	6	6	6	6	-	-
	579	9 ± 0	9 ± 0	10 ± 0,1	8 ± 0,2	8 ± 0	-	+
	38	6	6	6	6	6	-	-
	924	12 ± 0,4	14 ± 0,4	8 ± 0,1	10 ± 0,2	6	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	8 ± 0,1	8 ± 0,1	6	6	6	-	-
	100	12 ± 0,1	10 ± 0,5	12 ± 0	6	6	-	+
	39	6	6	6	6	6	-	-
	32	6	6	6	6	6	-	-
	353	6	6	6	6	6	-	-
	107	6	6	6	6	6	-	-
	192	9 ± 0	13 ± 0,1	8 ± 0	8 ± 0	6	-	+
	340	8 ± 0	8 ± 0	10 ± 0,2	14 ± 0,2	6	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70603	14 ± 0,3	18 ± 0,4	18 ± 0,3	14 ± 0,1	9 ± 0	-	++
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	17 ± 0,2	17 ± 0,1	12 ± 0,2	7 ± 0	8 ± 0	-	++

T(-): Témoin négatif

Tableau 11: Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait hexanolique de *Buxus dioica L.*

Souche	Code	Concentration mg/ml						Sensibilité
		Diamètre des zones d'inhibition en mm						
		100	50	25	12,5	6,25	T (-)	
<i>Proteus mirabilis</i>	237	16 ± 0,8	8 ± 0,1	8 ± 0,1	6	6	-	++
<i>Escherichia coli</i>	730	11 ± 0,5	8 ± 0,3	6	7 ± 0,2	13 ± 0,1	-	+
	660	6	6	6	6	6	-	-
	21	9 ± 0,2	8 ± 0,3	6	6	6	-	+
	579	6	10 ± 0,2	12 ± 0,3	12 ± 0,3	6	-	+
	38	6	6	6	6	6	-	-
	924	10 ± 0,2	12 ± 0,3	10 ± 0,2	12 ± 0,3	10 ± 0,2	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	0	8 ± 0,1	10 ± 0,2	30 ± 1,2	6	-	+++
	100	14 ± 0	12 ± 0,5	12 ± 0,2	10 ± 0,4	8 ± 0	-	+
	39	6	6	6	6	6	-	-
	32	14 ± 0,4	6	6	6	6	-	+
	353	10 ± 0,2	9 ± 0,1	9 ± 0,1	12 ± 0,3	6	-	+
	107	6	14 ± 0,3	6	6	8 ± 0,1	-	+
	192	17 ± 0,2	12 ± 0,3	11 ± 0	11 ± 0,3	13 ± 0,1	-	++
	340	9 ± 0,1	10 ± 0,1	8 ± 0,1	10 ± 0,2	10 ± 0,2	-	+
<i>K.pneumoniae</i>	ATCC70603	13 ± 0,3	10 ± 0,2	11 ± 0,3	12 ± 0,1	6 ± 0	-	+
<i>E. coli</i>	ATCC25922	24,5 ± 1,4	29 ± 1,5	23 ± 0,5	17 ± 0,3	18 ± 0,2	-	+++

T(-):Témoin négatif

Tableau 12: Diamètre des zones d'inhibition et la sensibilité obtenu par l'extrait Butanolique de *Buxus dioïca L.*

Souche	Code	Concentration mg/ml						Sensibilit é
		Diamètre des zones d'inhibitions en mm						
		100	50	25	12,5	6,25	T (-)	
<i>Proteus mirabilis</i>	237	14 ± 0,7	12 ± 0,6	6	6	6	-	+
<i>Escherichia coli</i>	730	6	6	6	6	6	-	-
	660	6	6	6	6	6	-	-
	21	6	6	6	6	6	-	-
	579	6	6	6	6	6	-	-
	38	10 ± 0	6	6	6	6	-	+
	924	10 ± 0,2	8 ± 0,1	8 ± 0,1	6	10 ± 0,2	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	10 ± 0,2	12 ± 0,3	16 ± 0,5	6	6	-	++
	100	6	6	6	6	6	-	-
	39	6	6	6	6	6	-	-
	32	8 ± 0,1	6	6	6	6	-	-
	353	6	6	6	6	6	-	-
	107	6	6	6	6	6	-	-
	192	8 ± 0,2	12 ± 0,1	7 ± 0,5	6 ± 0	11 ± 0,2	-	+
	340	8 ± 0,1	8 ± 0,1	8 ± 0,2	8 ± 0,1	8 ± 0,1	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	Atcc 70603	12 ± 0,5	6 ± 0,2	6	6	6	-	+
<i>E. coli</i>	Atcc 25922	7 ± 0,1	7 ± 0	8 ± 0	6	6	-	-

T(-):Témoin négatif

3.2 Résultats de la CMI

Pour confirmer quantitativement les résultats obtenus par la méthode de diffusion en disques, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque extrait par la technique de dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 13**.

Tableau 13: Les CMI obtenues des souches.

Souches		Extrait testé	CMI (mg/ml)		
			Méthanolique	Hexanolique	Butanolique
<i>Proteus mirabilis</i>	237		<0,78	<0,78	25
<i>E. coli</i>	730		25	3,12	>100
	660		25	>100	>100
	21		>100	25	>100
	579		3,12	6,25	>100
	38		25	50	50
	924		1,56	1,56	3,12
<i>K. pneumoniae</i>	31		50	6,25	12,5
	100		12,5	1,56	>100
	39		>100	>100	>100
	32		12,5	50	50
	353		3,12	6,25	>100
	107		>100	25	>100
	340		3,12	<0,78	3,12
	192		12,5	3,12	3,12
<i>Klebsiella ATCC70603</i>			3,12	<0,78	3,12
<i>E. coli ATCC 25922</i>			3,12	<0,78	3,12

3.2.1 Souches pathogènes

- ✓ *Proteus mirabilis* 237 était sensible aux trois extraits avec des concentrations minimales inhibitrices <0,78 pour les extraits méthanolique et hexanolique 25mg/ml pour l'extrait butanolique
- ✓ *Escherichia coli* 730 était caractérisée par des concentrations minimales inhibitrice de 25 et 3,12 mg/ml pour les extraits méthanolique et hexanolique. Elle était par contre résistante à l'extrait butanolique dont la concentration minimale inhibitrice est >100mg/ml.
- ✓ *Escherichia coli* 660 était sensible à l'extrait méthanolique avec une CMI de 25 mg/ml. Elle était par contre résistante aux deux autres extraits, hexanolique et butanolique (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Escherichia coli* 21 était sensible à l'extrait hexanolique avec une CMI de 25mg/ml. Elle était par contre résistante aux extraits méthanolique et butanolique (CMI>100 mg/ml).
- ✓ *Escherichia coli* 579 était sensible aux extraits méthanolique et hexanolique avec des CMI de 3,12 et 6,25 mg/ml respectivement. Elle était de l'autre côté résistante à l'extrait butanolique (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Escherichia coli* 38 était sensible aux trois extraits avec des CMI de 25 mg/ml pour l'extrait méthanolique et 50mg/ml pour les extraits hexanolique et butanolique.
- ✓ *Escherichia coli* 924 était sensible aux trois extraits avec des CMI de 1,56 mg/ml pour les extraits méthanolique et hexanolique et 3,12mg/ml pour l'extrait butanolique.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 31 était sensibles aux extraits testés avec des CMI de 50 ; 6,25 et 12,5 mg/ml pour l'extrait méthanolique, hexanolique et butanolique respectivement.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 100 était sensible aux extraits méthanolique et hexanolique avec des CMI de 12,5mg/ml et 1,56mg/ml respectivement. Elle était par contre résistante à l'extrait butanolique (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 39 était résistante à tous les extraits (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 32 était résistantes aux trois extraits testés avec des CMI de 12,5 pour l'extrait méthanolique et 50 pour les extraits hexanolique et butanolique respectivement.

- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 353 était caractérisée par une sensibilité aux extraits méthanolique et hexanolique avec des CMI de 3,12 et 6,25 mg/ml respectivement. Elle était résistante à l'extrait butanolique (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 107 était sensible à l'extrait hexanolique avec une CMI de 25mg/ml. Elle était par contre résistante aux extraits méthanolique et butanolique (CMI>100mg/ml).
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 340 a montré une sensibilité aux trois extraits avec des CMI de 3,12 ; <0,78mg/ml et 3,12mg/ml pour l'extrait méthanolique, hexanolique et butanolique respectivement.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* 192 était sensible aux trois extraits avec des CMI de 12,5 mg/ml pour l'extrait méthanolique et 3,12 mg/ml pour les extraits hexanolique et butanolique

3.2.2 Souches de référence

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922 s'est avérée sensible aux trois extraits testés avec des CMI de 3,12 pour les extraits méthanolique et butanolique et <0,78mg/ml Pour l'extrait hexanolique .
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603 était sensible aux trois extraits avec des CMI de 3,12mg/ml pour les extraits méthanolique et butanolique et <0,78mg/ml pour l'extrait hexanolique.

A notre connaissance peu de travaux ont été réalisés sur l'activité bactériologique des plantes appartenant au genre *Buxus*. **Zehouf et Zaoui (2022)** ont montré que l'extrait méthanolique de la plante *Buxus dioica* L. a exhibé une activité antibactérienne vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* avec une zone d'inhibition de 10mm avec la concentration 5mg/ml, Il n'a par contre montré aucune activité contre la souche *Escherichia coli* ATCC25922. L'extrait méthanolique de la plante *B. macowanii* s'est révélé actif contre *Escherichia coli* ATCC 25922 avec une CMI de 1,2 mg/ml (**Ngobeni et al., 2020**).

La majorité des souches testées ont montré une sensibilité vis-à-vis les extraits par rapport aux antibiotiques testés, dont elles sont multirésistantes. Ceci est expliqué par le fait que les extraits naturels sont riches en plusieurs molécules bioactives ce qui rend la résistance bactérienne à ces molécules difficile (**Vasey,2014**). En fait, les plantes contiennent plusieurs composés phénoliques dotés d'une action antimicrobienne (alkaloids, tanins, flavonoïdes, etc...) (**Ait Kaki et al., 2019**).

A titre d'exemple l'acide coumarique et l'acide benzoïque, constituent des agents de lutte chimique contre les bactéries pathogènes (**Kossonou et al., 2019**).

La sensibilité des souches testées aux trois extraits varie en fonction du solvant utilisé, ainsi le solvant peut influencer la composition phytochimique et donc l'activité antibactérienne d'un extrait (**Balouiri et al., 2016**).

Il est important aussi de noter que la sensibilité des souches aux extraits varie au sein de la même espèce. Ceci peut être expliqués par les différences génétiques entre les souches bactériennes et les facteurs environnementaux liés au milieu de culture de la bactérie (**Woods et al., 2021**) ; (**Saleem et al., 2019**). En outre, l'extrait hexanolique s'est montré actif contre la majorité des souches testées ce qui corrobore les résultats des teneurs en polyphénols où l'extrait hexanolique a enregistré le taux le plus élevé.

La faible sensibilité de certaines souches aux trois extraits de la plante *Buxus dioïca L.* exprimée par des concentration minimales inhibitrices élevées ,peut être expliquée par le fait que les composés responsable de l'action antibactérienne sont de nature hautement lipophile (**Albano et Miguel, 2010**). Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposoluble à s'insérer dans la membrane de ces cellules bactériennes et les endommager (**Khadri, 2018**).

3.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide des extraits

3.3.1 Souches pathogènes

- ✓ ***Proteus mirabilis* 237** : La concentration minimale bactéricide de cette souche était de l'ordre 0,78 mg/ml pour les extraits méthanolique et butanolique et 1,56mg/ml pour l'extrait hexanolique. Le rapport CMB/CMI ≤ 4 indique que les extraits exercent un effet bactéricide sur *Proteus mirabilis* 237.
- ✓ ***Escherichia coli*** : Les trois extraits exercent un effet bactéricide sur toutes les souches d'*Escherichia colis* avec des concentrations minimales bactéricides variant entre 0,78et 25mg/ml. L'activité bactéricide n'a pas été déterminée avec l'extrait méthanolique vis-à-vis la souche 21 et l'extrait butanolique vis-à-vis les souches 21, 730, 660 et 579 en raison de la résistance de ces souches aux extraits.
- ✓ ***Klebsiella pneumoniae*** : Les concentrations minimales bactéricides des souches de *Klebsiella pneumoniae* varient de 0,06 à 0,5 mg/ml. Les trois extraits exercent un effet bactéricide sur ces

souches (CMB/CMI ≤ 4). A noter que l'activité bactéricide n'a pas été déterminée dans le cas de la souche 39 qui était résistante aux trois extraits, la souche 107 avec l'extrait méthanolique et butanolique ainsi la souche 353 avec l'extrait butanolique.

3.3.2 Souches de référence

Les deux souches de référence *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603 et *Escherichia coli* ATCC 25922 étaient sensibles aux trois extraits avec des concentrations minimales bactéricides variant Entre 0,78 et 12,5 mg/ml, sachant que les trois extraits colis exercent un effet bactéricide sur les deux souches de référence (CMB/CMI ≤ 4).

Toutefois, cette action bactéricide de l'extrait polyphénolique sur la cellule bactérienne de mesure encore insuffisamment élucidée (Lakhdar et al.,2012). Plusieurs mécanismes seraient mis en jeu(Bakkali et al.,2008) précipitation des protéines et des acides nucléiques (Rafi et al.,1994), inhibition de la synthèse des macromolécules (AND, ARN, protéines et peptido-glycanes(Combe et al. , 1988), inhibition de la perméabilité membranaire sélective (Bouchikhi, 1994) et détérioration membranaire, inhibition de la glycolyse et déplétion potassique (Cox et al.,1998), modification de la morphologie de la cellule bactérienne (Pattnaik,1995),absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion (Rafi et al.,1994).

L'activité bactéricide des feuilles de *Buxus dioïca* L. serait donc un fondement scientifique à son utilisation dans le traitement des infections aux bactéries multirésistantes.

Tableau 14: Résultats de la CMB

Extrait		Méthanolique			Effet	Hexanolique			Effet	Butanolique			Effet
Souche		CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB/ CMI		CMB mg/m l	CMI mg/ml	CMB/ CMI		CMB mg/ml	CMI mg/m l	CMB/ CMI	
<i>P. mirabilis</i>	237	0,78	0,78	1	Bactéricide	1,56	0,78	1	Bactéricide	0,78	25	0,03	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	730	6,25	25	0,25		3,12	3,12	1		/	/	ND	
	660	12,5	12,5	1		/	/	ND		/	/	ND	
	21	/	/	ND		>100	25	4		/	/	ND	
	579	3,12	12,5	0,25		0,78	6,25	0,06		/	/	ND	
	38	12,5	25	0,5		1,56	25	0,06		1,56	50	0,03	
	924	0,78	1,56	0,5		0,78	12,5	0,06		1,56	3,12	0,5	
<i>K. pneumoniae</i>	31	1,56	25	0,06		6,25	6,25	1		0,78	12,5	0,06	
	100	12,5	12,5	1		1,56	1,56	1		/	/	ND	
	39	/	/	ND		/	/	ND		/	/	ND	
	32	0,78	12,5	0,06		12,5	50	0,25		3,12	50	0,06	
	353	3,12	3,12	1		0,78	6,25	0,12		/	/	ND	
	107	/	/	ND		1,56	6,25	0,06		/	/	ND	
	340	0,78	3,12	0,25		0,78	0,78	1		0,78	3,12	0,25	
	192	3,12	6,25	0,5	3,12	3,12	1	3,12	3,12	1			
<i>K. pneumoniae</i> ATCC70603		3,12	3,12	1	0,78	3,12	0,25	1,56	3,12	0,5			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		1,56	12,5	0,12	1,56	3,12	0,5	1,56	12,5	0,12			

4 Activité antioxydante

Les résultats du **tableau 15** révèlent que l'extrait butanolique présente la plus haute activité de piégeage des radicaux libres DPPH,

Avec une valeur de $(69,67 \pm 0,17 \text{ mg TE/mg})$, suivi par l'extrait hexanolique avec $(69,06 \pm 1,24 \text{ mg TE/mg})$, puis par l'extrait méthanolique avec $(68,26 \pm 0,20 \text{ mg TE/mg})$.

Ces valeurs d'activité antioxydante sont significativement plus élevées que les standards utilisés, à savoir $(5,12 \pm 0,21 \text{ mg TE/mg})$ pour le Trolox et $(4,39 \pm 0,01 \text{ mg TE/mg})$ pour l'acide ascorbique.

Concernant l'activité de pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP), l'extrait méthanolique présente la valeur la plus élevée, avec $(718,12 \pm 39,28 \text{ mg TE/mg})$, suivi par l'extrait hexanolique avec $(696,54 \pm 34,04 \text{ mg TE/mg})$, et enfin l'extrait butanolique avec $(417,24 \pm 56,63 \text{ mg TE/mg})$. Ces valeurs dépassent largement celles des standards utilisés, qui sont de $(5,25 \pm 0,20 \text{ mg TE/mg})$ pour le Trolox et $(3,62 \pm 0,29 \text{ mg TE/mg})$ pour l'acide ascorbique.

Une variation est observée dans l'activité des radicaux libres ABTS par rapport aux résultats de DPPH. L'extrait hexanolique présente la valeur la plus élevée $(109,62 \pm 0,25 \text{ mgTE/mg})$, suivi par l'extrait méthanolique $(108 \pm 0,94 \text{ mgTE/mg})$ et l'extrait butanolique $(102,44 \pm 1,26 \text{ mgTE/mg})$. Ces valeurs d'activité sont également supérieures aux standards utilisés, qui se situent entre $(3,21 \pm 0,06 \text{ mgTE/mg})$ pour le Trolox et $(3,04 \pm 0,05 \text{ mgTE/mg})$ pour l'acide ascorbique.

Dans les tests de Phénanthroline, l'extrait hexanolique affiche la valeur la plus élevée $(408,8 \pm 15,16 \text{ mgTE/mg})$, suivi par l'extrait méthanolique $(405,91 \pm 105,61 \text{ mgTE/mg})$ et enfin l'extrait butanolique $(314,24 \pm 21,46 \text{ mgTE/mg})$. Comparativement, les valeurs des standards, soit $5,21 \pm 0,27 \text{ mgTE/mg}$ pour le Trolox et $3,08 \pm 0,02 \text{ mgTE/mg}$ pour l'acide ascorbique, sont inférieures à nos résultats.

Aftab et al.(2018) de leur côté ont montré que l'extrait méthanolique de la plante *Buxus papillosa* exhibe une faible activité de piégeage du radical DPPH ($IC_{50} 41,2 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$) par rapport à l'extrait aqueux ($IC_{50} 18,4 \pm 2,5$). Le pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP) de cette plante s'est avéré par contre plus significatif dans l'extrait méthanolique

(IC₅₀ 16,6±1,0 µg/ml) en comparaison avec l'extrait aqueux (IC₅₀ 28,7±2,0 µg/ml). Contrairement à nos résultats, **Zehouf et Zaoui (2022)** ont montré que l'extrait méthanolique de la plante *Buxus dioïca L.* est doté d'une capacité significative à piéger le radical DPPH avec une concentration inhibitrice égale à IC₅₀ de 2,01 mg/ml.

L'activité antioxydante des extraits testés pourrait s'expliquer par l'existence de substances polyphénoliques (**Ghedadba et al.,2015**),connues pour leurs activités antioxydantes et biologiques telles que: l'acide p-coumarique (**Chen et al.,2019**), le kaempférol (**Jakimiuk et al.,2022**), la Quercétin et la naringénine (**Nishimura et al., 2013**).

Dans l'ensemble, ces résultats renforcent la corrélation entre la teneur phénolique des extraits de plantes et leur activité antioxydante, comme démontré par l'extrait hexanolique qui affiche la plus haute valeur de polyphénols et la plus forte activité antioxydante. Cette observation est conforme aux conclusions de l'étude menée par (**Shen et al., 2020**).

Tableau 15: Activités anti-oxydante des extraits de la plante *Buxus dioïca L.*

Extrait	DPPH (mgTE/mg)	ABTS(mgTE/mg)	Phénanthroline (mgTE/mg)	FRAP(mgTE/mg)
Méthanolique	68,26± 0,20	108± 0,94	405,91± 105,61	718,12± 39,28
Hexanolique	69,06±1,24	109,62± 0,25	408,8 ± 15,16	696,54± 34,04
Butanolique	69,67± 0,17	102,44± 1,26	314,24 ± 21,46	417,24 ± 56,63
Trolox	5,12 ± 0,21	3,21± 0,06	5,21± 0,27	5,25± 0,20
Acide ascorbique	4,39 ± 0,01	3,04± 0,05	3,08± 0,02	3,62± 0,29

Les résultats sont exprimés en moyenne ±SD (n=3)

Conclusion et perspectives

L'émergence croissante de la résistance aux antibiotiques, notamment celle observée chez les bactéries multirésistantes et en particulier les entérobactéries productrices des β -lactamines, représente une menace sérieuse pour la santé publique à l'échelle mondiale et en Algérie, en affaiblissant l'efficacité des traitements et en augmentant les risques pour la santé. Cette étude est donc une tentative de découvrir de nouveaux agents antibactériens à partir des extraits des feuilles de la plante *Buxus dioïca L.* Les résultats obtenus indiquent qu'à l'exception de la souche *Klebsiella pneumoniae 39*, toutes les autres souches sont sensibles à en moins un extrait, confirmant ainsi le large spectre de l'activité antibactérienne des feuilles de *Buxus dioïca L.*, bien que le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI varient d'une bactérie à l'autre. En outre, l'extrait hexanolique, a démontré une activité antibactérienne significative contre les entérobactéries testées où le diamètre de la zone d'inhibition a atteint 30mm avec la souche *Klebsiella pneumoniae 31*, ce qui est en corrélation avec les résultats indiquant la richesse de l'extrait hexanolique en polyphénols par rapport aux autres extraits. La souche *Proteus mirabilis 237* a montré une sensibilité aux trois extraits, de même que la souche *Escherichia coli 924* et les souches *Klebsiella pneumoniae 340,192* et *31*. La sensibilité des bactéries est complétée par la détermination de la CMI en milieu liquide. Les résultats révèlent que les CMI des extraits varient de 0,78mg/ml pour les souches sensibles à >100mg/ml pour les souches résistantes. De plus, les extraits testés se caractérisent par un effet bactéricide sur toutes les souches démontrant une sensibilité en milieu liquide et dotés de propriétés antioxydantes dépassant les standards utilisés en particulier l'extrait hexanolique.

À la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que la plante *Buxus dioïca L.* est une source naturelle de molécules chimiques possédant des activités antibactériennes et antioxydantes très importantes. Ces résultats pourraient contribuer au traitement des différentes infections causées par des entérobactéries et à pallier le problème de résistance des micro-organismes aux antibiotiques.

Enfin, bien que les résultats obtenus in vitro soient prometteurs, ils ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires pour confirmer les performances de la plante. En perspective, il est recommandé de tester la toxicité de la plante, de caractériser les principes actifs par des méthodes analytiques plus performantes telles que l'HPLC, le GC-SM et le

RMN, de tester l'activité antibactérienne des extraits de la plante in vivo, et de développer des combinaisons entre ces extraits et les antibiotiques ou des compléments à base de cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdel Hadi, H., Dargham, S.R., Eltayeb, F., Ali, M.O.K., Suliman, J., Ahmed, S.A.M., Omrani, A.S., Ibrahim, E.B., Chen, Y., Tsui, C.K.M., Skariah, S., Sultan, A., 2024. Epidemiology, Clinical, and Microbiological Characteristics of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia in Qatar. *Antibiotics* 13, 320.

Adree .K, Alexander K. Dhaliwal, Sokunthearath .S, Ahmad Mahmood, Cécile F., Jose Moran-Mirabal & Maikel C. 2019. Membrane charge and lipid packing determine polymyxin-induced membrane damage.

Aguilar, A. 2016. History, Current Situation, and Future Perspectives on Antibiotics and Antibiotic Resistance. *Int. J. Agric. Biosci.* 2, 109–118.

Ajila, C.M., Prasada Rao, U.J.S., 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food Chem. Toxicol.* 46, 303–309.

Albano, S.M., Miguel, M.G., 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind. Crops Prod.* 33, 338–343.

ALI-RACHEDI.F, MERAGHNI.S, TOUAIBIA.N& MESBAH.S. Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* 2018. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. Vol. 87.* 13-21

B

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79.

- Begum, Z., Mohsin, S., Zojajah, U.K., Rehan, N., Aziz, S.S., 2023. An evaluation of phytochemical constituents of sweet flag (*Acorus calamus*), a Unani herbal medicine. *Int. J. Unani Integr. Med.* 7, 27–37.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D., 2018. Overview of polyphenols and their properties, in: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, pp. 3–44.
- Bellik .Y , Nasreddine. M. Antioxidant and antimicrobial activities of four medicinal plants from Algeria. 2023/3/31 121–128.
- Bianco, F.B., Modjaz, M., Hicken, M., Friedman, A., Kirshner, R.P., Bloom, J.S., Challis, P., Marion, G.H., Wood-Vasey, W.M., Rest, A., 2014. *Astrophys. J. Suppl. Ser.* 213, 19.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bouchikhi .T , 1994. Activite antimicrobienne de quelques huiles essentielles.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I., 2012. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Rev. Génie Ind.* 7, 35–45.
- Boudieb, K., Kaki, S.A.S.-A., Amellal-Chibane, H., 2019. Traditional uses, phytochemical study and morphological characterization of *Pistacia lentiscus* L. fruits from three areas of northern Algeria. *J. Appl. Biosci.* 135, 13788.
- Boukemaya et Messaoudi., 2016. Etude phytochimique de la plante *Inula viscosa* (L) Ait (Asteraceae) et évaluation des activités insecticide et antimicrobienne de son extrait éthanolique
- Bouneb L et Souda I. 2016. Effet antibactérien de *Punica granatum* (cas du pied diabétique). Mémoire de master. Université du 20 aout 1955- Skikda
- Bousseboua, Moussedek; Rahmani .L, Fouad, 2001. Models of Alternating Renewal Process at Discrete Time.
- Bouzabata, 2016. The Genus *Myrtus* L. in Algeria: Composition and Biological Aspects of Essential Oils from *M. communis* and *M. nivellei* : A Review. *Chem. Biodivers.* 13, 672–680.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30.

C

cavallo j D., Chardon H., Chidias H., choutet P., Courvalin p., (2006)-Communiqué de la comité Française de l'Antibiogramme . Société Française de Microbiologie .2eme Ed .65-145

Chou, Y.Y., Chiu, S-K., Lai H-C., et Chang , F-Y., (2009). Tubo-ovarian abscess with *Morganella Morganii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 42: 357- 359.

CA-SFM. 2012. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommendations 2012. <http://WWW.sfm-microbiologie.org/>

Chaughule, R.S., Barve, R.S., 2023. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. *Vegetos* 37, 41–51.

Chidambaram, S.B., Essa, M.M., Rathipriya, A.G., Bishir, M., Ray, B., Mahalakshmi, A.M., Tousif, A.H., Sakharkar, M.K., Kashyap, R.S., Friedland, R.P., Monaghan, T.M., 2022. Gut dysbiosis, defective autophagy and altered immune responses in neurodegenerative diseases: Tales of a vicious cycle. *Pharmacol. Ther.* 231, 107988.

Clair, S., Kirk, R., Coulter, I.D., Saller, R., 2023. A Pragmatic Historical Assessment Tool: A New Systematic Framework for the Collation and Evaluation of Documented Empirical Effectiveness and Safety of Traditional Plant Medicines in the European Materia Medica. *Complement. Med. Res.* 30, 340–353.

Cox, G.F.N., Weeks, W.F., 1988. Numerical simulations of the profile properties of undeformed first-year sea ice during the growth season. *J. Geophys. Res. Oceans* 93, 12449–12460.

Chen and Ho. 1997 The preliminary study of artificial propagation of short-necked clam *Gomphina veneriformis* Lamarck, 1818. *J. Taiwan Fish. Res.* 5(1):31-40.

D

De Billerbeck, E., 2007. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 13, 4858.

E

EUCAST. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID)., (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*; 1-7.

F

Falleh.H, Hafsi.C, Mohsni.I et Ksouri.R. Evaluation of different procedures for the extraction of phenolic compounds from a medicinal plant: *Verbena officinalis*. 2021. *Biologie aujourd'hui*. Volume 215. 133 - 142

G

Ghedadba.N, L. Hambaba, A. Ayachi, M. C. Aberkane, H. Bousselsela & S. M. Oueld-Mokhtar, 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé 118–129.

Guillot .D, Gonzalo. M, Josep .A, Rosselló. P, Claves para los taxones cultivados del género *Buxus* L. en la provincia de Valencia.

Ginko, E., Alajmovic. D, E., Šarić-Kundalić, B., 2023. Ethnobotanical study of traditionally used plants in the municipality of Zavidovići, BiH. *J. Ethnopharmacol.* 302, 115888.

Gu“lac,ti Topc,u a, Mehmet Ay b, , Ali Bilici b,1, Cengiz Sariku“rkcü“, c, ,, Mehmet O“ztu“rk a,c, Ayhan .U, 2006. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem.* 103, 1449–1456.

H

Hama. H, PhD, Moussa .I, MC, Ikhiri. K, P, 2019. Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr.

Hamel .T, de Belair.G, Saci.A, Slimani.A, Boulemtafes.A, Boutabia.L & Telailia.S . Aperçu sur la connaissance actuelle de la flore vasculaire de la région de Filfila (Nord-est algérien).

Harborne, J.B. (1998) Textbook of Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 5th Edition, Chapman and Hall Ltd, London, 21-72.

J

Jakimiuk, K., Wink, M., Tomczyk, M., 2022. Flavonoids of the Caryophyllaceae. *Phytochem. Rev.* 21, 179–218.

K

Kamanzi, Callixte, 1991. . Rapp. Mission.

Khadri S. (2018). Evaluation de l'activité antibactérienne, antioxydante et cicatrisante des brulures thermiques des composés phénoliques extraits de la plante médicinale *Cystustrifolus* de l'Est Algérien. These de doctorat. Université de Badji Mokhtar- Annaba.

Karabay-Yavasoglu ,N Ulku, Sukatar.A, Ozdemir.G, Horzum.Z . Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens* 153–156.

Kossonou .Y K, Kouakou-Kouame. A C, Koffi. A C, Koffi .M,Tano.K. 2019. Activité Antifongique In Vitro des Extraits de Cinq Plantes Locales sur *Colletotrichum Higginsianum*, *Fusarium Oxysporum* et *Rhizopus Stolonifer*, Agents Pathogènes de la Papaye (*Carica Papaya* L.) et de la Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.). *European Scientific Journal* March 2019 edition Vol.15, No.9. 304 -321

Kaur. H, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Boxwood Dieback: Molecular Detection, In-Vitro Fungicide Efficacy, and Host Susceptibility for Managing a New Emerging Disease Caused by *Colletotrichum Theobromicola*.

Kausar, A., Iqbal, M., Javed, A., Aftab, K., Nazli, Z.-H., Bhatti, H.N., Nouren, S., 2018. Dyes adsorption using clay and modified clay: A review. *J. Mol. Liq.* 256, 395–407.

Kıran, T.R., Otlu, O., Karabulut, A.B., 2023. Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *J. Lab. Med.* 47, 1–11.

Konan, D., Bakayoko, A., Tra Bi, F.H., Bitignon, B.G.A., Piba, S.C., 2015. Dynamisme de la structure diamétrique du peuplement ligneux des différents biotopes de la forêt classée de Yapo-Abbé, sud de la Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.* 94, 8869.

Kouadio, B., Brahim, K., Viviane, Y.Y.C., Romuald, O.E., 2023. Micrographic characteristics of eleven medicinal plants used for the traditional treatment of schistosomiasis in the health district of Adzope (Cote d'Ivoire). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 12, 01–05.

Kouadio, N., Guessennd, N., Kone, M., Moussa, B., Koffi, Y., Guede, K., Yao, K., Bakayoko, A., Trabi, H., Dosso, M., 2015. Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9, 1252.

L

Lee et al, 2003. Activité antifongique de l'extrait de l'espèce végétale *Inula viscosa* L.(*Dittrichia viscosa* L.).

Linani, A., Serseg, T., Benarous, K., Bou-salah, L., Yousfi, M., Alama, M.N., Ashraf, G.M., 2023. *Cupressus sempervirens* L. flavonoids as potent inhibitors to xanthine oxidase: in vitro, molecular docking, ADMET and PASS studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 41, 7055–7068.

M

Marmitt, D.J., Shahrajabian, M.H., 2021. Plant species used in Brazil and Asia regions with toxic properties. *Phytother. Res.* 35, 4703–4726.

Moroh J.-L. A., BAHY C., DJE K., LOUKOU Y. G., GUEDE-GUINA. 2008. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.* 77 :44 – 61.

Moreira.V, Luis Ruiz-del-Arbol, Monescillo.A, Arocena.C, Valer.P, Gines.P, Jose .M, Wladimiro .J, and Vicente. A, 2005. Circulatory Function and Hepatorenal Syndrome in Cirrhosis.

Mougenot, A.-L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., Baron, T., 2012. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 33, 2225–2228.

Mukhametov, A., Paliivets, M., Berechikidze, I., Serikkyzy, M., 2023. Evaluating the recovery of bioactive compounds and antioxidant activity of unripe red grape liquid extracts obtained by maceration. *Food Sci. Technol.* 43, e117922.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.

N

Nishimura, F. de C.Y., De Almeida, A.C., Ratti, B.A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Ximenes, V.F., Silva, S. de O., 2013. Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013.

Ngobeni .N, S. S. Mashele, N. J. Malebo², E. van der Watt³ and I. T. Manduna. 2020. Disruption of microbial cell morphology by *Buxus macowanii*. *BMC Complementary Medicine and Therapies.* 20:266

O

Oulebsir-Mohandkaci H, S Khemili-Talbi, F Benzina, F Halouane, 2015. Isolation and identification of entomopathogenic bacteria from Algerian desert soil and their effects against the migratory locust, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758).

Ould El hadj Khelil ,A., Hadjadj, S., Kemassi, Asma, Meriga, Maroua, 2018. Comparaison des méthodes d'extraction des principes actifs de quelques plantes médicinales.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* 44, 307–315.

P

Pattanaik, S.N., Mudur, S.P., 1995. Adjoint equations and random walks for illumination computation. *ACM Trans. Graph.* 14, 77–102.

Pellegrini, N., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., Serafini, M., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 133, 2812–2819.

Perez-Llarena, F., Bou, G., 2009. 946;-Lactamase Inhibitors: The Story so Far. *Curr. Med. Chem.* 16, 3740–3765.

Poole, K., 2004. Resistance to -betalactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 61.

Patrick Berche ,Service de microbiologie, CHU Necker–Enfants–Malades, 149, rue de Sèvres,75015 Paris, France Reçu le 18 février 2002 ; accepté le 8 mars 2002

R

Rafi, A., Spigelman, M., Stanford, J., Lemma, E., Donoghue, H., Zias, J., 1994. DNA of *Mycobacterium leprae* detected by PCR in ancient bone. *Int. J. Osteoarchaeol.* 4, 287–290.

Ravichandran, S., Bhargavi, K.M., Rai, A., Pandey, T., Rajput, J., Sri, R.M.M., 2023. Medicinal plants for curing human diseases. *Insight - Chin. Med.* 6, 570.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.

Reverchon, E., Baldino, L., 2023. Extraction and Analysis of Plant Active Ingredients. *Separations* 10, 383.

Ríos, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100, 80–84.

S

Saleem, M.A., Bhutta, Z.M., Nauman, M., Zahra, S., 2019. Enhancing performance and commitment through leadership and empowerment: An emerging economy perspective. *Int. J. Bank Mark.* 37, 303–322.

Sannidhan M. S., Martis, J.E., Nayak, R.S., Aithal, S.K., Sudeepa K. B., 2023. Detection of Antibiotic Constituent in *Aspergillus flavus* Using Quantum Convolutional Neural Network: *Int. J. E-Health Med. Commun.* 14, 1–26.

Singleton, V. and Rossi, J. (1965) Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Shen, Y., Song, X., Li, L., Sun, J., Jaiswal, Y., Huang, J., Liu, C., Yang, W., Williams, L., Zhang, H., Guan, Y., 2019b. Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 111, 579–587.

Shipunov, A., Lee, H.J., Choi, J., Pay, K., DeSpiegelaire, S., Floden, A., 2020. Not out of the box: phylogeny of the broadly sampled Buxaceae.

Shungube, M., Hlophe, A.K., Girdhari, L., Sabe, V.T., Peters, B.B., Reddy, N., Omolabi, K.F., Chetty, L., Arumugam, T., Chuturgoon, A., Kruger, H.G., Arvidsson, P.I., Qin, H.-L., Naicker, T., Govender, T., 2023. Synthesis and biological evaluation of novel β -lactam-metallo β -lactamase inhibitors. *RSC Adv.* 13, 18991–19001.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18, 463–470.

Sreeja, M.K., Gowrishankar, N.L., Adisha, S., Divya, K.C., 2017. Antibiotic resistance-reasons and the most common resistant pathogens - A review. *Res. J. Pharm. Technol.* 10, 1886.

Steeve, K.T., Marc, P., Sandrine, T., Dominique, H., Yannick, F., 2004. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 49–60.

Sule, R.O., Condon, L., Gomes, A.V., 2022. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022, 1–31.

Szydłowska-Czerniaka et al., 2008. In vitro antioxidant and inhibitory potential of leaf extracts of *Varthemia sericea* against key enzymes linked to type 2 diabetes.

T

Taïbi, K., Aït Abderrahim, L., Boussaid, M., Taïbi, F., Achir, M., Souana, K., Benaïssa, T., Farhi, K.H., Naamani, F.Z., Nait Said, K., 2021. Unraveling the ethnopharmacological

potential of medicinal plants used in Algerian traditional medicine for urinary diseases. *Eur. J. Integr. Med.* 44, 101339.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372–1378.

U

Upson, T.M., J. Grayer, R., Greenham, J.R., A. Williams, C., Al-Ghamdi, F., Chen, F.-H., 2000. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 991–1007.

V

Velmud .P, D., Bortoluzzi. B, D., 2022. Potencial de uso medicinal e místico de plantas utilizadas em rituais de umbanda. *Rev. Eletrônica Científica UERGS* 8, 108–120.

Volpe, A.R., Carmignani, M., Cesare, P., 2023. Hydroalcoholic extract of *Buxus sempervirens* shows antiproliferative effect on melanoma, colorectal carcinoma and prostate cancer cells by affecting the autophagic flow. *Front. Pharmacol.* 14, 1073338.

W

Woods, C.R., Bradley, J.S., Chatterjee, A., Copley, L.A., Robinson, J., Kronman, M.P., Arrieta, A., Fowler, S.L., Harrison, C., Carrillo-Marquez, M.A., Arnold, S.R., Eppes, S.C., Stadler, L.P., Allen, C.H., Mazur, L.J., Creech, C.B., Shah, S.S., Zaoutis, T., Feldman, D.S., Lavergne, V., 2021. Clinical Practice Guideline by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America: 2021 Guideline on Diagnosis and Management of Acute Hematogenous Osteomyelitis in Pediatrics. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 10, 801–844.

Y

Yefrida, Suyan, H., Aziz, H., & Efdi, M. (2018). Comparison of Iron Reduction Methods on the Determination of Antioxidants Content in Vegetables Sample. *Oriental Journal of Chemistry*, 34(5), 2418-2424.

Yomeh. C.V, Bertin. K, Tra Bi, 2020. Activité antimicrobienne de l'extrait total aqueux (ETA) de feuilles de *Mallotus oppositifolius* sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la métilicine

Z

Zehouf .Let Zaoui .K, 2022. Evaluation phytochimique et microbiologique de la *Buxus dioica* de la région de Bougtob Wilaya (memoire de master 2). Université MOULAY Tahar, Saida, Saida.

Zhai, X., Wu, G., Tao, X., Yang, S., Lv, L., Zhu, Y., Dong, D., Xiang, H., 2023. Success stories of natural product-derived compounds from plants as multidrug resistance modulators in microorganisms. *RSC Adv.* 13, 7798–7817.

Sites d'internet

Site 1: <https://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Buxus>

Site 2 : <https://www.creapharma.ch/principes-actifs-phytotherapie.htm>

Site 3 : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio1.html>

Site4: <https://www.universalis.fr/media/relation-structure-fonction-dans-la-famille-des-betalactamines>

Site5: <https://fr.utc.city/1561241>

