

Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* (RUTACEAE), une plante endémique de Madagascar

**S. M. H. Randrianarivo^{1,2}, C. A. Rasolohery^{1,2}, F. N. R. Razafindrakoto³,
R. H. Randriamampionona^{1,2}, S. A. Soavina⁵, T. J. M. Razafimaharavo⁴,
R. Andrianantenaina⁶, R. Letsara^{3,7}, B. Demay de Goustine², R. B. Robijaona^{3,4},
R. M. Rafanomezantsoa¹**

¹Ecole doctorale Géochimie et Chimie Médicinale, Université de Fianarantsoa

²Laboratoire Plante Santé Fianarantsoa

³Ecole doctorale Génies des Procédés et Systèmes Industriels, Agricoles et Alimentaires, Université d'Antananarivo

⁴Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo

⁵Département Chimie, domaine Science et Technologie, Université de Toliara

⁶Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, CNRE

⁷Département Flore du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza, Antananarivo-Madagascar

Correspondant : mrhortensia@gmail.com

Sous-thème 4 : Le développement rural, l'agro-alimentaire, l'élevage et l'agriculture

Résumé

La ressource naturelle malgache regorge plusieurs plantes médicinales et aromatiques. Une plante aromatique parmi la richesse floristique d'Ambositra a fait l'objet de la présente étude. Elle s'est porté sur la détermination des compositions chimiques et de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis*, une plante endémique de Madagascar de la famille des Rutaceae.

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation de type Clevenger. Les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle extraite ont été caractérisées afin d'estimer ses qualités. Leurs constituants chimiques ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse. La technique d'aromatogramme a été utilisée lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle obtenue.

L'huile essentielle extraite des fruits de *Melicope madagascariensis* est constituée majoritairement du (E)- β -ocimène (58,2%), du (Z)- β -ocimène (19,2%) suivi du méthyl chavicol (2.62%) et le δ -cadinène (2.37%). L'activité biologique générée par l'huile essentielle est probablement liée à ses composants majoritaires mais également aux synergies entre ses différents constituants.

Par ailleurs, le test du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle obtenue a montré une inhibition totale vis-à-vis de la souche *Streptococcus pneumoniae*. L'HE étudiée a également un effet inhibiteur significative sur *Bacillus cereus*, *Salmonella enteridis* et *Candida albicans*. Elle a donc un effet antibactérien et antifongique.

L'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* constitue donc une source de composants biologiquement actifs. Elle pourrait ainsi être valorisée en tant que remède contre les infections ORL et pulmonaire. En raison de son arôme fruité, elle pourrait aussi servir d'agents aromatisants.

Mots clés : *Melicope madagascariensis*, huile essentielle, antimicrobienne

1. Introduction

Madagascar est classée parmi les pays hautement riche en diversité biologique avec un taux d'endémicité très élevée (Guillaumet, 1984). Au sein de la flore malgache comptant 12.000 espèces environ, 110 espèces aromatiques sont recensées et réparties dans 33 familles. Elles comprennent 58 espèces autochtones dont 86 % sont endémiques, et 52 % espèces introduites (L. H. Rakotovao, 1996).

Cependant, cette biodiversité remarquable est fortement menacée par une extinction alarmante. La déforestation détruit en moyenne plusieurs milliers d'hectares de forêts par an. En effet, certaines espèces de flore et de faune disparaissent avec la déforestation dont le taux annuel moyen est de 0,55% à Madagascar (Ministère de la Santé publique, 2015). De nombreuses espèces de plantes courent ainsi le risque de disparaître à jamais sans même avoir fait l'objet d'études approfondies pour la caractérisation de leurs compositions chimiques et de leurs activités biologiques. Ceci affecterait la possibilité de découvrir de nouveaux traitements potentiels contre un certain nombre de pathologie comme les maladies infectieuses, avec lesquels, notre pays doit lutter avec un moyen limité. De plus, une forte proportion de la population malagasy fait appel au traitement traditionnel basé sur l'utilisation des plantes. Le recours à l'aromathérapie et à la phytothérapie constitue en effet une solution efficace et moins coûteuse pour améliorer les conditions sanitaires. Les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques abritent plusieurs substances biologiquement actives. Elles sont très utilisées soit pour prévenir, soit pour soulager et même pour guérir certaines maladies. Les huiles essentielles sont largement employées dans divers domaines comme l'aromathérapie, la parfumerie et l'agro-alimentaire. Elles sont dotées d'une activité antimicrobienne à large spectre (F. Haddouchi et A. Benmansour, 2008). De plus, la filière huiles essentielles dispose de réelles perspectives de développement. En effet, ce secteur, à forte valeur ajoutée, peut générer des revenus auprès des populations locales.

Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif de déterminer les compositions chimiques et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des fruits de *Melicope madagascariensis* (RUTACEAE), une plante endémique de Madagascar. Il consiste à l'extraction de l'huile essentielle suivi de la caractérisation de ses propriétés organoleptiques et physicochimique, à l'identification de ses constituants et à évaluation de l'activité antimicrobienne.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté dans le district d'Ambositra, région Amoron'i Mania au mois de juin 2021. La plante a été identifiée sous le nom scientifique *Melicope madagascariensis* par le Dr Rokiman Letsara. Le décocté des feuilles de cette plante est utilisé par la population locale dans le traitement de l'hypertension et les parasites intestinaux.

2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* a été extraite, selon la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Après 3h d'extraction, l'huile essentielle obtenue a été soumise à une centrifugation, puis déshydratée sur sulfate de sodium anhydre. L'huile essentielle ainsi récupérée est ensuite conservée dans des petits flacons en verre opaques, fermés hermétiquement et stockée à une température – 20 °C jusqu'à son usage. Le rendement en HE a été estimé par rapport à la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité (AFNOR, 1986).

2.3. Analyse de l'huile essentielle

2.3.1. Caractéristiques organoleptiques

L'identification des propriétés organoleptiques telles que la couleur, l'aspect, l'odeur a été réalisée avec l'HE obtenue.

2.3.2. Caractéristiques physiques et chimiques

L'évaluation de quelques indices physicochimiques comme la densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acide ainsi que l'indice d'ester a été effectuée selon la norme AFNOR.

2.3.3. Analyse chromatographique

Les constituants de l'huile essentielle obtenue ont été analysés par Chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un CG PE Clarus 580 muni d'un injecteur automatique sous les conditions opératoires suivantes :

- Colonne : ELITE-WAX (30m x 0,32mm x 0.25µm) ; Four : 50 °C à 245 °C (5°C/min)
- Détecteur : FID ; Gaz vecteur : Hydrogène, pression 0,33 bar (4,8 psi)
- Injection : mode split (1/75) ; Intégration : pourcentage d'aire; seuil : 0,02%

2.3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

La propriété antimicrobienne de l'HE a été évaluée sur 8 microorganismes de référence dont 3 souches à Gram positif : *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6301), *Bacillus cereus* (ATCC 13061), *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) ; 4 souches à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 70032), *Salmonella enteridis* (ATCC 13076), *Enterobacter cloacae* (ATCC 700323), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9207) et sur une levure : *Candida albicans*. Elle a été testée selon la méthode de diffusion en milieu solide (gélose) ou méthode des disques (Hayes et Markovic ; 2002). Ainsi, deux disques stériles de 6 mm de diamètre imbibés de 10µl d'huile essentielle sont déposés sur la surface du milieu Mueller Hinton gélosé préalablement inondé par l'inoculum de 10⁶ UFC/ml de germe.

Après 24h d'incubation à une température 37°C, les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés. La sensibilité des différentes souches vis-à-vis de l'HE étudiée est ensuite évaluée en fonction du diamètre des halos d'inhibition selon le classement de Ponce et al. (2003) présenté dans le tableau I.

Tableau I : Classement de la sensibilité des souches

| Diamètre du halo d'inhibition (x) | Degré de sensibilité des germes |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| x < 8 mm | Insensible ou résistante |
| 9 mm < x < 14 mm | Sensible |
| 15 mm < x < 19 mm | Très Sensible |
| x > 19 mm | Extrêmement sensible |

3. Résultats

3.1. Rendement et caractéristiques organoleptiques

Les résultats du rendement d'extraction et des caractéristiques organoleptiques de l'HE sont rapportés dans le tableau II.

Tableau II: Résultats du rendement et caractéristiques organoleptiques de l'HE

| Rendement (%) | Aspect | Odeur | couleur |
|---------------|-----------------|-------------|--------------|
| 0,3 | Limpide, mobile | Type agrume | Jaune orangé |

3.2. Caractéristiques physicochimiques

Les résultats des propriétés physiques et chimiques de l'HE sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Résultats des caractéristiques physicochimiques de l'HE

| Paramètres | Densité relative | Indice de réfraction | Pouvoir rotatoire (apparente) | Indice d'acide | Indice d'ester |
|-------------------------|------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|----------------|
| Valeurs caractéristique | 0,83 | 1,47 | -0,05 | 1,25 | 31,87 |

3.3. Compositions chimiques

L'analyse de l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 42 composés qui représentent environ 94,06% de ces constituants. Les composés ayants un taux supérieur à 1% sont présentés dans e tableau IV

Tableau IV : Résultats des composants chimiques de l'HE

| Constituants | Teneur (%) |
|-----------------------------|-------------------|
| α -pinène | 1.42 |
| β -myrcène | 1.56 |
| (Z)- β -ocimène | 19.24 |
| (E)- β -ocimène | 58.24 |
| α -copaène | 1.09 |
| Linalol | 1.32 |
| (E)- β -caryophyllène | 1.38 |
| méthyl chavicol | 2.62 |
| d-cadinène | 2.37 |

4. Activité microbiologique

Les résultats du test de l'activité de l'HE contre les 8 souches microbiennes sont récapitulés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats du test antimicrobien de l' HE

| Souche | Halo d' inhibition (mm) |
|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Inhibition totale |
| <i>Bacillus cereus</i> | 12 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 7 |
| <i>Salmonella enteridis</i> | 13 |
| <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 |
| <i>Candida albicans</i> | 13 |

5. Discussions

Les échantillons de fruits de *Melicope madagascariensis* ont fourni un taux d'environ 0,3% d'huile essentielle. Ce rendement est inférieur à celui extrait à partir des feuilles collectées sur la Côte Est étudiée par F. Ny Riana Razafindrakoto et al. (2021) avec un taux de 0,4%.

L'huile essentielle obtenue lors du présent travail se caractérise par une odeur de type agrume de couleur jaune orangé. L'HE obtenu à partir des fruits de *Melicope madagascariensis* est une huile légère de densité 0,83. Elle se conserve bien puisque la valeur de son indice d'acide est inférieure à 2 (Kanko et al. 2004).

L'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* est composée principalement du (E)- β -ocimène (58,2%) suivi du (Z)- β -ocimène (19,2%) et accompagné d'autres constituants tels que le méthyl chavicol (2.62%), le δ -cadinène (2.37%), le β -myrcène (1.56%), l' α -pinène (1.42%), l'(E)- β -caryophyllène (1.38%), le linalol (1.32%), l' α -copaène (1.09%). D'après l'étude effectuée par Ny Riana F. Razafindrakoto et al. (2021), l'huile essentielle extraite des feuilles de *Melicope madagascariensis* du Forêt tropicale de la côte est de Madagascar a également comme composants majeurs du (E)- β -ocimène (25.7%) et du (Z)- β -ocimène (12.7%) mais avec des taux inférieurs à ceux obtenus à partir des fruits. Par ailleurs, leurs taux en α -pinène (8.56%), méthyl chavicol (6.25%), (E)- β -caryophyllène (3.21%) sont supérieurs que ceux de la présente étude. Il existe ainsi une similarité entre leurs constituants. Par contre La composition chimique de l'huile de feuille de *Melicope madagascariensis* étudié par Hartley T.G. (2001) a été caractérisée par le limonène (50,1 %) comme composant principal suivi du γ -terpinène (8,8 %), du β -eudesmol (4,0 %), le β -ocimène (3,8%) et l' α -pinène (2,6%). Quant à l'huile essentielle obtenue à partir des fruits de *Melicope pteleifolia* étudié par Hoang Thi Binh et al. (2020), elle est constituée majoritairement du (+)-Sabinène (34.73%), Cis- α -bergamotène (13.15%), Z- α -trans-bergamotol (5.28%), β -myrcène (4.98%), et du 1,3,6-octatriène, 3,7-diméthyl (4.71%). Cette différence de composition peut être engendrée par des diverses conditions, notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de la récolte et la méthode d'extraction (Svoboda et Hampson, 1999).

Les propriétés biologiques des huiles essentielles peuvent être dues principalement à ses composants majoritaires mais également aux effets synergiques avec les constituants minoritaires (Tajkarimi et al., 2010). L'effet synergique de ses différents constituants peut

être également l'origine de ses activités. Selon les études effectuées par Bomfim et al., (2016), Cascone et al., (2015) et Sayyah et al. (2004), il existe une association du β -Ocimène dans les HE ayant des activités anticonvulsivante, antifongique, antitumorale et insecticide. En outre, l'étude menée par Monica R. Loizzo, et al. (2008) sur l'HE de *Laurus nobilis* L. caractérisée par la présence de β -Ocimène (21,83%), 1,8 cinéole (9,43%), α -pinène (3,67%) et le β -pinène (2,14 %) a montré une forte activité antivirale contre le virus du SARS-CoV. Concernant le méthyl chavicol, le travail réalisé par L. C. B. Costa et al. (2015) a décelé son activité antifongique. De plus, C. W. G. de Menezes et al. (2019) ont pu aussi déterminer l'activité insecticide de ce constituant envers le *Spodoptera frugiperda*, un important ravageur du maïs. Par ailleurs, le méthyl chavicol est largement utilisé comme agent aromatisant dans l'industrie alimentaire (De Vincenzi M. et al. 2000). En outre, Pérez-López et al. (2011) ont mis en évidence l'activité antibactérienne du δ -Cadinène contre le *Streptococcus pneumoniae*.

Les résultats obtenus à partir de l'aromatogramme ont montrés que l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* provoque une inhibition totale sur la souche à Gram positif *Streptococcus pneumoniae*. Ce germe hautement pathogène est responsable d'un large éventail d'affections, s'étendant des infections des voies respiratoires supérieures à des infections invasives graves. (Varon E. 2012). Selon l'étude menée par Horne et al., 2001, sur 73 huiles essentielles testées pour leur activité antibactérienne contre *Streptococcus pneumoniae*, il y avait trois d'entre eux qui ont un effet hautement inhibitrices dont les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L., *Aniba rosaeodora* Ducke et *Origanum vulgare* L. L'HE des fruits de *Melicope madagascariensis* a aussi inhibée légèrement la souche à Gram positif *Bacillus cereus*. Parmi les 4 souches à Gram négatif sélectionnés, seul le *Salmonella enteridis* a été sensible à l'HE étudiée. Les souches à Gram positif dont *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* sont donc résistantes à l'HE essentielle étudiée. Lors du test antifongique, levure *Candida albican* s'est montrée sensible. L'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* contient alors des substances ayant des effets sur des micro-organismes pathogènes.

6. Conclusion

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, une étude a été menée sur le *Melicope madagascariensis* afin de caractériser, d'identifier les constituants chimiques et évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de ses fruits.

Le (E)- β -ocimène et le (Z)- β -ocimène ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse comme étant les principaux composants de l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* avec des taux respectifs 58,2% et 19,2%. Ces constituants jouent des rôles importants dans la propriété biologique de l'HE.

Le test antimicrobien a révélé que l'HE obtenue provoque une inhibition totale sur le germe *Streptococcus pneumoniae*. Les souches de *Bacillus cereus*, *Salmonella enteridis* et *Candida albicans* ont été également sensible à l'HE étudiée. L'HE a ainsi une propriété antimicrobienne.

L'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* peut donc être utilisée comme agent naturel dans le traitement des formes graves de pneumonies bactériennes, dont le *Streptococcus pneumoniae* en est la principale cause. Elle peut servir également de candidats potentiels dans la synthèse de nouveaux principes actifs permettant de traiter efficacement des diverses pathologies.

La suite de la présente étude consistera à déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle des fruits de *Melicope madagascariensis* envers les souches testées ainsi que de tester sa toxicité.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements aux équipes du laboratoire Plante Santé (LPS) et du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE).

Références

- AFNOR. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1), Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2), (Volumes 1 et 2). 2000.
- Alejandro Pérez-López, Anabel Torres Cirio, Verónica M. Rivas-Galindo, Ricardo Salazar Aranda and Noemí Waksman de Torres. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the Essential Oil and d-Cadinene Isolated from *Schinus molle* Fruit. *Journal of Essential Oil Research*. 2011.
- Bomfim, D. S., Ferraz, R. P., Carvalho, N. C., Soares, M. B., Pinheiro, M. L., Costa, E. V., et Bezerra D.P. Eudesmol isomers induce caspase-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013; 113(5), 300–306.
- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G.-I., & Guerrieri, E. Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology*. 2015; 173, 28–32.
- Delphin J. R. Rabehaja,, Gabriel Garcia, Julie-Marie Charmillon, Odile Désiréc, Mathieu Paoli, Panja A.R. Ramanoelina, Félix Tomi. Chemical composition of *Melicope belahe* (Baill.) T. G. Hartley (Rutaceae) leaf essential oil from Madagascar. *Natural Product research*. 2017; Vol. 31, No. 2, 224-227
- De Vincenzi M, Silano M, Maialetti F, Scazzocchio B. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*. 2000; 71: 725-729.
- Guillaumet J. L. The vegetation: an extraordinary diversity. Madagascar: Key environment. *Pergamon Press, Oxford*. 1984; p. 27 – 54.
- Haddouchi F, Benmansour A. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire*. 2008; 8, 20-27.
- Hayes A.J., Markovic B. Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 2002; 40: 535-543.
- Hartley T.G. Allertonia. On the taxonomy and biogeography of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae). 2001.

Hoang Thi Binh, Tran Thi Bao Tram, Do Ngoc Dai, Vuong Thuy Tien, Le Minh Tam, Nguyen Van Ngoc. Chemical composition and antibacterial activities of essential oils from fruits of *Melicope pteleifolia* (Champ. Ex Benth.) T.G. Hartley grown in Lam Dong Province, Vietnam. *Academia journal of biology*. 2020; 42(3): 89–94.

Horne DS, Holm M, Oberg C, Chao S, Young DG. Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res*. 2001; 13: 387-392

Kanko C, Sawaliho BE, Kone S, Koukoua G, N'guessan YT. Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie 7*. 2004: 1039-42

Larissa Corrêa Bomfim Costa, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Suzan Kelly Vilela Bertolucci⁴, João Cássia do Bomfim Costa, Péricles Barreto Alves, Edenilson dos Santos Niculau. In vitro antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic. *Revista Ciência Agronômica*. 2015; v. 46, n. 2, p. 428-435.

Ministère de la Santé publique. Politique de la recherche pour la santé. 2015

Ponce A., Fritz R., Del V.C., Roura S. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*. 2003.

Razafindrakoto F.N.R. , Andrianantenaina R., Letsara R., Rafalimanantsoa J., Randriamanantena A.A., Ashande M.C., Mpiana P. T., Ngbolua KN., Robijaona Rahelivololoniaina B. .TLC/GC-FID Analysis and Antioxidant Activity of *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley (Rutaceae) Essential Oil from Madagascar East Coast Rainforest. *Sumerianz Journal of Agriculture and Veterinary*. 2021; Vol. 4, No.1, pp.1-6

Rakotovao L H, Randrianjohany E. Origine et répartition bioécologique des plantes aromatiques de Madagascar - *Biogéographie de Madagascar*. 1996: 187- 94.

Sayyah, M., Nadjafnia, L., & Kamalinejad, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculoides* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 94(2–3), 283–287.

Shin S, Kim JH. *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res*. 2005; 28: 897-901.

Svoboda k.p., Hampson J.B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement, Riverside Campus Ayr -SAC (Scottish Agricultural College). *Auchincruive Ayr, Scotland*. UK.1999.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010; vol.21, p.p.1199-1218.

Varon E. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect*. 2012; 42:361-5.