



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ECHAHID CHEIKH LARBI TEBESSI- TEBESSA

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie appliquée

Domaine science de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie appliquée



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER

Effets de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et de
l'huile essentielle de (*Rosmarinus officinalis*, *Origanum compactum* et
Myrtus communis) contre les germes pathogènes.

Présenté et soutenu par:

Melle. ZEMOULI Fadhila

Melle. SOUALMIA Aya

Devant le jury:

Présidente de jury : Mme. Benhadj Mabrouka MCA Université ECLT-Tébessa

Promoteur: Mr. Mechai Abdelbasset Professeur Université ECLT-Tébessa

Co-Promoteur: Mme. Debabza Manel MCA Université ECLT-Tébessa

Examinatrice: Mme. Chadi Hafida MCA Université ECLT-Tébessa

Le : 08 /06/2023

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2022 / 2023

ملخص :

تهدف هذه الدراسة لقياس الفعالية المضادة للميكروبات لثلاثة زيوت أساسية مستخرجة من نباتات طبية و هي : الأوريغانو , اكليل الجبل والريحان , و من ناحية أخرى على النشاط المضاد لبكتيريا حمض اللاكتيك. حيث يتم اختبارها بمفردها وبالاقتران مع جزيء البكتريوسين شبه النقي من *Enterococcus faecium* بواسطة طريقة انتشار القرص على وسط أجار. ضد ثلاث سلالات دالة (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ، *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 و *Bacillus subtilis* ATCC 9372).

أظهر تقييم النشاط التثبيطي لبكتيريا حمض اللاكتيك أن هذه السلالات السبع تمارس نشاطاً مثبطاً موجهاً ضد السلالات الدالة التي تم اختبارها ، باستثناء *Enterococcus durans* ضد *B. Subtilis* ATCC 9372 حيث لم يتم اكتشاف أي تثبيط بواسطة طريقة الحفر وبالتالي فالنشاط يختلف حسب السلالة المختبرة.

للزيوت الثلاثة المستخدمة تأثيراً مثبطاً و نشاطاً ممتازاً مضاداً لجميع البكتيريا التي تم اختبارها ، مع غياب تأثير للريحان ضد *B. subtilis* ATCC 9372 . كما كشفت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا المتعلق بمزيج كل زيت عطري و FSC عن تأثيرات متباينة اتجاه السلالات البكتيرية التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، الزيوت الأساسية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، التأزر , الأوريغانو , اكليل الجبل , الريحان والمحافظة الحيوية.

Résumé

L'objectif de cette étude a porté d'une part, sur l'activité antimicrobienne de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes médicinales (*Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis*), d'autre part sur l'activité antagoniste des bactéries lactiques. Elles sont testées seules et en combinaison avec la fraction semi-pure de culture d'*Enterococcus faecium* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, vis-à-vis trois souches indicatrices (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372).

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques a montré que les 7 souches lactiques exercent une activité inhibitrice dirigée contre des souches indicatrices testées, sauf *Enterococcus durans* envers *B. subtilis* ATCC 9372 où aucune inhibition n'a été détectée par la méthode des puits et que cette activité varie selon la souche teste. Les trois huiles utilisées ont montré un effet inhibiteur, une excellente activité antibactérienne d'HEs vis-à-vis toutes les bactéries indicatrices testées, sauf MC contre *B. subtilis* ATCC 9372.

La combinaison de chaque huile essentielle et la FSC a révélée des effets dissemblables envers les souches testées.

Mots clés: Bactéries lactiques, Huiles essentielles, Activité antibactérienne, *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis*, *Myrtus communis*, Synergie et bio-préservation.

Abstract:

The objective of this study focused on the antimicrobial activity of three essential oils extracted from three medicinal plants *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* and *Myrtus communis* on one hand and on the antagonistic activity of lactic acid bacteria on the other hand. They are tested both in isolation and in combination with the semi-pure culture fraction of *Enterococcus faecium* by the disk diffusion method on agar medium, against three indicator strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Bacillus subtilis* ATCC 9372).

The evaluation of the inhibitory activity of the lactic acid bacteria showed that the 7 lactic acid strains exert an inhibitory activity directed against the indicator strains tested, except *Enterococcus durans* against *B. subtilis* ATCC 9372 where no inhibition was detected by the well method. So, this activity varies according to the strain tested. The three oils used showed an inhibitory effect, excellent antibacterial activity of EOs against all the indicator bacteria tested, except no activity was observed of *MC* against *B. subtilis* ATCC 9372. The combination of each essential oil and the FSC revealed dissimilar effects towards the bacterial strains tested.

Keywords: Lactic acid bacteria, Essential oils, Antibacterial activity, *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis*, *Myrtus communis*, Synergy and bio-preservation.

Remerciements :

*Le grand merci s'adresse au bon **dieu** le tout-puissant, de nous avoir donné la force, la volonté et la patience, et qui nous a guidé et éclairé notre chemin tout au long de notre parcours jusqu'à ce jour.*

*Notre sincère gratitude va en deuxième lieu à notre encadreur **Mr. Mechai Abdelbasset** pour ses conseils, sa compréhension, ses encouragements sa disponibilité tout le long du travail jusqu'à l'élaboration de ce document.*

Travailler avec vous a été un vrai plaisir.

*Nous tenons à remercier également notre Co-encadreur **Mme. Debabza Manel** pour tous ses efforts, ses conseils, sa gentillesse et son soutien moral. Elle était notre mère avant d'être notre enseignante.*

*Nous tenons également à remercier **Mme. Benhadj Mabrouka** pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.*

*Nous tenons également à remercier **Mme. Chadi Hafidha** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants de faculté qui nous ont enseigné, formé et soutenu durant nos années d'études.

*Nous ne pouvons pas oublier de remercier également les doctorantes **Boutaleb Naima** et **Fares Roufaïda** pour leur aide, patience, motivation et leur encouragement pendant le travail pratique au niveau de laboratoire.*

Et enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon acheminement de cette formation en biologie.

Dédicace :

Je dédie ce travail :

À "Allah" qui m'a donné la force, la volonté et la patience pour pouvoir accomplir ce travail, et qui m'a permis d'arriver là où je suis aujourd'hui.

À ma chère mère, et mon très cher père pour leurs sacrifices, leurs amours inestimables, leurs tendresses, leurs encouragements tout au long de mes études.

Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce n'est jamais suffisant. Je vous aime très fort et j'espère que vous êtes fières de moi.

À Mes chers frères Mohammed, Chouaïbe et Samir et à mes chers sœurs (M, C, S, I, A et Touta) pour leurs encouragement, leurs soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

Je veux dédier aussi un grand merci à mon binôme « Aya » qui a subi cette expérience avec moi ; nous avons formé une bonne équipe. Je voulais simplement te dire ceci : tu es une amie en or. Je te souhaite plein succès dans ta future carrière et bonne chance.

À mon âme sœur « Taima », je te souhaite tout ce que tu veux avec une vie pleine de joie et de succès.

À tous mes collègues de promotion de master 2 microbiologie appliquée, et tous mes collègues d'autre spécialités. Merci pour votre amour et votre amitié vous êtes les meilleurs.

Et À tous ceux qui ont été à mes côtés jusqu'à aujourd'hui.

Je vous aime.♥

Fadhila_♥

Dédicace :

Avec l'aide de DIEU, tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie avec un grand plaisir et une grande fierté :

*A ceux qui ont donné un sens pour mon existence, à ceux qui ont été toujours un synonyme d'amour, de sacrifices, tendresse, patience, confiance, d'aide et compréhension, à la lumière de mes yeux, mes chers parents **Tayeb et Habiba**,*

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous, ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous protège.

*A mes grands parents **Laïch et Mabrouka**, pour leur soutien et leurs prières tout au long de mes études que Dieu vous procure une bonne santé et une longue vie.*

*A ma chère sœur **Belkïs**, pour ses aides et son soutien, merci d'avoir une sœur comme toi dans ma vie.*

*A mes frères **Saadeddine et Youcef Amine**, pour leur support continu et leur amour.*

*A mon fiancé **Abdelmoumen**, ma source d'espoir et de motivation.*

*A toute ma famille et spécialement mes oncles **Saïf, Rabie et Ayoub** et ma tante **Nadjet**, en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé.*

*A ma belle famille et spécialement ma belle mère **Saïda**, pour ses encouragements permanents et son soutien moral.*

*A mon binôme et amie **Fadhila**, qui a été toujours à mes côtés pendant toute mes 5 ans à l'université. Tu es une perle rare et précieuse, je te souhaite une vie pleine de santé, de bonheur et de succès.*

*A mon amie et ma sœur **Zahra**, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde considération, et grâce à elle que j'ai compris c'est quoi la vraie amitié.*

*A mes adorables cousines **Takoua, Dikra et Nada**, je vous aime.*

*A mes amies ainsi qu'à toutes les étudiantes de la **Promotion Microbiologie appliquée**, avec eux j'ai partagée des moments inoubliables.*

Enfin, à tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer, Merci pour vous.

Aya ♡

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Source et partie utilisée des plantes médicinales.	15
Tableau 2 : Les souches lactique utilisées et leurs origines.	16
Tableau 3: Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.....	28
Tableau 4 : Résultat des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HEs des <i>OC</i> , <i>RO</i> et <i>MC</i> sur les souches indicatrices.	33
Tableau 5 : Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par <i>OC</i>	34
Tableau 6 : Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par <i>RO</i>	34
Tableau 7: Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par <i>MC</i>	34
Tableau 8 : Résultats de CMB des souches testées avec les trois HEs (<i>OC</i> , <i>RO</i> et <i>MC</i>).....	35
Tableau 9 : Comparaison entre la CMI et CMB.	35
Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition des souches indicatrice exprimés en mm par la méthode de spots.	38
Tableau 11 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en puits.	40
Tableau 12 : Effet de différentes combinaisons contre les trois souches testées pour les différentes concentrations d'HEs.:	48

Liste des figures

Figure 1: <i>Rosmarinus officinalis</i> après et avants séchage.	13
Figure 2: <i>Origanum compactum</i>	14
Figure 3 : <i>Myrtus communis</i> après et avants séchage.	15
Figure 4 : Dispositif de l’hydrodistillation de type Clevenger.	17
Figure 5: Les étapes d’extraction de l’huile essentielle de <i>OC</i>	18
Figure 6 : La méthode de CMI.	20
Figure 7 : Illustration des étapes du test des spots.	22
Figure 8: Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits.	23
Figure 9 : Effet de l’HE d’ <i>Origanum compactum</i> sur les bactéries indicatrices.	26
Figure 10 : Effet de l’HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur les bactéries indicatrices.	27
Figure 11 : Effet de l’HE de <i>Myrtus communis</i> sur les bactéries indicatrices.	27
Figure 12: Représentation graphique de test de sensibilité des bactéries indicatrices	28
Figure 13 : lecture de la microplaque de <i>OC</i> vis-à-vis les souches indicatrices.	31
Figure 14 : Lecture de la microplaque de <i>RO</i> vis-à-vis les souches indicatrices.	31
Figure 15 : Lecture de la microplaque de <i>MC</i> vis-à-vis les souches indicatrices.	32
Figure 16 : CMB des HEs d’ <i>OC</i> , <i>RO</i> et <i>MC</i> pour les trois souches indicatrices.	34
Figure 17 : Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre <i>S. aureus</i>	37
Figure 18 : Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre <i>S. epidermidis</i>	37
Figure 19: Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre <i>B. subtilis</i>	37
Figure 20 : Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers les souches <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>B. subtilis</i> ATCC 9372 et <i>S. epidermidis</i>	40
Figure 21 : Représentation graphique de l’effet antagoniste des bactéries lactiques envers les souches testées.	41
Figure 22 : Résultat de témoin réalisé avec un antibiotique et le DMSO.	43
Figure 23 : Effet de la combinaison FSC- <i>OC</i> à différentes concentrations sur	43
Figure 24 : Effet de la combinaison FSC- <i>RO</i> à différentes concentrations sur	44
Figure 25 : Effet de la combinaison FSC- <i>MC</i> à différentes concentrations sur <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	44
Figure 26 : Effet de la combinaison FSC- <i>OC</i> à différentes concentrations sur	44
Figure 27 : Effet de la combinaison FSC- <i>RO</i> à différentes concentrations sur	45
Figure 28: Effet de la combinaison FSC- <i>MC</i> à différentes concentrations sur <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.	45
Figure 29: Effet de la combinaison FSC- <i>OC</i> à différentes concentrations sur	45

Figure 30: Effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur	46
Figure 31 : Effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur	46
Figure 32 : Représentation graphique d'effet de la combinaison FSC-OC à différentes concentrations sur les trois souches testées.	47
Figure 33 : Représentation graphique d'effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur les trois souches testées.	47
Figure 34 : Représentation graphique d'effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur les trois souches testées.	48

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

ATCC: *American Type Of Culture Collection.*

B. subtilis : *Bacillus subtilis.*

BL : Bactérie lactique.

BMH : Bouillon Mueller Hinton.

BN : Bouillon Nutritif.

CMB: Concentration Minimale Bactéricide.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

CTX: Céfotaxime.

°C: Degré Celsius.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

E.coli: *Escherichia coli.*

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FSC: Fraction Semi-pure de Culture.

g: Gramme.

GN: Gélose Nutritive.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

h: heure

HCL: Hydrochloric acid.

HE: Huile Essentielle.

kDa: kilo Dalton.

MC: *Myrtus communis.*

MC: *Myrtus communis.*

MH: Mueller Hinton.

MHB : Mueller Hinton bouillon.

ml: Millilitre.

mm: Millimètre.

MRS: Man Rogosa Sharpe.

Nacl: Chlorure De Sodium.

OC: *Origanum compactum.*

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

pH: Potentiel D'hydrogène.

RO: *Rosmarinus officinalis*.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*.

St. thermophilus: *Streptococcus thermophilus*.

UFC: Unité Format Colonie.

V/V : Volume/Volume.

µl: Microlitre.

µm: Micromètre.

Table de matière

ملخص:	i
Résumé.....	ii
Abstract:	iii
Remerciements :	iv
Dédicaces :	v
Liste des tableaux :	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations :	x
Table de matière	xii

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :.....	1
---------------------	---

PARTIE EXPERIMENTALE

1 Cadre d'étude et Objectif générale:.....	10
2 Matériel et méthodes :	10
2.1 Matériel :	10
2.1.1 Matériel non biologiques :	10
2.1.2 Matériels biologiques :	11
2.2 Méthodes :	16
2.2.1 Extraction des huiles essentielles :	16
2.2.2 Revivification des souches bactériennes :	18
2.2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :	18
2.2.4 Etude de l'activité antimicrobienne de FSC des bactéries lactiques :	21
2.2.5 Etude de l'effet de combinaison de l'huile essentielle avec la FSC :	23

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :	26
1.1 Résultat de l'Aromatogramme : La méthode de Vincent.....	26
1.2 Résultats de la CMI :	31
1.3 Résultats de la CMB :	34
2 Résultats de l'activité antimicrobienne de FSC des bactéries lactiques :	36
2.1 Résultats de l'effet antagoniste (test de spot) :	36
2.2 Résultats de test des puits (Détection indirecte) :	39
3 Résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (huile essentielle + FSC) à différentes concentrations sur les souches bactériennes testées:.....	42

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion :	52
Références	Error! Bookmark not defined.
Annexes	53

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :

Bien que certains micro-organismes sont souhaitables pour la production d'aliments, beaucoup sont indésirables car ils peuvent provoquer une détérioration des aliments et engendrer des maladies d'origine alimentaire. Pour protéger les aliments contre ces effets indésirables il est indispensable de faire appel à des procédures en ayant comme objectif, la lutte contre les micro-organismes responsables de cette altération, plusieurs méthodes peut être utilisé seul ou en combinaison pour contrôler les activités microbienne au niveau des aliments à travers l'inhibition de leur croissance et de la germination des spores ou de la destruction de leur forme végétative et sporulé (**Tamime, 2009**).

Malgré la disponibilité de ces méthodes de conservation fiables et adéquates (réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, ...etc.). La contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique qui peuvent avoir des effets négatifs sur la salubrité des aliments et nuire à la santé des consommateurs en raison de leurs effets cancérigènes et tératogènes ou de leur toxicité résiduelle (**Sing, 2018**).

Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention des aliments sécurisés, présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum. Ces techniques sont orientés vers la recherche de substances naturelles d'origine microbien comme les bactériocines des bactéries lactiques qui montrent une activité contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques classiques (**Diep et Nes, 2002**), et d'origine végétale comme les huiles essentielles des plantes médicinales.

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires un moyen de bio-conservation efficace de nombreux produits alimentaires et ce grâce à leur métabolisme. Cependant leur rôles s'est étendu dans plusieurs secteurs, tel que le domaine alimentaire et thérapeutique.

La notion de BL dans les travaux scientifiques s'est formée au début des années quatre-vingt-dix, après que Joseph Lister ait obtenu la première culture en 1873 de *Bacterium lactis*, maintenant connue sous le nom de *Lactococcus lactis* (**Hammi, 2016; Kalbaza, 2018**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes à Gram positif, non mobile, non sporulant, elles sont des anaérobies aéro-tolérants, peuvent avoir des formes coccoides, bacillaires ou cocco-bacillaires (**Peterbauer et al., 2011; Yelnetty et al., 2014**) qui produisent de l'acide lactique comme le produit final majeur de la fermentation du glucose (**Swetwivathana et Visessanguan, 2015**) avec un pourcentage GC de 33 à 55% (**Felis et al.,**

2015).Elles sont généralement connues, étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et ont un rôle dans la fermentation et la conservation des aliments (Naghmouchi et al., 2010). On les emploie surtout dans de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.) dont le principal but d'améliorer la qualité technologique, la qualité organoleptique (saveur et texture) et l'inhibition de la flore d'altération et les germes pathogènes (O'Sullivan et al., 2002).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, on les trouve dans différents niches écologiques et sont fréquemment isolées d'environnements riches en matières organiques telles que les végétaux et les fruits en décomposition mais elles vivent même en association avec des hôtes, tels que l'homme, l'animal, dans un écosystème bactérien comme les tractus gastro-intestinaux et urogénitaux des mammifères (Saad, 2010). Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine .Actuellement, dans l'industrie agroalimentaire, les bactéries lactiques occupent une place importante parmi les auxiliaires de fabrication. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans le secteur laitier (Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010), elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, les salaisons des viandes et des poissons, ainsi qu'en boulangerie et dans la fabrication du vin.

Les bactéries lactiques exigent pour leur croissance des milieux riches en nutriments tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras, les sels, les vitamines (Hammes et Hertel, 2006). Elles sont essentiellement cultivées sur le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) contenant de sources de carbone et d'azote telles que la peptone, le glucose et le Tween 80 (Adamberg et al., 2003; Lairini et al., 2014; Kassas, 2016).

Leur métabolisme principal est la dégradation des glucides en produisant principalement de l'acide lactique (Khalid, 2011). Selon le mode de fermentation du glucose, les bactéries lactiques sont divisées en homo-fermentaires et hétéro-fermentaires :

- La bactérie homo-fermentaire convertit les glucides en acide lactique comme principal produit final en utilisant la glycolyse pour dégrader les hexoses (*Streptococcus, Lactococcus*) (Hammi, 2016).
- La bactérie hétéro-fermentaire produit en plus d'une molécule d'acide lactique, des produits supplémentaires tels que l'éthanol, l'acide acétique, le dioxyde de carbone et une molécule d'ATP en utilisant la voie de pentose phosphate (*Leuconostocs* et certains lactobacilles) (König et Fröhlich, 2017).

La classification des bactéries lactiques était largement basée sur des caractéristiques observables telles que leurs propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Ces

caractéristiques sont souvent appelées phénotype. En général, les bactéries ayant des propriétés très similaires étaient considérées comme appartenant à la même espèce, et les espèces ayant des propriétés similaires étaient classées comme appartenant au même genre (Limsowtin et al., 2002).

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, de nouvelles techniques telles que l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARN 16s des gènes codant pour les protéines ribosomales ou d'autres études du génome ont permis d'aborder la taxonomie bactérienne sous un angle différent. Néanmoins, les BL ne peuvent pas être classées comme un groupe phylogénétique et leur classification actuelle est le résultat d'une taxonomie poly-phasique (Pot et Tsakalidou, 2009; Tahlaoui, 2019).

Les BL appartiennent au phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales*. Il existe environ 500 espèces de BL classées en genres et regroupées en six grands groupes Gram (+) (Felis et al., 2015).

Les genres de bactéries lactiques les plus connues et les plus largement utilisées en industrie alimentaires sont *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* (Egan et al., 2016).

Lactobacillus est le genre le plus répandu de BL. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C (Zhang, 2014).

Les lactobacilles appartiennent à la flore normale de la cavité buccale, urogénitale et du tractus gastro-intestinal. Elles contenant 152 espèces et 14 groupes en 2012 (Salveti et al., 2012) et en 2019, 241 espèces avaient été officiellement reconnues sur la « List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature » (Fangous, 2019).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel : Groupe I « *Thermobacterium* », Groupe II « *Streptobacterium* », Groupe III « *Betabacterium* » (Tamime, 2002; Guiraud et Rosec, 2004).

Le genre *Streptococcus* est divisé en trois groupes : les Streptocoques oraux, Streptocoques pyogènes et autres Streptocoques (Axelsson, 2004; Hardi et whiley, 2006). Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à

2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais sans production de gaz (**Patal et Gupta, 2018; Park et al., 2019**).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (**Stiles et Holzapfel, 1997**). Elle se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer les *St.thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Pilet et al., 2005**).

Les *Enterococcus* sont les plus importants des bactéries lactiques vue sa large distribution environnementale et la grande variété des niches écologiques qu'il occupe, depuis les divers aliments fermentés jusqu'au tractus intestinal humain et animal dans lesquels il joue un rôle bénéfique. En étant membres habituels de la microflore intestinale, les entérocoques peuvent servir comme indicateurs de contamination fécale (**Shepard et al., 2002**).

En 1987 Schleifer et Kilpper-Bälz ont proposé une nouvelle classification dont ils ont transféré certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre : *Enterococcus*. Il s'agit de : *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* qui sont devenues ainsi: *Enterococcus faecalis* « espèce type » *Enterococcus faecium* (**Leclerc et al., 1996**).

Les membres de ce genre sont des homofermentaires, facilement différenciables en se basant sur leurs capacités de croître à 10 et à 45°C, en présence de 6,5% de NaCl, à pH 9,6 et en présence de 40% de bile, 0.04% d'acide de sodium ou dans du lait avec 0,1% de bleu de méthylène, en plus de leur survie après un chauffage à 60°C pendant 30 min (**Hardie et Whiley, 2006**).

Les lactocoques se présentent sous forme de cocci en paire ou en chaînes de longueur variable. Ils sont des homofermentaires qui ne produisent que l'acide lactique. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C. Ils peuvent se développer à 10°C mais pas à 45°C. Comme ils croissent à 4% de NaCl (**Desmazeaud, 1992**).

En dehors des cinq espèces actuellement reconnues, seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. En effet pour l'espèce *Lactococcus lactis* trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris*,

Lactococcus lactis subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières ; *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* et *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (**Axelsson, 2004**).

Les bactéries lactiques sont considérées comme des bactéries bénéfiques car la plus part des genres lactiques ont le caractère probiotique. Le terme "probiotique", issu des termes

Grec “pros” et “bios”, signifie « pour la vie » (**Faure et al., 2013**). Il a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965. En 2002, l’Organisation des Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) et l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont adopté la définition suivante « Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Axelsson, 2004**).

Pour permettre aux espèces et aux souches des bactéries lactiques d’être probiotiques, plusieurs critères de sécurité spécifiques, sont pris en considération. Les critères fonctionnels et technologiques, telles que : l’effet bénéfique démontré sur l’hôte, l'origine de la souche (souche d'origine humaine pour un usage sur des humains), la résistance aux acides gastriques et aux sels biliaires, non pathogène et non toxiques et sans effets indésirables, la capacité à adhérer et à coloniser la muqueuse intestinale, la production des substances d’intérêt (bactériocine, acide lactique), l’effet sur le système immunitaire, possibilité de production à grande échelle et la conservation des propriétés organoleptiques et technologiques (**Metrouh, 2022**).

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (**Caridi et al., 2003**). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d’hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyle et des bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, modifiée ou non post-traductionnelle et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ils ne sont pas des antibiotiques, mais elles ont des qualités antibiotiques puisqu'elles peuvent être bactéricides, c'est-à-dire éliminer des bactéries spécifiques, ou bactériostatiques parce qu'ils ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et qui ont gagné une énorme attention en tant qu'agent de bio-conservation potentiel (**Baptista et al., 2020**).

Les bactériocines peuvent être classées en fonction de leur masse moléculaire, de leur structure chimique, de leur stabilité thermique et enzymatique, de leur mode d'action, de leur activité antimicrobienne ou de la présence de résidus d'acides aminés modifiés après traduction (**Jiong et al., 2017**). Klaenhammer, a proposé de classer les bactériocines en quatre principales classes en se basant sur leurs structures primaires et tridimensionnelles et sur leurs modes d'action (**Taale, 2016**).

Les bactériocines de classe I regroupe tous les peptides antimicrobiens thermorésistants subissant des modifications post-traductionnelles et contenant certains acides aminés inhabituels. Elle se subdivise en trois sous-classes (les lantibiotiques, les labyrinthopeptides et les sactibiotiques). Les lantibiotiques ou bactériocines de la sous-classe Ia sont de petits peptides (≤ 5 kDa ; de 19 à 28 acides aminés). Le lantibiotique le mieux caractérisé est la nisine synthétisée par *Lactococcus lactis* (Taale, 2016).

Les bactériocines de la classe II forment un groupe hétérogène de peptides de taille inférieure à 10kDa, ne possèdent que les acides aminés standards et ne subissent pas de modifications post-traductionnelles.

Les molécules de 3^{ème} classe sont des protéines d'une masse moléculaire supérieure à 30 kDa, elles sont thermolabiles et ne possèdent pas d'acides aminés modifiés.

Les bactériocines de classe IV sont caractérisées par une structure cyclique, elles sont synthétisées par voie ribosomales et subissent des modifications post-traductionnelle comme la création d'une liaison entre le premier et le dernier acide aminé (Fernandez, 2014).

L'activité antimicrobienne des bactériocines des bactéries lactiques s'exerce essentiellement par deux principaux mécanismes : Adsorption de la bactériocine à la surface cellulaire, suivi de la formation de pores sur la membrane plasmique de la cellule cible en provoquant une perméabilité de celle-ci et donc la mort cellulaire et inhibition de la synthèse du peptidoglycane constituant principal de la paroi des bactéries Gram positif (Bauer et Dicks, 2005; Da Silva Sabo et al., 2014).

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire. L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée, les produits à base d'œufs liquides pasteurisés, les fromages et d'autres produits laitiers. En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires. Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides etc...., La bactériocine sera alors libérée dans les produits au cours de la conservation comme bio-conservateur (Ghalfi, 2006; Galvez et al, 2007).

Dans la recherche de méthodes alternatives de lutte contre les germes pathogènes et

ceux qui causent la détérioration des aliments, la recherche s'oriente vers des alternatives moins coûteuse et moins dangereuse pour la lutte contre des bactéries multi-résistantes, notamment l'utilisation des plantes médicinales. L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément et l'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours des dernières années (**Benkiki, 2006**).

En effet, pour la plupart le choix s'est porté sur l'utilisation des huiles essentielles ; celles-ci, sont des molécules naturellement présentes dans différentes parties des plantes et obtenues par divers méthodes d'extraction.

Il existe plusieurs définitions des huiles essentielles, mais la plus précise est probablement celle proposée par Schilcher, Hegnauer et Cohn-Riechter, qui a été résumée par Sonwa : "Les huiles essentielles sont des produits ou des mélanges de produits, qui se forment dans le cytoplasme et sont normalement présents sous forme de minuscules gouttelettes entre les cellules. Elles sont volatiles et aromatiques". Elles sont composées de "mélanges de substances odorantes et inodores", une substance odorante étant définie comme un "composé chimiquement pur qui est volatil dans des conditions normales et qui, en raison de son odeur, peut être utile à l'organisme" (**Echchaoui, 2018**).

Une caractéristique importante des HE et de leurs composants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permettra de partitionner avec les lipides de la membrane cellulaire des bactéries et des mitochondries, perturbant les structures cellulaires afin de les rendre perméables (**Solórzano-Santos et Miranda-Movales, 2012; Perricone et al., 2015**).

Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (**Dung et al., 2008**), d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances grasses, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**Gachkar et al., 2007**).

Notre contribution vise à tester l'effet synergique des HEs de trois plantes ; *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis* et des bactériocines semi-pures extraites à partir de bactéries lactiques contre des bactéries pathogènes. La partie bibliographique, qui a été résumée dans cette introduction générale, portant essentiellement sur des données récentes sur les bactéries lactiques, leur taxonomie, leur écologie, leur métabolisme et leur importance dans le domaine agroalimentaire. Aussi, l'étude des huiles essentielles d'une manière générale.

Une partie expérimentale présentera les matériels et les méthodes utilisées, l'ensemble

des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

Elle finira par une conclusion générale résumant les résultats obtenus.

PARTIE
EXPERIMENTALE

1 Cadre d'étude et Objectif générale :

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie Appliquée de la faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie, de l'Université Larbi Tébessi de Tébessa pendant une durée d'un mois et 15 jours de l'année universitaire 2023. Dans cette partie expérimentale nous avons traité les deux axes suivants:

- Le premier axe :
 - Extraction des huiles essentielles des trois plantes médicinales (*Rosmarinus officinalis*, *Origanum compactum* et *Myrtus communis*).
- Le deuxième axe:
 - L'étude de l'activité antimicrobienne de ces HE contre les bactéries pathogènes.
 - L'obtention de la fraction semi-pure de la bactériocine à partir de 07 souches de bactéries lactiques et l'étude de leur pouvoir antimicrobienne.
 - L'étude de l'effet de synergie des fractions semi-pures des cultures des bactéries lactiques et les huiles essentielles contre les bactéries pathogènes.

2 Matériel et méthodes :

2.1 Matériel :

2.1.1 Matériel non biologiques :

2.1.1.1 Appareillages :

- Un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger, utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, il se compose de trois compartiments essentiels :
 - Une chauffe ballon.
 - Un ballon en verre à fond rond de 1 litre.
 - Un réfrigérant.
- Autoclave 120°C.
- Balance électrique de précision.
- Etuve à 37°C.
- Plaque chauffante.
- Réfrigérateur (-20°C à 5°C).
- PH mètre.
- Agitateur.

2.1.1.2 Verrerie :

- Bêchers (500 ml).

- Flacons stériles 250 ml.
- Pipettes graduées 10ml.
- Pipettes Pasteur.
- Tubes à essai.

2.1.1.3 Outils :

- Boîtes de Pétri.
- Bec Bunsen.
- Micropipette 1000µl.
- Micropipette 200µl.
- Pince.
- Portoirs.
- Disques en papier (Wattman n°4).
- Ecouvillons.
- Des microplaques à 96 puits.
- Cônes bleus et jaunes.
- Tubes Eppendorf.
- Tubes coniques.
- Eaux distillées et eaux physiologiques.

2.1.1.4 Milieux de culture :

- Mueller Hinton (MH).
- Bouillon Nutritif (BN).
- Gélose Nutritive (GN).
- Gélose de Man, Rogosa et Sharpe (MRS).
- Bouillon MRS.
- Tween (80).
- DMSO.

2.1.2 Matériels biologiques :

2.1.2.1 Matériels végétales :

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, nous sommes intéressés à l'extraction de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum compactum* et *Myrtus communis* provenant de la région Tébessa et Souk Ahras. Notre choix est porté sur ces plantes aromatiques, car elles sont très répandues en Algérie et largement utilisées en plusieurs

domaines.

2.1.2.1.1 *Rosmarinus officinalis* :

Le Romarin connu sous son nom scientifique *Rosmarinus officinalis*, il est dérivé du mot latin ros (rosée) et marinus (mer) qui signifie «rosée de la mer» (**Begum et al., 2013**), leur origine le sud de l'Europe, notamment les régions côtières de la mer Méditerranée (**Belbey, 2014**). On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il est très exigeant en lumières et en chaleur, et résistant à la sécheresse (**Benikhlef, 2014**) est l'une des plantes les plus populaires en Algérie puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (**Berkane, 2015**) où elle y est largement répartie et recouvre plus de 70000 ha du territoire national (**Aouati, 2016**).

Cette plante appartient à la famille des *Lamiaceae* ou *Labiatae* (**Mosayeb et al., 2016**), est un arbrisseau vivement rameux, touffu, toujours vert (feuilles persistantes), très aromatique, de 0,5 à 2 mètres de haut. Il possède des tiges ligneuses sub-arrondies à écorce brun foncé, avec des feuilles sessiles opposées, étroites et entières (**Marion, 2017**). Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* sont de couleur verte sombre luisante à la face supérieure et blanchâtre en dessous (**Mecheri, 2017**).

Le romarin est couramment utilisé comme épice pour sa saveur et son arôme, et en raison de ses propriétés chimiques, biochimiques ou organoleptiques spécifiques, le romarin est utilisé à des fins thérapeutiques, aromatiques et diététiques ou gastronomiques. Il a également des propriétés stimulantes, toniques et médicinales, et il est utilisé dans la parfumerie, l'aromathérapie, les produits industriels et pharmaceutiques (**Kondo et al., 2018**). Parmi les utilisations médicinales pharmacologiquement validées du romarin figurent les effets antibactériens, anticancéreux, antidiabétiques, anti-inflammatoires et anti-nociceptifs, antioxydants, anti-thrombotiques, antiulcérogènes, améliorant les déficits cognitifs, antidiurétiques et hépatoprotecteurs (**Johnson, 2015**).

La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a été collectée au mois de Mars 2023 dans la région de Hammamet de la wilaya de Tébessa. Après la récolte, la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant quelque jour. La partie utilisée a été d'abord coupée en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.



Figure 1: *Rosmarinus officinalis* après et avants séchage.

2.1.2.1.2 *Origanum compactum* :

Origanum compactum est une plante herbacée vivace. Son odeur est aromatique, et sa saveur amère, un peu âpre et aromatique (Chafai et al., 2014). Les tiges sont toutes dressées, grêles, velues de longues 20 cm à 1 m, à feuilles opposées, pétiolées, presque entières, plus ou moins velues sur les bords de forme ovale et ponctuées de glandes (Il s'agit de minuscules poches à huile essentielle) (Ait Youcef, 2006). Les inflorescences sont en épis denses et courtes, très violettes, de grandes fleurs opposées (5-12 mm), sessiles. Dans cet épi, les fleurs sont situées à l'aisselle des feuilles (qui égalent ou dépassent le calice); ces fleurs restent contiguës après la floraison (Belkamel et al., 2013).

La principale caractéristique morphologique de cette espèce est la présence d'un organe de secrétariat (trichomes glandulaire et non glandulaire). Cette structure sécrète des huiles essentielles avec une saveur unique, qui est principalement due à ses composés majeurs tels que le carvacrol, le thymol, etc (Bouyahya et al., 2016).

Origanum compactum pousse spontanément dans les forêts, les substrats calcaires, les arbustes et les pâturages rocheux des plaines et des basses montagnes ; se trouve au Maroc, sud-ouest de l'Espagne et Afrique du Nord (Belkamel et al., 2013).

Les feuilles séchées sont utilisées en tant que médicaments et arômes. La plante séchée et fumée est utilisée comme antiseptique et désinfectant, bonne pour le rhume, les bronchites, les céphalées. L'infusion de la poudre de la plante (les feuilles et les inflorescences) est un excellent remède pour la diarrhée et les troubles intestinaux. L'HE de cette espèce est en général considéré comme un tonifiant et un bon stimulant mental et sexuel (Chafai et al., 2014).



Figure 2: *Origanum compactum*.

2.1.2.1.3 *Myrtus communis* :

Le mot *Myrtus* vient de grec Myrtos, lui-même dérivé de Muron qui signifie parfum, cela indique que toute la plante est aromatique, communis signifie commun (**Beniston, 1985**). Le *Myrtus communis* est une plante de la famille des *myrtacées* qui pousse spontanément et en abondance dans les régions méditerranéennes, commune dans le Tell et sur le littoral du centre (**Mimica-Dukic et al., 2010**).

C'est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à tiges très ramifiées, dès la base; ses buissons touffus et aromatiques. La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices surtout au niveau des feuilles. Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longue que larges, à nervation pennée, persistantes, opposées, à très court pétiole, coriaces et d'un vert brillant. Les rameaux sont de taille fine de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse (**Barboni, 2006**). Les fleurs apparaissent au début de l'été; elles sont grandes 10-15 mm de long, axillaire, solitaires longuement pédonculées, odorantes, de couleur blanche, calice à un tube soudé à l'ovaire, à 5 lobes étales, 5 pétales, et nombreuses étamines et un style, à stigmate simple (**Beloued, 2001**). Les fruits sortent à l'automne, ce sont des baies ovoïdes 6-8 mm noires bleuâtres à peau charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice. Ces fruits sont comestibles mais âpres et astringents (**Barboni, 2006**).

Le myrte est une plante médicinale aromatique, endémique à la région méditerranéenne. Le myrte commun pousse au niveau de la mer à 500-800 m d'altitude (**Migliore, 2011**). En Algérie, il est commun dans les Tell et les forêts du Littoral Algéro-constantinois.

Le Myrte commun est doté de vertus médicinales notamment utilisé comme antiseptique et désinfectant mais également pour ses propriétés balsamiques. Ce sont les qualités aromatiques et médicinales du myrte qui favorisent son utilisation dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. D'après **Mimica-Dukic et al., (2010)**, le *Myrtus* est utilisé pour lutter contre les bronchites et les dilatations bronchiques, les catarrhes muco-purulentes des voies respiratoires et urinaires, la tuberculose pulmonaire, la sinusite, les otites, les diarrhées, les prostatites, et les hémorroïdes. Il est connu également par leur effet hypoglycémique.



Figure 3 : *Myrtus communis* après et avants séchage.

Tableau 1 : Source et partie utilisée des plantes médicinales.

Non scientifique	Partie utilisée	Lieu d'échantillonnage	Date d'échantillonnage
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Partie aérienne (Les feuilles)	Hammamet de la wilaya de Tébessa	01 Mars 2023
<i>Origanum compactum</i>	Partie aérienne (Les feuilles)	Stah Guentis-Tébessa	06 Mars 2023
<i>Myrtus communis</i>	Partie aérienne (Les feuilles)	souk Ahras	02 Mars 2023

2.1.2.2 Souches bactériennes:

- Les souches de référence utilisées appartiennent à la collection de notre laboratoire sont :
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.
 - *Bacillus subtilis* ATCC 9372.
- Les souches lactique utilisées dans notre travail (07 souches lactique) sont isolées et identifiées par Melle Zouari Souaad dans le cadre d'un mémoire de (LMD) sous la direction de Pr Mechai Abdelbasset et Dr Debabza Manel. Les souches lactiques sont identifiées au niveau de l'espèce et la souche par la galerie biochimique API 50 CHL.

Tableau 2 : Les souches lactique utilisées et leurs origines.

Souches lactiques	Origine d'isolement	Espèce présumé
JMZ12	Klila	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KMQ02	Jben	<i>Enterococcus faecium</i>
JMQ23	Klila	<i>Enterococcus faecium</i>
JMZ05	Klila	<i>Enterococcus durans</i>
ULZ15	Jben	<i>Lactococcus lactis sp lactis</i>
KMQ22	Klila	<i>Enterococcus faecium</i>
JMZ25	Jben	<i>Lactobacillus plantarum</i>

2.2 Méthodes :**2.2.1 Extraction des huiles essentielles :**

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum compactum* et *Myrtus communis* est réalisée au niveau du laboratoire de recherche sur les Molécules Bioactives et Applications de la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie université de Tébessa.

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 04). Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé à l'alcool puis rincé à l'eau distillée pour éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

a) Principe :

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple la plus anciennement utilisée (Mebarki, 2010; Abdelli, 2017). Le principe consiste à faire bouillir le mélange d'eau et de

plantes pour lequel l'huile essentielle est souhaité extraire, les cellules végétales s'éclatent et libèrent des molécules odorantes, qui sont ensuite emportées par la vapeur d'eau générée ils passent dans un refroidisseur d'eau, où ils se condensent, qui sont ensuite collectés dans un récipient.

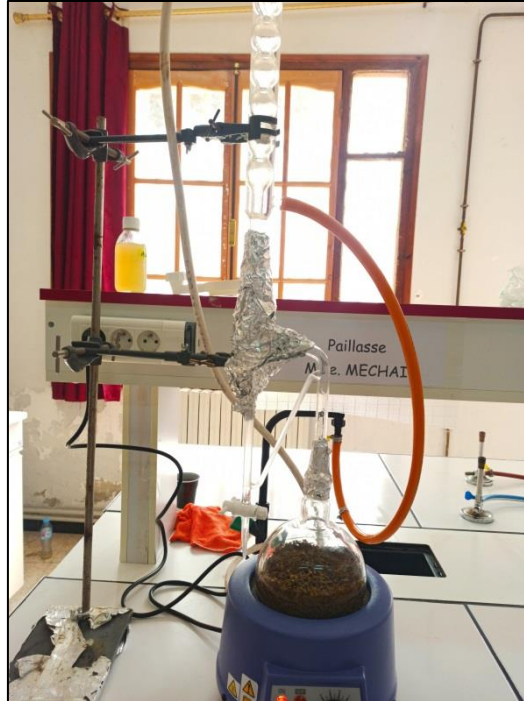


Figure 4 : Dispositif de l'hydrodistillation de type Clevenger.

b) Technique :

Pour faire l'extraction des plantes (*RO*, *OC* et *MC*), les étapes suivantes ont été réalisées :

- Peser 50g de la matière végétale (découper les feuilles de *OC* en petits morceaux) et l'introduire dans un ballon d'une capacité de 1000ml, puis ajouter 500ml d'eau distillée.
- Mettre ce ballon dans le chauffe-ballon ensuite introduire l'ouverture du dispositif dans le ballon (Figure 05).
- Alimenter le réfrigérant en eau et établir un équilibre entre les volumes d'eau présents dans l'appareil pour assurer la condensation des huiles.
- Allumer le chauffe-ballon.
- Après deux heures d'extraction, ouvrir le robinet afin de dégager l'eau florale, puis l'huile essentielle a été recueillies et conservées à 4C° dans un tube fermé et enveloppé par l'aluminium.

Remarque : Les mêmes étapes ont été appliquées pour les autre plantes (*RO* et *MC*).

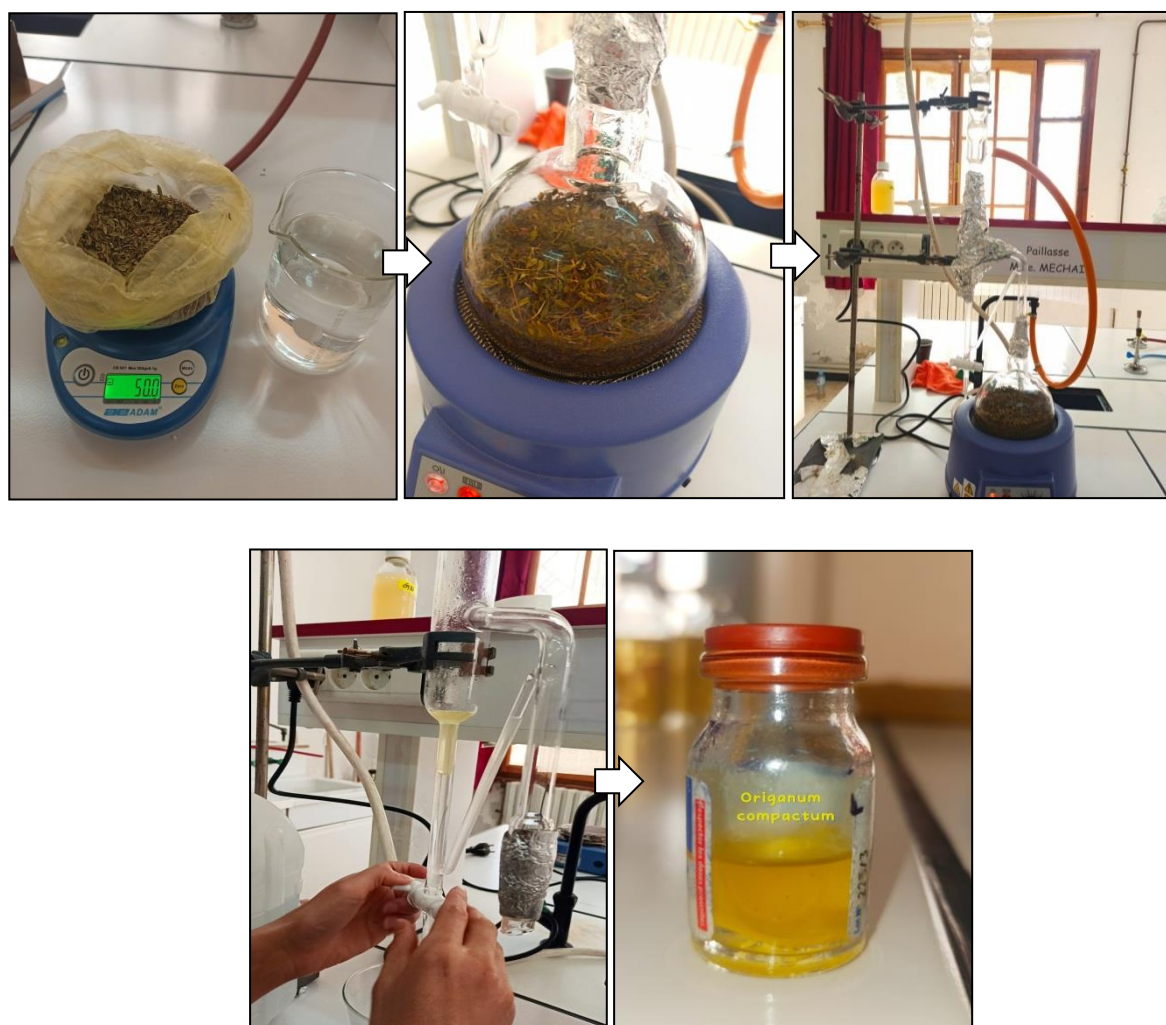


Figure 5: Les étapes d'extraction de l'huile essentielle de *OC*.

2.2.2 Revivification des souches bactériennes :

A partir des souches testées de notre collection, conservées dans du glycérol à -16°C , nous avons prélevé un petit volume à l'aide d'un écouvillon que nous avons par la suite trempé dans un tube de 5 ml de bouillon nutritif pour chaque souche de référence et dans un tube de 5 ml MRS bouillon pour chaque souche lactique dans une zone stérile. Les tubes ont été incubés pendant 24h à 37°C .

2.2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

2.2.3.1 Aromatogramme : La méthode de Vincent.

a) Technique :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été testée par la méthode de diffusion de disque en milieu gélosé selon les recommandations de la Comité National pour

les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001).

Des cultures bactériennes jeunes pour les souches indicatrices ont été mises en suspension dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl). Ces inoculum ont été étalés avec des écouvillons stériles sur la surface de boîtes de Pétri contenant de la Mueller-Hinton Agar.

Ensuite, des disques de papier (Wattman n°4) stériles de 6 mm de diamètres ont été disposés sur la plaque et 5 µl d'HE ont été ajoutés à chaque disque. Les boîtes de Pétri ont été maintenues à 4°C pendant 1 h, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. (Da Silva Dannenberg et al., 2019 ; Chebaibi et al., 2016).

b) Lecture :

À la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne s'est traduite par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés à l'aide d'une règle transparente, y compris le diamètre des disques. Selon la fourchette proposée par (Ponce et al., 2003; Mouas et al., 2017), les souches seront ainsi classées selon l'effet inhibiteur d'HE comme suit :

- **Non sensible (-)** : Si le diamètre d'inhibition ne dépasse pas 8mm ($6\text{mm } \varnothing \leq 8\text{mm}$).
- **Sensible (+)** : Si $9 < \text{diamètre} \leq 14\text{mm}$.
- **Très sensible (++)** : Si $15 < \text{diamètre} \leq 19\text{mm}$.
- **Extrêmes sensible (+++)** : Si le diamètre dépasse 20mm ($\varnothing \geq 20\text{ mm}$).

2.2.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus petite d'HE qui empêche les bactéries de se multiplier. C'est le paramètre le plus utilisé pour mesurer *in vitro* l'activité d'un antibiotique (Fauchère et Avril, 2002).

a) Principe :

Cette méthode consiste à ensemercer, par une suspension bactérienne standardisée (0,5 McFarland), une série des dilutions de l'HE. L'observation de cette série après un temps d'incubation de 18 à 24 h permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus petite concentration en HE pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu (inhibition de la croissance de 90% de la population microbienne) (Brahmi et al., 2021).

b) Technique :

Une micro-dilution des huiles essentielles à tester, a été réalisée dans des microplaques à 96 puits selon le protocole décrit par (Oumaskour et al., 2021). Le milieu de culture utilisé est constitué de Muller Hinton bouillon avec 0,5% de tween 80. 10 µl d'huile essentielle sont

ajoutés dans le premier puits qui contient 180 μ l de bouillon

Mueller-Hinton (tween 80 : 0,5%) les autres puits contiennent déjà 95 μ l MHB (tween 80 : 0,5%). Après homogénéisation du premier puits, 95 μ l du mélange du premier puits sont transférés dans le deuxième puits et ainsi de suite, les 95 μ l du dernier puits sont retirés (une dilution géométrique de base 2). Ensuite, chaque puits a été inoculé avec 5 μ l de la suspension bactérienne à tester ($3,5 \times 10^7$ UFC/ml). Des puits contenant de MHB (tween 80 : 0,5%) ont été inoculés par la souche à tester sont utilisés comme contrôles positifs, ceux contenant le HE et BMH (tween 80 : 0,5%) non inoculés sont utilisés comme contrôle négatif (Figure 06).

Après 18 heures d'incubation à température de 37° C, Les résultats sont lus à l'œil nu, la CMI de l'huile essentielle est défini comme la plus faible concentration de l'huile essentielle à laquelle le micro-organisme testé ne présente pas de croissance visible dans le bouillon. (Kengne *et al.*, 2019 ; Oumaskour *et al.*, 2021).

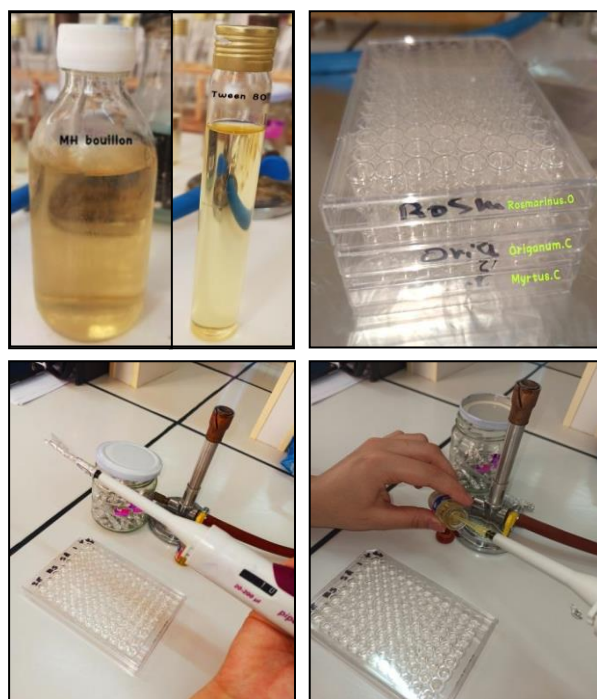


Figure 6 : La méthode de CMI.

2.2.3.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. 10 μ l de la suspension bactérienne sont repiqués à partir des puits montrant une absence complète de la croissance bactérienne puis déposés en strie sur gélose MH. Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 18h d'incubation à 37°C. La CMB a été considérée comme la concentration la plus faible à laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée. (Da Silva Dannenberg *et al.*, 2019 ;

Chebaibi et al., 2016). Le rapport CMB/CMI est calculé, il permet de déterminer le pouvoir antibiotique de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de bactériostatique (**Bouharb et al., 2014**).

Remarque : Pour chacun des tests réalisés (CMI et CMB) le nombre de répétition est deux fois.

2.2.4 Etude de l'activité antimicrobienne de FSC des bactéries lactiques :

2.2.4.1 Mise en évidence de l'effet antagoniste (Méthode direct par test de spot) :

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées à l'égard des souches pathogènes est réalisée par un test d'antagonisme direct qui est le test de spots de **Schillinger et Lucke , (1989)**.

➤ Préparation de la culture de 18 h des souches lactiques :

A partir d'une culture jeune sur des boites de gélose MRS, nous avons prélevé quelques colonies avec la pipette Pasteur que nous avons suspendues dans un tube à essai contenant 05ml de bouillon MRS (pH 7), puis incubé à 37°C pendant 18 heures.

➤ Préparation de la culture de 18h des souches pathogènes :

A partir des boites de gélose nutritive contenant des colonies de souches pathogène jeune (souches de référence), on prend deux colonies par boites avec l'anse de platine et on la met dans un tube à essai contenant 05ml de bouillon nutritif (chaque souche pathogène pour un tube de bouillon nutritif en total 4 tubes plus un tube témoin), puis on incube ces tubes à 37°C pendant 18 heures.

➤ Réalisation du test de spot :

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non de produits antibactériennes par les souches de bactéries lactiques.

A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5µl ont étéensemencées sous forme de spots sur gélose MRS sécher devant bec bunsen à moitié ouverte de façon à obtenir des spots de même taille et identiques. Ces boites sont laissées séchées près de bec bunsen pendant 30minute. L'incubation se fait en anaérobiose à 37°C durant 24 heures.

Après incubation, les boites ont été ensuite recouvertes par 10ml de MH molle (0.75% d'agar) inoculée par 1ml d'une pré-culture de 18h de chaque souche pathogène (*S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 9372). Après 24 h

d'incubation à 37°C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de zone d'inhibition est mesuré.

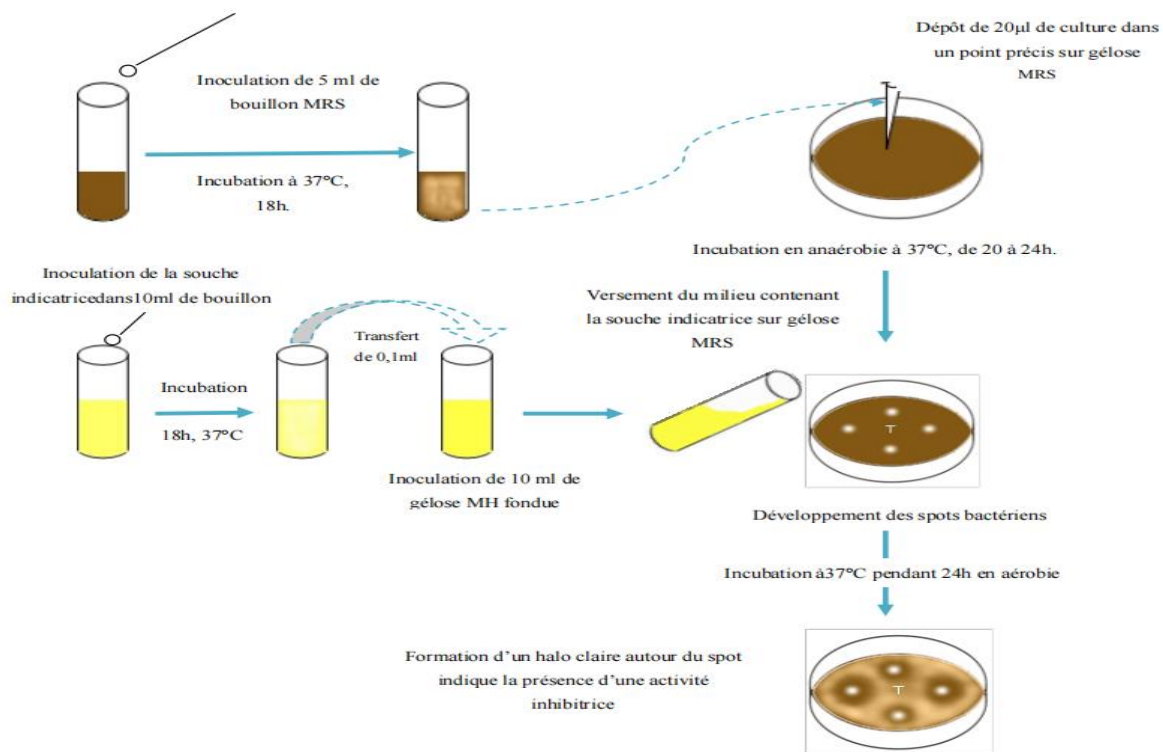


Figure 7 : Illustration des étapes du test des spots.

2.2.4.2 Méthode de détection indirecte (Test de puits) :

Les souches purifiées sont testées pour la production de substances antimicrobiennes autres que les acides organiques suivant la méthode des puits (méthode indirecte) de méthode de **Barefoot et Klaenhammer, (1983)** (figure 08). Un bouillon MRS est inoculé par la souche à tester au $1/10^3$ à partir d'une culture de 18 h à 37°C (fin de la phase exponentielle) de façon à obtenir 10^2 à 10^3 UFC/ml, puis incubé pendant 18 h à 37°C.

La culture obtenue est centrifugée à 4500 tours pendant 20 min et à 4°C. Le surnageant est ajusté à pH 6 avec de la soude 1M (Merck), puis filtré (filtre d'ester mixte de cellulose, 0,45 µm, Costar). Le filtrat obtenu constitue l'extrait de culture.

Parallèlement, des boîtes de Pétri sont préparées de la façon suivante : des boîtes sont recouvertes de 10ml de gélose MHensemencée avec une souche indicatrice. Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose à l'aide d'un tube stérile. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 20 min, avant que les puits soient remplis d'extrait de culture (80µl).

Après diffusion complète de ce dernier dans la gélose (1 à 2 h à température

ambiante), les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C, puis examinées pour la présence de zones d'inhibition (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie indicatrice) autour des puits.

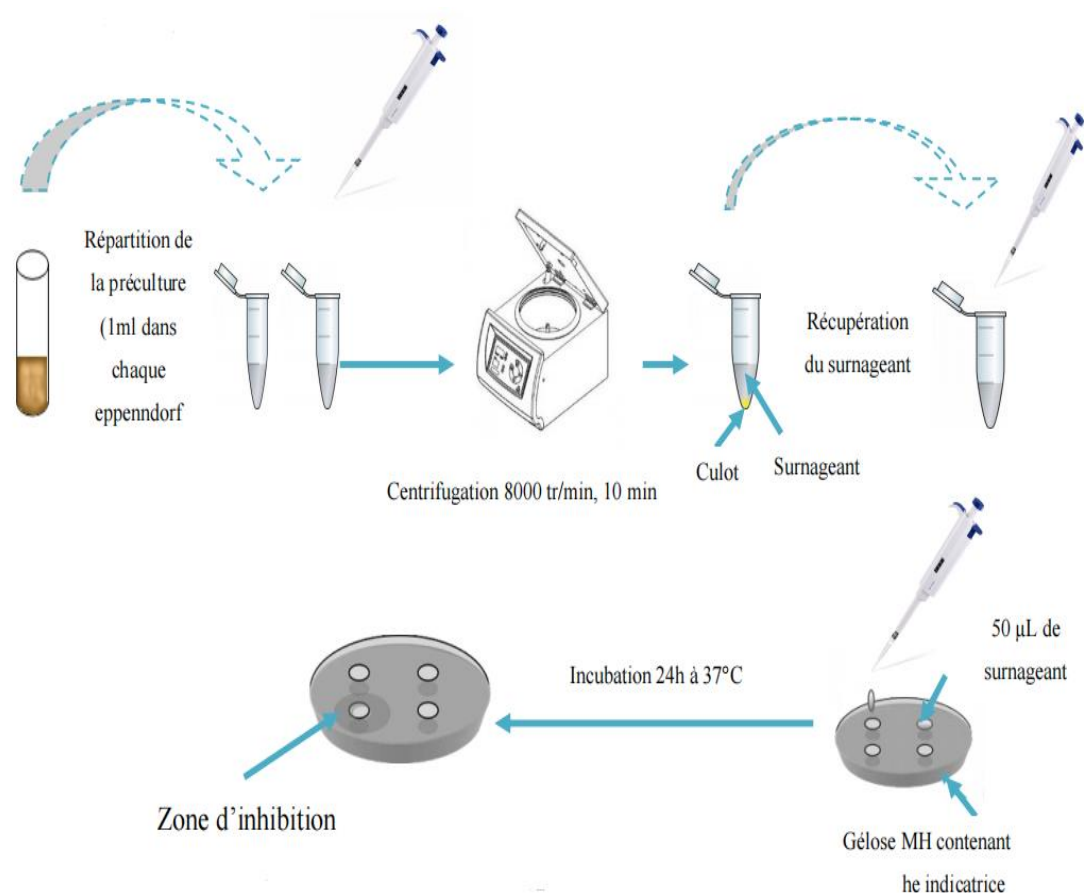


Figure 8: Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits.

2.2.5 Etude de l'effet de combinaison de l'huile essentielle avec la FSC :

2.2.5.1 Test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des HES et la FSC :

Cette combinaison est réalisée afin de tester l'activité antibactérienne et de mettre en valeur un éventuelle effet synergique entre chaque huile et la FSC de la souche *Enterococcus faecium* KMQ22 sur les souches bactériennes testées.

Ce test consiste à réaliser des combinaisons entre chaque huile et la FSC à trois différentes concentrations différentes émulsifiées dans le DMSO à raison de 50% (v/v).

- 25% d'huile +75% de FSC.
- 50% d'huile + 50% de FSC.
- 75% d'huile +25% de FSC.

Des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètres imbibés de 10µl de

chaque concentration déposés sur des boites pétri préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats de la FSC et de l'HE séparément. Le témoin positif et le témoin négatif ont été réalisés par dépôt au centre des boites de Pétri préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée de disques d'antibiotiques et de disques de papier Whatman imprégnés de 10µl d'un mélange de 50% de DMSO et de 50% d'HCL à 0,02N. Tous les essais ont été répétés deux fois. Après l'incubation à 37° pendant 24h, une lecture a été faite comme cité précédemment dans l'aromatogramme.

D'après **Pibiri (2005)**, il existe quatre effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, ainsi pour les antibiotiques :

- **Indifférent** : $(A+B) = \text{Effet A ou Effet B}$.
- **Addition** : $(A+B) = \text{Effet A} + \text{Effet B}$.
- **Synergie** : $(A + B) > \text{Effet A} + \text{Effet B}$.
- **Antagonisme**: $(A + B) < \text{Effet A ou Effet B}$.

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

1 Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

1.1 Résultat de l'Aromatogramme : La méthode de Vincent.

La méthode de diffusion sur disque est la méthode de référence pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles selon plusieurs auteurs (Pibiri et al., 2005; Mehani et al., 2014) par ce qu'elle permet le contact direct de l'HE avec la bactérie testée. L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné par les HEs étudiés; les souches bactériennes testées présentent des diamètres d'inhibition différents vis à vis les huiles essentielles du RO, OC et MC. Les résultats sont consignés dans les figures suivantes :

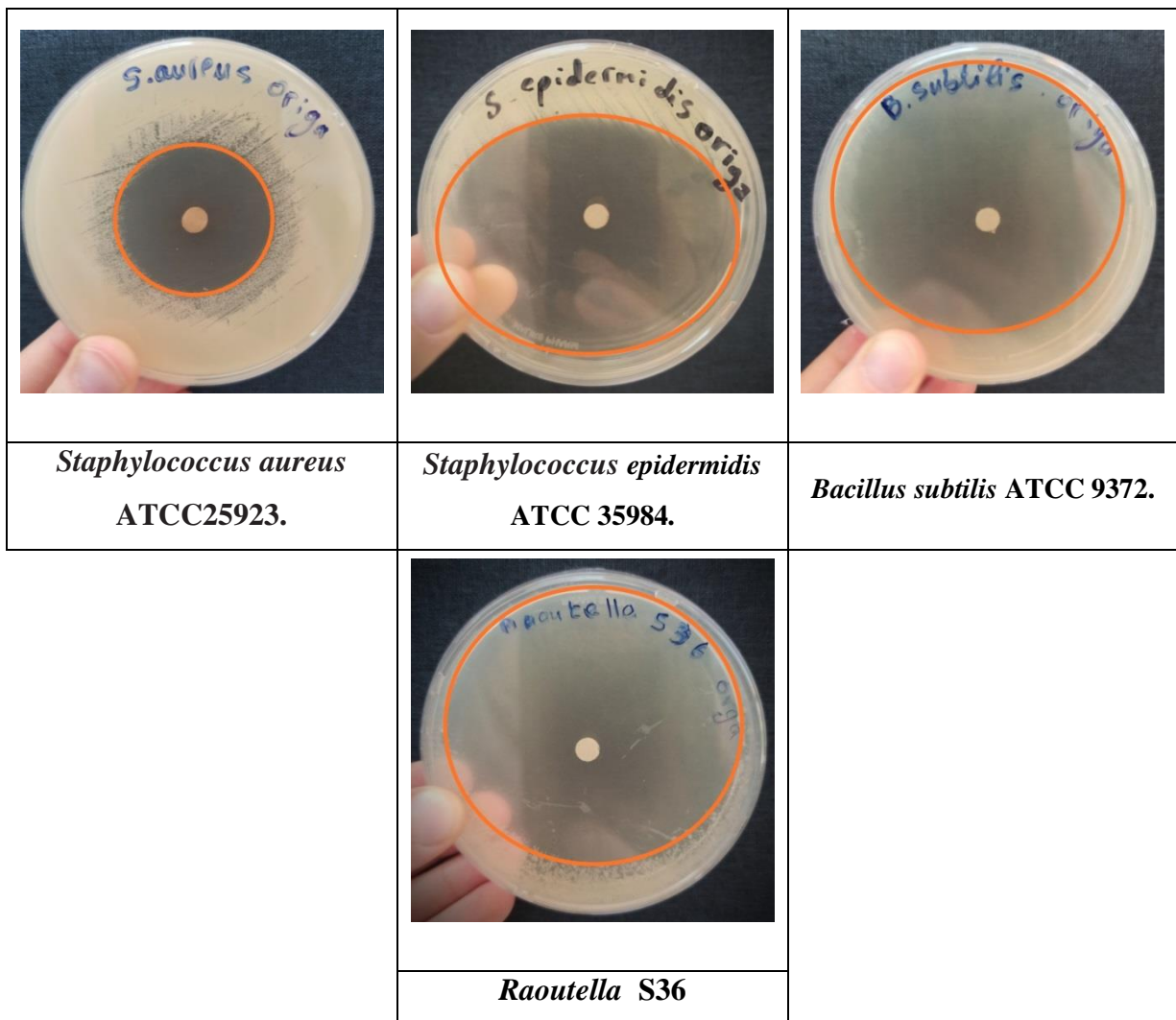


Figure 9 : Effet de l'HE d'*Origanum compactum* sur les bactéries indicatrices.

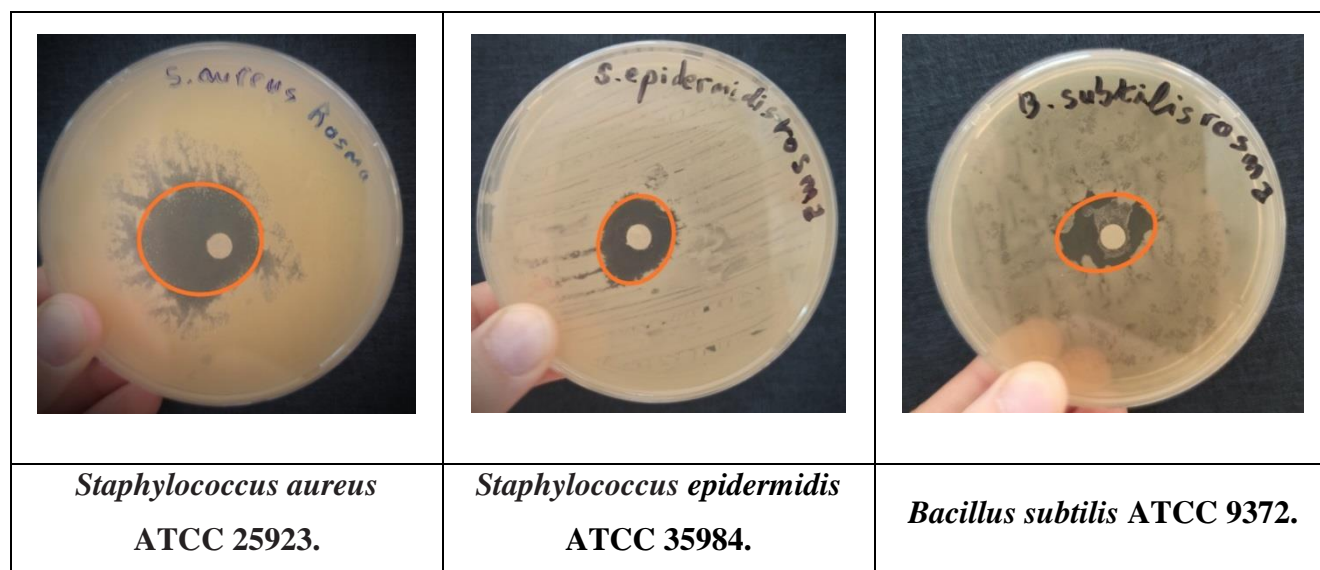


Figure 10 : Effet de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur les bactéries indicatrices.



Figure 11 : Effet de l'HE de *Myrtus communis* sur les bactéries indicatrices.

Les résultats du test de l'activité anti-bactérienne de nos huiles essentielles sur les bactéries indicatrices sont regroupés dans le tableau 3, à noter que le diamètre du disque est (6mm) a été inclus dans le calcul du diamètre de la zone d'inhibition :

Tableau 3: Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.

	<i>Origanum compactum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Myrtus communis</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	40mm +++	30mm +++	30mm +++
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	64mm +++	22mm +++	40mm +++
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	70mm +++	24mm +++	0mm -
<i>Raoutella</i> S36	70mm +++	/	/

+++ : Extrêmement sensible

- : Non sensible

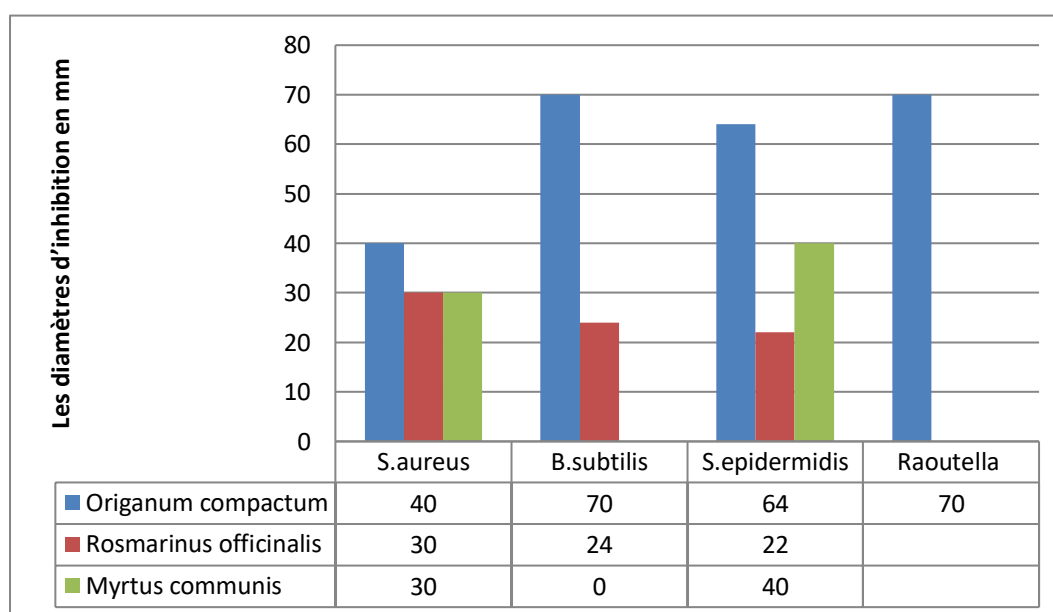


Figure 12: Représentation graphique de test de sensibilité des bactéries indicatrices vis-à-vis les huiles essentielles testées.

L'analyse des résultats obtenus (figure 9 et le tableau 3) nous ont permis de constater que l'HE de l'*Origanum compactum* possède un fort pouvoir antibactérien contre les trois souches indicatrices à Gram (+), *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372, ainsi qu'une activité nettement remarquable sur la souche *Raoutella* S36 d'origine clinique multi-résistante aux

antibiotiques avec des diamètres d'inhibition estimés à de 40mm, 70mm, 64mm et 70mm respectivement. Donc toutes les souches testés sont présentées une activité extrêmement sensible à l'OC.

Nos résultats sont en accord avec les résultats du travail réalisé par **Sarni et Yelles, (2017)** qui ont étudié l'activité antibactérienne de l'OC vis-à-vis *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ils ont trouvé que la bactérie à Gram positif testée, *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible à l'HE *Origanum compactum* avec un diamètre de 22,5mm.

D'après l'étude réalisée par **Bouyahya, (2017)**, sur l'activité antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum* par la méthode de diffusion en puits, tous les extraits sont révélés capables d'inhiber les souches bactériennes testées à savoir les Gram (+) (*Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*) et les Gram (-) (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) avec des zones d'inhibition de l'ordre de $34 \pm 1,24$ mm.

Toutefois, l'activité antibactérienne de l'HE d'*Origanum compactum* pourrait être expliquée par sa forte teneur en carvacrol et thymol (30,53% et 27,5%) respectivement. Ces composés phénoliques sont parmi les agents antibactériens les plus efficaces connus à ce jour (**Nazer et al., 2005**).

L'analyse comparative des résultats sur l'activité antibactérienne de l'HE d'*Origanum Compactum* vis-à-vis les souches testées Gram (+) et Gram (-) (*Raoutella* S36) et les résultats d'autre études similaires, nous a permis de constater que l'activité biologique d'une huile essentielle est en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, et leurs proportions jouent un rôle déterminant (**Laib, 2012**).

L'analyse du tableau 3 et l'histogramme représenté dans la figure 12, nous a permis de remarquer une excellente activité antibactérienne d'HE de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis des bactéries à Gram (+) *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372, avec des diamètres de zones d'inhibitions estimées à 30mm, 24mm et 22mm, respectivement. Donc elles sont des souches extrêmement sensible (+++) à l'huile essentielle de RO.

Des études similaires ont été rapporté par **Lamia Boutabia, Salah Telailia et al., (2016)** qui ont suggéré trois échantillons de l'HE de de la plante *Rosmarinus officinalis* collectée de la même région Hammamet-Tébessa, montre une importante activité

antibactérienne vis-à-vis *S. aureus* avec des diamètres de zones d'inhibitions de l'ordre de 17,1mm, 18,1mm et 15,3mm, respectivement.

Par ailleurs, **Mouas Yamina, Benrebiha Fatma Zohra et al., (2017)** ont rapporté que *RO* récoltés des deux écotypes Blida et Djelfa ont inhibé la croissance de *S. aureus* avec des diamètres de zones d'inhibitions de 23,75 mm et 16,75mm respectivement.

Généralement, toutes les plantes de la famille *Lamiaceae* connues pour ses composés phénoliques, ont été prouvé actifs contre une variété de micro-organismes (**Gortzi et al., 2007**). Nos résultats justifient l'utilisation de *RO* dans les traitements traditionnels comme un remède antibactérien (**Makhloufi, 2013**).

Concernant l'activité antibactérienne d'huiles essentielles extraites de *Myrtus communis*, les résultats présentent un effet inhibiteur sur les souches testées à savoir ; *S. aureus* ATCC 9372 et *S. epidermidis* ATCC 35984 avec des diamètres de zones d'inhibitions de l'ordre de 30mm et 40mm, respectivement. Donc ils sont des souches extrêmement sensible (+++). Par contre, on n'a remarqué aucune activité sur *B. subtilis* ATCC 9372 .

Nos résultats sont cohérents avec ceux de **Luiz Estevão Salvagnini et al., (2008)**, qui ont déterminé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Myrtus communis* croissant au Brésil vis-à-vis les bactéries Gram négatif et positif. Ils ont trouvé que la souche *E. coli* ne donne aucune zone d'inhibition par contre *S. marcescens*, *S. aureus* et *S. epidermidis* se sont montré très sensible à l'HE de *Myrtus communis* avec un diamètre de 15mm. En revanche, la souche *B. subtilis* n'a pas donné des résultats similaires à nos résultats, ou ils sont trouvés que l'HE de *Myrtus communis* donne un effet inhibiteur vis-à-vis de cette souche avec une zone d'inhibition de 15mm de diamètre.

Dans l'étude d'**Akin et al., (2010)**, l'huile essentielle de *Myrtus communis* montre une activité considérable contre la plupart des bactéries Gram négatives et positives.

Suite à ces comparaisons on peut dire que les huiles essentielles présentent une activité antibactérienne différente, d'une part selon l'écotype et d'autre part selon la souche bactérienne elle-même. La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches et bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (**Hermal, 1993**).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. L'HE exerce son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la bactérie grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne: l'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire;

l'acidification de l'intérieure de la bactérie, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure; la destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Caillet et Lacroix, 2007). En revanche, les bactéries à Gram négatifs sont plus résistantes que les Gram positifs, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (Burt, 2004).

1.2 Résultat de la CMI :

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée selon la méthode de micro dilution sur microplaque de 96 puits. La CMI est basée sur l'observation de la présence ou l'absence d'une croissance bactérienne autour du puits. Les huiles essentielles de *RO*, *OC* et *MC* ont été testées contre trois souches : *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372. Les résultats sont représentés sur les figures 13, 14, 15 et le tableau 4, 5, 6 et 7.

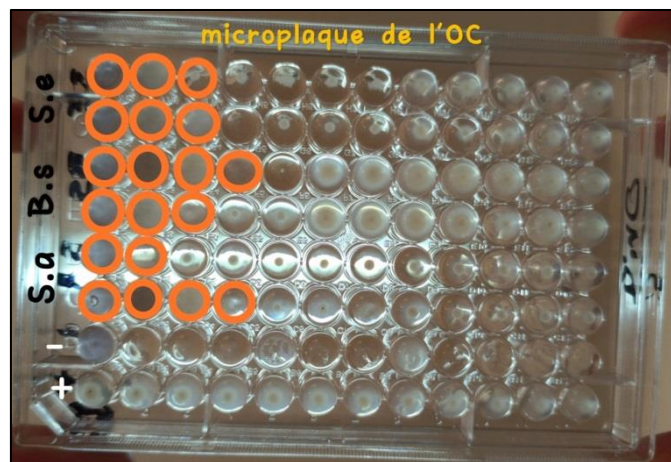


Figure 13 : lecture de la microplaque de *OC* vis-à-vis les souches indicatrices.

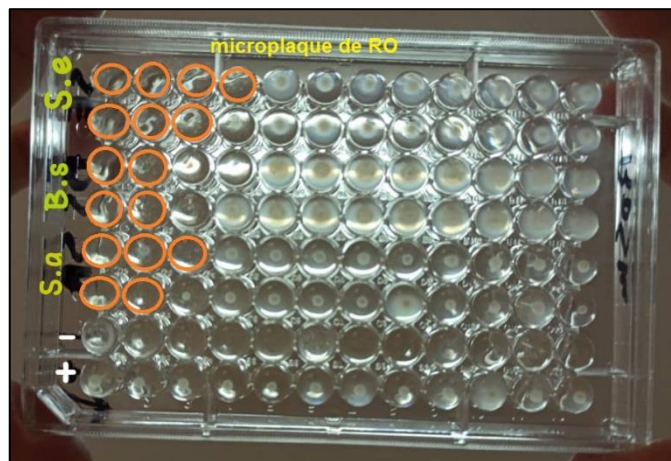


Figure 14 : Lecture de la microplaque de *RO* vis-à-vis les souches indicatrices.

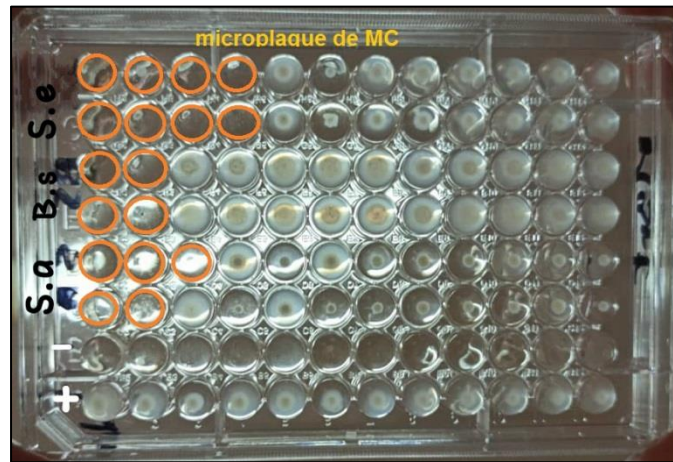


Figure 15 : Lecture de la microplaque de MC vis-à-vis les souches indicatrices.

Tableau 4 : Résultat des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HEs des *OC*, *RO* et *MC* sur les souches indicatrices.

Souches		05 µl/ml	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	0,62 µl/ml	0,31 µl/ml	0,16 µl/ml	0,08 µl/ml	0,04 µl/ml	0,02 µl/ml	0,01 µl/ml	0,005 µl/ml	0,002 µl/ml
Témoin positif		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Témoin négatif		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Origanum compactum</i>	<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B.subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Myrtus communis</i>	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

- : Négatif

+ : Positif

Tableau 5 : Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par OC.

Plante: <i>Origanum compactum</i>						
souche	<i>S.aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>	
CMI	0,62 µl/ml	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	1,25 µl/ml	1,25 µl/ml	0,62 µl/ml
Moyenne	1,56 µl/ml		1,25 µl/ml		0,9 µl/ml	

Tableau 6 : Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par RO.

Plante: <i>Rosmarinus officinalis</i>						
souche	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>	
CMI	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	1,25 µl/ml	0,62 µl/ml	2,5 µl/ml	2,5 µl/ml
Moyenne	1,9 µl/ml		0,9 µl/ml		2,5 µl/ml	

Tableau 7: Représentation des moyennes de CMI pour chaque souche testée par MC.

Plante: <i>Myrtus communis</i>						
Souche	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>	
CMI	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	0,62 µl/ml	0,62 µl/ml	2,5 µl/ml	2,5 µl/ml
Moyenne	1,9 µl/ml		0,62 µl/ml		2,5 µl/ml	

1.3 Résultat de la CMB :

Les valeurs des CMB sont déterminées à partir des résultats de repiquage des souches prélevées à partir des boîtes qui ont présenté une zone d'inhibition lors de l'observation des résultats des CMI. Les résultats de détermination de CMB des huiles essentielles d'OC, RO et MC sont illustrés dans les figures et les tableaux suivants :

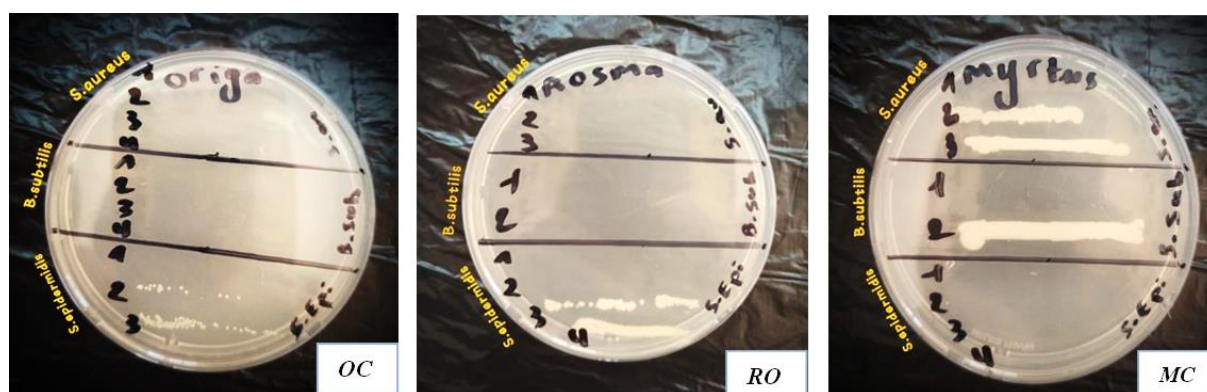


Figure 16 : CMB des HEs d'OC, RO et MC pour les trois souches indicatrices.

Tableau 8 : Résultats de CMB des souches testées avec les trois HEs (OC, RO et MC).

	Souches	05 µl/ml	2.5 µl/ml	1.25 µl/ml	0.62 µl/ml	CMB
<i>OC</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	2.5 µl/ml
	<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	//	05 µl/ml
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	1.25 µl/ml
<i>RO</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	+	//	2.5 µl/ml
	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	1.25 µl/ml
	<i>B. subtilis</i>	-	-	//	//	2.5 µl/ml
<i>MC</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	+	//	2.5 µl/ml
	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	0.62 µl/ml
	<i>B. subtilis</i>	-	-	//	//	2.5 µl/ml

Tableau 9 : Comparaison entre la CMI et CMB.

Souches	CMI	CMB	Rapport CMB/CMI
<i>Origanum compactum</i>			
<i>S. aureus</i>	1,56 µl/ml	2,5 µl/ml	2,03
<i>S. epidermidis</i>	1,25 µl/ml	05 µl/ml	4
<i>B. subtilis</i>	0,9 µl/ml	1,25 µl/ml	1,39
<i>Rosmarinus officinalis</i>			
<i>S. aureus</i>	1,9 µl/ml	2,5 µl/ml	1,31
<i>S. epidermidis</i>	0,9 µl/ml	1,25 µl/ml	1,56
<i>B. subtilis</i>	2,5 µl/m	2,5 µl/ml	1
<i>Myrtus communis</i>			
<i>S. aureus</i>	1,9 µl/ml	2,5 µl/ml	1,32
<i>S. epidermidis</i>	0,62 µl/ml	0,62 µl/ml	1
<i>B. subtilis</i>	2,5 µl/ml	2,5 µl/ml	1

Ces résultats montrent que les huiles essentielles des trois plantes : *OC*, *RO* et *MC* ont une activité antibactérienne de nature bactéricide pour toutes les souches testées. Ces huiles agissent différemment sur les bactéries testées, leurs CMI varient entre 0.9 et 1.56 µl/ml pour l'HE d'*OC*, 0.9 et 2.5 µl/ml pour l'HE de *RO* et entre 0.62 et 2.5 µl/ml pour l'HE de *MC*.

D'après Le tableau, *B. subtilis* ATCC 9372 est la moins sensible vis-à-vis l'HE de *RO* et *MC* par une plus forte CMI de 2.5µl/ml et de CMB égal à 2.5 µl/ml, par contre avec l'HE

d'OC cette souche apparait plus sensible.

S. epidermidis ATCC 35984 se montre la plus sensible à l'action de RO et de MC avec une plus faible CMI de 0.9µl/ml et 0.62µl/ml respectivement. En revanche *S. aureus* ATCC 25923 est la moins sensible à l'action d'OC par une forte CMI de 1.56 µl/ml.

Selon une étude récente menée par **Chraïbi et al., (2019)**, sur la caractérisation chimique et les activités antibactériennes des huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et *Myrtus communis* et leur effet antibactérien synergique, ils ont trouvé que *S. epidermidis* est une souche sensible à l'activité de l'HE de MC avec une CMI de 0.25µl/ml qui est proche à celle mentionnée dans nos résultats.

Il a été démontré précédemment que les composés phénoliques seraient parmi les constituants responsables de l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Le taux d'inhibition de la croissance bactérienne pourrait être dû à plusieurs facteurs, tels que : la saisonnalité, la variabilité de la matière végétale et la composition de l'huile essentielle (**Fidan et al., 2019**).

De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique (**Burt, 2004; Wang et al., 2012**).

2 Résultats de l'activité antimicrobienne de FSC des bactéries lactiques :

2.1 Résultats de l'effet antagoniste (test de spot) :

L'évaluation du pouvoir antagoniste de 7 isolats lactiques a été étudié vis-à-vis trois souches indicatrices; *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372 par la méthode directe (méthode despot). L'inhibition se traduit par la formation d'une zone claire autour des souches lactiques déposées (spot) avec des bordures bien distincte. Les résultats des interactions sont présentés dans les figures suivantes:

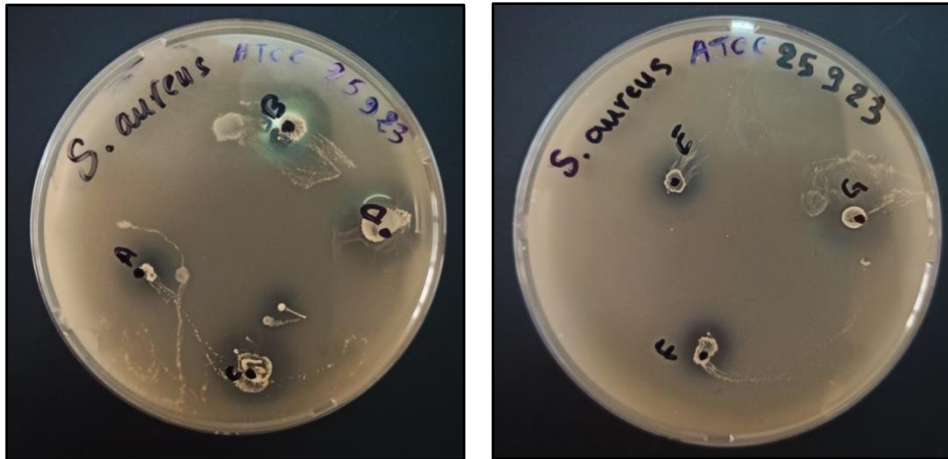


Figure 17 : Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre *S. aureus* ATCC 25923.



Figure 18 : Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre *S. epidermidis* ATCC 35984.



Figure 19: Résultats de test de spots des 7 souches lactiques contre *B. subtilis* ATCC 9372.

- Sachant que, les codes des souches lactiques sont :

A : *Lactobacillus plantarum*.

B : *Enterococcus faecium*.

C : *Enterococcus faecium*.

D : *Enterococcus durans*.

E : *Lactococcus lactis*.

F : *Enterococcus faecium*.

G : *Lactobacillus plantarum*.

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour de les spots ont été mesurés et présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition des souches indicatrice exprimés en mm par la méthode de spots.

	JMZ12 = A	KMQ02 = B	JMQ23 = C	JMZ05 = D	ULZ15 = E	KMQ22 = F	JMZ25 = G
<i>S. aureus</i>	10 mm	14 mm	17 mm	20 mm	10 mm	13 mm	14 mm
<i>S. epidermidis</i>	13 mm	10 mm	11 mm	10 mm	10 mm	9 mm	8 mm
<i>B. subtilis</i>	12 mm	15 mm	13 mm	18 mm	14 mm	22 mm	15 mm

D'après les résultats de test d'antagonisme on observe que toutes les souches lactiques (JMZ12, KMQ02, JMQ23, JMZ05, ULZ15, KMQ22 et JMZ25) de trois genres étudiées *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* montrent un spectre d'activité antibactérienne proche vis-à-vis toutes les souches testées *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372.

Les zones d'inhibitions présentées par les sept souches lactiques envers *S. aureus* ATCC 25923 sont plus proches dont l'intervalle entre 10 et 20mm. On remarque que la souche JMZ05 montre une activité la plus marquante vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre de 20mm. Nos résultats sont concorde avec celles trouvé par **Benmammar, (2017)** qui a trouvé des zones d'inhibition entre 12 et 16 mm de diamètre.

Belhamra, (2017) a trouvé que *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'action des bactéries lactiques avec un diamètre varient entre 30,5 à 43,5mm, ces résultats sont plus supérieur que nos résultat. Ces inhibitions peuvent être dues à une variété des substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques.

Pour *S. epidermidis* ATCC 35984, les souches lactiques donnent des zones d'inhibitions de diamètres 13mm, 10mm, 11mm, 10mm, 10mm, 9mm et 8mm

respectivement. Ces résultats montrent un effet moins important que ce montré par **Izerghouf et Habhoub, (2021)** qui ont étudié les activités antimicrobiennes et protéolytiques des bactéries lactiques isolées du lait et des produits laitiers fermentés vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella.sp*, *Bacillus cereus* et *Micrococcus.sp*. Ils ont trouvé que toutes les souches lactiques utilisées par eux ont une activité inhibitrice importante contre les souches indicatrices à Gram positif comme *S. epidermidis* avec des zones d'inhibitions supérieures à ceux trouvés dans notre travail.

Nos souches lactiques utilisés sont montrées un effet plus active contre *B. subtilis* ATCC 9372 avec un diamètre des zones d'inhibition se situe entre 13 et 22mm. La souche KMQ22 montre l'activité la plus importante avec une zone d'inhibition de 22mm de diamètre. Une meilleure activité est trouvée par **Izerghouf et Habhoub, (2021)** contre *B. subtilis* ou leurs souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle exercent des diamètres de zones d'inhibition supérieures aux zones données par nos souches isolées de Klila et Jben.

D'après **Leonard, (2013)**, l'effet bactéricide des souches lactiques peut être attribué à divers facteurs comme l'origine d'isolement des souches lactiques, la compétition nutritionnelle et pour l'espace ainsi la production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutérine et les bactériocines. Le métabolite antibactérien que produisent tous les bactéries lactiques est l'acide lactiques ce métabolites modifie le pH de milieu et peut avoir une influence sur les bactéries pathogènes.

Coma et al, (2001); Charlier et al, (2009) montrent que le potentiel antagoniste des bactéries lactiques peut également attribuer à la production de bactériocines qui sont actives contre les Gram (+). La bactériocine caractérisée et les plus fréquemment utilisée pour lutter contre les Gram (+) est la nisine (un lantibiotique, produit par certaines souches de *Lactococcus lactis*).

2.2 Résultats de test des puits (Détection indirecte) :

Pour mieux comprendre les mécanismes de l'activité inhibitrice de nos bactéries lactiques, la méthode de diffusion en puits a été effectuée. Cette technique permet de mettre en contact les surnageants des bactéries lactiques avec les souches pathogènes indicatrices.

Les résultats de l'interaction obtenue révèlent la présence d'un halo clair au tour des puits. Les zones d'inhibition sont exprimées en (mm) et ils illustrés dans la figure 20

et exprimés en mm dans le tableau 11.



Figure 20 : Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers les souches *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 9372 et *S. epidermidis* ATCC 35984.

Tableau 11 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en puits.

	JMZ12 = A	KMQ02 = B	JMQ23 = C	JMZ05 = D	ULZ15 = E	KMQ22 = F	JMZ25 = G
<i>S. aureus</i>	05 mm	06 mm	05 mm	05 mm	06 mm	05 mm	05 mm
<i>B. subtilis</i>	06 mm	04 mm	05 mm	-	04 mm	05 mm	06 mm
<i>S. epidermidis</i>	05 mm	05 mm	04 mm	06 mm	04 mm	06 mm	04 mm

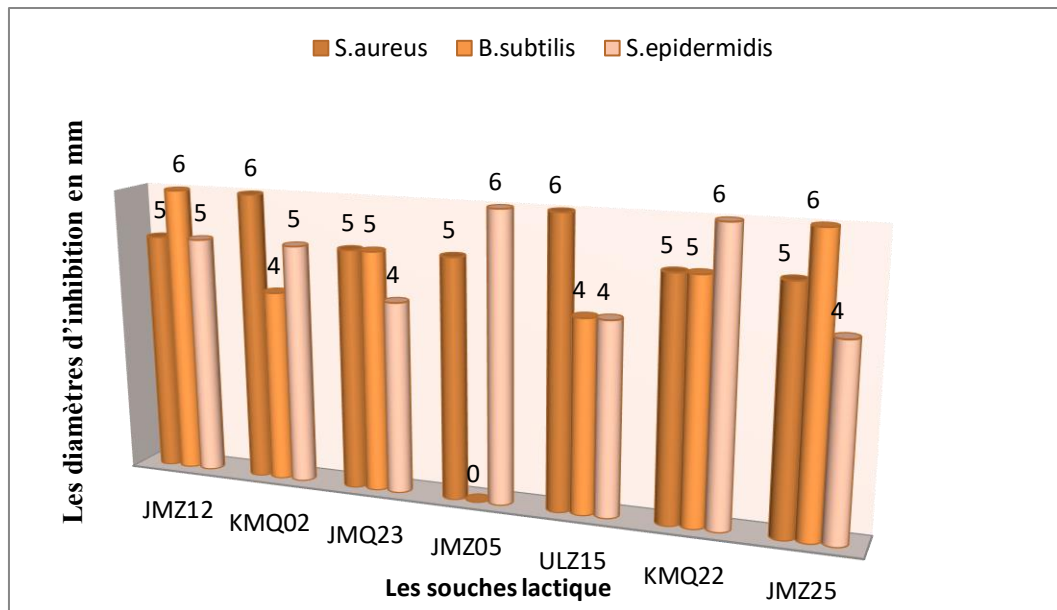


Figure 21 : Représentation graphique de l'effet antagoniste des bactéries lactiques envers les souches testées.

Les résultats présentés dans le tableau 11 et l'histogramme représenté dans la figure 21 confirment que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antimicrobienne. On observe que toutes les souches lactiques de trois genres étudiées *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* isolées à partir du Jben et Klila ont un effet inhibitrice comparable vis-à-vis les souches indicatrices à Gram (+) avec des zones d'inhibition entre 4mm et 6mm, sauf la souche JMZ05 qui ne montre aucune activité inhibitrice vis-à-vis *B. subtilis* ATCC 9372.

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm au tour du puits (Schillinger et Lucke, 1989).

Nos résultats sont concorde avec celles trouvés par Zuo et al., (2014) qui évaluer le potentiel antibactérien d'une collection des BL isolées du produits laitiers traditionnels des éleveurs collectés au Xinjiang, en Chine. Les auteurs ont découvert que les BL des quatre genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* présentaient une activité inhibitrice contre au moins une des bactéries indicatrices Gram (+) (*Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* sp). Les zones d'inhibition diffèrent selon la bactérie étudiée.

Dans une étude conduite par Mekri Meriem, (2016) qui a trouvé que les souches lactiques de genres (*Streptococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus*) isolées de lait cru des chèvres ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

ATCC 25932, avec des diamètres des zones d'inhibitions de 20.33 ± 0.57 mm, 22.33 ± 0.80 mm et 18.75 ± 0.45 mm respectivement. Ces résultats sont plus supérieurs que nos résultats.

Au contraire, l'étude de **Keramane, (2009)** qui a trouvé qu'aucune zone d'inhibition sur 10 souches de *Staphylococcus* testées par le surnageant natif (pH entre 5.7 et 6.2) et le surnageant neutralisé de neuf souches de lactocoques bovines.

Selon **Biswas et al., (1991)** les bactéries lactiques ont manifesté une activité antagoniste vis-à-vis les germes pathogènes à Gram positif et agissent par le mécanisme de formation des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires.

Concernant la variabilité de l'effet antimicrobien des souches isolées, **Schillinger et Lucke, (1989)**, on a remarqué une différence dans l'effet antibactérien selon la méthode utilisée. Effectivement *Enterococcus durans* a montré un résultat positif par le test des spots, mais qui a disparu lors de l'utilisation de surnageant par la méthode de puits. Ces résultats sont semblables à nos observations.

L'absence de l'activité antibactérienne par l'isolat JMZ05 vis-à-vis *B. subtilis* ATCC 9372 révélés actifs avec le test de spot avec un diamètre de 18mm pourrait indiquer que l'effet inhibiteur observé par le contact direct dans le test des spots pourrait être attribué à un effet de compétition nutritionnelle entre cellules sans synthèse de métabolites inhibiteurs ou à leur faible production sous les conditions de culture utilisées. (**Tagg et al., 1976; Mami et al., 2008**). Notamment l'agrégation des molécules de bactériocines entre elles, l'hydrolyse des bactériocines par des protéases non spécifique (**Lewis et al., 1991**).

3 Résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (huile essentielle + FSC) à différentes concentrations sur les souches bactériennes testées :

Dans le but de déterminer le type de l'effet antibactérien (synergique, antagoniste, indifférent et additif) de l'huile essentielle + FSC envers les trois souches testées, efférentes combinaisons sont réalisées. Cette activité est déterminée in vitro par la méthode de diffusion sur gélose en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques en (mm).

D'après les résultats obtenus avec le test de puits, la souche lactique la plus active sur les trois souches indicatrices testées est *Enterococcus faecium*. C'est pourquoi elle a été choisie dans l'étude synergie entre la FSC de cette souche et les huiles essentielles d'*Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis*.

➤ Résultats de témoin réalisés avec un antibiotique et le DMSO :

Dans ce teste, une boites de Pétri préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, un disque d'antibiotique céfotaxime CTX et un disque de papier Whatman imprégné de 10 µl de DMSO (figure 22) sont placés sur la surface de la gélose.



Figure 22 : Résultat de témoin réalisé avec un antibiotique et le DMSO.

➤ Effet de la combinaison FSC-HEs sur *S. aureus* ATCC 25923:

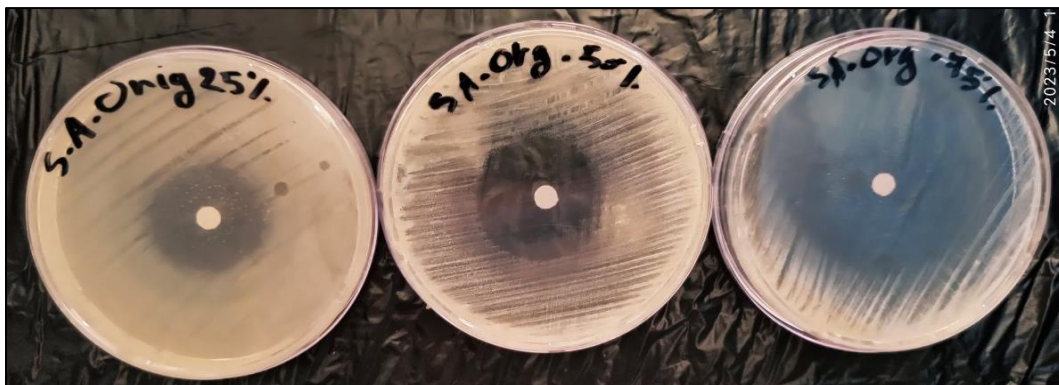


Figure 23 : Effet de la combinaison FSC-OC à différentes concentrations sur *S. aureus* ATCC 25923.

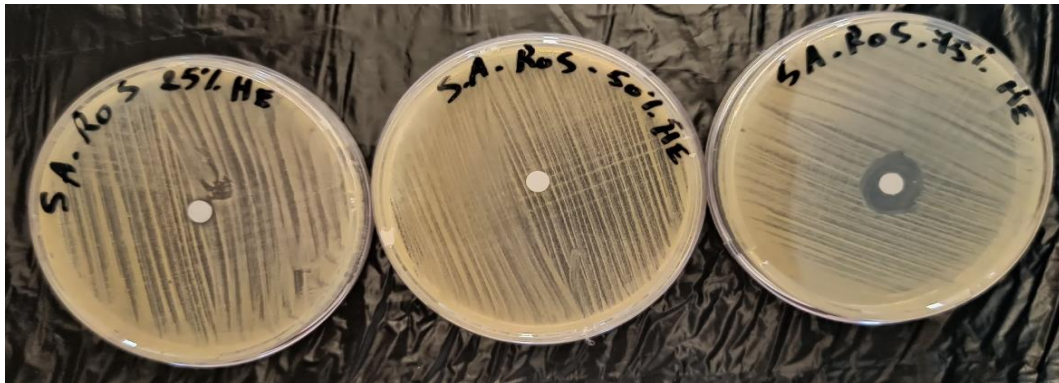


Figure 24 : Effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur *S. aureus* ATCC 25923.

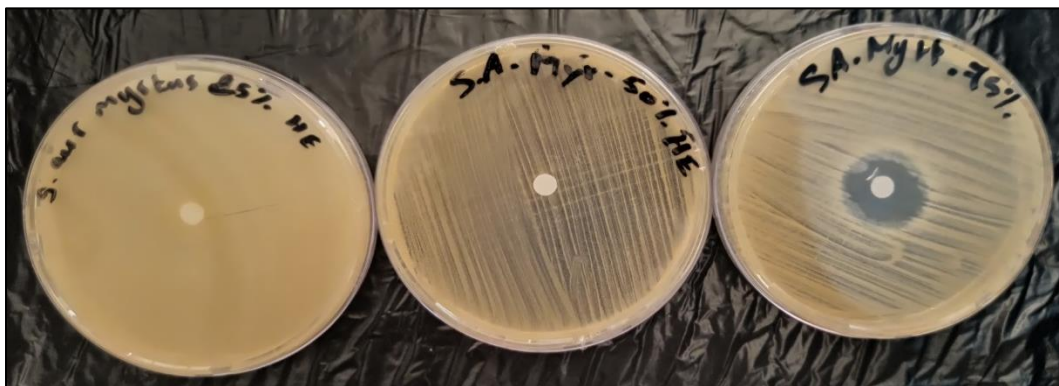


Figure 25 : Effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur *S. aureus* ATCC 25923.

➤ Effet de la combinaison FSC-HEs sur *S. epidermidis* ATCC 35984:

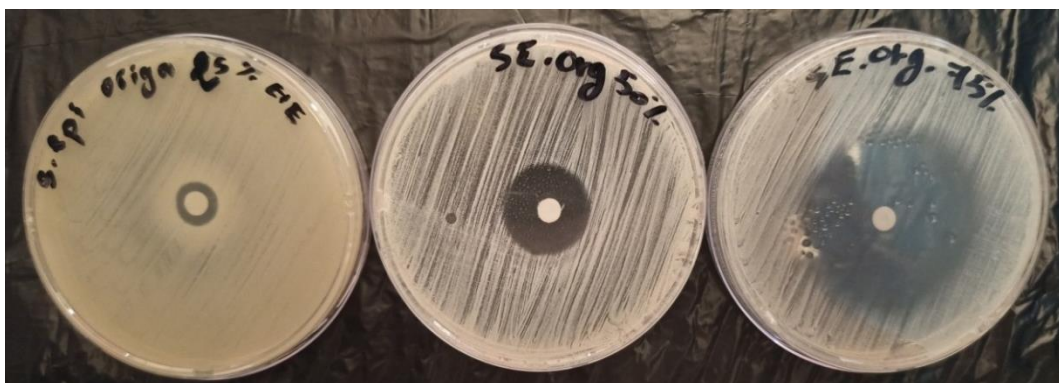


Figure 26 : Effet de la combinaison FSC-OC à différentes concentrations sur *S. epidermidis* ATCC 35984.



Figure 27 : Effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur *S. epidermidis* ATCC 35984.



Figure 28: Effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur *S. epidermidis* ATCC 35984.

➤ Effet de la combinaison FSC-HEs sur *B. subtilis* ATCC 9372:



Figure 29: Effet de la combinaison FSC-OC à différentes concentrations sur *B. subtilis* ATCC 9372.



Figure 30: Effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur *B. subtilis* ATCC 9372.



Figure 31 : Effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur *B.subtilis* ATCC 9372.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison de l'HE et la FSC à différentes concentrations sont représentés sur les histogrammes (figures 32,33 et 34).

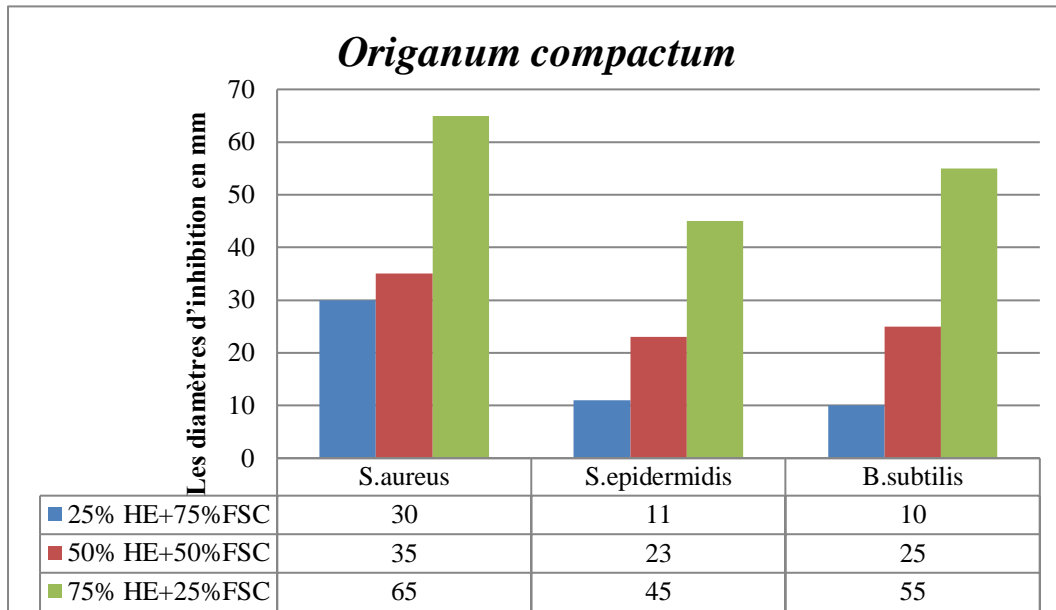


Figure 32 : Représentation graphique d’effet de la combinaison FSC-OC à différentes concentrations sur les trois souches testées.

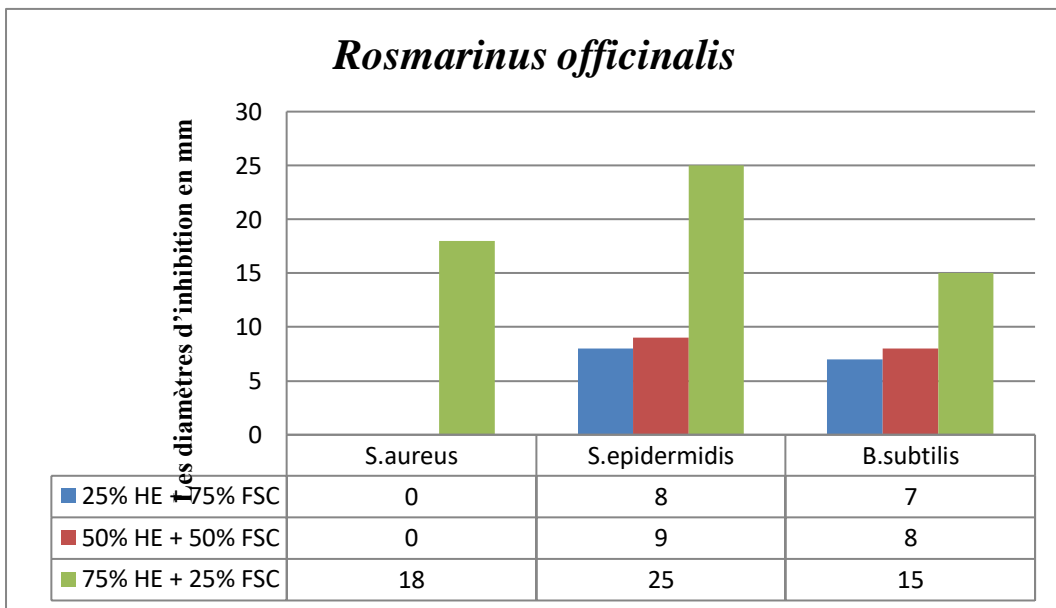


Figure 33 : Représentation graphique d’effet de la combinaison FSC-RO à différentes concentrations sur les trois souches testées.

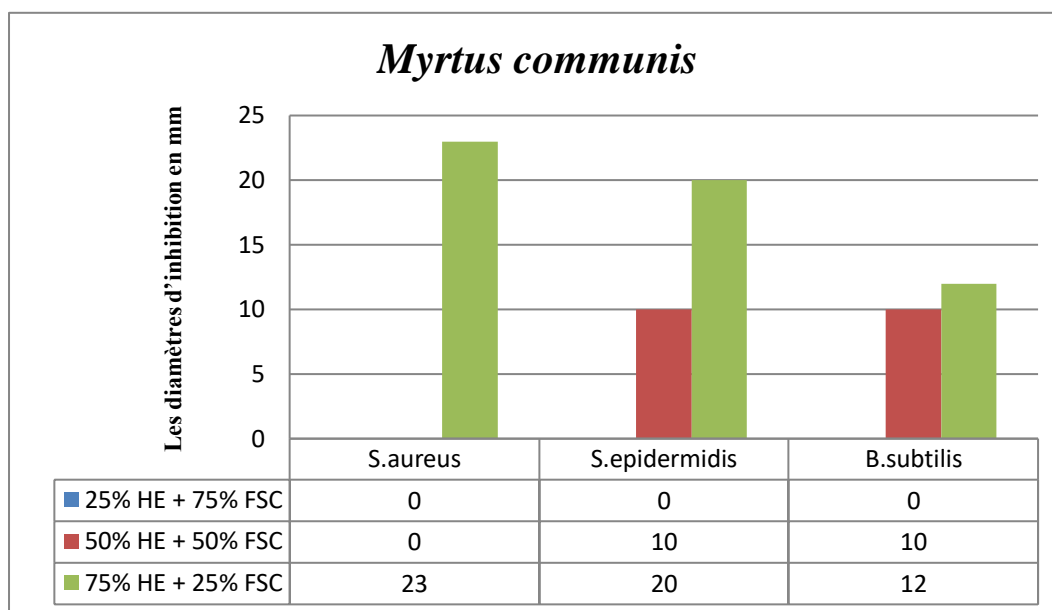


Figure 34 : Représentation graphique d'effet de la combinaison FSC-MC à différentes concentrations sur les trois souches testées.

Tableau 12 : Effet de différentes combinaisons contre les trois souches testées pour les différentes concentrations d'HEs.

<i>Rosmarinus officinalis</i>					
Souches	Combinaison A+B		Effet de A	Effet de B	Effet de combinaison
<i>S. aureus</i>	25% HE	-	30 mm	5 mm	Antagonisme
	50% HE	-	30 mm	5 mm	Antagonisme
	75% HE	18 mm	30 mm	5 mm	Antagonisme
<i>S. epidermidis</i>	25% HE	8 mm	22 mm	6 mm	Antagonisme
	50% HE	9 mm	22 mm	6 mm	Antagonisme
	75% HE	25 mm	22 mm	6 mm	Antagonisme
<i>B. subtilis</i>	25% HE	7 mm	24 mm	5 mm	Antagonisme
	50% HE	8 mm	24 mm	5 mm	Antagonisme
	75% HE	15 mm	24 mm	5 mm	Antagonisme
<i>Origanum compactum</i>					
Souches	Combinaison A+B		Effet de A	Effet de B	Effet de combinaison
<i>S. aureus</i>	25% HE	30 mm	40 mm	5 mm	Antagonisme
	50% HE	35 mm	40 mm	5 mm	Antagonisme
	75% HE	65 mm	40 mm	5 mm	Synergie

<i>S. epidermidis</i>	25% HE	11 mm	64 mm	6 mm	Antagonisme
	50% HE	23 mm	64 mm	6 mm	Antagonisme
	75% HE	45 mm	64 mm	6 mm	Antagonisme
<i>B. subtilis</i>	25% HE	10 mm	70 mm	5 mm	Antagonisme
	50% HE	25 mm	70 mm	5 mm	Antagonisme
	75% HE	55 mm	70 mm	5 mm	Antagonisme
<i>Myrtus communis</i>					
Souches	Combinaison A+B		Effet de A	Effet de B	Effet de combinaison
<i>S. aureus</i>	25% HE	-	30 mm	5 mm	Antagonisme
	50% HE	-	30 mm	5 mm	Antagonisme
	75% HE	23 mm	30 mm	5 mm	Antagonisme
<i>S. epidermidis</i>	25% HE	-	40 mm	6 mm	
	50% HE	10 mm	40 mm	6 mm	Antagonisme
	75% HE	20 mm	40 mm	6 mm	Antagonisme
<i>B. subtilis</i>	25% HE	-	-	5 mm	Antagonisme
	50% HE	10 mm	-	5 mm	Synergie
	75% HE	12 mm	-	5 mm	Synergie

Les tableaux, les figures et les histogrammes ci-dessus montrent l'effet de la combinaison des HEs de chaque plante avec la FSC d'*Enterococcus faecium* sur les trois bactéries testées. D'après les résultats obtenus, on remarque que la combinaison FSC-OC exerce une très forte activité vis-à-vis les trois souches, surtout avec les concentrations les plus élevés d'huiles (50% HE et 75% HE). Les zones d'inhibitions sont estimés entre 30 et 65mm de diamètre en fonction de la croissance de la concentration d'HE pour *S. aureus* ATCC 25923, qui est considéré comme la souche la plus sensible vis-à-vis de l'effet de cette combinaison par rapport *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372 qui ont moins interagi par l'effet de la combinaison FSC-OC avec des zones d'inhibition de 11 à 45mm et de 10 à 55mm respectivement.

La combinaison FSC-RO ne a donné aucune activité vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923 pour les deux concentrations 25% HE et 50% HE c'est-à-dire la souche est notée comme résistante. Par contre cette combinaison exerce une activité importante avec une zone d'inhibition de 18mm de diamètre à la concentration 75% HE. Concernant les deux autres souches, on remarque qu'elles n'ont pas donné une activité importante lorsqu'on augmente la concentration d'huile essentielle, mais elle est inférieure à celle remarqué pour la combinaison FSC-OC avec des zones d'inhibition de 8 à 25mm pour *S. epidermidis*

ATCC 35984 et de 7 à 15mm pour *B. subtilis* ATCC 9372.

La troisième combinaison FSC-MC représente la combinaison la moins efficace par rapport aux premiers, ou elle ne montre aucune activité vis-à-vis des trois souches testées à la concentration 25% HE et 50% HE pour *S. aureus* ATCC 25923. L'activité est présente à la concentration 75% HE contre *S. aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition 23mm de diamètre. Pour *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372, la combinaison donne un effet à la concentration 50% avec un diamètre de 10mm pour les deux souches. A la concentration la plus élevée d'huile essentielle (75% HE), nous avons constaté une augmentation importante de l'activité exercée par cette combinaison envers *S. epidermidis* ATCC 35984 avec une zone d'inhibition de 20mm, et une activité réduite par rapport aux autres combinaisons avec un diamètre de zone d'inhibition de 12mm de diamètre vis-à-vis *B. subtilis* ATCC 9372.

Selon ces résultats, nous avons constaté que les différentes concentrations de combinaisons en HEs et FSC ont montré des effets différents envers les souches microbiennes testées :

- La combinaison de 75% d'*Origanum compactum* + 25% de FSC a donné un effet synergique envers *S. aureus* ATCC 25923 par contre un effet antagoniste pour les deux autres concentrations. Signalant également que les trois concentrations de cette combinaison ont eu un effet antagoniste sur *S. epidermidis* ATCC 35984 et *B. subtilis* ATCC 9372.
- La combinaison *Rosmarinus officinalis* + FSC a donné un effet antagoniste pour les 3 concentrations vis à vis les trois souches.
- La combinaison MC + FSC a donné un effet synergique contre *B. subtilis* ATCC 9372 seulement pour les concentrations 50% MC et 75% MC. Par contre, cette combinaison a donné un effet antagoniste contre les 2 autres souches pour toutes les concentrations.

D'après les travaux de **Naab Dehbia, (2018)**, sur la combinaison entre l'huile essentielle du *Rosmarinus Officinalis* et la nisine isolée de *Lactococcus lactis*, un effet synergique a été détecté envers *E. coli* pour la combinaison 75% de RO +25% de nisine. Les trois concentrations de la combinaison *Rosmarinus officinalis* + nisine ont eu un effet indifférent sur *S. aureus* et *Bacillus cereus*. Ces résultats sont différents à ceux que nous avons trouvés contre la souche *S. aureus* ATCC 25923.

Les activités variables observées avec les différentes huiles (synergie, antagonisme),

peuvent être expliqués par le mode d'action des composés de l'HE, ceux-là ne réagissent pas de la même manière en les combinant avec la FSC d'*Enterococcus faecium* testée.

Généralement, il est bien admis que les composés majeurs d'une HE donnée reflètent souvent son activité biologique (**Ipek et al., 2005**), l'efficacité et les différences de leurs activités dépendent de leurs concentrations dans le milieu en présence d'autres composés minoritaires.

Le mécanisme réel de la synergie entre les huiles essentielles et les bactériocine n'est pas parfaitement éclairci. Cependant, les huiles essentielles utilisées peuvent contribuer à la stimulation de l'action des bactériocines par l'augmentation du nombre des pores élaborés au niveau de la des membranes cytoplasmiques et le développement de leur taille, ce qui conduit à une réduction considérable des cellules viables (**Pol et Smid, 1999**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion :

La bio-préservation consiste à inoculer un produit par des bactéries sélectionnées pour leur aptitude à inhiber le développement de germes indésirables, sans modifier les qualités organoleptiques et sanitaires de ce produit. Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie car elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs. Elles peuvent améliorer les caractéristiques nutritionnelles, organoleptiques, technologiques et la durée de conservation de divers aliments et boissons fermentés. De plus, certains de ces biomolécules peuvent être utilisées pour inactiver et contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire (Gao et al., 2021).

Aujourd'hui, la recherche porte aussi sur l'utilisation des huiles essentielles comme un outil très intéressant pour la bio-préservation des denrées alimentaires, ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérées comme alternative importante pour résoudre le problème de l'utilisation des conservateurs d'origine chimique (Cagnon et al., 2003; Sarrano, 2008).

De ce fait l'objectif de ce travail vise à démontrer l'activité antagoniste des bactéries lactiques qui sont déjà identifiées dans des précédents travaux, l'évaluation de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes aromatiques *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis* et l'effet de leurs associations avec la fraction semi-pure de culture de bactérie lactique (*Enterococcus faecium*) vis-à-vis trois souches indicatrices, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372.

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques par la méthode de diffusion en puits et par celle des spots a montré que les 7 souches lactiques exercent une activité inhibitrice dirigée contre des souches indicatrices à Gram positifs testées, sauf *Enterococcus durans* envers *B. subtilis* ATCC 9372 où aucune inhibition n'a été détectée par la méthode des puits et que cette activité varie selon la souche teste.

Les trois huiles utilisées ont montré un effet inhibiteur, une excellente activité antibactérienne d'HE d'*Origanum compactum*, de *Rosmarinus officinalis* et de *Myrtus communis* vis-à-vis toute les bactéries indicatrices testées, sauf aucune activité n'était observées de MC contre *B. subtilis* ATCC 9372.

Les résultats de la CMI et CMB ont montrés que les trois huiles essentielles peuvent être qualifiées des bactéricides sur toutes des souches testées.

Une étude plus poussée de l'activité antibactérienne qui porte sur la combinaison de chaque huile essentielle et la FSC, a révélée des effets dissemblables envers les souches bactériennes testées.

Ce travail peut être suivi par les perspectives suivantes :

- Purification et la caractérisation à l'échelle moléculaire des bactériocines étudiées.
- Identification à l'échelle moléculaire des molécules bioactives contenues dans les huiles essentielles de plantes étudiées.
- L'utilisation des huiles essentielles et bactériocines pour l'amélioration de l'innocuité et les qualités organoleptique des fromages traditionnels type « Djben ».

LES REFERENCES

Référence :

-A-

1. **Abdelli W. (2017).** Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle LMD : Microbiologie Appliquée : Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 104p.
2. **Adamberg K., Kask S., Laht T. M. et al. (2003).** The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 171-183.
3. **Ait youcef M. (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Edition Ibis press, Paris.
4. **Akin A., Aktumsek A.N. (2010).** Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and *Myrtus communis* L growing in Northern Cyprus *Afr J Biotechnol*, 9 (4), 531-535.
5. **Aouati A. (2016).** Etude de la toxicité de certaines plantes sur les larves de culex pipiens (Diptera, Culicidae). Thèse de doctorat : Entomologie : Université des frères Mentouri Constantine, 150p
6. **Axelsson L. (2004).** Classification and physiology of lactic acid bacteria In: Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. *Microbiological and functional aspects*. 3^{ed}. New York: Marcel Dekker, (633), 1-66.

-B-

7. **Baptista R.C., Horita C.N., Sant-Ana A.S. (2020).** Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood. *Food research international*, (127), 108-762.
8. **Barboni T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat : Chimie : l'université de Corse, p26.
9. **Barefoot S.F., Klaenhammer T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin B a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6), 1808-1815.
10. **Bauer R., Dicks L. M. T. (2005).** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International journal of food microbiology*, 101(2), 201-216.

11. **Begum A., Sandhya S., Syed Shaffath A. et al. (2013).**An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci-Pol Technol Aliment*, 12(1), 61-73.
12. **Belbey L. (2014).** Activité antioxydante de *Rosmarinus officinalis* L et son in vitro effet sur *Penicillium digitatum*. Mémoire de master : Analyse Biochimique : Université de Msila, 50p.
13. **Belhamra Z. (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de doctorat : Biologie : Université Ferhat Abbas Sétif 1, 147p.
14. **Belkamel A., Bammi J., Abdelfettah B. et al. (2013).** Étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine: *Origanum compactum* (Benth). *Journal of Animal & Plant Sciences*, (1), 2880-2887.
15. **Beloued A. (2001).** Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des Publications Universitaires. Alger, 284p ISBN 9789961003046.
16. **Benkiki N. (2006).** Etude phytochimique des plantes médicinales algérienne. *Rutamontana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perfoliatum*. Thèse de Doctorat : Chimie : Université Al-Hadj Lakhdar Batna, 198p.
17. **Berkane A. (2015).** La détermination des propriétés thermodynamiques d'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* L. Mémoire de Master : Chimie : Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, 66p.
18. **Biswas S. R., Ray P., Johnson M. C. (1991).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocinAcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl Environ Microbiol*, 57(4), 1265-1267.
19. **Bouharb H., El Badaou K., Zair T. et al. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du *Zerhoun* (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Bioscience*, (78), 6685-6693.
20. **Boutabia L., Telailia S., Bougatof I. et al. (2016).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (85), 174 – 189.

21. **Bouyahya A., Jamal A., Edaoudi F. et al. (2016).** *Origanum compactum* Benth: A Review on Phytochemistry and Pharmacological Properties. Medicinal & Aromatic Plants, 5(6).
 22. **Bouyahya J., Abrini Y., Bakri N. et al. (2017).** Screening phytochimique évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. Journal Phytothérapie, 15(6).
 23. **Brahmi M., Adli D.E., Boufadi M.Y. (2021).** Antimicrobial and antiochratoxic activities of menthaspicata essential oil. Phytothérapie, 19(5-6), 397-403.
 24. **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review Int J Food Microbiol, (94), 223-253.
- C-
25. **Cai Z. (2014).** Application of Langlois. Reagent in Trifluoromethylation Reactions, 14(15), 2895– 2906.
 26. **Caillet S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier RESALA, 1-8.
 27. **Caridi A., Micari P., Caparra P et al. (2003).** Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the cheese Pecorino. International Dairy Journal, (13), 191-200.
 28. **Chafai A., Boukil A., Bachar M. et al. (2014).** Manuel des bonnes pratiques de collecte de l'origan « *Origanum compactum* ». Projet Plantes Médicinales et Aromatiques, 3-10.
 29. **Charlier C., Cretenet M., Even S. et al. (2009).** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. Int J Food Microbiol, 131(1), 30-39.
 30. **Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali, F. et al. (2016).** Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. Phytothérapie, 14(6), 355-362.
 31. **Coma V., Pardon I.S.P., Deschamps A. et al. (2001).** Antimicrobial Edible Packaging Based on Cellulosic Ethers Fatty Acids and Nisin Incorporation To Inhibit

Listeria innocua and *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection, 64(4), 470-475.

-D-

32. **Da Silva Dannenberg G., Funck G.D., Da Silva W.P. et al. (2019).** Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. Food control, (95), 115-120.
33. **Da Silva Sabo S., Vitolo M., Gonzalez J.M.D. (2014).** Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Research International, (64), 527-536.
34. **Desmazeaud M.J.(1992).** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review Le Lait, INRA Editions, 1-34.
35. **Diep D. Nes R. (2002).**Ribosomally synthesized Antibacterial peptides in Gram position Bacteria. Drug Targ, 107-122.
36. **Dortu C., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques et caractéristiques. Biotechno Agron Soc Environ, (13), 143-154.
37. **Dung N. T., Kim J. M., Kang S.C. (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology, (46), 3632-3639.

-E-

38. **Echchaoui M. (2018).** Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Thèse de doctorat: Université Mohammed-v Rabat. 139 p.
39. **Egan K.D., Field M.C., Rea R.P. (2016).** Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems. Front Microbiol, (7), 1-21.

-F-

40. **Fangous M.S. (2019).** Nouvelle thérapeutique anti-*Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose: les *Lactobacillus* spp. Thèse de Doctorat : Microbiologie : Université de Bretagne occidentale-Brest, 198p.
41. **Faure S., Pubert C., Rabiller J. et al. (2013).** Que savons-nous des probiotiques? Actualités pharmaceutiques, 52(528), 18-21.

42. **Felis G. E., Salvetti E., Torriani S. (2015).** Systematics of lactic acid bacteria novel applications. In: Fernanda M., Raúl R., Graciela M. et al. Biotechnology of lactic acid bacteria. États-Unis :John Wiley & Sons, 25-31p ISBN:9781118868409
43. **Fernandez B. (2014).** Activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes. Thèse de Doctorat : Sciences et Technologies des aliments : Université Laval Québec, 143p.
44. **Fidan H., Stefanova G., Kostova I. (2019).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Laurus nobilis* essential oils from Bulgaria. *Molcules*, 24(4), 804.

-G-

45. **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B. et al. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*, (102), 898-904.
46. **Galvez A., Abriouel H., Lopez et al. (2007).** Bacteriocin-Based Strategies For Food Biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120(1-2), 51-70.
47. **Gao, X., Kong, J., Zhu, H. et al. (2021).** *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 4(5),163-214
48. **Ghali H. (2006).** «Bacteriocin activity by *L.curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4degrees C storage J. *Food Protect*, (69), 1066-1071.
49. **Gortzi O., Lalas S., Chinou I. et al. (2007).** Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules*, (12), 932-945.
50. **Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. New York: AFNOR, 300p.

-H-

51. **Hammes W. P., Hertel C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In prokaryotes, (4), 320-403.
52. **Hammi I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de

différentes variétés de fromages français. Thèse de doctorat : Microbiologie-biologie moléculaire : Université Strasbourg, 149p.

53. Hardie J.M., Whiley R.D. (2006). The genus *Streptococcus*-Oral; in: *Prokaryotes*, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3eme Ed, Springer, New York.

54. Hermal C. (1993). Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Thèse Faculté de pharmacie : Université Montpellier I, 87p.

-I-

55. Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., et al. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of *origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella microsomal test. *Food Chemistry*, (93), 551–6.

56. Izerghouf T., Habhoub S. (2021). Activités antimicrobiennes et protéolytiques des bactéries lactiques isolées du lait et des produits laitiers. Mémoire de Master : Microbiologie appliquée : Université de Larbi Tébessi Tébessa, 124p.

-J-

57. Jiong Z., Han J., Hui C et al. (2017). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Biomacdoi*, 233p.

-K-

58. Kalbaza K. (2018). Bactéries Lactiques De Produits Artisanaux : Identification Et Caractéristiques Technologiques. Thèse de doctorat : Biotechnologie : Université Ahmed Ben Bella Oran 1.

59. Kassas Z (2016). Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de doctorat : Microbiologie Appliquée : Université d'Algérie, 158p

60. Kengne L.G., Nyegue M.A., Del E. et al. (2019). Antibacterial activity of selected plant essential oils on airborne bacteria and mode of action on membrane integrity. *Am J Essent*, (7), 28-35.

61. Keramane B. (2009). Effets antimicrobiens des Lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus* multi-résistant. Mémoire de magister : Microbiologie appliquée : Université de Béjaia, 138p.

- 62. Khalid K. (2011).** An overview of lactic acid bacteria. International journal of Biosciences, 1(3), 1-13.
- 63. Kheyar N., Meridja D., Belhamel K. (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. Algerian Journal of natural products, 2 (1), 18-26.
- 64. Kondo T., Rodriguez J., Diaz M. F. et al. (2018).** Description of two new species of Cryptinglisia Cockerell (Hemiptera: Coccoomorpha: Coccidae) associated with rosemary, *Rosmarinus officinalis* L (*Lamiaceae*) in Colombia. Zootaxa, 4420 (30), 379-390.
- 65. König H., Fröhlich J. (2017).** Lactic acid bacteria. In Biology of Microorganisms on Grapes in Must and in Wine, 3-41.

-L-

- 66. Laib I. (2012).** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies Agro-aliment. Revue Nature & Technologie, (07), 44-51.
- 67. Lairini S., Beqqali N., Bouslamti, R. et al. (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels marocains et formulation d'un lait fermenté proche du kéfir. Afrique Science: Revue International des sciences et technologie, (10)4, 267-277.
- 68. Leclerc H., Deveriese L.A., Mmsel D.A.A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) *enterococci* and *streptococci*: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. Appl Bacteriol, (81), 459-466.
- 69. Leonard L. (2013).** Évaluation du potentiel bio-protecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique in Procédés Alimentaires et Microbiologiques. Thèse de doctorat : Sciences de l'Alimentation: Université Bourgogne, 318p.
- 70. Limsowtin G.K., Broome M.C., Powell I.B. (2002).** Lactic acid bacteria, taxonomy. Encyclopedia of Dairy Sciences, 1470–1478.
- 71. Luiz E., José R.S.O., Luis E.S. et al. (2008).** Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (*Myrtaceae*). Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(2), 241-244.

-M-

- 72. Makhloufi A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et de beur cru. Thèse de Doctorat d'Etat : Microbiologie sécurité sanitaire des aliments : Université Aboubaker Belkaid Tlemcen.
- 73. Mami A., Henni J. E., Kihal M. (2008).** Antibacterial activity of *Lactobacillus* isolated from Algerian raw goat's milk against *S. aureus*. World Journal of Dairy and Food Science, (3), 39-49.
- 74. Marion L. (2017).** Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une *Lamiacée* médicinale de la garrigue provençale. Présenté pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie : Université d'Aix-Marseille, 166p.
- 75. Mebarki N. (2010).**Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne. Magister : Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques : Université M'hamed Bouga Boumerdes.
- 76. Mecheri F., Akdif N. (2017).** Contribution à l'étude de l'effet des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Ruta graveolens* sur la croissance des quelques microorganismes pathogènes. Mémoire de Master : Université M'hamed Bougara de Boumerdes.
- 77. Mehani M., Ladjel S. (2014).** Biological Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camendulensis* on Some Fungi and Bacteria. Journal of Engineering Research and Applications, (4), 71-73.
- 78. Mekri M. (2016).** Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudo-lactiques et des huiles essentielles d'*Inula viscosa* contre les germes pathogènes. Thèse de Doctorat : Sciences biologiques : Université Djillaliliabes Sidi Bel Abbes, 205p.
- 79. Metrouh R. (2022).** Caractérisation d'une collection de bactéries lactiques autochtones étude des propriétés biotechnologiques et probiotiques. Thèse de doctorat : Microbiologie Appliquée : Université Larbi Tébessi Tébessa, 185p.

- 80. Migliore J. (2011).** Empreintes des changements environnementaux sur la phytogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au sahara. Thèse de doctorat : Université paulcézanne d'Aix-Marseille III, 66-117.
- 81. Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S et al. (2010).** Essential Oil of *Myrtus communis* L. As a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents, (15), 2759-2770.
- 82. Moraes M.P., Perin L.M., Ortolani M.B. et al. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic. Food SciTechnol, (43), 1320-1324.
- 83. Mouas Y., Benrebiha F.Z., Chaouia C. (2017).** Évaluation De l'activité Antibacterienne De l'huile Essentielle Et De l'extrait Méthanolique Du Romarin *Rosmarinus Officinalis* L. Revue Agrobiologia, 7(1), 363-370.

-N-

- 84. Naab D., Hadibi S. (2018).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* en combinaison avec la nisine. Mémoire de Master : Biotechnologie microbienne : Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou, 101p.
- 85. Naghmouchi K., Belguesmia Y., Baah J. et al. (2010).** Antibacterial activity of class I and II bacteriocins combined with Polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Research in Microbiology, (162), 99-107.
- 86. Nazer A.I., Kobilinsky A., Tholozan J.L. et al. (2005).** Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv.Typhimurium*: a synergistic effect. Food Microbiology, (22), 391-398.
- 87. NCCLS, "National Committee for Clinical Laboratory Standards". (2001).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA.

-O-

- 88. Oumaskour K., Benaziz M., Ainane T. et al. (2021).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential of *Pistacia lentiscus* L. Pharmacology Online, (2), 518-526.

-P-

- 89. Park S. N., Lim Y.K., Shin J. H. (2019).** *Streptococcus gwangjuense* sp Nov Isolated from Human Pericoronitis. *CurrentMicrobiology*, 76(7), 799-803.
- 90. Patal S., Gupta R.S. (2018).** Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phyligenies and molecular signatures. *Infection Genetics and Evolution*, (66), 130-151.
- 91. Perricone M., Arace M. R., Corbo M. et al. (2015).** Bioactivity of essential oils. A review on their interaction with food components. *FrontMicrobiol*, (6), 1-7.
- 92. Peterbauer C., Maischberger T., Haltrich D. (2011).** Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology journal*, 6(9), 1147-1161.
- 93. Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse doctorat : Université Lausan Suisse,
- 94. Pilet M.F., Magras C., Federigh M. (2005).** Bactéries lactiques. In bactériologie alimentaire. 2e Ed. Paris : Economica, 219-240.
- 95. Pol I. E., Smid E. J. (1999).** Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* And *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, (29), 166-170.
- 96. Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. et al. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (7), 679-684.
- 97. Pot B., Tsakalidou E. (2009).** Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus* molecular biology. *From Genomics To Probiotics*, (1), 1-56.

-S-

- 98. Saad N. (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro. Thèse Doctorat : Biologie et santé : Université Limoge, 266p.
- 99. Sakina M. P., Jeremy J. J. (2015).** Diterpenes from Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Letters*, 367(2), 93-102
- 100. Salvetti E., Torriani S., Felis G. E. (2012).** The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4(4), 217-226.
- 101. Sarni T., Yelles D. (2017).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* : application sur la tomate,

Mémoire Master : Microbiologie Appliquée : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 99p.

- 102.Schillinger U., Lücke F.K. (1998).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and environmental microbiology, 55(8), 1901-1906.
- 103.Shepard D., Michael S., Gilmore W. (2002).** Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Letters to nature, 84 (87).
- 104.Solórzano-Santos F., Miranda-Novales M. (2012).** Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol, (23), 136-141.
- 105.Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol, (36), 1-29.
- 106.Sullivan L., Ross R., Hill C. (2002).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, (84), 593-604.
- 107.Swetwivathana A., Visessanguan A. (2015).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. Meat Sci, (109), 101-105.

-T-

- 108.Taale E. (2016).** Bioactive molecules from bacteria strains: biochemical and molecular characterization of bacteriocins producing strains isolated from Soumbala, Bikalga and some yoghurt. Thèse de doctorat: Microbiologie- Biologie Moléculaire: Université de Kara Kara Togo, 119p.
- 109.Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriology Reviews, (40), 722-756.
- 110.Tahlaiti h. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Thèse de Doctorat: Université d'Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 205p.
- 111.Tamime Y.A. (2009).** Milk processing and quality management. Blackwell Publishing, L.td.ISBN978-1-405-14530-5.
- 112.Tamime Y. (202).** Microbiology of Starter Cultures. In: Robinsonr K. Dairy Microbiology Hand book. 3e Ed. New York: John Wiley And Sons Inc, 261-366p.

-W-

113. Wang W., Luo M., Efferth T. et al (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil Compared to that of its main component. *Molecules*, (17), 2704-271.

-Y-

114. Yelnetty A., Purnomo H., Mirah A. (2014). Biochemical characteristics of lactic acid bacteria with proteolytic activity and capability as starter culture isolated from spontaneous fermented local goat milk. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(10), 137-146.

-Z-

115. Zhang C, (2014). Application of Langlois Reagent in Trifluoromethylation Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis*, (356), 2895-2906.

116. Zuo F. L., Feng X. J., Chen L. L. et al. (2014). Identification and partial characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products produced by herders in the western Tianshan Mountains of China. *Letters in Applied Microbiology*, 59(5), 549-556.

ANNEXES

Composition des milieux de culture :

1) Bouillon Nutritive :

- Peptones.....10,00g
- Extrait de bœuf1,00g
- Extrait de levure2,00g
- Chlorure de sodium.....5,00g

➤ **Préparation :**

Suspendre 13 g de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec agitation. Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Mettre dans des flacons ou des tubes et stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes.

2) Bouillon MRS :

- Peptone10,00g
- Extrait de viande.....8,00g
- Extrait de levure4,00g
- Glucose.....20,00g
- Hydrogénophosphate de potassium2,00g
- Acétate de sodium trihydraté.....5,00g
- Citrate d'ammonium..... 2,00g
- Sulfate de magnésium heptahydraté0,20g
- Sulfate de manganèse tétrahydraté0,05g
- pH.....6,20g

➤ **Préparation :**

Suspendre 52,25 g de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec agitation. Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Mettre dans des flacons ou des tubes et stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes.

3) Gélose MH (Mueller Hinton) :

- Peptone17.5g
- Extrait de viande2,00g
- Amidon1.5g
- Agar..... 17,00g

➤ **Préparation :**

Mettre en suspension 38 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.

Porter à l'ébullition lentement en agitant jusqu'à dissolution complète. Autoclaver à 115 °C pendant 15min.

4) Gélose MRS :

- Peptone10,00 g
- Extrait de viande8,00 g
- Extrait de levure déshydraté4,00 g
- Dextrose.....20,00 g
- Tween 80 (Sorbitane monoléate)1,00 ml
- Hydrogène-orthophosphate dipotassique (K₂HPO₄) 2,00 g
- Acétate de sodium trihydraté (H₂CO₂, 3H₂O) ...5,00 g
- Citrate de diammonique (C₆H₆O₇ (NH₄)₂)2,00 g
- Sulfate de magnésium hydraté (HOSO₄ 7H₂O) ...2,00 g
- Sulfate de magnésium tétrahydraté MNSO₄, 4H₂O 0.5 g
- Agar-Agar10,00 g

➤ **Préparation :**

Suspendre les composants, poudre déshydratée, dans l'eau (62g dans 1000 ml d'eau distillée). Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute jusqu'à complète dissolution. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, refroidir à 45-50°C.

5) Gélose Nutritive :

- Tryptone..... 5,0g
- Extrait de viande..... 1,0g
- Extrait de levure..... 2,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Agar-agar bactériologique..... 12,0 g

➤ **Préparation :**

Suspendre les composants, poudre déshydratée, dans l'eau (20g dans 1000 ml d'eau distillée). Porter le milieu à ébullition sous agitation jusqu'à complète dissolution. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, refroidir à 45-50°C.
