



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة الشهيد الشخير العربي التبسي



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
des huiles essentielles de (*Salvia officinalis* et *Mentha piperita*) contre les
germes pathogènes d'origine alimentaire.**

Présenté par:

Mr. Hafsi moundher

Mr. Mansour issam

Mr. Smida adem

Membres de jury:

Présidente : SMAALI Saoussen (MCA)

Université ECLT-Tébessa

Promoteur : MECHAI Abdeslasset (professeur)

Université ECLT-Tébessa

Co-promoteur : DEBEBZA Manel (professeur)

Université ECLT-Tébessa

Examinatrice : AZIZI Nassima (MAA)

Université ECLT-Tébessa

Présenté le 06/06/2024

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023 / 2024

ملخص

هدفت دراستنا من ناحية إلى الكشف عن النشاط المضاد للميكروبات لزيتين أساسيتين مستخلصتين من نباتين طبيين (النعناع الفلفلي والمريمية)، ومن ناحية أخرى إلى النشاط المضاد للبكتيريا لبكتيريا حمض اللاكتيك البروبيوتكية المعزولة من منتجات الألبان الجزائرية. تم اختبار الزيوت الأساسية بمفردها وفي تركيبة مع الجزء شبه النقي من البكتيريوسينات المستخرجة من سلالتين من بكتيريا اللاكتيك باستخدام طريقة انتشار الأقراص على وسط الآجار، مقابل ستة سلالات مؤشر *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Escherichia coli* ATCC 25422، *Klebsiella pneumoniae* spp و *Klebsiella oxytoca* spp أظهرت الأجزاء النشطة شبه المنقاة المحتوية على البكتيريوسينات و المستخرجة من سلالتين بكتيريا حمض اللاكتيك 03 و 08 قوة مثبطة معتدلة بأقطار مناطق تثبيط تبلغ 24 ملم و 23 ملم على التوالي، في حين أن الجزء 33 أظهر تأثيرًا مثبطًا أكبر بقطر منطقة تثبيط يبلغ 33 ملم . أظهرت نتائج اختبارات النشاط المضاد للبكتيريا لتراكيب الزيوت الأساسية (EO) من النعناع الفلفلي والمريمية مع الأجزاء شبه النقية من بكتيريا حمض اللاكتيك 08 و 33 تأثيرات متنوعة ضد الجراثيم الممرضة *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella pneumoniae* spp و *Klebsiella oxytoca* spp بالنسبة لزيت النعناع الفلفلي، أظهرت التركيبة مع الأجزاء البكتيريوسينية شبه النقية 33 تآزرًا ضد سلالتين *Klebsiella pneumoniae* spp و *Klebsiella oxytoca* spp عند استخدامها بنسب (50/50) و (25/75) على التوالي. بالمقابل، أظهرت المريمية عند دمجها مع الأجزاء البكتيريوسينية شبه النقية 08 تأثيرات تآزرية ضد *Klebsiella pneumoniae* spp و *Klebsiella pneumoniae* spp عند استخدامها بنسب 25/75 و 75/25 على التوالي.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، زيوت أساسية، نشاط مضاد للبكتيريا، النعناع الفلفلي، المريمية، التآزر والحفظ البيولوجي.

Abstract

The objective of our study focused, on one hand, on revealing the antimicrobial activity of two essential oils extracted from two medicinal plants (*Mentha piperita* and *Salvia officinalis*), and on the other hand, on the antagonistic activity of probiotic lactic acid bacteria isolated from Algerian dairy products. The essential oils were tested alone and in combination with the semi-pure fractions of bacteriocins extracted from two lactic strains using the disc diffusion method on agar medium, against six indicator strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25422, *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, and *Klebsiella oxytoca spp.*). The semi-purified active fractions of bacteriocins extracted from the strains of Lactic acid bacteria 03 and Lactic acid bacteria 08 exhibited moderate inhibitory power with inhibition zone diameters of 24 mm and 23 mm respectively, while the Lactic acid bacteria 33 fraction showed a greater inhibitory effect with an inhibition zone diameter of 33 mm.

The results of antibacterial activity tests of the combinations of essential oils (EO) from *Mentha piperita* and *Salvia officinalis* with semi-pure fractions of lactic acid bacteria 08 and 33 showed varied effects against the pathogenic germs *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, and *Klebsiella oxytoca spp.*

For the EO of *Mentha piperita*, the combination with the bacteriocin fraction 33 showed synergy against the strains *Klebsiella pneumoniae spp.* and *Klebsiella oxytoca spp.* when used at ratios of (50/50) and (75/25) respectively.

In contrast, the EO of *Salvia officinalis* combined with the bacteriocin fraction 08 showed synergistic effects against *Kluvera spp.* and *Klebsiella pneumoniae spp.* when used at ratios of 75/25 and 25/75 respectively.

Keywords: Lactic acid bacteria, Essential oils, Antibacterial activity, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, Synergy, and bio-preservation.

Résumé

L'objectif de notre étude a porté d'une part, sur la révélation de l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles extraites à partir de deux plantes médicinales (*Mentha piperita* et *Salvia officinalis*), d'autre part sur l'activité antagoniste des bactéries lactiques probiotiques isolées de produits laitiers Algériens. Les huiles essentielles sont testées seules et en combinaison avec la fraction semi-pure des bactériocines extraites à partir de deux souches lactiques par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, vis-à-vis six souches indicatrices (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25422, *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp*, *Klebsiella pneumoniae spp*, et *Klebsiella oxytoca spp*.) .Les fractions actives semi purifiées des bactériocines extraites des souches de Bactéries Lactiques 03 et 08 sont dotées d'un pouvoir inhibiteur modéré avec des diamètres de zone d'inhibition de 24 mm et 23 mm respectivement. Tandis que La fraction de Bactérie lactique 33 exerce un effet inhibiteur plus important avec un diamètre de zone d'inhibition de 33 mm.

Les résultats des tests d'activité antibactérienne des combinaisons d'huiles essentielles (HE) de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis* avec des fractions semi-pures de bactéries lactiques 08 et 33 montrent des effets variés contre les germes pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, et *Klebsiella oxytoca spp*.

Pour l'HE de *Mentha piperita*, la combinaison avec la fraction de la bactériocine 33 a montré une synergie contre la souche *Klebsiella pneumoniae spp* et *Klebsiella oxytoca spp*. lorsqu'elles sont utilisées avec des pourcentage de (50/50), et (75/25) respectivement.

En revanche, l'HE de *Salvia officinalis* combinée avec la fraction de la bactériocine 08 a montré des effets synergiques contre *Kluvera spp.*, et *Klebsiella pneumoniae spp* lorsqu'elle est utilisée à 75/25 et à 25/75 respectivement.

Mots clés: Bactéries lactiques, Huiles essentielles, Activité antibactérienne, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, Synergie et bio-préservation.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements au Professeur Mechai Abdelbasset, notre encadrant de thèse, pour son soutien inconditionnel, son appui scientifique et financier précieux, et surtout pour sa patience, sa sagesse et sa compréhension tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa guidance et son expertise ont été essentielles pour la réussite de ce travail.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à Mme le Professeur Debebza Manel pour son rôle de co-encadrante. Votre soutien constant, vos conseils avisés et votre rigueur scientifique ont été essentiels à la réalisation de notre projet. Merci infiniment pour votre précieuse collaboration et votre dévouement.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements aux membres du jury, Dr. Saoussen Smaali, en tant que présidente, et Dr Azizi Nassima, en tant qu'examinatrice, d'avoir accepté de présider et d'examiner ce travail.

Nos gratitude vont également aux doctorantes ; Melle AMRA Amel et Melle BOUTALEB Naima de nous avoir fournis les souches indicatrices, quelles trouvent ici nos sincères remerciements.

Un grand merci à toute la famille de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, comprenant les enseignants, les membres du personnel administratif, et l'ensemble de la communauté universitaire, pour leur soutien, leur encouragement et leur contribution à mon parcours académique.

Dédicaces

À mes parents, qui ont toujours été mon soutien inconditionnel et ma source d'inspiration, je vous dédie tout mon amour et ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À mon frère Aymen, complice de mes joies et de mes peines, je t'adresse cette dédicace pleine de fraternité et de complicité.

À mes sœurs Amani et Tasnime, qui illuminent ma vie de leur présence et de leur amour, je vous dédie ces mots empreints de tendresse et de complicité fraternelle.

À mes grands-pères et mes grandes-mères, piliers de notre famille, je vous adresse toute ma gratitude et mon respect pour les valeurs et l'amour que vous nous avez transmis.

À mes tantes et mes oncles, qui ont toujours été là pour moi, je vous dédie cette pensée reconnaissante pour votre soutien et votre affection.

À mes cousins Fadi et Abdelhamid, complices de mes souvenirs d'enfance, je vous adresse cette dédicace pleine de complicité et d'amitié.

À mes collègues Issam, Adem et Nadjib, qui ont partagé avec moi les hauts et les bas de mon parcours professionnel, je vous dédie ces mots de reconnaissance pour votre loyalisme et votre amitié sincère.

À tous mes amis d'enfance, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, je vous adresse cette dédicace empreinte de nostalgie et de souvenirs précieux.

Moundhir.

Dédicaces

À ma mère, pour son amour inconditionnel, sa patience infinie et ses innombrables sacrifices. Tu as été mon pilier, ma source d'inspiration et ma plus grande supportrice. Ton soutien indéfectible et tes encouragements m'ont donné la force de mener à bien ce travail.

À la mémoire de mon père, qui m'a quitté quand j'avais quatre ans. Bien que le temps passé ensemble ait été court, ton amour et tes valeurs continuent de me guider chaque jour. Ton souvenir reste une source de force et d'inspiration. Tu es toujours présent dans mon cœur et mes pensées.

À mes tantes et mes oncles, pour leurs encouragements constants, leur sagesse et leurs précieux conseils. Votre soutien moral et vos paroles réconfortantes m'ont toujours aidé à persévérer et à rester motivé.

À ma grand-mère, pour ses prières inlassables, sa bienveillance infinie et sa chaleur. Ta présence et tes bénédictions m'ont toujours apporté réconfort et force, me guidant à travers les moments difficiles.

À mes sœurs, Amani et Fatma, pour leur affection, leur camaraderie et leur soutien indéfectible. Vous avez été mes confidentes et mes alliées tout au long de ce parcours, apportant joie et motivation à chaque étape.

À mes amis, Moundhir, Issam et Nadjib, pour leur amitié précieuse et leur soutien moral.

Adem

Dédicaces

À ma mère, pour son amour inconditionnel, sa patience infinie, et ses innombrables sacrifices. Tu as toujours été mon pilier et ma source d'inspiration, et je te dois tout ce que je suis aujourd'hui.

À mon père, pour sa sagesse, ses encouragements et son soutien indéfectible tout au long de mon parcours. Ton exemple m'a guidé et m'a donné la force de persévérer.

À ma femme, pour son amour, sa compréhension et son soutien constant. Ta présence à mes côtés a été une source de réconfort et de motivation inestimable.

À mon fils, Adem, pour être ma joie et ma source de bonheur quotidien. Ta présence lumineuse m'a donné la force de continuer même dans les moments les plus difficiles.

À tous les enseignants de la faculté de SESNV, pour leur dévouement et leur transmission de connaissances. En particulier, au professeur Mechai Abdelbasset, pour son expertise et ses conseils précieux qui ont largement contribué à ce travail.

À tous mes amis, et en particulier Moundher, Adem, Nadjib, Taha et Ayoub, pour leur amitié sincère et leur soutien moral. Vous avez été des compagnons précieux et des alliés indispensables tout au long de cette aventure.

À tous les techniciens des laboratoires de recherche, pour leur expertise et leur aide précieuse. Votre travail a été essentiel pour la réalisation de ce projet.

À tout le staff de l'hôpital Khaldi Abdelaziz, pour leur soutien et leur professionnalisme. Vous avez joué un rôle crucial dans le bon déroulement de mes recherches.

À tous ceux qui me connaissent, pour leur soutien, leurs encouragements et leur amitié. Votre présence et vos paroles de réconfort ont été une source de force tout au long de ce parcours.

Issam

Liste des tableaux

Tableau 1 : les plus importantes espèces de bactéries lactiques considérées comme probiotiques	10
Tableau 2 : Applications proposées pour l'usage des bactériocines dans les produits alimentaires naturels ou fermentés.....	14
Tableau 5 : Les souches bactériennes utilisées et leurs origines.	27
Tableau 6 : le facteur de dilution et le volume d'HE correspondant	33
Tableau 7 : combinaisons entre huile essentielle FAC.	37
Tableau 8 : résultats du test microscopique.....	39
Tableau 9 : Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.	41
Tableau 10 : résultats de la lecture du test la CMI sur plaque de 96 puits	44
Tableau 11 : détermination de la CMI de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	45
Tableau 12 : détermination de la CMI de l'huile essentielle <i>Mentha piperita</i>	45
Tableau 13 : résultats du test de l'activité antimicrobienne des fractions semi pures (FAC) des souches de bactéries lactique (en mm) contre des souches bactériennes indicatrices sur milieu MH gélosé.	48
Tableau 14 : Résumé des résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (HE <i>Mentha piperita</i> + FAC08, FAC33) à différentes concentrations sur les souches bactériennes indicatrices.....	54
Tableau 15 : Résumé des résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (HE de <i>Salvia officinalis</i> + FAC08, FAC33) à différentes concentrations sur les souches bactériennes indicatrices.....	55

Liste des figures

Figure 1 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative de l'ADN ribosomique (ADNr) montrant les différents groupes phylogénétiques des bactéries lactiques à faible (GC%) et les genres Gram positif non reliés <i>Propionibacterium</i> et <i>Bifidobacterium</i> .	7
Figure 2 : modes d'action des différentes classes de bactériocines.	13
Figure 3 : limonène	19
Figure 4 : caryophyllène	19
Figure 5 : α -Thujaplicine	20
Figure 6 : bêta-sitostérol	20
Figure 7 : la plante <i>Mentha piperita</i> fraîche et après séchage	25
Figure 8 : la plante <i>Salvia officinalis</i> avant et après séchage	26
Figure 9 : les étapes d'isolement, de purification, et de conservation des souches de bactéries lactiques	29
Figure 10 : dispositifs de l'hydrodistillation de type Clevenger	30
Figure 11 : représentation des étapes de la réalisation du test de puits	34
Figure 12 : aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques	38
Figure 13 : forme cocci	38
Figure 14 : forme bacille	38
Figure 15 : forme cocobacille	38
Figure 16 : Effet antibactérien de l'huile essentielle <i>Mentha piperita</i> "HE1" et <i>Salvia officinalis</i> "HE2" sur les bactéries indicatrices	40
Figure 17 : représentation en Histogramme de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.	41
Figure 18 : lecture de microplaque de <i>Mentha piperita</i> et <i>Salvia officinalis</i> vis à vis <i>S.aureus</i> et <i>Mentha piperita</i>	43
Figure 19 : lecture de microplaque <i>Mentha piperita</i> vis-à-vis LCA01 LCA02 LCA03 LCA04	43
Figure 20 : lecture de microplaque <i>Salvia officinalis</i> vis à vis LCA01 LCA02 LCA03 LCA04	43
Figure 21 : lecture de microplaque de <i>Mentha piperita</i> et <i>Salvia officinalis</i> vis à vis <i>S.aureus</i> et <i>Mentha piperita</i>	47
Figure 22 : effet d'antagonisme entre la fraction semi pure de 14 souches de BL et la souche teste <i>S.aureus</i> ATCC 25923	47
Figure 23 : effet d'antagonisme entre la fraction semi pure de 14 souches de BL et la souche teste <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	48
Figure 24 : représentation de test de puits	48
Figure 25 : différentes combinaisons entre l'HE de <i>Salvia officinalis</i> et FSC08 vis à vis des souches testées	50

Figure 26 : différents combinaisons entre l'HE de <i>Mentha piperita</i> et FSC08 vis à vis des souches testées	51
Figure 27 : différents combinaisons entre l'HE de <i>Salvia officinalis</i> et FSC33 vis à vis des souches testées	51
Figure 28 : différents combinaisons entre l'HE de <i>Mentha piperita</i> et FSC08 vis à vis <i>S.aureus</i>	51
Figure 29 : histogramme représentant de l'effet des combinaisons de l'HE <i>Salvia officinalis</i> avec FSC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont des proportions % tandis que les zones d'inhibition sont mesurés en mm).....	52
Figure 30 : histogramme représentant de l'effet des combinaisons de l'HE <i>Salvia officinalis</i> avec FSC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont des proportions % tandis que les zones d'inhibition sont mesurés en mm).....	52
Figure 31 : histogramme représentant de l'effet des combinaisons de l'HE <i>Mentha piperita</i> avec FSC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont des proportions % tandis que les zones d'inhibition sont mesurés en mm).....	53
Figure 32 : histogramme représentant de l'effet des combinaisons de l'HE <i>Mentha piperita</i> avec FSC08 sur <i>S.aureus</i> (les combinaisons sont des proportions % tandis que les zones d'inhibition sont mesurés en mm).....	53

Liste des abréviations

-A-

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

ATCC: American Type Of Culture Collection.

-B-

B. subtilis : Bacillus subtilis.

BL : Bactérie lactique.

BMH : Bouillon Mueller Hinton.

BN : Bouillon Nutritif.

-C-

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

°C: Degré Celsius.

-D-

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

-E-

E. coli: Escherichia coli.

-F-

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAC: Fraction Semi-pure de Culture.

-G-

g: Gramme.

GN: Gélose Nutritive.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

-H-

h: heure.

HCL: Hydrochloric acid.

HE: Huile Essentielle.

-K-

kDa: kilo Dalton.

-M-

MH: Mueller Hinton.

MHB: Mueller Hinton bouillon.

ml: Millilitre.

mm: Millimètre.

Mp: Mentha piperita.

MRS: Man Rogosa Sharpe.

-N-

NaCl: Chlorure De Sodium.

-O-

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

-P-

pH: Potentiel D'hydrogène.

-S-

S. aureus : Staphylococcus aureus.

So: Salvia officinalis.

-U-

UFC: Unité Format Colonie.

-V-

V/V: Volume/Volume.

-μ- μl: Microlitre.

Zi: Zone d'Inhibition

ملخص.....	i
Abstract.....	ii
Résumé.....	iii
Remerciements.....	iv
Dédicaces.....	v
Liste de figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abreviations.....	xi

Table des matières

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale	1
1 Les bactéries lactiques et les probiotiques	4
1.1 Les bactéries lactiques.....	4
1.1.1 Généralités sur les bactéries lactiques.....	4
1.1.2 Habitat	4
1.1.3 Taxonomie des bactéries lactiques	5
1.1.4 Utilisation des bactéries lactiques.....	7
1.2 Les probiotiques.....	8
1.2.1 Généralités sur les probiotiques.....	8
1.2.2 Les Critères de sélection des probiotiques.	8
1.2.3 L'activité antimicrobienne des probiotiques.	10
1.2.4 Les bactériocines des bactéries lactiques	11
1.2.5 Utilisation des bactéries lactiques pour la bioconservation des aliments	13
2 Plantes médicinales et huiles essentielles.....	16
2.1 Définition des plantes aromatiques et médicinales.....	16
2.2 Historique d'utilisation des plantes médicinales	16

2.3	Les huiles essentielles	16
2.3.1	Définition.....	16
2.3.2	Techniques d'extraction des huiles essentielles :	17
2.3.3	La composition des Huiles essentielles	19
2.3.4	Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles.....	21
3	L'association entre les huiles essentielles et les souches probiotiques	22
3.1	Interaction entre les composants des huiles essentielles	22
3.2	Interaction entre les huiles essentielles et les probiotiques	22

PARTIE EXPERIMENTALE

4	Matériel et méthodes	24
4.1	Lieu d'étude.....	24
4.2	Objectives d'étude	24
4.3	Matériel	24
4.3.1	Milieus de culture	24
4.3.2	Matériel biologique et produits chimiques.....	24
4.3.3	Appareillages.....	25
4.3.4	Outils de la microbiologie	25
4.3.5	Matériel végétal	25
4.3.6	Souches utilisées.....	26
4.4	Méthodes	27
4.4.1	Isolement, purification et conservation des souches.....	27
4.4.2	Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	29
4.4.3	Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :	31
4.4.4	Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques par la méthode de puits.....	33
4.4.5	Etude de l'effet antibactérien combiné des huiles essentielles avec les fractions semi pures (FAC) des bactéries lactiques:	34

5	Résultats et Discussions	38
5.1	Isolement et purification des bactéries lactiques	38
5.1.1	Aspect macroscopique	38
5.1.2	Aspect microscopique	38
5.2	Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	40
5.2.1	Résultat de l'Aromatogramme.....	40
5.2.2	Résultats de la CMI.....	42
5.3	Résultats de l'activité antimicrobienne de fractions de bactériocine semi-pures (FAC) des bactéries lactiques :	46
5.4	Résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (huile essentielle + FAC) à différentes concentrations sur les souches bactériennes testées :	50
6	CONCLUUSION.....	58
	Références bibliographiques.....	64
	Annexes.....	73

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction Générale

Introduction générale

La qualité des aliments se définit selon ses différents volets, nutritionnel, organoleptique, sanitaire, environnemental, etc. Les qualités organoleptique et sanitaire peuvent être affectées par la présence ou l'activité de microorganismes. En effet, les produits alimentaires sont pour la plupart non stériles et susceptibles d'être un support de croissance des microorganismes, Certains de ces microorganismes contaminants peuvent altérer la qualité ou la sécurité des produits alimentaires.

(Dubois-Brissonnet, 2019)

Malgré les progrès réalisés dans les méthodes de conservation des aliments, la nature des conservateurs demeure l'un des problèmes réels qui doivent être pris en compte pour préserver la santé des consommateurs. Pour faire face aux problèmes de contamination et d'oxydation des aliments, le développement de la chimie a favorisé l'apparition et l'application de nouvelles substances chimiques telles que les benzoates, les sulphites, le chlorure de calcium, l'acide citrique, etc., utilisés comme conservateurs alimentaires synthétiques. Par la suite, plusieurs de ces conservateurs synthétiques ont été interdits dans certains pays en raison de leurs effets toxicologiques négatifs à long terme **(Christian, 2023)**.

La bioconservation des aliments est une méthode biologique utilisée depuis 40 ans. Elle permettrait une conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents chimiques ou de la chaleur **(Mekri, 2016)**.

Au cours des dernières décennies, une attention particulière a été accordée à l'importance des produits naturels pour protéger contre la dégradation des aliments. Il y a donc un intérêt croissant pour les huiles essentielles, **(Dhifi et al., 2016)**

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes aromatiques et médicinales et représentent une très petite fraction de la composition totale de la plante, environ moins de 5% de la matière sèche végétale. Les extraits aromatiques végétaux sont volatils, généralement liquides et incolores à température ambiante. Elles sont peu solubles dans l'eau mais très solubles en alcool et en solvants organiques **(Falleh et al., 2020)**.

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. De nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes. **(Burt, 2004)**.

Introduction Générale

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. **(Kalemba & Kunicka, 2003)**. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire. **(Burt, 2004)**.

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. **(Saad, 2010)**

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées **(Metrouh, 2022)**. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes **(O'Sullivan et al., 2002)**. Ces propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens. En effet, les bactéries lactiques ont la propriété de produire de nombreuses substances antimicrobiennes telles que les acides organiques (acide lactique), du peroxyde d'hydrogène, du CO₂, de l'acétylène, de l'acétaldéhyde et des bactériocines **(Mekri, 2016)**. Plusieurs revues et travaux de recherche rapportent le potentiel des bactéries lactiques utilisées comme cultures ajoutées pour inhiber des microorganismes pathogènes présents dans les aliments **(Mechai, 2009)**, notamment l'inhibition de *L. monocytogenes* en présence de bactéries lactiques **(Mami, 2013)**

Récemment, les bactéries lactiques ont été de plus en plus utilisées comme probiotiques, et 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

Introduction Générale

que l'effet bénéfique démontré sur l'hôte, l'origine de la souche, 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**).

L'objectif de cette étude consiste à l'étude de l'effet de synergie des bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait cru (de chèvre et de vache Algérien), d'un Jben artisanal et les huiles essentielles extraites de deux plantes ; *Salvia officinalis* et *Mentha piperita*. La stratégie de cette étude est axée sur l'isolement en premier lieu d'une large gamme de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes type bactériocine. Ensuite, nous étudierons les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et des bactériocines vis-à-vis des germes pathogènes multirésistants aux antibiotiques d'origine alimentaire. Dans un dernier temps, l'étude synergétique des bactériocines produite par les bactéries lactiques et les huiles essentielles extraites de nos plantes.

1 Les bactéries lactiques et les probiotiques

1.1 Les bactéries lactiques

1.1.1 Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (**Klein *et al.*, 1998; Badis, *et al.*, 2005**), sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques tolèrent des pH acides, ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotolérant (**Hardie & Whiley, 1997**). De trop grandes teneurs en oxygène peuvent leur être néfastes en raison de l'absence de chaîne respiratoire. La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème, n'est pas présent dans le milieu (**Lechardeur *et al.*, 2011**). L'hème est un cofacteur indispensable au cytochrome c-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire.

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique (**Mekri, 2016**) comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homofermentaires, en plus de l'éthanol et CO₂ chez les bactéries hétérofermentaires. Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (**Stiles & Holzapfel, 1997**) et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb. Les bactéries lactiques se caractérisent par de faibles activités protéolytique et lipolytique et sont très exigeantes en acides aminés et en vitamine B (**Caplice & Fitzgerald, 1999**). Elles sont ubiquistes et se trouvent soit libres dans l'environnement, soit en association avec un hôte.

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire, réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines Caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation, Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (**Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010**).

1.1.2 Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (**Douault et Corthier, 2000**). On peut également les trouver dans le sol, les engrais, ou encore dans les eaux d'égout (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

1.1.2.1 Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques exigent pour leur croissance des milieux riches en nutriments tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras, les sels et 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 le peptone, le glucose et le Tween 80.

1.1.2.2 Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**Leveau et Bouix, 1993**)

1.1.2.3 Diversité des bactéries lactiques

grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. (**de Roissard et Luquet, 1994**) Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Elles sont utilisées dans l'alimentation, sont considérées comme non pathogènes et sont qualifiées d'organismes GRAS (**Generally Recognized As Safe**) (**Adams, 1995**). Cependant, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*, ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

1.1.3 Taxonomie des bactéries lactiques

Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (**Vos et al., 2009**), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Actuellement, d'un point de vue technologique, les bactéries lactiques regroupent douze genres bactériens différents, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

Bactéries Lactiques et Probiotiques

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Salminen & von Wright, 2004). L'appellation bactéries lactiques est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Macrooccus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisées dans la fabrication de divers produits fermentés (Klaenhammer *et al.*, 2005).

1.1.3.1 Classification phénotypique

L'ancienne taxonomie des bactéries lactiques repose sur l'approche classique ou bien l'identification phénotypique (morphologique, biochimique et physiologique). Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques, analyse des protéines totales de la cellule et autre composants cellulaires. Néanmoins, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites, notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions métaboliques.

1.1.3.2 Classification génotypique

La classification moderne est basée sur les approches moléculaires, qui s'appuient sur des tests génotypiques telles que le séquençage de l'ARN16S, ribotypage et d'autres méthodes de typage basées sur l'ADN. Ces techniques moléculaires permettent une meilleure différenciation des microorganismes à différents niveaux (Chiff, 2021). Les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum : Firmicute, la Classe : Bacilli et sont divisées en quatre familles (Madigan et Martinko, 2007) :

- *Lactobacillaceae*.
- *Enterococcaceae*.
- *Leuconostocaceae*.
- *Streptococcaceae*.

Ces familles regroupent les principaux genres de bactéries lactiques en fonction de leur parenté phylogénétique. Il s'agit des genres : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Aerococcus* et *Bifidobacterium* (figure 1) (bifidum considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, ils sont liés au phylum Actinobacteria (Federighi, 2005).

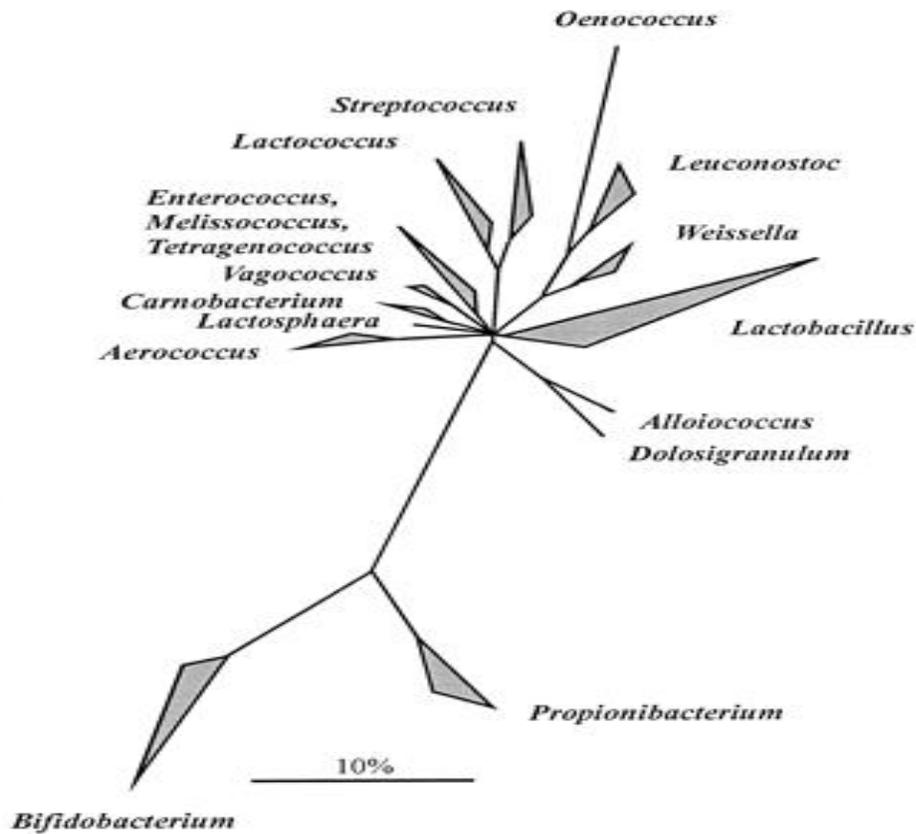


Figure 1 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative de l'ADN ribosomique (ADNr) montrant les différents groupes phylogénétiques des bactéries lactiques à faible (GC%) et les genres Gram positif non reliés *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001).

1.1.4 Utilisation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la transformation des aliments et sont largement utilisées dans divers domaines tel que l'industrie agroalimentaire, santé, Biotechnologie, Agriculture, Médecine vétérinaire et dans la bioconservation.

1.1.4.1 Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines.

Les BL possèdent des propriétés d'acidification et de production de polysaccharides utiles pour la fermentation. Ils produisent également des bactériocines, des molécules antimicrobiennes qui permettent de conserver les aliments et d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes. La production des bactériocines in situ par les BL présente des avantages économiques et environnementaux par rapport à la production ex situ. Il existe d'autres propriétés bénéfiques portées par les BL bactériocinogènes, telles que l'augmentation de la valeur nutritive des aliments et la réduction de la formation de produits toxiques. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont

Bactéries Lactiques et Probiotiques

les plus utilisées pour la production de bactériocines tandis que D'autres genres bactériens, tels que *Enterococcus* et *Pediococcus*, sont également utilisés. (Franz, 2007). Les bactériocines sont reconnues comme sûres, sensibles aux protéases digestives et à priori non toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al.*, 2006). Certaines possèdent une tolérance élevée aux variations de pH et traitements thermiques (Drider *et al.*, 2006). Les spectres antimicrobiens sont plus ou moins larges et peuvent cibler d'une façon sélective des bactéries pathogènes ou d'altération sans pour autant affecter les bactéries utiles du même écosystème (Gálvez *et al.*, 1986). Les bactériocines sont considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existants (Snyder *et al.*, 2013)

1.2 Les probiotiques

1.2.1 Généralités sur les probiotiques

1.2.1.1 Historique et définition

Le terme probiotique a bénéficié d'une variété de définitions qui ont évolué au fil du temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Le concept de probiotiques est en grande partie dû aux travaux de Metchnikoff, qui a proposé que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes pourrait prolonger la durée de vie en réduisant le nombre de bactéries putréfactives ou productrices de toxines dans le tube digestif. En 1965, Lilly et Stillwell ont proposé la première définition des probiotiques en tant que "facteurs de croissance produits par des microbes". Depuis, la définition du terme probiotique a été révisée à plusieurs reprises (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). En 1989, Roy Fuller a souligné l'exigence de viabilité des probiotiques et avancé l'idée que les probiotiques sont bénéfiques pour l'hôte (Guarner *et al.*, 2008). La FAO et l'OMS (2002) ont récemment élaboré des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et ont élaboré la définition suivante : « Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes, confèrent un avantage pour la santé à l'hôte qui affecte qui les ingère".

1.2.2 Les Critères de sélection des probiotiques.

1.2.2.1 Critères de sécurité

- Identification taxonomique précise.
- Souche caractérisée par des techniques phénotiques et génotypiques.
- Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal.

Bactéries Lactiques et Probiotiques

1.2.2.2 Critères fonctionnels

La Résistance à l'acidité gastrique

Les bactéries probiotiques doivent pouvoir survivre au passage dans l'estomac, qui est un environnement très acide (pH 1 à 3). Pour cela, elles doivent posséder des mécanismes de protection contre l'acide gastrique, tels qu'une paroi cellulaire épaisse ou la production d'enzymes neutralisantes (**Ammor et Mayo, 2007**)

La Résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, les sels biliaires, sécrétés par le foie, peuvent décomposer les membranes cellulaires des bactéries. Les probiotiques doivent donc être capables de résister à l'action des sels biliaires pour pouvoir survivre et se coloniser dans l'intestin (**Ammor et Mayo, 2007**).

Adhésion aux cellules épithéliales

Pour exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent se fixer aux cellules épithéliales de la paroi intestinale. Cette adhésion permet aux probiotiques d'exclure les pathogènes, de stimuler le système immunitaire et de produire des substances bénéfiques pour l'organisme (**Arboleya et al., 2011**).

Production de substances antimicrobiennes

Les bactéries probiotiques peuvent produire une variété de substances antimicrobiennes qui permettent d'inhiber ou de tuer les bactéries pathogènes. Ces substances incluent :

- **Acides organiques:** Acide lactique, acide acétique, acide propionique, etc.
- **Peroxyde d'hydrogène:** Molécule oxydante qui endommage les cellules bactériennes.
- **Dioxyde de carbone:** Crée un environnement anaérobie défavorable aux bactéries pathogènes.
- **Diacétyl:** Composé aromatique à effet antibactérien.
- **Bactériocines:** Peptides antimicrobiens spécifiques à certaines souches bactériennes.

La production de substances antimicrobiennes par les probiotiques contribue à la protection de la muqueuse intestinale contre les infections et à l'équilibre de la microflore intestinale (**Labioui et al, 2005**).

Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques présentent naturellement une résistance à certains antibiotiques, ce qui est un avantage important pour leur utilisation en tant que probiotiques. Cependant, il est important de

Bactéries Lactiques et Probiotiques

sélectionner des souches qui ne possèdent pas de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles, car ces gènes pourraient être transférés à des bactéries pathogènes (**Ammor et Mayo, 2007**).

1.2.2.3 Critères technologiques

Outre la sécurité et les propriétés fonctionnelles, des critères techniques sont également pris en compte lors de la sélection des souches probiotiques (**tableau 1**). Selon **Saarela et al. (2000)**, ces normes :

- Bonnes propriétés sensorielles
- Résistance aux phages
- Viabilité durant le traitement technologique
- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

Tableau 1 : les plus importantes espèces de bactéries lactiques considérées comme probiotiques

<i>Lactobacillus (Lb)</i>	<i>Bifidobacterium (B)</i>	Autres BL
• <i>Lb. acidophilus</i>	• <i>B. adolescentis</i>	• <i>Enterococcus faecalis</i>
• <i>Lb. amylovirus</i>	• <i>B. animalis</i>	• <i>Enterococcus faecium</i>
• <i>Lb. brevis</i>	• <i>B. bifidum</i>	• <i>Lactococcus lactis</i>
• <i>Lb. casei</i>	• <i>B. breve</i>	• <i>Leuconostoc</i>
• <i>Lb. cellobius</i>	• <i>B. infantis</i>	<i>mesenteroides</i>
• <i>Lb. crispatus</i>	• <i>B. lactis</i>	• <i>Pediococcus</i>
• <i>Lb. curvatus</i>	• <i>B. longum</i>	<i>acidilactici</i>
• <i>Lb. delbrueckii</i>	• <i>B. thermophilum</i>	• <i>Sporolactobacillus</i>
• <i>Lb. farciminis</i>		<i>inulinus</i>
• <i>Lb. fermentum</i>		• <i>Streptococcus</i>
• <i>Lb. gallinarum</i>		<i>thermophilis</i>
• <i>Lb. gasseri</i>		
• <i>Lb. johnsonii</i>		

1.2.3 L'activité antimicrobienne des probiotiques.

Les bactéries probiotiques déploient un arsenal de composés antimicrobiens pour préserver l'intégrité des produits (**Labioui et al., 2005**). Parmi ces composés

- les acides organiques, tels que l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, issus de la fermentation des glucides, agissent comme gardiens redoutables, inhibant levures, moisissures et bactéries indésirables (**Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006**).

Bactéries Lactiques et Probiotiques

- Le peroxyde d'hydrogène, produit par les bactéries lactiques, s'accumule dans l'environnement, créant un climat hostile à certains micro-organismes (**Ammor et Mayo, 2007**).
- Les bactéries lactiques hétérofermentaires, quant à elles, synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire, dont l'accumulation dans le milieu extérieur produit des effets anaérobies toxiques pour certains micro-organismes aérobies présents dans les aliments (**Ammor et Mayo, 2007**).
- Le diacétyle, un autre composé antimicrobien produit par les bactéries lactiques, s'attaque aux bactéries Gram-négatives, aux levures et aux moisissures (**Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006**).
- Enfin, les bactériocines, substances antibactériennes de différents poids moléculaires, complètent cet arsenal antimicrobien (**Dortu et Thonart, 2009**). Leur activité inhibitrice, ciblant principalement les bactéries proches de la souche productrice, se caractérise par un spectre d'action généralement étroit. Parmi les bactériocines les plus connues figurent la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Ogunbanwo et al., 2003**). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent un mode d'action commun : la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**De Vuyst et Leroy, 2007**)

1.2.4 Les bactériocines des bactéries lactiques

1.2.4.1 Définition :

Les bactériocines sont des composés peptidiques synthétisés naturellement par certaines bactéries. Elles jouent un rôle important dans la compétition entre souches bactériennes.

Les bactériocines peuvent être bactéricides, c'est-à-dire éliminer certains micro-organismes et/ou elles peuvent être bactériostatiques, c'est-à-dire inhiber la croissance de certains micro-organismes. L'activité bactéricide ou bactériostatique est orientée contre certaines espèces proches de la souche productrice.

Les bactériocines sont généralement des peptides cationiques et amphiphiles, responsables de la perméabilisation de la membrane des cellules cibles. En effet, elles se fixent à certains récepteurs membranaires et y provoquent la formation de pores. La membrane est ainsi rendue perméable à certains composés tels les ions ou molécules. Cela est généralement létal pour la bactérie cible.

1.2.4.2 Classification

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par **Klaenhammer (1993)** :

- ✚ **Classe I.** Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-

Bactéries Lactiques et Probiotiques

dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types :

✓ **Ia** qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés

✓ **Ib** qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**McAuliffe et al., 2001**).

✚ **Classe II.** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoléctrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes.

✓ **sous-classe IIa** contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006**)

✓ **sous-classe IIb** : comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués :

- type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre.
- type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

✓ **Sous-classe IIc** : contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes

✚ **Classe III.** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B.

✚ **Classe IV.** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

1.2.4.3 Mode d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram⁻. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés. Selon **Tagg et al. (1976)**, le mode d'action des bactériocines comporte deux étapes (**figure 2**):

1^{ère} étape : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non

Bactéries Lactiques et Probiotiques

spécifiques de la membrane des cellules cibles.

2^{ème} étape : elle est une phase irréversible implique la modification pathologique de la cellule cible. L'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cible et la fuite des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle dans le maintien et l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte va perturber la synthèse de macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les protéines.

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**Wijaya et al., 2006**). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (**Galvez et al., 2007**). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (**Deegan et al., 2006**).

1.2.5 Utilisation des bactéries lactiques pour la bioconservation des aliments

1.2.5.1 Aspects généraux de la bioconservation (La technologie des barrières)

La bioconservation est l'extension de la durée de conservation et de la sécurité des aliments en utilisant une microflore naturelle et/ou leurs produits antimicrobiens (**Stiles, 1996**). Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières (**Leistner, 2000**). Il s'agit d'appliquer successivement plusieurs procédés ralentissant la croissance des Microorganismes. Chacun n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisant en soi pour obtenir une bonne conservation. C'est alors la succession de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée ; diminution : réfrigération), l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate) et la biopréservation (**Leistner, 2000**).

1.2.5.2 La bioconservation

La bioconservation consiste à l'inoculation dans un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit (**Rodgers, 2001**). La biopréservation fait partie des techniques qui

Bactéries Lactiques et Probiotiques

peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières. Elle peut être utilisée sur des produits légèrement préservés, sur des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou sur des produits ayant subis une cuisson rapide. Différents mécanismes entrent en jeu lors de la bioconservation. L'inhibition des flores indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de bactériocines (**Helander *et al.*, 1997**). L'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de bioconservation. (**Stiles, 1996**) A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

1.2.5.3 Les bactéries lactiques dans la bioconservation

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (**tableau 2**). Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches (**Guinane *et al.*, 2005**).

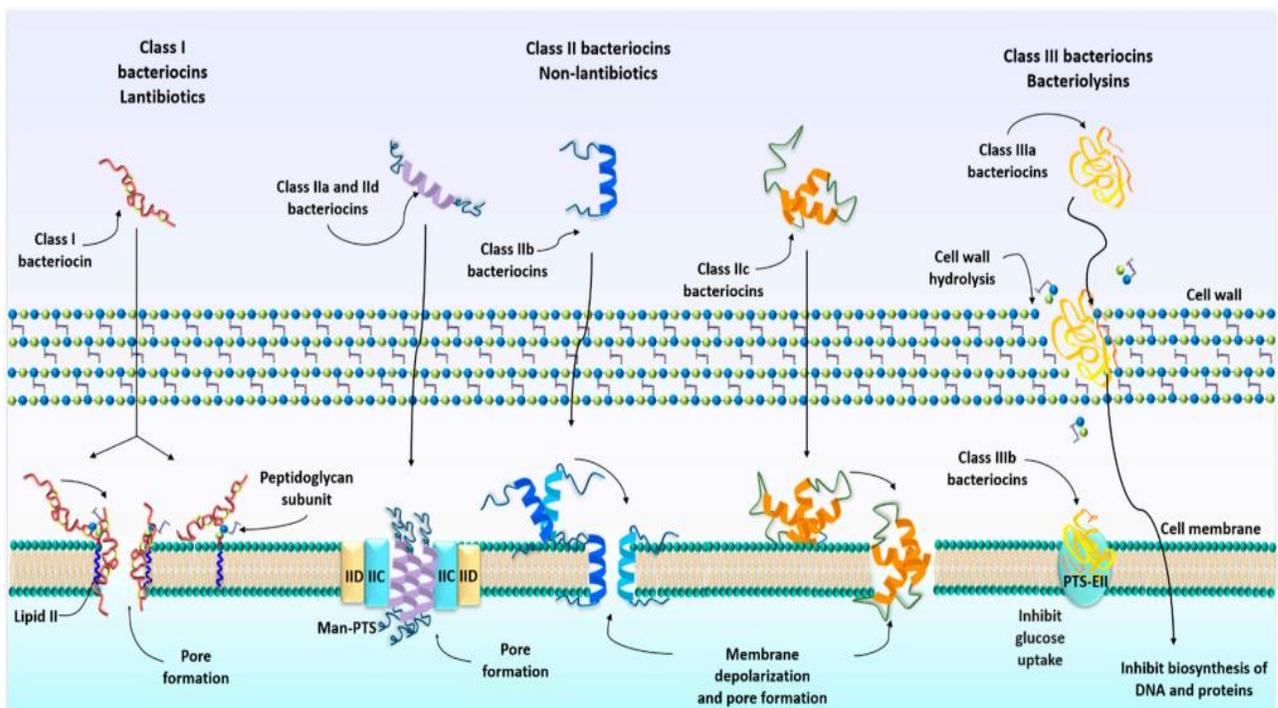


Figure 2 : mécanismes d'action des différentes classes de bactériocines. (**Hernández *et al.*, 2021**)

Bactéries Lactiques et Probiotiques

Tableau 2 : Applications proposées pour l'usage des bactériocines dans les produits alimentaires naturels ou fermentés

Souches productrices	Bactériocine produite	Application	Organismes ciblés
<i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48	Entéroisine AS-48	Jus de fruits, fruits frais, Charcuteries, Préparation de légumes et de soja	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Bacillus cereus</i> • <i>Bacillus macroides</i>
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	Entéroisines A et B	Jambon blanc	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Enterococcus faecium</i> CRL35	Entéroisine CRL35	Fromage de chèvre	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i> L50	Entéroisine L50A/L50B	Bières	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus brevis</i> • <i>Pediococcus damnosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> EJ97	Entéroisine EJ97	Purée de légumes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus macroides</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> EJ97	Sakacine P	Poulet	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	Pédiocine PA-1/AcH	Poulet cru	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i>

2 Plantes médicinales et huiles essentielles

2.1 Définition des plantes aromatiques et médicinales

On appelle plante médicinale toute plante qui renferme un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Bouhrara, 2016**) et parfois toxique selon son dosage. Les plantes médicinales représentent une source considérable et permanente pour l'extraction de principe actif. Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière, le plus souvent, il s'agit d'une ou de plusieurs parties qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes.

2.2 Historique d'utilisation des plantes médicinales

Les plantes s'imposent sur la planète par leur aspect, leur exubérance et leur mystère. Depuis les temps les plus reculés l'Homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux et il a appris à ses dépens à discerner les plantes toxiques. Ces connaissances, transmises d'abord oralement, l'ont ensuite été dans les écrits et il subsiste des traces de l'emploi des plantes comme médicaments par les Anciens dans les plus vieilles civilisations. (**Chabrier, 2010**). Depuis toujours, l'homme a eu recours aux plantes pour se maquiller, se parfumer, mais aussi pour se soigner sans connaître réellement les propriétés de ces plantes, ni avoir la moindre connaissance scientifique, même sommaire, expliquant leurs vertus. Ce n'est qu'au moyen âge que les huiles essentielles ont été réellement découvertes grâce aux premières distillations et plus tard, grâce aux progrès de la science et tout particulièrement à l'apparition de la chimie. Cette médecine traditionnelle ancestrale est le précurseur de la phytothérapie et de l'aromathérapie d'aujourd'hui. (**Guerrouf, 2017**)

2.3 Les huiles essentielles

2.3.1 Définition

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition».

La plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante (**Lardry et Haberkorn, 2007**). Ces dernières fabriquent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaques diverses...) (**Ferdes, 2019**).

2.3.2 Techniques d'extraction des huiles essentielles :

2.3.2.1 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode d'extraction d'huiles essentielles la plus courante et la plus simple. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau chaude à travers la matière végétale, entraînant les huiles essentielles volatiles. La vapeur chargée d'huiles essentielles est ensuite refroidie, permettant à la vapeur de se condenser et aux huiles essentielles de se séparer sous forme de liquide. (**Bruneton, 1999**)

2.3.2.2 Entraînement à la vapeur d'eau (Distillation à la vapeur d'eau)

Similaire à l'hydrodistillation, cette méthode utilise une pression de vapeur plus élevée pour une extraction plus efficace, particulièrement pour les matières végétales délicates. La vapeur à haute pression permet de libérer les huiles essentielles sans endommager la plante.

2.3.2.3 Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'hydrodistillation où la matière végétale est immergée dans l'eau chaude avant l'introduction de la vapeur. Cette méthode est particulièrement adaptée aux plantes riches en eau et aux huiles essentielles hydrosolubles. (**Nasardin et al., 2018**)

2.3.2.4 Expression à froid

Cette technique sans chauffage est réservée à l'extraction des zestes des agrumes. Le principe est mécanique. Il est fondé sur la rupture des péricarpes, réservoirs d'essences olfactives, en passant les agrumes sur des récipients dont les parois sont recouvertes de pics en métal. L'essence est libérée par un courant d'eau, puis décantée. La présence de l'eau peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse, de contamination par des pesticides résiduels ou des micro-organismes. Une nouvelle technique physique basée sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet soit d'une

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

dépersion, soit par abrasion de l'écorce fraîche, éliminerait l'eau et diminuerait les effets d'oxydation des composés de ces essences. **(Pierron, 2014)**

2.3.2.5 Extraction par solvants

L'extraction par solvant organique utilise des solvants volatils comme l'hexane ou l'éthanol pour dissoudre les huiles essentielles de la matière végétale. Cette méthode permet d'obtenir des rendements plus élevés que la distillation, mais elle présente des risques de toxicité et un impact environnemental **(Boukhatem, 2019)**

2.3.2.6 Extraction par micro-ondes

La distillation assistée par micro-ondes (MAE) se présente comme une alternative prometteuse aux méthodes d'extraction d'huiles essentielles (HE) traditionnelles, telles que l'hydrodistillation. Cette technique révolutionnaire offre de nombreux avantages considérables, notamment une réduction significative du temps d'extraction, une augmentation des rendements en HE, une économie d'énergie notable et la possibilité d'extraire des composés sensibles à la chaleur. De plus, la MAE se distingue par son caractère écologique en éliminant l'utilisation de solvants organiques nocifs pour l'environnement.

Fonctionnant sur le principe du chauffage direct de la matière végétale par des micro-ondes, la MAE provoque la vaporisation des HE, permettant leur collecte et leur condensation ultérieures. Cependant, l'optimisation des paramètres d'extraction, l'investissement dans un équipement spécialisé et le risque de dégradation des HE en cas d'exposition excessive aux micro-ondes représentent des défis à relever.

Malgré ces défis, la MAE démontre un fort potentiel pour révolutionner l'industrie de l'extraction d'HE. Les recherches continues et les progrès technologiques permettront de surmonter les obstacles actuels et de faire de la MAE une méthode d'extraction d'HE incontournable, alliant efficacité, durabilité et respect de l'environnement. **(Boukhatem, 2019)**

2.3.3 La composition des Huiles essentielles

Les composants aromatiques de toute huile essentielle sont des molécules connues et biochimiquement définies. Ce sont ces éléments chimiques aromatiques des huiles essentielles chémotypées qui leur confèrent leurs propriétés thérapeutiques spécifiques.

2.3.3.1 Les composés terpéniques

Avec les polyphénols, les terpénoïdes sont classés parmi les substances secondaires importantes du métabolisme chez les végétaux. Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel ils sont parfois désignés. Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue:

✚ **Monoterpènes** : Ce sont les hydrocarbures les plus abondants dans les huiles essentielles.

○ **Propriétés générales**

- Positivants
- Décongestionnants respiratoires
- Lymphotoniques
- Stimulants digestifs
- Antiseptiques atmosphériques
- Antiviraux
- Expectorants balsamiques

○ Exemples : limonène, alpha-pinène, bêta-pinène.

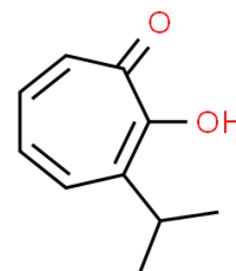


Figure 3 : limonene

✚ **Sesquiterpènes** : Composés de trois unités d'isoprènes, ils sont présents dans de nombreuses huiles essentielles.

○ Propriétés générales

- Négativants
- Anti-inflammatoires
- Calmants
- Hypotenseurs
- Décongestionnants veineux et lymphatiques
- Anti-allergiques

○ Exemples : caryophyllène, bêta-caryophyllène, farnésol.

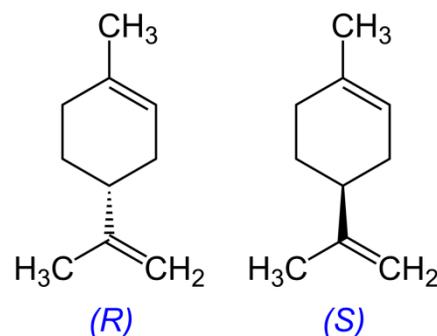


Figure 4 : caryophyllène

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

✚ **Diterpènes** : Quatre unités d'isoprènes forment ces diterpènes, dont la masse moléculaire relativement importante limite leur présence dans les huiles essentielles obtenues par distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

- Propriétés générales :
 - anti-inflammatoires
 - antibactériennes
 - antifongiques
- Exemples : abietine, thujaplicine, pimaricine.

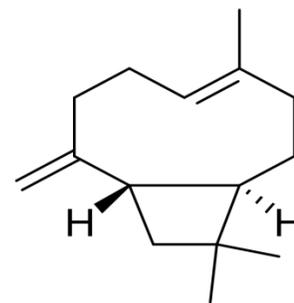


Figure 5 : α -Thujaplicine

✚ **Triterpènes**

- Propriétés générales :
 - anti-inflammatoires
 - antioxydantes
 - anticancéreuses
- Exemples : squalène, bêta-sitostérol

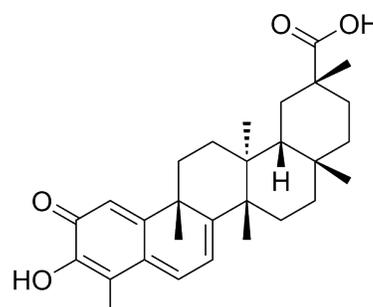


Figure 6 : bêta-sitostérol

2.3.3.2 Composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiacées (persil, anis, fenouil, etc...) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc.... (Bazizi, 2017)

2.3.3.3 Autres composés

- **Alcools**: Ils ont des propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires. Exemples : linalol, géraniol, menthol.
- **Aldéhydes**: Ils ont des propriétés antibactériennes, antifongiques et expectorantes. Exemples : citral, citronellal, neral.
- **Cétones**: Elles ont des propriétés anti-inflammatoires, antispasmodiques et calmantes. Exemples : camphre, menthone, thujone.
- **Esters**: Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et calmantes. Exemples : linalyl acétate, géranyl acétate, néryl acétate.

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

- **Phénols:** Ils ont des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes. Exemples : thymol, carvacrol, eugénol.
- **Coumarines:** Elles ont des propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires et antispasmodiques. Exemples : coumarine, ombelliférone, xanthotoxine.

2.3.4 Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (**Laouar *et al.*, 2013**) :

- ❖ Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires
- ❖ Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure
- ❖ Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie.

2.3.4.1 Application dans le domaine de la bioconservation

Les huiles essentielles actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe GRAS), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais cependant des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne. Grâce leur propriétés antimicrobiennes à large spectre elles inhibent la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

3 L'association entre les huiles essentielles et les souches probiotiques

3.1 Interaction entre les composants des huiles essentielles

Les études ont révélé que les composés phénoliques et alcooliques dans les huiles essentielles ont principalement des effets additifs et synergiques. En général, les composés ayant des structures similaires ont tendance à avoir un effet additif plutôt que synergique. Dans certaines huiles essentielles, les interactions additives sont liées à leur composition principale en composés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol. L'effet antagoniste est attribué à l'interaction entre les hydrocarbures monoterpéniques non oxygénés et oxygénés. **(Bassolé et Juliani, 2012)** d'autres études ont conclu que les huiles essentielles entières ont une activité antibactérienne plus élevée que celle des composants majeurs mélangés, suggérant ainsi que les composants mineurs sont essentiels à cette activité et peuvent avoir un effet synergique ou potentialisateur. **(Soukkou et al., 2011)**

En combinant différentes huiles essentielles ou en utilisant des assaisonnements contenant des concentrations élevées d'huiles essentielles, il est possible de créer la méthode à base d'huile la plus efficace pour de nombreux produits alimentaires. Cette approche permet non seulement d'inhiber la croissance des bactéries altérantes, mais aussi de préserver des profils de saveur et d'odeur plus subtils, évitant ainsi les saveurs très concentrées et potentiellement répréhensibles. Ainsi, les huiles essentielles ou leurs combinaisons offrent une alternative prometteuse pour la conservation des aliments, en garantissant à la fois leur sécurité et leur qualité organoleptique. **(Soukkou et al., 2011)**.

3.2 Interaction entre les huiles essentielles et les probiotiques

Dans de nombreux pays, les huiles essentielles sont actuellement étudiées pour mieux cerner leur efficacité comme agents de conservation naturels pour les aliments. Une large gamme d'huiles a été testée contre des dizaines de microorganismes. les résultats sont souvent utilisées dans d'autres études qui visent à explorer le potentiel de l'effet combiné des HE avec les bactéries probiotiques dans le de la bioconservation, selon **Shpradeep et al., (2013)** l'utilisation combinée des huiles essentielles et des probiotiques dans les produits alimentaires offre une perspective prometteuse pour la bio conservation Malgré le fait que les huiles essentielles aient une concentration minimale inhibitrice élevée pour les probiotiques, elles se révèlent efficaces à des concentrations plus faibles contre les agents pathogènes .

Plantes Médicinales et Huiles Essentielles

Par exemple, selon **Zemouli et Soualmia (2023)** l'HE d'*Origanum compactum* a montré un effet synergique avec la fraction semi pure de *Enterococcus faecium* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, aussi l'HE *Myrtus communis* avec la même fraction Un effet synergique uniquement contre *Bacillus subtilis* ATCC 9372, et uniquement à des concentrations spécifiques (concentration d'HE à 50 % et 75 %). Plusieurs d'autres études ont montrés des résultats similaires, des résultats considèrent comme prometteuses dans le domaine de la bioconservation des aliments.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthode

4 Matériel et méthodes

4.1 Lieu d'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie Appliquée, de l'université de E.C.L.T de Tébessa, pendant une durée de 3 mois de l'année universitaire 2024.

4.2 Objectives d'étude

Notre étude vise à évaluer le potentiel des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes. Il vise également à :

- ✚ L'isolement et la purification des bactéries lactiques bactériocinogènes à partir des produits laitiers (le jben et lait de chèvre).
- ✚ L'étude de l'activité antimicrobiennes des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes vis-à-vis les souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques.
- ✚ L'extraction des huiles essentielles des deux plantes médicinale (*Mentha piperita* et *Salvia officinalis*).
- ✚ L'étude de l'effet synergétique des bactériocines produite par les bactéries lactiques et les huiles essentielles extraites des deux plantes.

4.3 Matériel

4.3.1 Milieux de culture

Les milieux utilisés pour isoler et caractériser les souches lactiques sont nombreux.

- MRS (gélose et bouillon)
- Gélose nutritif
- Bouillon nutritif
- Muller Huntent

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min. Le milieu est stérilisé à 110°C pendant 10 min.

4.3.2 Matériel biologique et produits chimiques

- Ethanol 96% (Sigma-Aldrich)
- Eau oxygénée
- Kit coloration Gram

Matériel et méthode

- tampon phosphate salin (PBS).
- DMSO
- Fromage traditionnel « Jben »
- Lait cru de chèvre et de vache

4.3.3 Appareillages

Agitateur, cocote autoclave, bain marie, balance, étuve, microscope optique, réfrigérateur, centrifugeuse, pied à coulisse. Fromagère, loupe binoculaire.

4.3.4 Outils de la microbiologie

Anse de platine, bec benzène, boîtes pétri, écouvillons, épinddorfs, flacons, pipettes Pasteur, lames et lamelles, tubes à essai. Pipettes graduées, fioles erlenmeyer, bécher, jarre d'anaérobiose.

4.3.5 Matériel végétal

4.3.5.1 *Mentha piperita*

Les feuilles de la plante sont obtenues depuis un jardin dans la région d'El-ATER. Puis séché pendant une semaine



Figure 7 : la plante *Mentha piperita* fraîche et après séchage

Matériel et méthode

4.3.5.2 *Salvia officinalis*

La plante a été apportée d'un jardin situé dans la ville de Hammamet.



Figure 8: la plante *Salvia officinalis* avant et après séchage

4.3.6 Souches utilisées

Les bactéries sont conservées dans un mélange glycérol (30%), bouillon cerveau-cœur (70%) à -20°C . Pour une conservation de courte durée, elles sont gardées sur une gélose de conservation de souches à 4°C . Avant leur utilisation, les bactéries sont revivifiées par une ou deux subcultures dans des bouillons choisies (suivant les souches) à 30°C pendant 18 à 24 h

4.3.6.1 Souches de références

Dans le but d'explorer le spectre d'activité des espèces de bactéries lactiques sélectionnées et des huiles essentielles de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis*, des tests de l'activité antagonistes vis-à-vis un certain nombre de germes pathogènes ont été effectués. Les souches témoins de l'activité antagoniste utilisées proviennent de l'Institut Pasteur. Pour vérifier la pureté des souches, des tests de caractérisation cultureux et morphologiques (Gram et catalase) ont été effectués au préalable.

Les souches testées sont: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25422. (ATCC: American Type Culture Collection).

4.3.6.2 Souches entérobactéries multirésistantes productrices de BLSE

Les souches d'entérobactéries utilisées dans notre travail (04 souches) sont isolées et identifiées par M^{elle} Amra Amel dans le cadre d'une thèse de doctorat sous la direction de Pr Debazza Manel et

Matériel et méthode

Mechai Abdelbasset (**tableau 3**). Leur antibiogramme est réalisé vis vis de 22 antibiotiques selon les recommandations de la CASFM 2018.

Tableau 3 : Les souches bactériennes multirésistantes utilisées et leurs origines.

Code des souches	Source d'isolement	Espèce bactérienne	Profil de résistance	Phénotypes de résistance détectés	Profil de multirésistance	Types de gènes BLSE détectés
LCA 01	Coriandre	<i>Kluyvera spp</i>	AMX-PRL-TIC-TTC-CL-CAZ-CTX-FEP-ATM-NA-OFX-CIP-C-COT	BLSE	8 Catégories, 14 ATB	<i>bla</i> CTX-M-79
LCA 02	Céleri	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PRL-TIC-TTC-CL-AMC-CAZ-CTX-FEP-ATM-GN-OFX-CIP-C-FOS-COT	BLSE	10 Catégories, 15 ATB	<i>bla</i> CTX-M-117 <i>bla</i> TEM-194 <i>bla</i> SHV-176
LCA 03	Épinard	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PRL-TIC-TTC-CL-AMC-CAZ-CTX-FEP-ATM-OFX-FOS-COT	BLSE	8 Catégories, 12 ATB	<i>bla</i> CTX-M-107 <i>bla</i> TEM-125 <i>bla</i> SHV-176
LCA 04	Coriandre	<i>Klebsiella oxytoca</i>	PRL-TIC-TTC-CL-CAZ-CTX-FEP-ATM-NA-OFX-CIP-C-FOS-COT	BLSE	8 Catégories, 14 ATB	<i>bla</i> TEM-112

MC: amoxicillin-clavulanic acid, **AMX:** amoxicillin, **ATM:** aztreonam, **C:** chloramphenicol, **CAZ:** ceftazidime, **CIP:** ciprofloxacin, **CL:** cephalixin, **COT:** cotrimoxazole, **CTX:** cefotaxime, **ETP:** ertapenem, **FEP:** cefepime, **FOS:** fosfomycin, **FOX:** cefoxitin, **GN:** gentamicin, **NA:** nalidixic acid, **NIT:** nitrofurantoin, **OFX:** ofloxacin, **PRL:** piperacillin, **TIC:** ticarcillin, **TTC:** ticarcillin-clavulanic acid. (BLSE: Beta lactamase à spectre élargie.)

4.4 Méthodes

4.4.1 Isolement, purification et conservation des souches

Les étapes d'isolement, de purification et de conservation des souches sont presque identiques pour les genres recherchés. La différence réside dans la nature des milieux de culture ainsi que dans les durées et les températures d'incubation.

✓ Isolement

A partir de l'échantillon, nous avons effectué initialement des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-6} . Après plusieurs essais, seules les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont retenues pour ensemercer le milieu de culture solide MRS coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des

Matériel et méthode

colonies suffisamment séparées. Les temps et les températures d'incubation sont adaptés à chaque genre :

- l'incubation est réalisée à 37°C pendant 72h.

- Pour chaque échantillon, l'observation des colonies est réalisée simultanément pour toutes les dilutions.

✓ Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

✓ Purification

A partir des colonies isolées sur boîtes de Pétri présentant la morphologie et la pigmentation proche de celles des bactéries lactiques, on procède à un premier repiquage sur les bouillons spécifiques d'enrichissement. Ainsi les colonies isolées sur gélose MRS et sont repiquées sur bouillon MRS puis incubées pendant 48 h, par la suite on réalise un deuxième isolement sur gélose spécifique à partir de la culture sur bouillon d'enrichissement.

Après incubation aux temps et température appropriés à chaque genre, on vérifie s'il s'agit toujours du même type de colonies que celles isolées dans la première étape et ceci par l'observation directe de leurs caractères morphologiques. On effectue un deuxième repiquage sur les bouillons d'enrichissement à partir de colonies bien distinctes (Mechai, 2009).

✓ **La conservation à court terme** La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur la surface de gélose inclinée. Après incubation à une température 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fait toutes les trois semaines (Saidi *et al.*, 2002).

✓ Identification des bactéries lactiques isolées

Les bactéries lactiques isolées sont identifiées par les méthodes phénotypiques (**figure 9**), basées sur la connaissance d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques proposés par Guiraud & Galzey (1980), Deroissart,(1994) et Leveau *et al.*, (1991).

Matériel et méthode

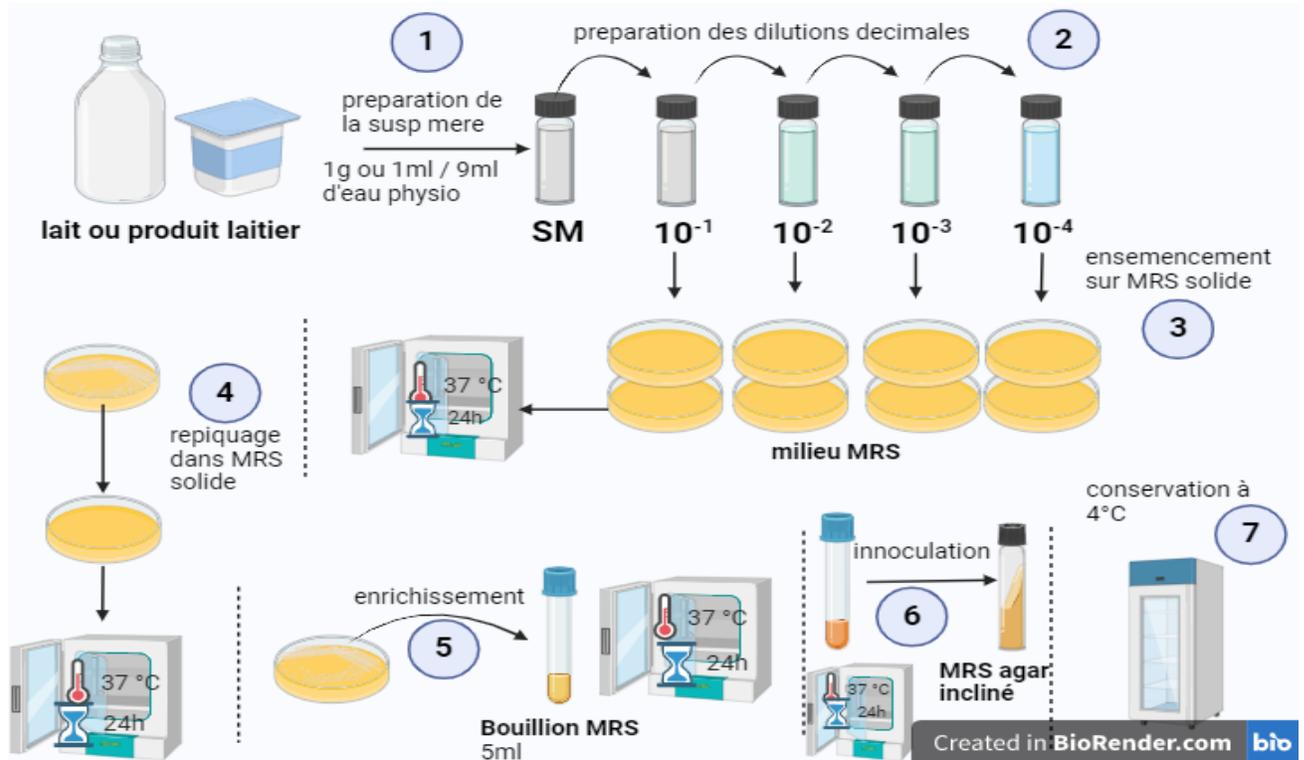


Figure 8 : les étapes d'isolement, de purification, et de conservation des souches de bactéries lactiques

4.4.2 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

4.4.2.1 Principe de montage Clevenger

Le montage Clevenger est désigné par le nom de son inventeur, Joseph Franklin Clevenger. Le montage est composé d'une chauffe ballon, Un ballon en verre à fond rond de 1 litre et un réfrigérant (**figure 10**). Le ballon, de taille variable, contient de l'eau que l'on fait bouillir et la plante à extraire. La vapeur monte dans le montage jusqu'à un condensateur, et le condensat retombe dans la petite burette. L'huile flotte sur l'eau, qui est pour sa part progressivement renvoyée dans le ballon chauffé par le conduit en diagonale. Après 2 h d'extraction, on peut recueillir le volume d'huile extrait. (**Nasardin et al., 2018**)

4.4.2.2 Étapes :

a) Préparation de la matière végétale:

- Peser 100 grammes de la plante sélectionnée (*salvia officinalis* ou *mentha piperita*)

b) Mise en place de l'appareil d'extraction:

Matériel et méthode

- Introduire les 100 grammes de matière végétale dans un ballon d'une capacité de 1000 ml.
- Ajouter 500 ml d'eau distillée dans le ballon.
- Placer le ballon dans le chauffe-ballon et connecter l'ouverture du dispositif d'extraction au ballon.

c) Refroidissement et condensation des vapeurs:

- Alimenter le réfrigérant en eau pour assurer la condensation des vapeurs d'huile essentielle.
- Établir un équilibre entre les volumes d'eau présents dans l'appareil pour optimiser la condensation.

d) chauffage:

- Allumer le chauffe-ballon et chauffer le mélange eau-plante pendant deux heures.

e) Récupération de l'huile essentielle:

- Après deux heures d'extraction, ouvrir le robinet pour récupérer l'eau florale.
- Recueillir l'huile essentielle séparée de l'eau florale à l'aide d'une seringue
- Conserver l'huile essentielle dans un flacon fermé et enveloppé à une température de 4°C.

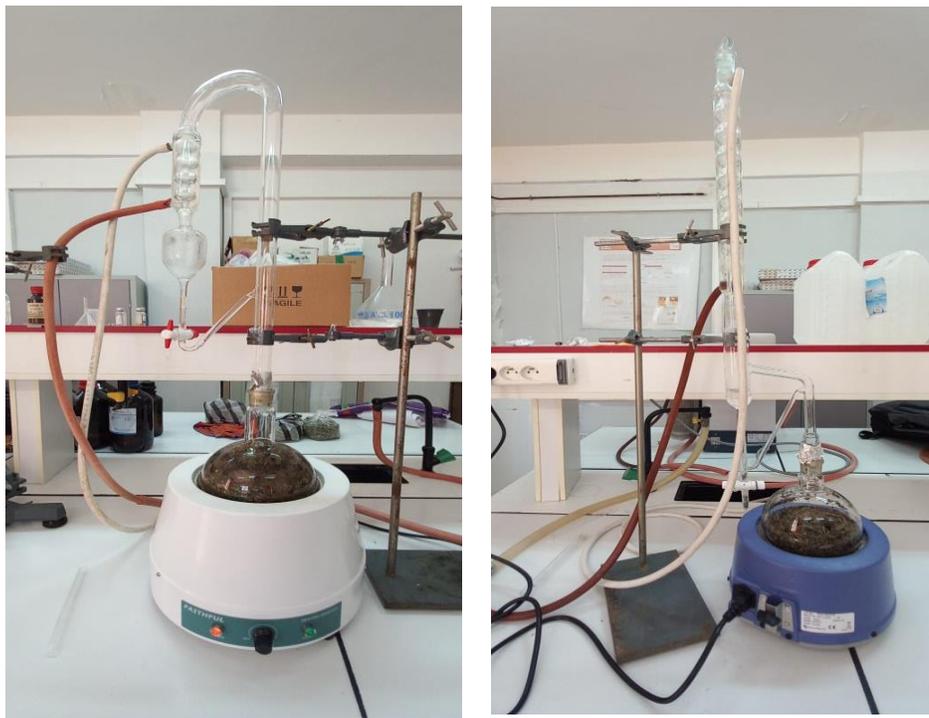


Figure 90 : dispositifs de l'hydrodistillation de type clevenger

Matériel et méthode

4.4.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

L'étude de l'activité antimicrobienne consiste à déterminer des paramètres antibactériens (CMI) des extraits de *Mentha piperita* et *Salvia officinalis*.

4.4.3.1 Aromatogramme (la méthode de Vincent)

a. principe

Le test de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatogramme (NCCLS, 1997) Le choix des bactéries a été porté sur six souches:

- *Staphylococcus aureus* ATCC25329.
- *Escherichia coli* ATCC 25422.
- *Kluyvera spp* LCA01.
- *Klebsiella pneumoniae* LCA02.
- *Klebsiella pneumoniae* LCA03 .
- *Klebsiella oxytoca* LCA04.

b. technique

On a mis en suspension des cultures bactériennes jeunes (0.5 Mc Farland) pour les souches indicatrices dans de l'eau physiologique (0,9 % NaCl). La surface des boîtes de Pétri contenant de la Mueller-Hinton Agar a été inoculé par des écouvillons stériles depuis ces suspensions. Ensuite, des disques de papier whatman n°4 stériles de 6mm sont imprégnés sur la gélose et 5µl de HE ont été disposés sur chaque disque. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

c. Lecture

L'absence de croissance microbienne est présentée par la formation d'un halo translucide autour du disque, similaire à la gélose stérile, dont les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle transparente, D'après la fourchette suggérée par (**Ponce et al. 2003 ; Mouas et al., 2017**), les souches seront donc classées en fonction de l'effet inhibiteur dès l'HE sur eux, de la manière suivante :

- **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 ($\varnothing \geq 20\text{ mm}$).

Matériel et méthode

4.4.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration minimale (en $\mu\text{g/mL}$) qui inhibe 90% de la croissance bactérienne d'une souche donnée.

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) (**Zemouli et Soualmia, 2023**).

b. **Technique :**

❖ Préparation des dilutions d'huiles essentielles:

- Dans le premier puits d'une rangée, ajouter 10 μl d'huile essentielle.
- Ajouter 180 μl de MHB (Tween 80 : 0,5%) dans le premier puits.
- Homogénéiser le mélange dans le premier puit.
- Prendre 95 μl du mélange du premier puits et le transférer dans le deuxième puits.
- Répéter l'étape précédente jusqu'au dernier puits, en éliminant 95 μl du dernier puits.
- Vous obtenez ainsi une dilution géométrique d'huile essentielle.

❖ Inoculation des puits:

- Ajouter 5 μl de la suspension bactérienne à tester dans chaque puits.
- Inclure des contrôles positifs: des puits contenant du MHB (Tween 80 : 0,5%) inoculés avec la souche bactérienne à tester.
- Inclure des contrôles négatifs: des puits contenant l'huile essentielle et du MHB (Tween 80 : 0,5%) non inoculés.

❖ Incubation:

- Incuber les microplaques à 37°C pendant 18 heures.

❖ Lecture des résultats:

- Observer les microplaques à l'œil nu. la lecture est réalisé a l'aide de tableau 6.

Matériel et méthode

- La CMI de l'huile essentielle est la plus faible concentration de l'huile essentielle à laquelle le micro-organisme testé ne présente pas de croissance visible dans le bouillon.

Tableau 4 : le facteur de dilution et le volume d'HE correspondant

puits	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Facteur de dilution d'HE	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
HE µl/ml	5	2.5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02

4.4.4 Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques par la méthode de puits

a) Préparation des cultures de bactéries lactiques:

- Les bactéries lactiques sont cultivées dans du milieu MRS pendant 18 heures à 37°C.
- Après incubation, les cultures sont centrifugées à 6000 tr/min pendant 15 minutes pour séparer les cellules bactériennes du surnageant.

b) 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 (**figure 11**).

c) Test de diffusion en milieu solide:

- Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'un Cône jaune stérile dans des plaques de gélose Mueller Hinton inoculées par les souches indicatrices : *Escherichia coli* ATCC 25422, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.
- Soixante microlitres (60 µL) du surnageant des cultures de bactéries lactiques sont déposés dans chaque puits.
- Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures pour permettre l'action des substances antibactériennes sur la souche indicatrice.

d) Mesure des zones d'inhibition:

La lecture de l'activité bactériocinogénique se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des puits (Z_i), exprimée en millimètre. Une inhibition est considérée positive si le diamètre de (Z_i) est supérieur à 2 mm. Selon Doumandji et al. (2010). La mesure du diamètre d'inhibition (Z_i) est effectuée selon la formule suivante :

Matériel et méthode

Z_i (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits (6 mm).

Remarque: Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'un large éventail de substances produites par les bactéries lactiques.

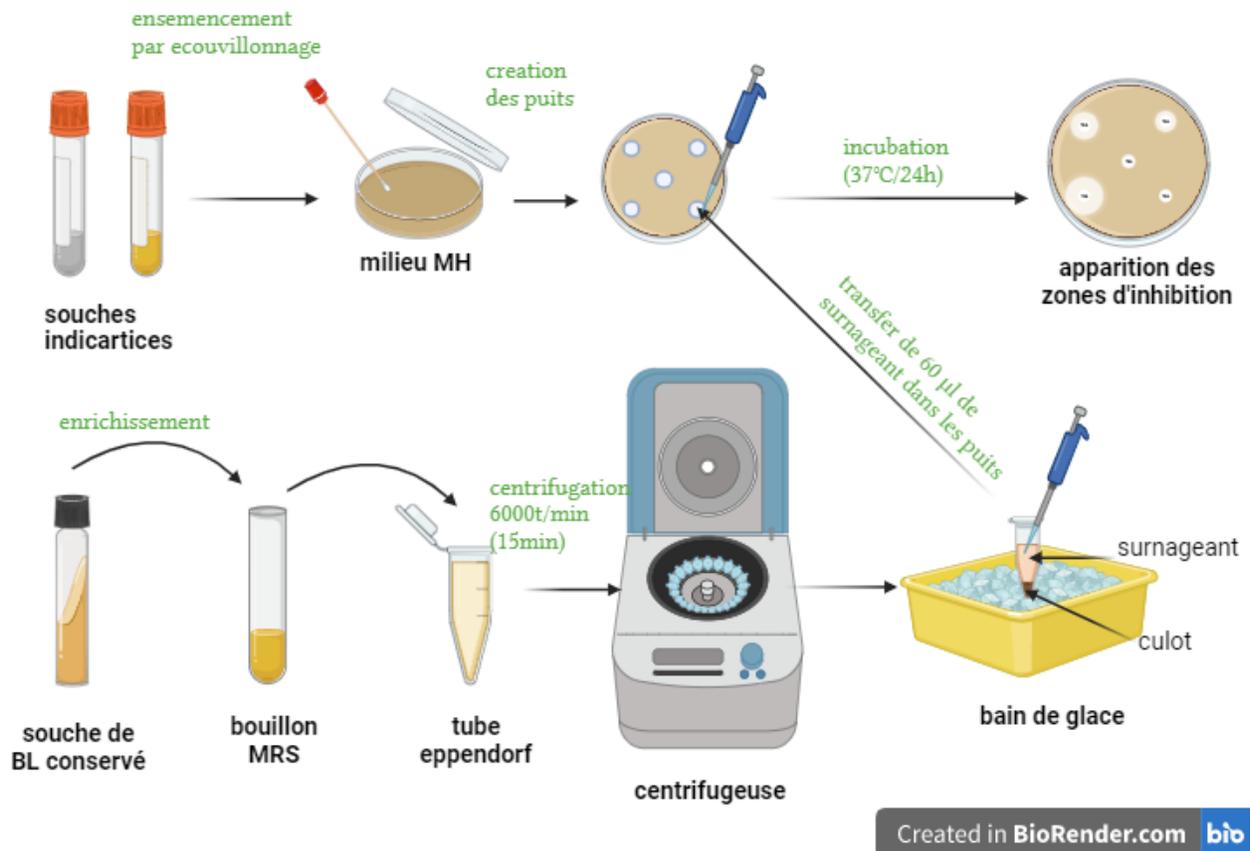


Figure 11 : représentation des étapes de la réalisation du test de puits.

4.4.5 Etude de l'effet antibactérien combiné des huiles essentielles avec les fractions semi pures (FAC) des bactéries lactiques:

Cette combinaison est réalisée afin de tester l'activité antibactérienne et de mettre en valeur un éventuelle effet synergique entre chaque HE et les fractions antimicrobiennes actives (FAC) de deux souches lactiques qui ont montrées une activité antimicrobienne intéressante sur les souches bactériennes testées (FAC8 ; FAC33)

Ce test consiste à réaliser des combinaisons entre la FAC et chacune des deux huiles émulsifiées dans le DMSO à raison de 10% (v/v.) (**tableau 7**), et avec les concentrations choisies comme suit :

Matériel et méthode

Tableau 5 : combinaisons huiles essentielle / FAC.

100% d'huile	00% de FAC
75% d'huile	25% de FAC
50% d'huile	50% de FAC
25% d'huile	75% de FAC
0% d'huile	100% de FAC

Des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètres imbibés de 10 μ l de chaque concentration déposés sur des boîtes pétri préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats de la FAC et de l'HE séparément. Le témoin positif et le témoin négatif ont été réalisés par dépôt au centre des boîtes de Pétri préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée de disques de papier Whatman imprégnés de 05 μ l 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 :

- **Indifférent** : (A+B)= Effet A ou Effet B.
- **Addition** : (A+B)= Effet A + Effet B.
- **Synergie** : (A +B) > Effet A ou Effet B.
- **Antagonisme**: (A +B) < Effet A ou Effet B.

Résultats et Discussions

5 Résultats et Discussions

5.1 Isolement et purification des bactéries lactiques

5.1.1 Aspect macroscopique

A partir de différents échantillons collectés nous avons isolé 31 souches suspectes d'être des souches de bactéries lactiques.

Les colonies présentes sur la gélose MRS sont de petite taille de 0.5mm jusqu'à 2mm avec une surface lisse et crémeuse et une couleur beige blanchâtre, les colonies sont bien arrondies à contour régulier (figure 12)

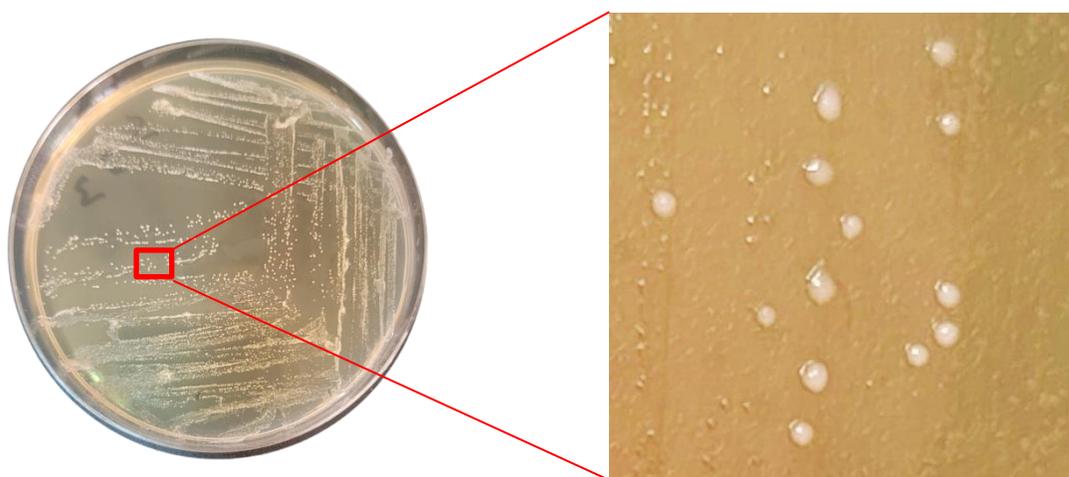


Figure 12 : aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques

5.1.2 Aspect microscopique

Après une coloration de Gram, l'aspect microscopique des souches a révélé trois formes de cellules dont 29% sont des bacilles, 19% sont des coccobacilles et 52% sont des cocci (**figure 14, 15, 16 et 17**)

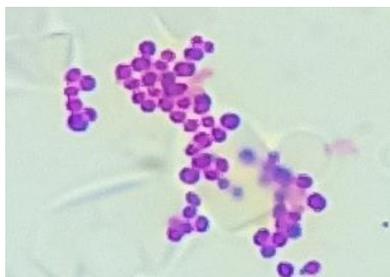


Figure 13 : forme cocci

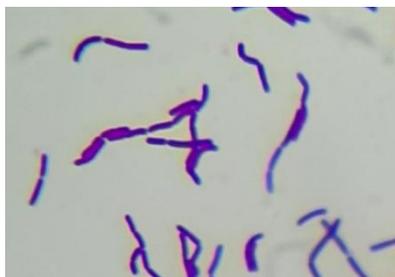


Figure 14: forme bacille

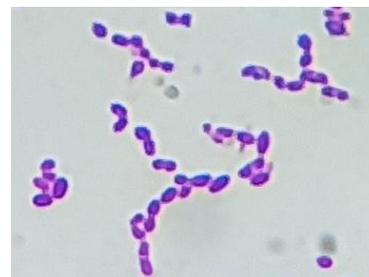


Figure 15: forme cocobacille

Résultats et Discussions

Tableau 6 : résultats du test microscopique

Souches lactiques	Caractères	
	Gram	Forme
BL 01	+	Cocci en chainettes
BL 02	+	Cocci en chainette
BL 03	+	Cocci en diplo
BL 04	+	Cocci en diplo
BL 05	+	Cocci en chaine
BL 06	+	Cocci en chainette
BL 07	+	Bacilles en amas
BL 08	+	Coccobacilles en diplo
BL 09	+	Bacilles en chainettes
BL 10	+	Bacilles en chaines
BL 11	+	Coccobacilles
BL 12	+	Cocci en amas
BL 13	+	Cocci isolés
BL 15	+	Coccobacilles en chaine
BL 16	+	Coccobacilles en chaine
BL 17	+	Cocci isolés
BL 19	+	Cocci en amas
BL 20	+	Coccobacilles en chaines
BL 21	+	Cocci en diplo
BL 22	+	Coccobacilles chainettes
BL 23	+	Coccobacilles
BL 24	+	Coccobacilles en chainette
BL 25	+	Coccobacilles en chainette
BL 26	+	Coocci en chaines
BL 27	+	Diplo cocci
BL 28	+	Diplo Cocci
BL 29	+	Coocci amas
BL 30	+	Coocci en amas
BL 31	+	Bacilles en chaines
BL 33	+	Bacilles en chaines
BL 34	+	Bacilles isolés

Résultats et Discussions

5.2 Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

5.2.1 Résultat de l'Aromatogramme

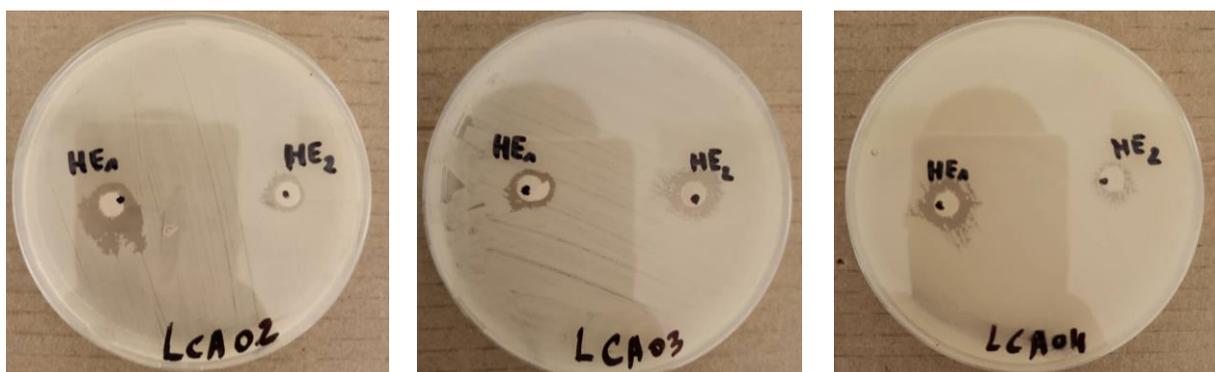
Pour la plupart de ces études l'effet antimicrobien est déterminé in vitro par la méthode de diffusion en milieu solide. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un disque de papier whatman, en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable (Badaoui *et al.*, 2020) Les résultats de l'aromatogramme sont présentés dans les figures 16, 17 et et dans le tableau 9.



Staphylococcus aureus ATCC
25923

Escherichia coli ATCC 25422

LCA 01 (*Kluyvera* spp)



LCA 02 (*Klebsiella*
pneumoniae)

LCA 03 (*Klebsiella pneumoniae*)

LCA 04 (*Klebsiella oxytoca*)

Figure 16 : Effet antibactérien de l'huile essentielle *Mentha piperita* "HE1" et *Salvia officinalis* "HE2" sur les bactéries indicatrices

Résultats et Discussions

Tableau 7 : Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.

HE	HE 1	HE 2
Souches testées		
<i>LCA 01</i>	22 (+++)	12 (+)
<i>LCA 02</i>	12 (+)	09 (+)
<i>LCA 03</i>	10 (+)	13 (+)
<i>LCA 04</i>	14 (+)	10 (+)
<i>E. coli ATCC 25422</i>	16 (++)	12 (+)
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	31 (+++)	10 (+)

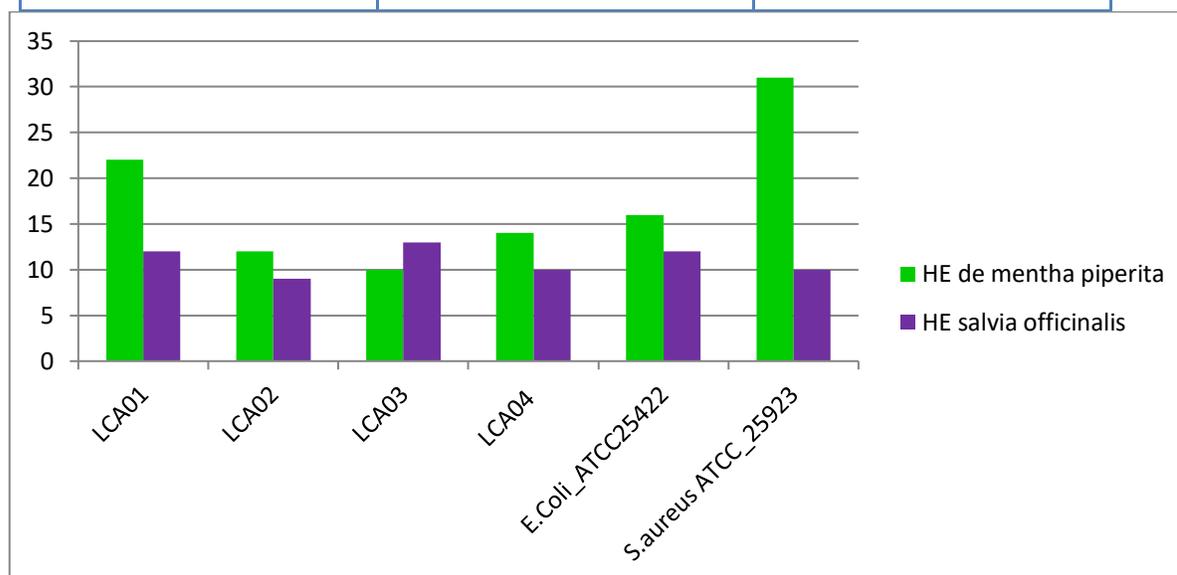


Figure 17 : représentation en histogramme de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.

L'HE *Mentha piperita* présente une activité antibactérienne plus élevée contre toutes les souches testées par rapport à l'HE de *Salvia officinalis*, en particulier contre *Staphylococcus aureus* (31 mm), *Kluyvera spp.* (22 mm), et *E. coli* (16 mm). tous les souches testés sont qualifiés de "extrêmement sensibles" selon la fourchette d'interprétation proposé par (Ponce *et al.*, 2003; Mouas *et al.*, 2017). Toutefois l'huile essentielle *Mentha piperita* est particulièrement efficace contre *S. aureus* ATCC 25923 avec une large zone d'inhibition de 31 mm, Ceci est en accord avec une étude de Muntean *et al.* (2019), qui a également montré que l'huile essentielle de *M. piperita* présentait une activité antibactérienne significative contre *S. aureus* ATCC25923 avec un diamètre d'inhibition de 42mm.

Résultats et Discussions

D'après **Al-Refaie et al (2023)**. L'huile essentielle de *M. piperita* agit sur les espèces de *S. aureus* par deux mécanismes, le déséquilibre de la membrane cytoplasmique et la fuite des électrolytes. Cela sert à expliquer la grande sensibilité de *S. aureus* à cette huile.

Selon l'étude de **Muntean et al. (2019)** la souche bactérienne *E. coli* est extrêmement sensible à l'huile essentielle *M. piperita* avec un diamètre d'inhibition de 39mm en revanche notre étude a montré que la souche *E. coli* est sensible à l'HE *M.piperita* avec un diamètre d'inhibition de 16mm.

L'HE *S.officinalis* possède une activité constante mais plus faible que celle de *M. piperita* sur toutes les souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 9 à 13mm. Ces résultats se concordent avec les résultats **d'Aggouni et Cherifi . (2018)** qui ont rapporté une activité relativement remarquable de l'huile essentielle de *M. piperita* sur *E. coli* qui se traduit par une activité antibactérienne estimée de 11mm, les mêmes études notent une très forte activité antibactérienne de l'huile contre *S. aureus* avec 37mm ce qui diffère de nos résultats mais mentionne quand même la présence d'une activité antimicrobienne considérable de l'HE *S.officinalis* contre les deux espèces.

Au même fil d'idées, des études menées par **Belhamel et al (2014)** rapportent une activité antimicrobienne l'huile essentielle de *S.officinalis* contre *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition de $21.5\text{mm}\pm 0.5$ cependant nos résultats révèlent une activité modérée avec des diamètres de 9mm et 13mm contre les souches multirésistantes aux antibiotiques *LCA02* et *LCA 03* respectivement.

5.2.2 Résultats de la CMI

La méthode de microplaque en 96 puits est une technique standardisée en microbiologie pour déterminer la CMI d'un antibiotique ou d'une substance antimicrobienne contre une souche microbienne donnée, les résultats présentés par les figures (21, 22 et 23) sont représentés dans les tableaux 7, 8,9 ci-dessous.

Résultats et Discussions

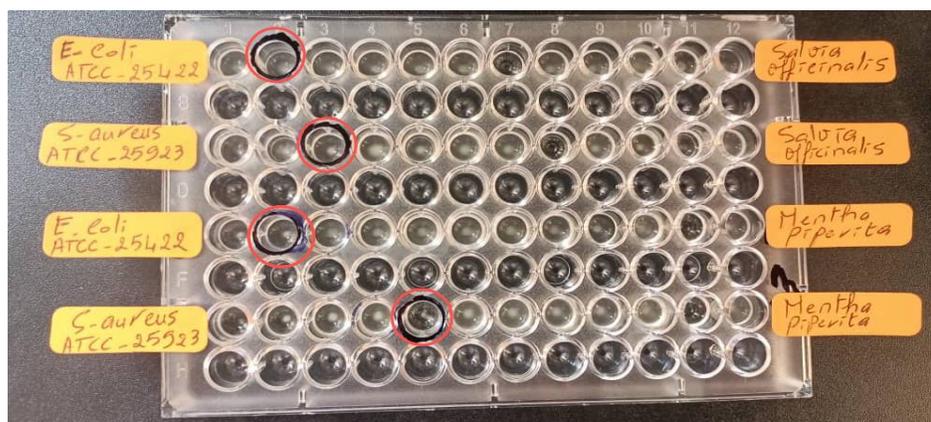


Figure 18 : lecture de la CMI de *Mentha piperita* et *Salvia officinalis* vis à vis *E. coli* ATCC 25422 et *S. aureus* ATCC 25923

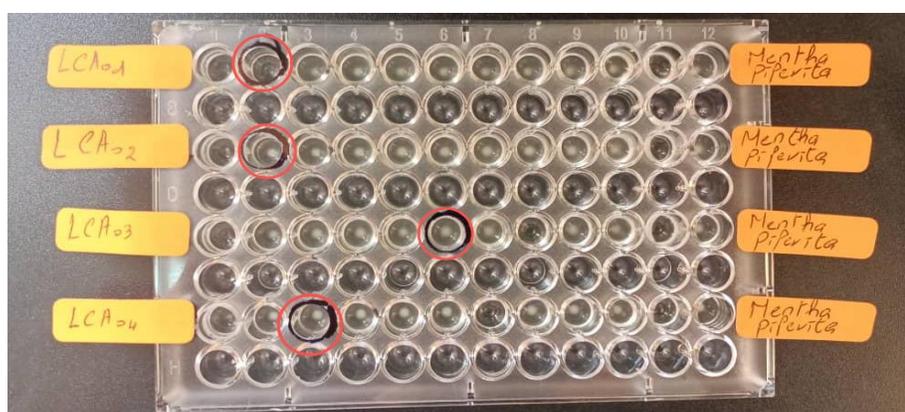


Figure 19 : lecture de la CMI de l'huile essentielle *Mentha piperita* vis-à-vis des souches multirésistantes aux antibiotiques LCA01, LCA02, LCA03 et LCA04



Figure 20 : lecture de la CMI de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* vis à vis des souches des souches multirésistantes aux antibiotiques LCA01 LCA02 LCA03 LCA04

Résultats et Discussions

Tableau 8 : résultats de la lecture du test la CMI sur plaque de 96 puits

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 négatif		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin positif		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mentha piperita</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> ATCC 25422	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LCA01	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LCA02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LCA03	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	LCA04	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salvia officinalis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i> ATCC 25422	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LCA01	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LCA02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	LCA03	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	LCA04	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble à l'oe nue

- : absence d'observation d'un trouble à l'oe nue

Résultats et Discussions

Tableau 9 : détermination de la CMI de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

<i>Salvia officinalis</i>						
souche	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25422	LCA01	LCA02	LCA03	LCA04
CMI ($\mu\text{l/ml}$)	1,25	2.5	1.25	0.02	0.16	0.08

Tableau 10 : détermination de la CMI de l'huile essentielle *Mentha piperita*

<i>Mentha piperita</i>						
souche	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25422	LCA01	LCA02	LCA03	LCA04
CMI ($\mu\text{l/ml}$)	0.31	2.5	2.5	2.5	0.16	1.25

Les huiles essentielles de *Salvia officinalis* et de *Mentha piperita* ont été testées contre plusieurs souches bactériennes pathogènes, y compris des souches multirésistantes comme *Klebsiella pneumoniae* (LCA02 et LCA03), *Klebsiella oxytoca* (LCA04) et *Kluvera spp.* (LCA01). Les résultats des CMI montrent que *Salvia officinalis* donne une CMI de 1,25 $\mu\text{l/ml}$ contre *S. aureus* ATCC 25923, tandis que *Mentha piperita* présente une CMI plus basse estimée de 0,31 $\mu\text{l/ml}$, indiquant une meilleure efficacité de cette l'huile essentielle contre bactérie indicatrices testées.

Pour *E. coli* ATCC 25422, les deux huiles montrent une CMI de 2,5 $\mu\text{l/ml}$, suggérant une activité antimicrobienne modérée similaire. Contre *Kluvera spp.* (LCA01), *Salvia officinalis* a une CMI de 1,25 $\mu\text{l/ml}$, alors que *Mentha piperita* présente une CMI de 2,5 $\mu\text{l/ml}$, indiquant que *Salvia officinalis* est plus efficace.

Pour *Klebsiella pneumoniae* multi-résistante (LCA02 et LCA03), l'HE de *Salvia officinalis* montre une CMI exceptionnellement basse de 0,02 $\mu\text{l/ml}$ pour LCA02, indiquant une activité antimicrobienne très élevée, alors que l'HE de *Mentha piperita* montre une CMI plus élevée de 2,5 $\mu\text{l/ml}$ pour LCA02, indiquant une faible efficacité.

Résultats et Discussions

Pour LCA03, l'HE de *Salvia officinalis* montre une CMI de 0,16 µl/ml, démontrant une forte activité antimicrobienne, tandis que l'HE de *Mentha piperita* a la même CMI de 0,16 µl/ml, indiquant une efficacité similaire.

Contre *Klebsiella oxytoca* (LCA04), l'HE de *Salvia officinalis* montre une CMI de 0,08 µl/ml, indiquant une forte activité antimicrobienne, alors que l'HE de *Mentha piperita* présente une CMI plus élevée de 1,25 µl/ml, suggérant une moindre efficacité.

Selon **Burt (2004)**, l'HE de *Salvia officinalis* a montré des CMI de 3.5 µl/ml et 0.75 µl/ml vis à vis *E. coli* et *S. aureus* respectivement.

Une autre étude menée par **alloun (2013)** a rapporté des CMI variables pour les mêmes souches *E. coli* et *S. aureus* où la CMI est trouvé 0.25 µl/ml et 0.6 µl/ml respectivement. Toutefois, nous avons notés que pour *S. aureus* les valeurs de la CMI de l'HE de *S. officinalis* sont toujours proches tandis que pour *E. coli* en note des fluctuations importantes des resultats de alloun (2013) par rapport à nos résultats et aux résultats de Burt (2004)

Pour *M.piperita*, des études réalisées par **Chahrazed (2018)** a montré des valeurs de CMI pour *S. aureus* proches à nos valeurs avec 0.5 µl/ml, en revanche, la CMI des *E.coli* et plus basse que notre indiquant une plus forte efficacité. Les mêmes études rapportent des valeurs de CMI très élevés vis à vis des souches de *K. pneumoniae* avec 8 µl/ml comparés à 2.5 µl/ml chez nous.

En conclusion, les résultats indiquent que l'HE de *Salvia officinalis* possède une activité antimicrobienne supérieure contre les souches multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* comparée à l'HE de *Mentha piperita*. Cependant, *Mentha piperita* montre une meilleure efficacité contre *S. aureus*. Ces différences peuvent être attribuées aux variations dans la composition chimique des huiles essentielles, ce qui influence leur spectre d'activité antimicrobienne.

5.3 Résultats de l'activité antimicrobienne de fractions de bactériocine semi-pures (FAC) des bactéries lactiques :

Le teste présentée évalue l'activité antimicrobienne de fractions semi-pures issues de 14 souches de bactéries lactiques contre des souches bactériennes pathogènes de référence. **Boumehira et al.,(2011)** ont suggéré que l'activité antagoniste peuvent avoir plusieurs origines tels que la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines, dans notre étude et

Résultats et Discussions

pour assurer que l'action antimicrobienne des FSC est exécuté par le moyen des bactériocines nous avons fixé le pH des fractions semi pures des bactéries lactiques par un tampons de la soude 1M (Merck) à pH 6 pour éliminer les actions antimicrobiennes des acides organiques tandis que l'action de peroxyde d'hydrogène été éliminé par l'incubation des boites en anaérobiose .

Les résultats, présentés sous forme de zones d'inhibition autour des puits sur milieu MH gélosé, (figures 21, 22, 23 et 24) (tableau 13) révèlent une variabilité de l'activité antimicrobienne selon les fractions et les souches testées. Les fractions ayant montré une activité inhibitrice importante contre une ou plusieurs souches pathogènes pourraient être de potentiels candidats pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens naturels.



Figure 21 : effets d'antagonisme des FAC extraites des 14 souches de BL vis-à-vis E. coli ATCC 25422.



Figure 22 : effet d'antagonisme des FAC extraites des 14 souches de BL vis-à-vis de S. aureus ATCC 25923

Résultats et Discussions



Figure 23 : effet d'antagonisme des FAC extraites des 14 souches de BL vis-à-vis de la souche teste *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Tableau 11 : résultats du test de l'activité antimicrobienne des fractions semi pures (FAC) des souches de bactéries lactique (en mm) contre des souches bactériennes indicatrices sur milieu MH gélosé.

Souche lactique	BL 01	BL 02	BL 03	BL 04	BL 07	BL 08	BL 10	BL 11	BL 12	BL 13	BL 15	BL 29	BL 30	BL 33
<i>E. coli</i> ATCC 25422	00	00	10	20	00	23	00	00	00	00	00	06	00	13
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	00	00	00	00	00	23	00	00	00	00	00	10	00	15
<i>Listeria Monocytogenes</i> ATCC 7644	15	13	24	09	00	00	00	08	09	00	10	00	21	33

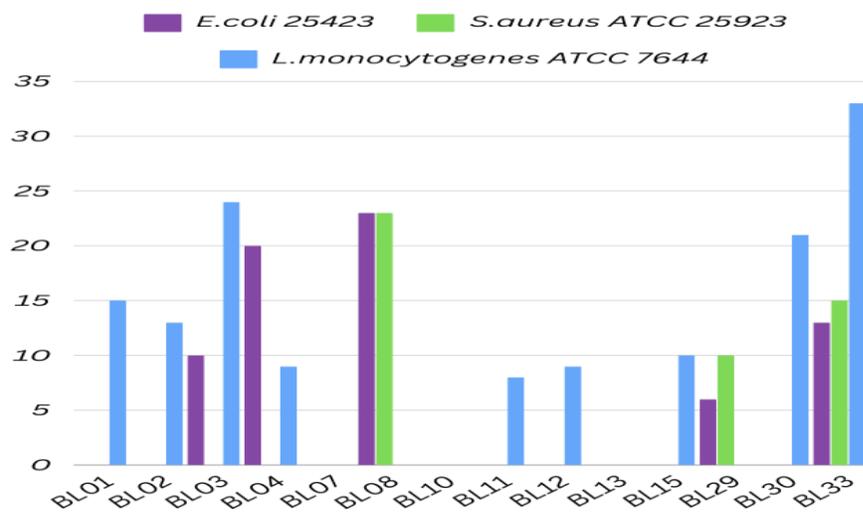


Figure 24 : résultats du test de diffusion en puits (l'unité de mesure est millimètre)

Résultats et Discussions

Les résultats montrent que les fractions semi-pures des souches de bactéries lactiques BL01, BL02, BL04, BL07, BL08, BL10, BL11, BL12, BL13 et BL15 n'ont montré aucun effet inhibiteur sur *E. coli* 25422. Cependant, les fractions BL03 et BL29 montrent un effet inhibiteur modéré avec des diamètres de zone d'inhibition de 10 mm et 13 mm respectivement. La fraction FAC de la souche BL30 a un effet inhibiteur plus important avec un diamètre de zone d'inhibition de 33 mm.

Les résultats indiquent que les fractions semi-pures des souches de bactéries lactiques BL01, BL02, BL04, BL07, BL08, BL10, BL11, BL12, BL13 et BL15 n'ont pas d'effet inhibiteur sur *S. aureus* ATCC-25923. Cependant, les fractions BL03 et BL29 ont un effet inhibiteur modéré avec des diamètres de zone d'inhibition de 23 mm et 15 mm respectivement.

pour *Listeria monocytogenes* Les résultats montrent que les fractions semi-pures des souches de bactéries lactiques BL01, BL02, BL04, BL07, BL08, BL10, BL11, BL12, BL13 et BL15 ont un effet inhibiteur variable, Les fractions BL03 et BL29 ont un effet inhibiteur modéré avec des diamètres de zone d'inhibition de 24 mm et 21 mm respectivement. La fraction BL30 a un effet inhibiteur plus important avec un diamètre de zone d'inhibition de 33 mm.

Plusieurs études ont montrées que la résistance des bactéries à Gram négatif en présence des bactéries lactiques antagonistes peut être due principalement à la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, qui constitue une véritable barrière et empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, le siège de leur activité antagoniste (**Mekri, 2016**)

selon (**Zergoug, 2017**) Cette résistance peut résulter probablement de modification de la composition de la membrane bactérienne, la destruction moyenne de la bactériocine par les protéases ou les récepteurs modifiés.

les souches BL33 et BL08 ont montrés une activité antimicrobiennes remarquablement importantes ce qui nous à inciter à les pour le tes de synergie avec les huiles essentielles.

Résultats et Discussions

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

Afin de déterminer le type d'effet antibactérien (synergique, antagoniste, indifférent ou additif) de la combinaison huile essentielle + fraction semi-purifiée (FAC) sur les cinq souches cibles, différentes combinaisons ont été réalisées. Cette activité a été évaluée in vitro par la méthode de diffusion surgélose, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques en mm. D'après les résultats obtenus avec le test de diffusion en puits, les souches lactiques BL08 et BL33 se sont avérées les plus actives contre les trois souches indicatrices testées. C'est pourquoi ces deux isolats ont été sélectionnés pour étudier la synergie entre leur fraction semi-pures (FAC) respective et les huiles essentielles de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis* contre diverses bactéries pathogènes, y compris *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, et *Klebsiella oxytoca*. Les résultats, détaillés sont dans les tableaux (11 et 12) et les figures (31, 32, 33 et 34) et fournissent des informations sur les interactions entre ces antimicrobiens naturels et leur efficacité combinée.

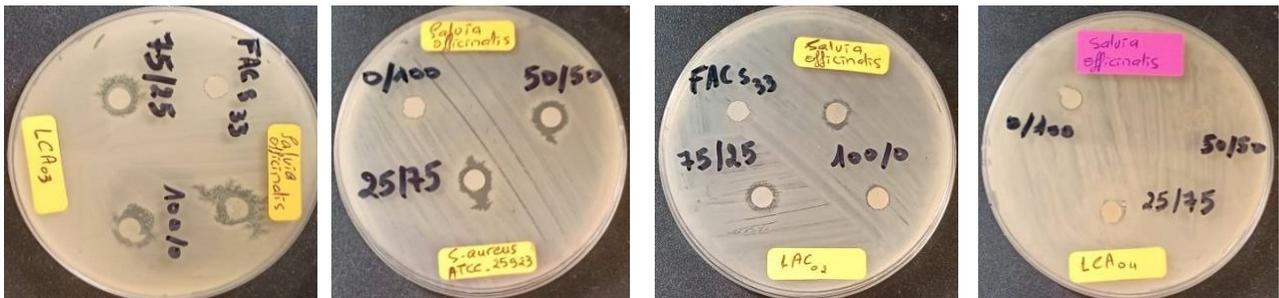


Figure 25 : les différents combinaisons entre l'HE de *Salvia officinalis* et FAC08 vis à vis des souches multirésistantes aux antibiotiques.

Résultats et Discussions



Figure 26 : les différents combinaisons entre l'HE de *Mentha piperita* et FAC08 vis à vis des souches multirésistantes aux antibiotiques.

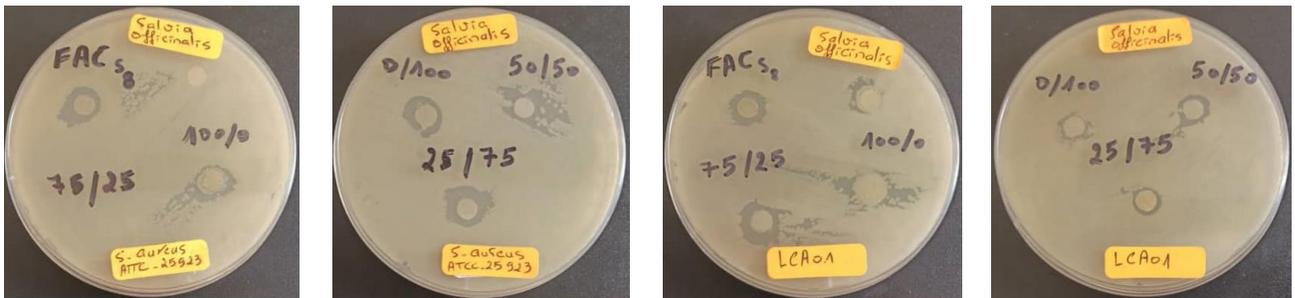


Figure 27 : les différents combinaisons entre l'HE de *Salvia officinalis* et FAC33 vis à vis des souches multirésistantes aux antibiotiques.



Figure 28 : les différents combinaisons entre l'HE de *Mentha piperita* et FAC33 vis à vis *S. aureus* ATCC 25923.

Résultats et Discussions

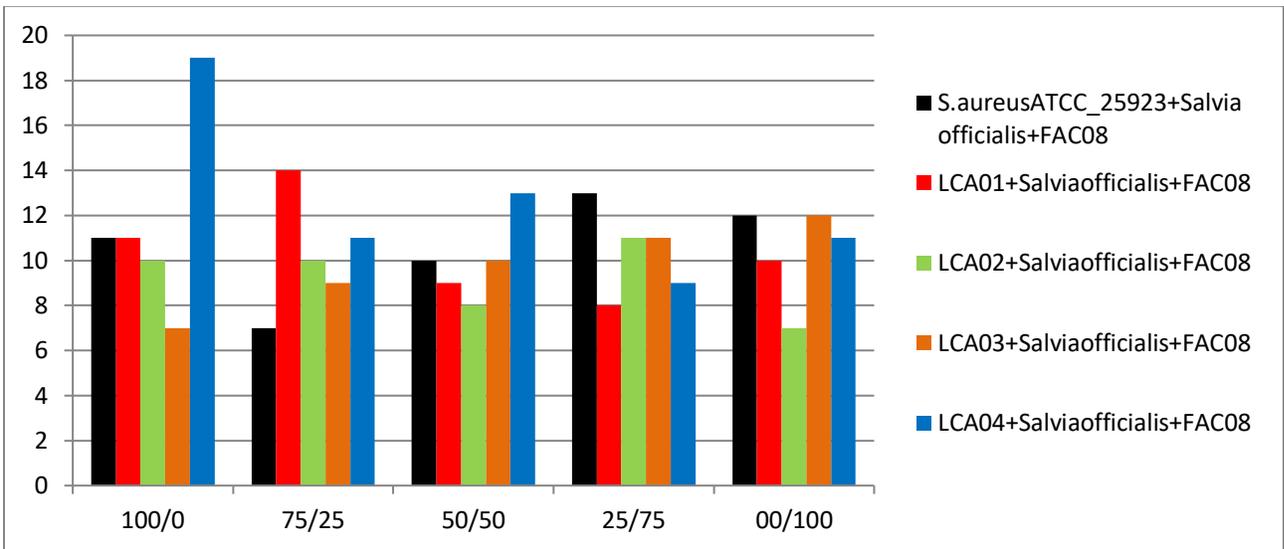


Figure 29 : histogramme représentant l'effet des combinaisons de l'HE *Salvia officinalis* avec FAC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont exprimées en pourcentages tandis que les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres).

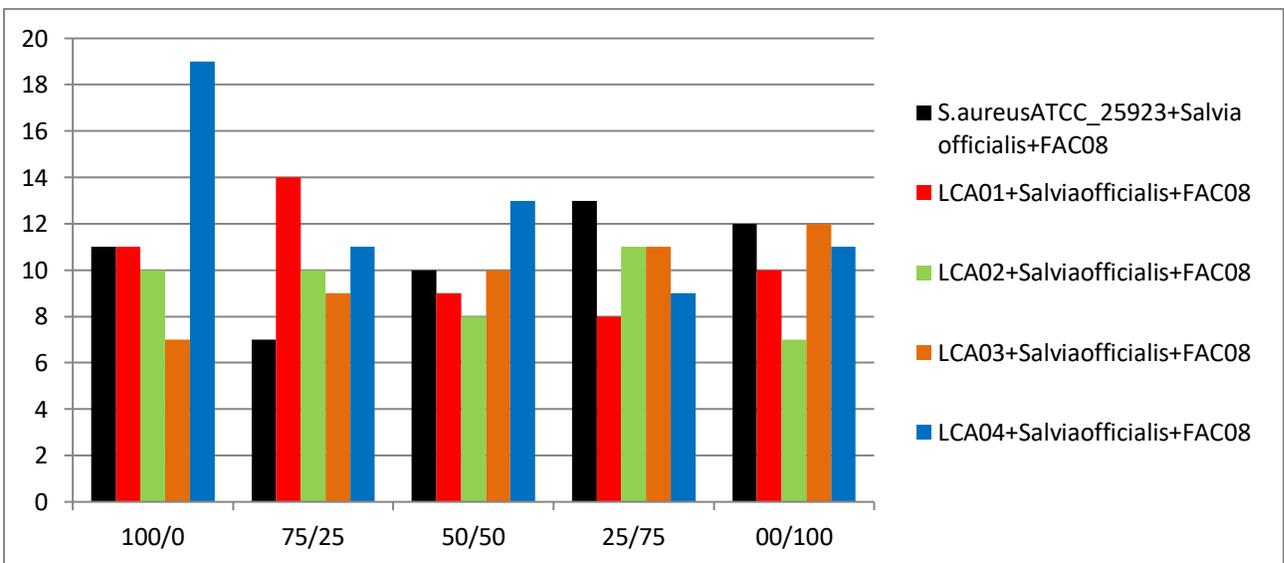


Figure 30 : histogramme représentant l'effet des combinaisons de l'HE *Salvia officinalis* avec FAC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont exprimées en pourcentages tandis que les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres).

Résultats et Discussions

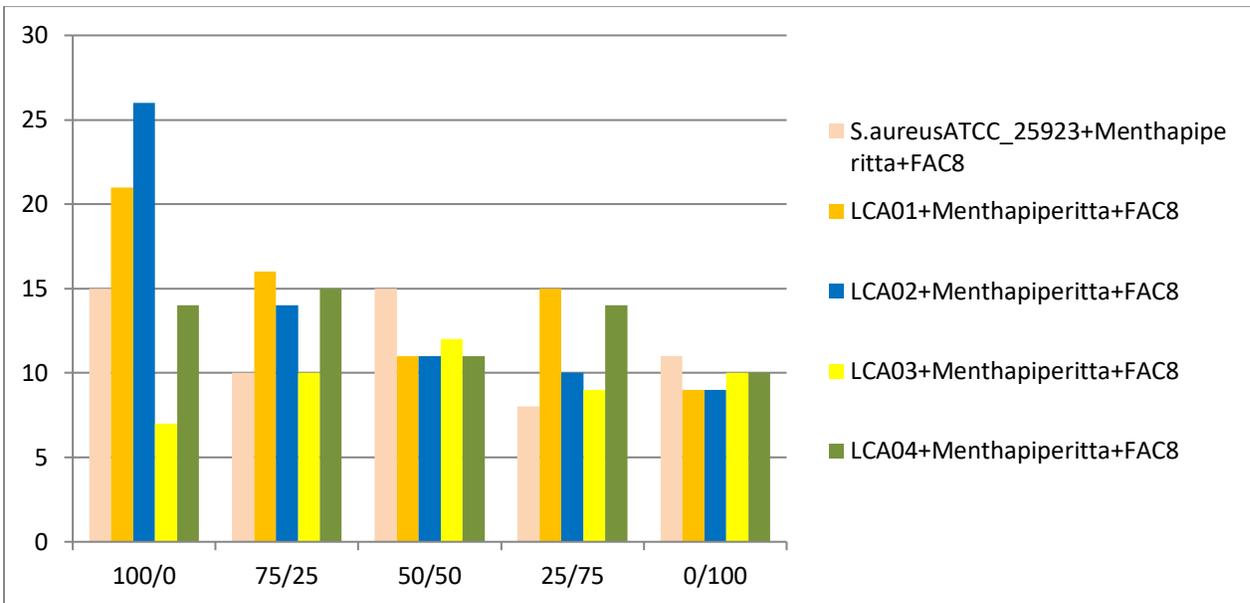


Figure 31 : histogramme représentant l'effet des combinaisons de l'HE *Mentha piperita* avec FAC08 sur cinq souches indicatrices (les combinaisons sont exprimées en pourcentages tandis que les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres).

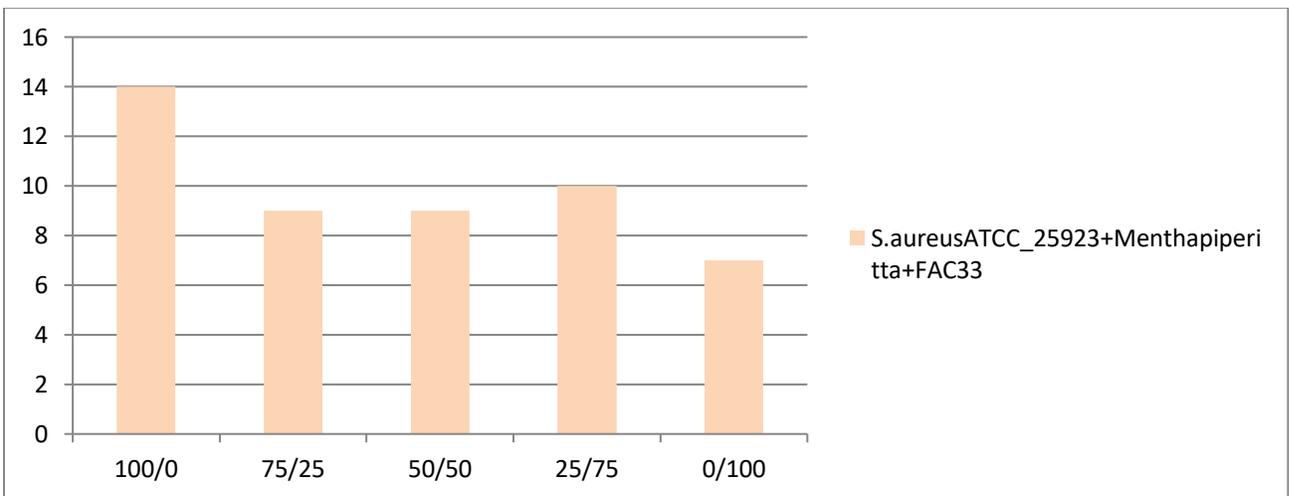


Figure 32 : histogramme représentant l'effet des combinaisons de l'HE *Mentha piperita* avec FAC08 sur *S.aueus* (les combinaisons sont exprimées en pourcentages tandis que les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres).

Résultats et Discussions

Tableau 12 : résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (HE *Mentha piperita* + FAC08, FAC33) à différentes concentrations sur les souches bactériennes indicatrices

<i>Mentha piperita</i>						
	Souches	Combinaisons HE%+FSC%	Diamètres d'inhibition			Effet combiné
			combinaisons	HE 100%	FAC 100%	
FAC 08	<i>S.aureus</i> ATCC_25923	75/25	10	15	11	Antagonisme
		50/50	15			Indiffèrent
		25/75	08			Antagonisme
	LCA 01	75/25	16	21	09	Antagonisme
		50/50	11			Antagonisme
		25/75	10			Antagonisme
	LCA 02	75/25	14	26	09	Antagonisme
		50/50	11			Antagonisme
		25/75	10			Antagonisme
	LCA 03	75/25	10	07	10	Indiffèrent
		50/50	12			synergie
		25/75	09			Antagonisme
	LCA 04	75/25	15	14	10	synergie
		50/50	11			Antagonisme
		25/75	14			Indiffèrent
FAC 33	<i>S.aureus</i> ATCC_25923	75/25	09	14	07	Antagonisme
		50/50	09			Antagonisme
		25/75	10			Antagonisme

Résultats et Discussions

Tableau 13 : résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (HE de *Salvia officinalis* + FAC08, FAC33) à différentes concentrations sur les souches bactériennes indicatrices.

<i>Salvia officinalis</i>						
	Souches	Combinaisons HE%/+FSC %	Diamètres d'inhibition			Effet combiné
			combinaisons	HE 100%	FSC 100%	
FAC 08	<i>S.aureus</i> ATCC_2592 3	75/25	07	11	12	Antagonisme
		50/50	10			Antagonisme
		25/75	13			synergie
	LCA 01	75/25	14	11	10	synergie
		50/50	09			Antagonisme
		25/75	08			Antagonisme
	LCA 02	75/25	10	10	07	Indiffèrent
		50/50	08			Antagonisme
		25/75	11			synergie
	LCA 03	75/25	09	07	12	Antagonisme
		50/50	10			Antagonisme
		25/75	11			Antagonisme
	LCA 04	75/25	11	19	11	Antagonisme
		50/50	13			Antagonisme
		25/75	09			Antagonisme
	FAC 33	<i>S.aureus</i> ATCC_2592 3	75/25	10	09	07
50/50			10	synergie		
25/75			10	synergie		
LCA 01		75/25	00	08	07	Antagonisme
		50/50	11			synergie
		25/75	10			synergie
LCA 02		75/25	09	08	00	Indiffèrent
		50/50	09			Indiffèrent
		25/75	08			Indiffèrent
LCA 03		75/25	11	11	00	indiffèrent
		50/50	09			Antagonisme
		25/75	09			Antagonisme
LCA 04		75/25	08	08	07	Indiffèrent
		50/50	07			Antagonisme
		25/75	08			Indiffèrent

Résultats et Discussions

Les résultats des tests d'activité antibactérienne des combinaisons d'huiles essentielles (HE) de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis* avec des fractions semi-pures de bactéries lactiques (FAC08 et FAC33) montrent des effets variés contre les germes pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, et *Klebsiella oxytoca spp.*

Pour l'HE de *Mentha piperita*, la combinaison avec FAC08 a révélé un effet antagoniste pour la plupart des concentrations testées contre *S. aureus*, LCA01, LCA02, et LCA03, tandis que seule une combinaison (50/50) a montré une synergie contre LCA03, et une autre (75/25) une synergie contre LCA04.

La combinaison de l'HE de *Mentha piperita* avec FAC33 a majoritairement montré un effet antagoniste contre *S. aureus*.

En revanche, l'HE de *Salvia officinalis* combinée avec FAC08 a montré des effets synergiques contre LCA01 à 75/25 et contre LCA02 à 25/75, mais un effet antagoniste ou indifférent pour les autres combinaisons et souches.

La combinaison de l'HE de *Salvia officinalis* avec FAC33 a montré une synergie contre *S. aureus* et LCA01 à diverses concentrations, mais un effet indifférent ou antagoniste contre les autres souches testées.

Ces résultats indiquent que l'efficacité des combinaisons des huiles essentielles avec les fractions semi-pures des bactéries lactiques dépend largement des types de souches bactériennes et des concentrations utilisées. Comparativement, des études antérieures ont montré que les combinaisons de surnageants de bactéries lactiques avec d'autres huiles essentielles, telles que l'HE de *Inula viscosa*, ont souvent révélé des effets synergiques significatifs contre plusieurs pathogènes, renforçant l'hypothèse que les combinaisons spécifiques peuvent augmenter l'activité antimicrobienne globale (Mekri & Abbouni, 2016). Ces variations peuvent être attribuées aux différentes compositions chimiques des huiles essentielles et à la nature spécifique des bactéries lactiques utilisées, suggérant la nécessité de tests plus approfondis pour déterminer les combinaisons optimales pour des applications thérapeutiques et de bioconservation.

selon (Fernandez, 2014), le mécanisme d'action entre les huiles essentielles et les bactériocines des bactéries lactiques est complexe et implique plusieurs interactions entre les molécules actives de ces deux types de composés.

Résultats et Discussions

Les huiles essentielles agissent principalement sur la membrane cellulaire des bactéries, en modifiant la structure et la fonctionnalité de cette membrane. Elles peuvent également interagir avec les composants de la membrane, tels que les lipides et les protéines, pour affecter la perméabilité de la membrane et la régulation des flux ioniques

Les bactériocines, quant à elles, sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries lactiques et qui peuvent interagir avec la membrane cellulaire des bactéries cibles, formant des pores qui permettent l'écoulement des ions et des molécules à travers la membrane, ce qui peut entraîner la mort de la bactérie (**Dalet *et al.*, 2000**).

Lorsque les huiles essentielles et les bactériocines sont utilisées ensemble, elles peuvent interagir pour produire des effets synergiques. Les huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui facilite l'entrée des bactériocines dans la cellule et leur action inhibitrice (**Fernandez, 2014**). De plus, les bactériocines peuvent augmenter la sensibilité des bactéries à l'action des huiles essentielles en modifiant la structure et la fonctionnalité de la membrane cellulaire (**Moll *et al.*, 1996**).

En conclusion, le mécanisme d'action entre les huiles essentielles et les bactériocines des bactéries lactiques est complexe et implique plusieurs interactions entre les molécules actives de ces deux types de composés. Les huiles essentielles agissent sur la membrane cellulaire, tandis que les bactériocines interagissent avec la membrane pour produire des effets inhibiteurs. Lorsque ces deux types de composés sont utilisés ensemble, ils peuvent interagir pour produire des effets synergiques qui augmentent leur efficacité antimicrobienne.

Dans l'ensemble, les résultats soulignent le potentiel des combinaisons de HE et de fractions semi-pures de bactéries lactiques comme une approche prometteuse dans la lutte contre les altérations des produits alimentaires et même contre les infections bactériennes multirésistantes.

Conclusion

6 CONCLUUSION

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de déterminer l'étendue de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles (*Mentha Piperita* et *Salvia officinalis*) et l'activité antagoniste de 14 souches lactiques sur des souches d'origine alimentaire et multirésistantes et productrices de bêta-lactamases ainsi que les types d'interaction de ces huiles en combinaison avec une fraction semi pure d'une bactériocine extraite d'une souche lactique; le but final étant de trouver des synergies entre les composants utilisés et permettre la recherche d'alternative aux antibiotiques pour la lutte contre la déssimination et la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques par la méthode de diffusion en puits a montré que quatre sur quatorze souches lactiques sont dotées d'une activité inhibitrice dirigée contre les souches indicatrices *E. coli* ATCC 25422, *S. aureus*_ATCC25923 et *Lycteria Monocytogenes* ATCC 7644. Il s'agit notamment des souches lactiques LB8, LB29, LB30 et LB33 qui donnent des zones d'inhibition allant de 10 à 33mm.

Les souches lactiques BL08 et BL33 se sont avérées les plus actives contre les souches indicatrices testées. C'est pourquoi ces deux isolats ont été sélectionnés pour étudier la synergie entre leur fraction de bactériocines semi-pures (FAC) et les huiles essentielles de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis* contre diverses bactéries pathogènes

Les huiles essentielles de *Salvia officinalis* et de *Mentha piperita* ont été testées contre plusieurs souches bactériennes pathogènes, y compris des souches multirésistantes comme *Klebsiella pneumoniae* (LCA02 et LCA03), *Klebsiella oxytoca* (LCA04) et *Kluvera spp.* (LCA01).

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha piperita* a montré une activité remarquable contre la majorité des espèces testées. L'HE *S. officinalis* possède une activité constante mais plus faible que celle de *M. piperita* sur toutes les souches testées.

Cependant, les bactériocines utilisées dans la préservation des aliments sont soumises aux nombreuses contraintes liées principalement: à la résistance des bactéries Gram négatif,

Conclusion

L'association des bactériocines avec des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques constitue une technique couramment utilisée.

Les résultats des tests d'activité antibactérienne des combinaisons d'huiles essentielles (HE) de *Mentha piperita* et de *Salvia officinalis* avec des fractions semi-pures de bactéries lactiques (FAC08 et FAC33) montrent des effets variés contre les germes pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Kluvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, et *Klebsiella oxytoca spp.*

Pour l'HE de *Mentha piperita*, la combinaison avec FAC08 a révélé un effet antagoniste pour la plupart des concentrations testées contre *S. aureus*, LCA01, *Klebsiella pneumoniae spp* (LCA02), et *Klebsiella pneumoniae spp* (LCA03), tandis que seule une combinaison (50/50) a montré une synergie contre LCA03, cependant, lorsqu'elle est utilisée avec un pourcentage de (75/25) elle montre une synergie contre *Klebsiella oxytoca spp.*, (LCA04).

La combinaison de l'HE de *Mentha piperita* avec FAC33 a majoritairement montré un effet antagoniste contre *S. aureus*.

En revanche, l'HE de *Salvia officinalis* combinée avec FAC08 a montré des effets synergiques contre *Kluvera spp.* (LCA01) à 75/25 et contre *Klebsiella pneumoniae spp.* (LCA02) à 25/75, mais un effet antagoniste ou indifférent pour les autres combinaisons et souches.

La combinaison de l'HE de *Salvia officinalis* avec FAC33 a montré une synergie contre *S. aureus* et *Kluvera spp.*

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de poursuivre l'étude par :

- ✓ La caractérisation moléculaires des huiles essentielles testées ; purification de la fraction antibactérienne des surnageants des bactéries lactiques.
- ✓ Tester la combinaison des huiles avec les bactéries lactiques dans un modèle alimentaire (fromages, produits laitier, viandes etc.).
- ✓ lancer des essais de conservation des produits alimentaires avec des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits de cette huile pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place des conservateurs de synthèse.

Références bibliographiques

-A-

1. **Abedini, A. (2013).** *Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atrorubens Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes.* these de doctorat, Université du Droit et de la Santé - Lille II). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01016507>.
2. **Aguirre, M., & Collins, M. D. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107.
3. **Aggouni, C. & Cherifi, A. (2018).** Evaluation De L'activité Antimicrobienne De Deux Espèces De La Famille Lamiaceae Mémoire de Master, Université Saad Dahleb - Blida.103p.
4. **Aguirre, M., & Collins, M. D. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107.
5. **Ait-Belgnaoui, A., Lamine, F., Han, W., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Theodorou, V. (2005).** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutrition and Food Science*, 3, 59-63.
6. **Al Kassaa I., Belguesmia, Y ., Chihib, NE ., Hamze, M ., Bendali, F., Nagmouchi, K & Fliss, I., Drider, D. (2015).** Applications des bactériocines et bactéries lactiques dans le contrôle des pathogènes alimentaires. 183-199.
7. **Al-Refaie , D. ., Mehyar , G. F. ., & Shahein, M. . (2023).** Functional Role of Essential Oils as Antimicrobial and Antioxi-dat Agents in Food Industry: A Review. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 19(1), 70–88. <https://doi.org/10.35516/jjas.v19i1.1237>
8. **Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000).** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
9. **Alloun, K. (2013).** Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens L.*), de la sauge (*Salvia officinalis L.*) et de la rue des

Références Bibliographiques

- montagnes (*Ruta montana L.*). these de magister. Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach-Alger. 113p.
10. **Ammor, M.S. and Mayo, B.** (2007) Selection Criteria for Lactic Acid Bacteria to Be Used as Functional Starter Cultures in Dry Sausage Production: *An Update. Meat Science*, 76, 138-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>
 11. **Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M.** (2011). *Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 28–36.
 12. **Axelsson, L.** (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- B-
13. **Bassolé, I. H., & Juliani, H. R.** (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(4), 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
 14. **Bazizi, M.** (2017). Extraction d'huile essentielle de l'espèce végétale *Salvia officinalis L.* par hydrodistillation. Memoire de master. Univesité Badji Mokhtar-Annaba.96p.
 15. **Belhamel, K., Dahia, M., Kheyar, N.** (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. 18-26.
 16. **Boughrara, B.** (2016). Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du Parc national El- Kala. these de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba.
 17. **Boukhatem, M. N.** (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *AGROBIOLOGIA*, 9(2), 1653–1659. <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/120330>
 18. **Boumehira A. Z., Mami A., Hamedi A. R., Henni J. E., Kihal M.** (2011). Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria. *J. Pure. Appl. Microbiol.* Vol. 5(2) ,553-566.
 19. **Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Techniques et Documentations*. Ed. Lavoisier. Paris.

Références Bibliographiques

20. **Burt, S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

-C-

21. **Caplice, E. and Fitzgerald, G.F.** (1999) Food Fermentation: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
22. **Chabrier, J.Y., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1.165p.
23. **Chahrazed, B.** (2018). Screening de molécules à activité antimicrobienne. thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar - Annaba.103p.
24. **Chiff, N. & Djebaili, R. & Souid, W. & Boudjenah, S. (2021).** *Isolement Des Souches Lactiques Camelines À Aptitude Technologique.* Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah - Ouergla.76p.
25. **Christian, K. T. R., Carole, D. F. M., Alain, K. Y., Dahouénon-Ahoussi, E., Avlessi, F., Sohounhloué, D. C. K., & Simal-Gándara, J. (2023a).** *Essential oils as natural antioxidants for the control of food preservation. Food Chemistry Advances*, 2, 100312.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100312>

-D-

26. **Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y., Héchard Y.** (2000). The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, **41**(6), 441-443.
27. **De Vuyst, L. and Leroy, F.** (2007) Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
<http://dx.doi.org/10.1159/000104752>
28. **Deegan, L., Cotter, P., Hill, C., Ross, P.** (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 16. 1058-1071.
10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
29. **Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W.** (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological 26 Activities: A Critical Review. *Medecines*, 3, 1-16. DOI:10.3390/medicines3040025.

Références Bibliographiques

30. **Dortu, C. et Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143-154. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=3626#tocto1n2>
31. **Dridier, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H.** (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(2), 564–582. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>
32. **Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D., & Renault, P.** (2000). Expression of the Staphylococcus hyicus Lipase in Lactococcus lactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 588-598.

-F-

33. **Falleh, H., Jemaa, M. B., Saada, M., & Ksouri, R.** (2020). *Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative. Food Chemistry*, 127268. doi:10.1016/j.foodchem.2020.
34. **Ferdes Ilhem, S.** (2019). *Etude De L'activité Antifongique Des Huiles Essentielles De Lavandula Stoechas L. Et D'origanum Floribundum Munby. Sur Des Agents D'otomycoses : Cas D'aspergillus Niger* .Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 - Guelma. 87p.
35. **Fernandez, B., Hammami, R., Savard, P., Jean, J., & Fliss, I.** (2014) *Pediococcus acidilactici UL 5 and Lactococcus lactis ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions. Journal of applied microbiology* 116(3), 677-688.
36. **Fimland G. et al.**, (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, **182**, 2643-2648.
37. **Franz, C. M. A. P., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A.** (2007). *Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 293–310. <https://doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>

-G-

38. **Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., ... & Le Mair, T.** (2008). *Recommandation Pratique : Probiotiques et Prébiotiques. WGO Practice Guidelines*.
39. **Guerrouf, A.** (2017). *Application Des Huiles Essentielles Dans La Lutte Microbiologique Cas D'un Cabinet Dentaire*. Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah - Ouergla.65p.
40. **Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P.** (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1316-1325.

Références Bibliographiques

41. **Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Ben Omar, N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
 42. **Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E.** (1986). *Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by Streptococcus faecalis.* *Canadian Journal of Microbiology*, 32(10), 765–771. doi:10.1139/m86-141
- H-
43. **Hammes, W., Hertel, C.** (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. 10.1007/0-387-30744-3_10.
 44. **Hardie, J. M., & Whiley, R. A.** (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83, 1-11.
 45. **Helander, I. M., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M.** (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 146-150.
 46. **Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S.** (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, 11(4), 979. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>
- K-
47. **Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Logan Buck, B., & Azcarate-Peril, M. A.** (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 393-409.
 48. **Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G.** (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103-125.
- L-
49. **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M & Ouhssine M.,** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antimicrobiennes. *Soc. Pharm. Bordeaux*. 144 (2) : 37, 250
 50. **Lamoureux, L.** (2000). Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canada*, 23-47.

Références Bibliographiques

51. **Laouar, S., Sifer, H., & Bekka, F.** (2013). Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques. Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira - Bejaia.70p.
52. **Lardry, J. M., & Haberkorn, V.** (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*, 61, 14-7.
53. **Lechardeur, D., et al.** (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 143-149.
54. **Leistner L.** (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00161-6)
55. **Leveau, J. Y., & Bouix, M.** (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc*, Lavoisier. Paris.

-M-

56. **Madigan M, Martinko J. Brock.** (2007)Biologie des micro-organismes. *Pearson Éducation*, France.
57. **Mami, A.** (2013).Recherche des bactéries lactiques productrices debactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans lestoxi-infections alimentaire en Algérie. Thèse de doctorat, Oran, 161 p.
58. **McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C.** (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS microbiology reviews*, 25(3), 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>
59. **Mechai, A** (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat université de badji-mokhtar Annaba. 186 p.
60. **Mekri, M., & Abbouni, B.** (2016). Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudo lactiques et des huiles essentielles d'*Inula viscosa* contre les germes pathogènes. these de doctorat. Université de Sidi Bel Abbès.205p. <http://rdoc.univ-sba.dz/handle/123456789/1149>
61. **Metrouh, R** (2022). Caractérisation d'une collection de bactéries lactiques autochtones : étude des propriétés biotechnologiques et probiotiques. Thèse de doctorat. Université d'E.C.L.T Tébessa. 205p.
62. **Michel M. Federighi .** 2005.Bactériologie alimentaire, *Compendium d'hygiène des aliments*. Lavoisier, 290p.

Références Bibliographiques

63. **Moll G.N., Roberts G.C.K., Konings W.N., Driessen A.J.M. (1996).** Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69: 185-191.
64. **Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Science and Technology*, 43, 1320-1324.
65. **Mouas, Y., Benrebiha, F. Z., & Chaouia, C. (2017).** Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* l. *AGROBIOLOGIA*, 7(1), 363–370. <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/119423>
66. **Muntean, D., Licker, M., Alexa, E., Popescu, I., Jianu, C., Buda, V., Dehelean, C., Ghiulai, R., Horhat, F., Delia, H., Danciu, C. (2019).** Evaluation of essential oil obtained from *Mentha piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infection and Drug Resistance*. Volume 12. 10.2147/IDR.S218141.

-N-

67. **Nasardin, N.R.M., Mat Hanafiah, Mohd Ariff., Zainon, Maslan., Ibrahim, Mazree., Rahman, A.I.A., Baharudin, Z.A., Husin, M.H.M., Mahir, I., Zulkefle, Ahmad Aizan. (2018).** Comparison of Chemical Compounds of Essential Oils from Natural Agarwood and Inoculated Agarwood (Roselle-Based Inoculation). *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*. 11. 677-681. 10.11591/ijeecs.v11.i2.pp677-681.

-O-

68. **O'Sullivan L., Ross R. P., Hill, C. (2002).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 84: 593-604.

-P-

69. **Pierron, C. (2014).** Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs [Essential oils and their experiments in French hospital services: examples of applications in geriatrics-gerontology and palliative care]. *Sciences pharmaceutiques*, 60(3), 206-212.
70. **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.

-R-

71. **Richard C. et al., (2006).** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23(2), 175-183.

Références Bibliographiques

72. **Rodgers S.**, 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, **12**, 276-284.
- S-
73. **S.T. Ogunbanwo***, **A.I. Sanni**, and **A. A. Onilude** (2003). *Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1*. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219–227. doi:10.5897/ajb2003.000-1045
74. **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.
75. **Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T.** (2000). *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. doi:10.1016/s0168-1656(00)00375-8
76. **Salminen, S., & von Wright, A.** (Eds.). (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033>
77. **Schillinger U. and Lucke F.K.** (1987), Identification of *lactobacilli* from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4, 199–208.
78. **Shiradeep, S., Karmakar, R.S., Khare, S., Ojha, K. and Kundu, S.** (2012) Development of Probiotic candidate in combination with essential oils from medicinal plant and their effect on enteric pathogens: A review. *Gastroenterol. Res. Pract.* 47150: 1-6.
79. **Snyder, L., Peters, J.E., Henkin, T.M. and Champness, W.** (2013) Molecular Genetics of Bacteria. 4th Edition, *American Society of Microbiology*, Washington DC. <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817169>
80. **Soukkou, L. & Guenat, L. & Mahallag, N. & Bekka, F.** (2011). *Effet Et Mécanisme D'action Des Huiles Essentielles Sur La Cellule Bactérienne*. Mémoire de Fin d'Étude, Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel.55p.
81. **Stiles, M.E. and Holzapfel W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Science and Technology* 36: 1-29.

-T-

82. **Tagg, J., Dajani, A., Wannamaker, L.** (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological reviews*.p722-p756. 722-56. 10.1128/MMBR.40.3.722-756.1976.

-V-

Annexes

83. **Vos, P., et al.** (2009) *Bergey's manual of systematic bacteriology*: Volume 3, the firmicutes. Springer, Berlin.

-W-

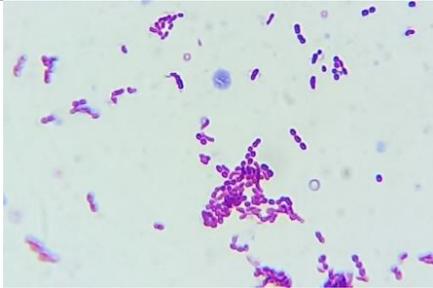
84. **Wijaya A., Neudeker C., Holzapfel W. & Franz C.** (2006). Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. In: *Proceedings of Food Micro, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy*, 124.

-Z-

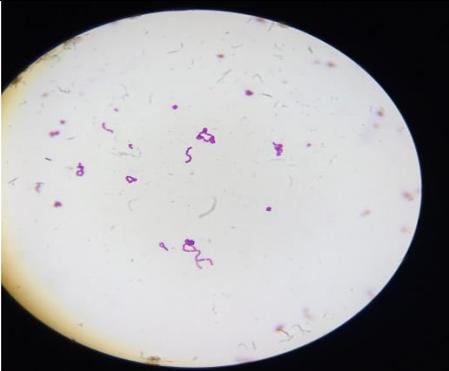
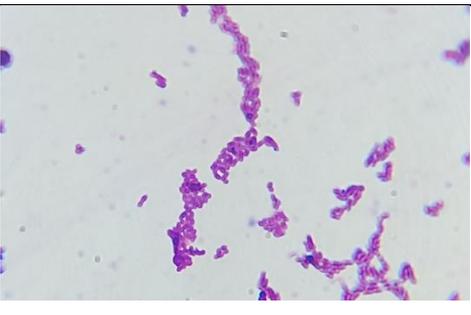
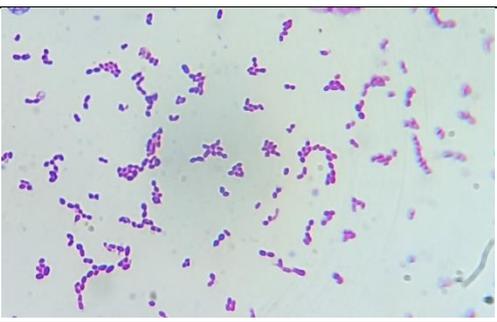
85. **Zemouli, F et Soualmia, A.** (2023) Effets de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et de l'huile essentielle de (*Rosmarinus officinalis*, *Origanum compactum* et *Myrtus communis*) contre les germes pathogènes. these de master. Universite echahid cheikh larbi tebessi-tebessa. 85p.
86. **Zergoug, A.** (2017). *Effet Des Probiotiques Et Bactériocines Vis-à-vis Des Pathogènes Responsables Des Infections Urinaires*. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem.166p.

Annexes

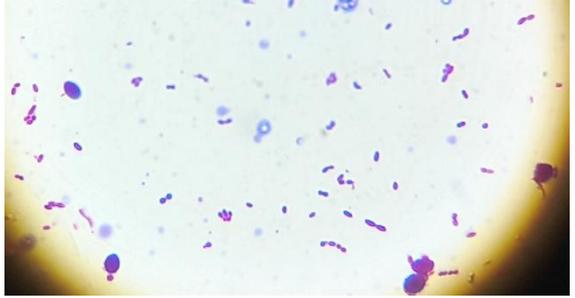
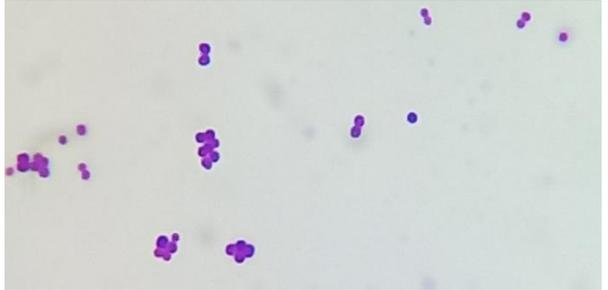
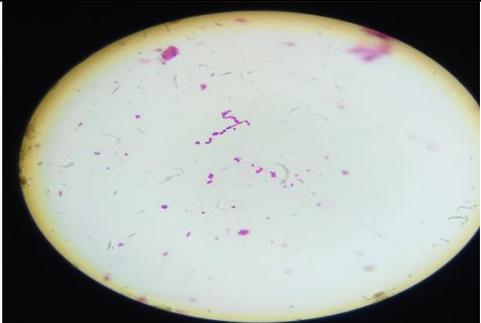
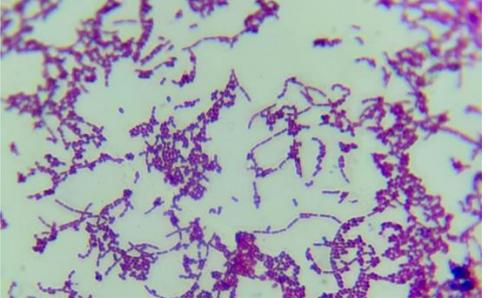
Résultats de la coloration de Gram

souche	Aspect micro	photo
S1	Cocci en chainettes	
S2	Cocci en chainette	
S3	Cocci en doplo	
S4	Cocci en diplo	

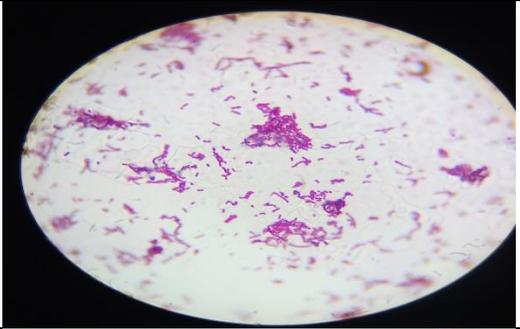
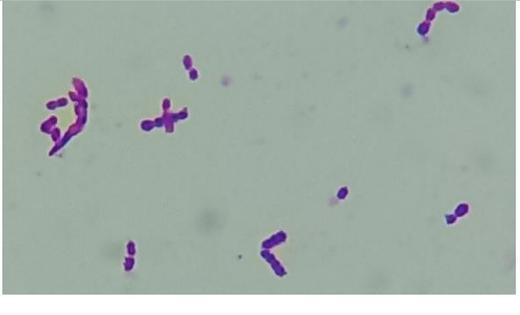
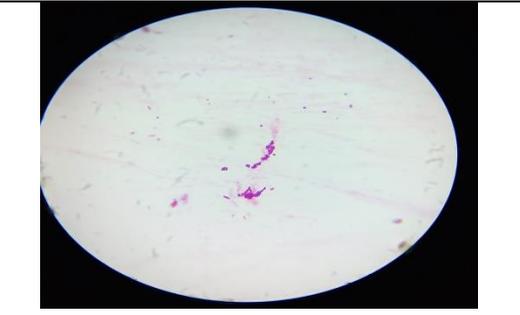
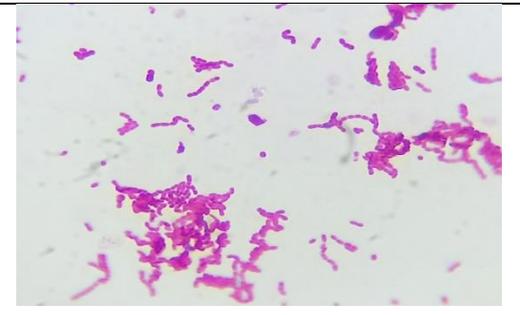
Annexes

S5	Cocci en chaine	 A circular micrograph showing several chains of small, purple-stained cocci against a light background.
S6	Cocci en chainette	 A rectangular micrograph showing several chains of purple-stained cocci, some appearing as short, curved chains.
S7	Bacilles en amas	 A rectangular micrograph showing several clumps of purple-stained bacilli, with some individual bacilli scattered around.
S8	Coccobacilles en diplo	 A rectangular micrograph showing numerous pairs of purple-stained coccobacilli, appearing as small, slightly curved rods.
S9	Bacilles en chainettes	 A circular micrograph showing several chains of purple-stained bacilli, with some individual bacilli also visible.

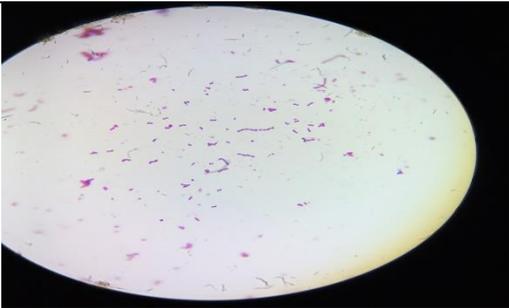
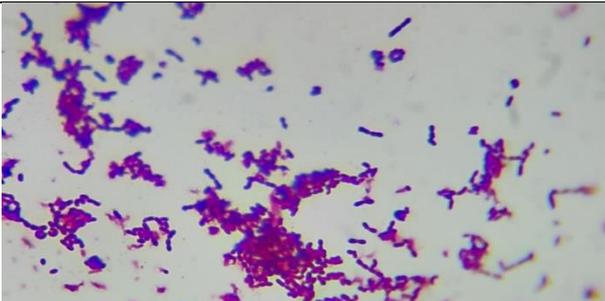
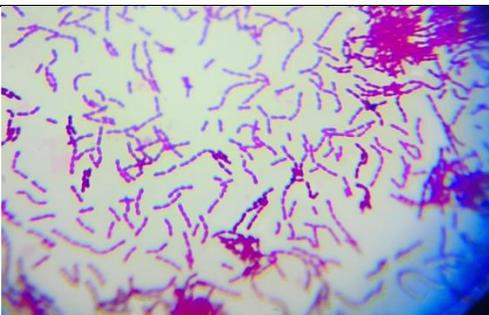
Annexes

S10	Bacilles en chaines	
S11	Coccobacilles	
S12	Cocci en amas	
S13	Cocci isolés	
S15	Coccobacilles en chaine	

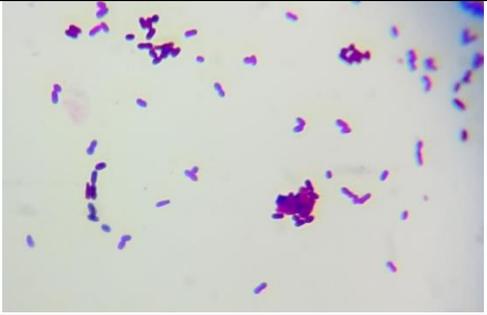
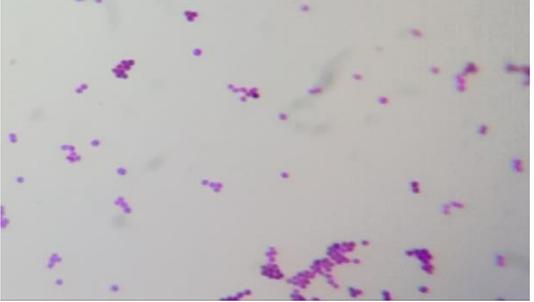
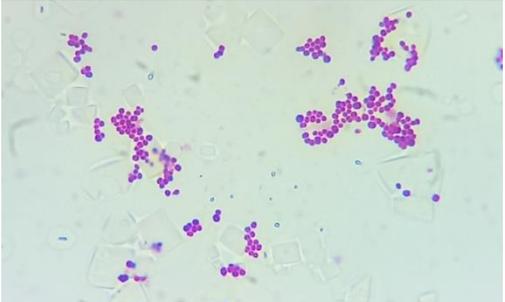
Annexes

S16	Coccobacilles en chaine	
S17	Cocci isolés	
S19	Cocci en amas	
S20	Coccobacilles en chaines	
S21	Cocci en diplo	

Annexes

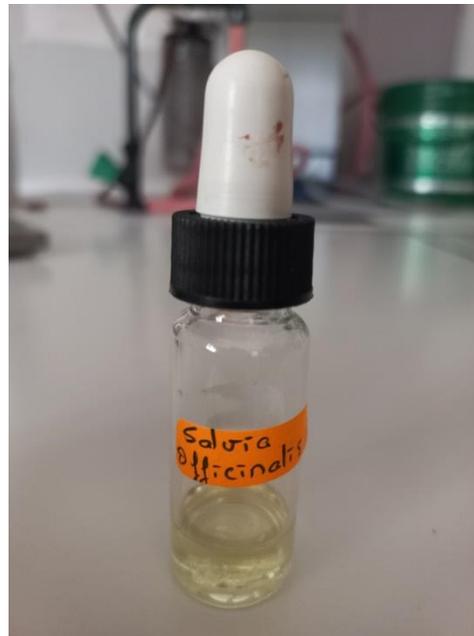
S22	Coccobacilles chainettes	 Micrograph showing coccobacilli arranged in chains. The bacteria are purple-stained and appear as short, slightly curved rods.
S23	Coccobacilles	 Micrograph showing coccobacilli. The bacteria are purple-stained and appear as short, slightly curved rods, scattered across the field of view.
S24	Coccobacilles en chainette	 Micrograph showing coccobacilli arranged in chains. The bacteria are purple-stained and appear as short, slightly curved rods.
S25	Coccobacilles en chainette	 Micrograph showing coccobacilli arranged in chains. The bacteria are purple-stained and appear as short, slightly curved rods.
S26	Cocci en chaines	 Micrograph showing cocci arranged in chains. The bacteria are purple-stained and appear as short, slightly curved rods.

Annexes

S27	Diplo cocci	 Micrograph showing pairs of purple-stained cocci (diplo cocci) scattered across the field of view.
S28	Diplo Cocci	 Micrograph showing numerous pairs of purple-stained cocci (diplo cocci) distributed throughout the field.
S29	Coocci amas	 Micrograph showing small, irregular clusters of purple-stained cocci (coocci amas) scattered across the field.
S30	Coocci en amas	 Micrograph showing larger, more organized clusters of purple-stained cocci (coocci en amas) against a light background.
S31	Bacilles en chaines	 Micrograph showing long, thin, purple-stained bacilli arranged in chains (bacilles en chaines) across the field.

Annexes

S33	Bacilles en chaines	
S34	Bacilles en diplo	



Les huiles essentielles *Mentha piperita* et *Salvia officinalis*