



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ECHAHID CHEIKH LARBI TEBESSI-
TEBESSA



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

Département : Biologie appliquée

Domaine science de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie appliquée

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

**Activité de la ciprofloxacine, des huiles essentielles et des
bactériocines contre des souches à Gram négatif
uropathogènes productrices de bêta-lactamases à spectre**

Présenté et soutenu par :

Melle. Sellat Baya

Melle. Rabah Taqwa

Devant le jury :

Présidente de jury :	Mme. Ferhi Selma	MCA	Université ECLT-Tébessa
Promoteur :	Mr. Mechai Abdelbasset	Professeur	Université ECLT-Tébessa
Co-Promoteur :	Mme. Debabza Manel	Professeur	Université ECLT-Tébessa
Examinatrice :	Mme. Smaali Saoussen	MCA	Université ECLT-Tébessa

Année universitaire : 2023/2024

رَبِّ زَيْنَبِ عَالِيهَا
وَقَالَ

REMERCIEMENT :

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Tout d'abord, ce travail ne sera pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr. Mechai Abdelbasset**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité et son soutien moral durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions **Mme. Manal Debabza** pour ses conseils, ses efforts et son soutien moral.*

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

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

Nos enseignants Aucun remerciement ne saurait exprimer notre respect et considération pour les orientations que vous avez consentis pour notre étude de l'université.

*Nos vifs remerciements vont à **Mr. Issam Manssour** pour les orientations et le soutien durant la période la réalisation de la partie pratique de notre travail.*

Ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien actif des membres de notre famille, surtout nos parents qu'ils nous ont toujours encouragé moralement et matériellement et à qui on tient à les remercier.

Enfin on tient à exprimer vivement nos remerciements avec une profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation, car un projet ne peut pas être le fruit d'une seule personne.

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

*À l'âme de mon grand-père **saâd** et mon père **Youssef (Allah yarhmhom inchallah)** : un héritage de sagesse et d'amour éternel*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, mon adorable mère **Aicha** :*

Ton amour, ta sagesse et ton soutien m'ont guidé à travers chaque étape de ma vie. Tu es la lumière qui éclaire mes jours et la force qui me soutient dans les moments difficiles. Merci pour tout ce que tu fais et pour tout ce que tu es. Je t'aime infiniment.

*À mes extraordinaires oncles **lazher** et **Mouhammed** :*

Vos encouragements constants, votre générosité et votre sagesse ont joué un rôle crucial dans ma réussite. Chacun de vous a, par sa présence et ses paroles, contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui. Merci pour vos précieux conseils, Votre influence positive et votre dévouement m'ont inspiré à viser toujours plus haut et à persévérer malgré les défis. Ce mémoire est un hommage à votre impact indélébile sur ma vie.

*À mes sœurs **Meriem, Riheb, Yakine** et mon frère **Mouataz** : votre amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*À mes chers : **takwa** et **imane** merci pour votre amour.*

À tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

BAYA

Dédicace :

Je dédie ce mémoire :

*À mon cher père Mouhamed **Rabah** :*

Merci pour la sagesse, le soutien et l'amour inconditionnel ont toujours été ma source d'inspiration. Ton exemple de détermination et de persévérance m'a guidé tout au long de ce voyage académique. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et pour être toujours là, me poussant à atteindre de nouveaux sommets.

*À ma très chère mère **Dalila** :*

Ton amour, ta sagesse et ton soutien m'ont guidé à travers chaque étape de ma vie. Tu es la lumière qui éclaire mes jours et la force qui me soutient dans les moments difficiles.

*À mes sœurs **Amira, Aya et Anfel** :*

Votre amour, votre soutien et votre complicité ont été une source de réconfort et de motivation tout au long de ce parcours, Merci pour vos encouragements constants et pour être toujours présentes à mes côtés.

*À mes formidables frères **Oussama, Ayoub, Amine et Ayhem** :*

Merci pour votre présence inébranlable, vos rires partagés et votre croyance en moi, même dans les moments de doute. Ce succès est autant le vôtre que le mien.

*À mon grand père et ma tante (**Hasna**) :*

Grand-père, ta force tranquille et ta bienveillance ont toujours été une source d'inspiration pour moi.

Tante, ta générosité, ta joie de vivre et tes précieux conseils continuent de résonner dans mon cœur, vous me manquez profondément, et je vous dédie ce mémoire en hommage à l'impact indélébile que vous avez eu sur ma vie allah yarhmkom inch'Allah

*À mes belles amies : **Baya et Imene***

Chacune de vous, par vos conseils, vos sourires et vos rires, a contribué à rendre ce parcours non seulement supportable, mais véritablement agréable et mémorable, merci pour les innombrables moments de complicité, les discussions profondes et les éclats de rire partagés. Votre amitié est un trésor que je chéris profondément.

TAKWA

Résumé :

L'objectif de ce travail était la mise en évidence de l'effet de synergie des bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées des produits laitiers Algérien et les huiles essentielles de *Mentha piperita* et *Myrtus communis* et la ciprofloxacine, antibiotique empiriquement utilisé dans le traitement des infections urinaires.

Les activités antimicrobiennes des souches lactiques sélectionnées dans cette étude possèdent de larges spectres d'activité dirigée contre les bactéries indicatrices Gram négatives et Gram positif et les bactéries uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques isolés de prélèvement urinaires.

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha piperita* a montré une activité remarquable contre la majorité des espèces testées. En effet, cette huile a donné des zones d'inhibitions qui fluctuent entre 07 et 35 mm de diamètre pour toutes.

L'huile essentielle de *M. communis* présente des activités antibactériennes intéressantes dirigée contre les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* UPT15, *Klebsiella pneumoniae* ssp UPT20 et *Raoultella terrigena* UPT78. Les valeurs de la CMI varient entre 0.32 et 2.5µl/ml pour l'HE de *Mentha piperita* et entre 0.62 et 1.25 µl/ml pour l'HE *Myrtus communis*.

La triple combinaison ciprofloxacine-Huile essentielle *Mentha piperita* -Fraction active de la bactériocine a affiché un effet synergique (19 et 20 mm) chez *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20 respectivement. Cependant les combinaisons ont montré un effet antagonisme contre *Escherichia coli* ATCC 25422 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et un effet indifférent envers les deux souches *Enterobacter cloacae* UPT11 et *Raoultella terrigena* UPT 78.

La triple combinaison ciprofloxacine-Huile essentielle *M. communis*- Fraction active de la bactériocine montre un pouvoir synergique (diamètre de zone d'inhibition entre 21 et 32 mm) chez toutes les souches indicatrices testées.

Mots clés : Bactéries lactiques, potentiel inhibiteur, bactériocinogène, bactériocine, multirésistance, huiles essentielles. Effet synergétique, *Mentha piperita*, *Myrtus communis*, antibiotique.

ملخص:

كان الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على التأثير التآزري للبكتريوسينات التي تنتجها بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من منتجات الألبان الجزائرية والزيوت الأساسية النعناع الفلفلي، الريحان، وسيبروفلوكساسين، وهي مضادات حيوية تستخدم تجريبياً في علاج التهابات المسالك البولية.

الأنشطة المضادة للميكروبات لسلاسل حمض اللاكتيك المختارة في هذه الدراسة لها أطياف واسعة من النشاط الموجه ضد البكتيريا سالبة الجرام و الموجبة الجرام و كذا البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من العينات البولية.

أظهر الزيت الأساسي لأوراق النعناع الفلفلي نشاطاً ملحوظاً ضد غالبية الأنواع التي تم اختبارها. في الواقع، أعطى هذا الزيت مناطق تثبيط يتغير قطرها بين 07 و 35 ملم للجميع.

يقدم الزيت الأساسي للريحان أنشطة مثيرة للاهتمام مضادة للبكتيريا موجهة ضد سلالات *Klebsiella pneumoniae sp* و *E. coli* UPT15 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و UPT20 و *Raoultella terrigena* UPT78. تتراوح قيم التراكيز الدنيا المثبطة من 0.32 إلى 12.5 µl/m بالنسبة لزيت النعناع الفلفلي ومن 0.62 إلى 1.2 µl/ml لـ زيت الريحان.

أظهر المزيج الثلاثي من السيبروفلوكساسين والزيت العطري النعناع الفلفلي - جزء نشط من البكتريوسين تأثيراً تآزرياً (19 و 20 مم) ضد السلالات *E. coli* UPT 15 و *Klebsiella pneumoniae spp* و UPT20 *pneumoniae* على التوالي فيحين أظهرت التركيبات تأثيراً ضدياً ضد *E. coli* ATCC 25422 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، ونشاطاً غير مؤثر على السلالتين *Enterobacter cloacae* UPT11 و *Raoultella terrigena* UPT 78.

يُظهر مزيج ثلاثي من زيت السيبروفلوكساسين العطري النعناع الفلفلي - جزء نشط من البكتيريا ذو تأثير تآزري (قطر منطقة التثبيط بين 21 و 32 مم) في جميع سلالات المؤشرات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، الإمكانات المثبطة، البكتريوسين، المقاومة المتعددة، الزيوت الأساسية. تأثير تآزري، النعناع الفلفلي، الريحان، مضاد حيوي.

Abstract

The objective of this work was to highlight the synergistic effect of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Algerian dairy products and the essential oils of *Mentha piperita* and *Myrtus communis* and ciprofloxacin, antibiotic empirically used in the treatment of urinary tract infections.

The antimicrobial activities of the lactic acid strains selected in this study have broad spectra of activity directed against Gram-negative and Gram positives indicator bacteria and multidrug-resistant uropathogenic bacteria isolated from urinary samples. The essential oil of *Mentha piperita* showed remarkable activity against the majority of the species tested. Indeed, this oil has given inhibition zones that fluctuate between 07 and 35 mm in diameter for all.

The essential oil of *M. communis* presents interesting antibacterial activities directed against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* UPT15, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT20 and *Raoultella terrigena* UPT78. MIC values range from 0.32 to 2.5 µl/ml for *Mentha piperita* EO and from 0.62 to 1.25 µl/ml for *Myrtus communis* EO.

The triple combination of ciprofloxacin and essential oil of *Mentha piperita* - Active fraction of bacteriocin showed a synergistic effect (19 and 20 mm) against *E. coli* UPT 15 and *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 20 respectively. However, the combinations showed an antagonistic effect against *E. coli* ATCC 25422 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and an indifferent effect against the two strains *Enterobacter cloacae* UPT11 and *Raoultella terrigena* UPT 78. The triple combination ciprofloxacin-essential oil *M. communis* - active fraction of bacteriocin shows a synergistic activity (diameter of inhibition zone between 21 and 32 mm) against all the indicator strains tested.

Keywords: Lactic acid bacteria, inhibitory potential, bacteriocin, multidrugresistance, essential oils. Synergistic effect, *Mentha piperita* -, *Myrtus communis*, antibiotic.

Sommaire

Titre	Page
Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
ملخص	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les entérobactéries (Gram négatif)	3
1-Classification des entérobactéries	3
2-Résistance bactérienne aux antibiotiques	4
2-1-Types de résistance	4
2-1-1-Résistance naturelle	4
2-1-2-1-Résistances par mutation chromosomique	5
2-1-2-2- Résistances extra-chromosomiques	5
2-2-Niveaux de résistance	5
2-3-Mécanismes de résistance	6
2-4-Phénotype de résistance	7
2-4-1-Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	7
3-Définition et classification des β -lactamases	7
3-1- β -lactamases à spectre élargi	9
3-2-Diversité des types de BLSE	10

4-Une nouvelle alternative aux antibiotiques	11
Chapitre II : Les bactéries lactiques et probiotiques	13
1-Bactéries lactiques probiotiques	13
2-Les bactéries lactiques bactériocinogènes comme alternative aux antibiotiques	15
2-1-Les bactéries lactiques	15
2-2-Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	15
2-2-1-Les genres <i>Lactobacillus</i> et <i>Carnobacterium</i>	15
2-2-2-Les genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	16
2-2-3-Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	17
2-2-4-Le genre <i>Bifidobacterium</i>	18
2-3-Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques	20
2-3-1-Les acides organiques	20
2-3-2-Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	20
2-3-3-Le dioxyde de carbone (CO ₂)	21
2-3-4-Le diacétyl (C ₄ H ₆ O ₂)	21
2-4-Les bactériocines des bactéries lactiques	22
2-4-1-Définition	22
2-4-2-Mode d'action des bactériocines	22
Chapitre III : Les huiles essentielles	23
1-Définition des huiles essentielles	23
1-1-L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants	23
1-2-Mécanismes d'action des huiles essentielles	24
1-3-Interaction entre les huiles essentielles et les probiotiques	24
2-Association Antibiotique-huile essentielle	25
2-1-Généralités	25

2-2-La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques	25
Partie II : Etude Expérimentale	
1-Cadre d'étude et Objectif générale	27
2-Matériel et méthodes	27
2-1-Matériel	27
2-1-1-Matériel non biologiques	27
2-1-1-1-Appareillages	27
2-1-1-2-Verrerie	28
2-1-1-3-Outils	28
2-1-1-4-Milieus de culture	28
2-1-2-Matériels biologiques	29
2-1-2-1-Matériels végétales	29
2-1-2-2-La Menthe poivrée (<i>Mentha piperita</i>)	29
2-1-2-3-Classification botanique	30
2-1-2-4- <i>Myrtus communis</i>	30
2-1-3-Souches bactériennes	31
2-2-Méthodes et protocoles utilisés	32
2-2-1-Les bactéries lactiques	32
2-2-1-1-Collecte des échantillons	32
2-2-1-2-Isolement, purification et conservation des souches lactiques	32
2-3-Identification des bactéries lactiques isolées	33
3-Examen microscopique	33
4-Tests physiologiques et biochimiques	34
5-Souches indicatrices utilisées	34
5-1-Souches de références	34

5-2-Souches uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques	34
6- Activité antibactérienne des bactéries lactiques	37
6-1-Méthode de détection indirecte (Méthode direct par test des puits)	37
6-2-La lecture	38
7-Extraction des huiles essentielles	39
7-1-Détermination des rendements en huiles essentielles	39
8-Activité inhibitrice des HE des plantes sur les Entérobactéries productrice de bêta-Lactamases	40
8-1-Aromatogramme : La méthode de Vincent	40
8-1-1-Technique	40
8-1-2-Lecture	40
9-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles	41
9-1-Principe	41
9-2-Technique	41
10-Détermination de types d'interaction entre HEs les fractions antimicrobiennes actives (FAC) et la ciprofloxacine	42
Chapitre II : Résultats et Discussions	44
1- Isolement et purification des bactéries lactiques	44
1-1-Observation macroscopique des cultures bactériennes	44
1-2-Observation microscopique après coloration de Gram	45
2-Activité antimicrobienne des bactéries lactiques	47
2-1-Résultats de l'Activité antibactérienne des Huiles essentielles par aromatoigramme	52
2-2-Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles	54
3-Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles de la ciprofloxacine et des bactériocines	56

Discussion générale	62
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	70

Liste des abréviations :

- ATB** : Antibiotique
- ATCC** : American Type Culture Collection.
- BLSE** : Les β -lactamases à spectre élargi.
- BN** : Bouillon Nutritif.
- CMB** : la concentration minimale bactéricide.
- CO₂** : Le dioxyde de carbone.
- CTX-M** : Cefotaximase-Muenchen.
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde.
- E. coli*** : *Escherichia coli*.
- FAC** : fractions antimicrobiennes actives.
- g** : Gramme.
- GES**: Guyana Extended Spectrum bêta-lactamase.
- GN**: Gélose Nutritive.
- GRAS**: Generally Recognized As Safe.
- HEs**: huiles essentielle(s).
- LAB**: Lactic acid bacteria.
- MC**: *Myrtus communis*.
- MH**: Mueller Hinton.
- MIC**: la concentration minimale inhibitrice.
- ml**: Millilitre.
- MP**: *Mentha piperita*.
- MRS**: Man, Rogosa, Sharpe.
- OMS** : l'Organisation Mondiale pour la Santé.
- ONU** : l'Organisation des Nations Unies.
- P. aeruginosa***: *Pseudomonas aeruginosa*.
- PER**: P. Normann, E. Ronco, R. Labia.
- R**: Résistance.
- S**: Sensible.
- SHV**: SulfiHydroxyl Variable.
- VEB**: Vietnam Extended Spectrum Bêta-lactamase.
- μ l** : Microlitre.

Liste des figures

Figure	Page
Figure 1 : Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les Antibiotiques touchés.	07
Figure 02 : <i>Mentha piperita</i> avant séchage.	29
Figure 03 : <i>Myrtus communis</i> après séchage	31
Figure 04 : échantillon de Jben (la région de Tébessa).	32
Figure 05 : Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits.	38
Figure 06 : Dispositif de l'hydrodistillation de type Clevenger.	39
Figure 07 : Aspects macroscopiques des colonies de bactéries lactiques de la dilution 10^{-2} cultivées sur le milieu MRS.	44
Figure 08 : Bactéries Gram positif de forme bacille, agrandissement x 100.	45
Figure 09 : Représentation graphique de test de sensibilité des bactéries indicatrices vis-à-vis les huiles essentielles testées.	53
Figure 10 : Effet de l'HEs de MP et MC sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 et <i>Raoultella terrigena</i> UPT78.	54
Figure 11 : Lecture de la microplaque de MP vis-à-vis les souches indicatrices.	55
Figure 12 : Lecture de la microplaque de MC vis-à-vis les souches indicatrices.	56
Figure 13 : Représentation graphique de de la ciprofloxacine de l'huile de <i>Mentha piperita</i> (HE-MP) et de la bactériocine (FAC1).	57
Figure 14 : Représentation graphique de l'interaction de l'huile essentielle de <i>Myrtus comminus</i> (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.	59
Figure 15 : l'interaction de l'huile essentielle de <i>Myrtus comminus</i> (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.	61
Figure 16 : l'interaction de l'huile essentielle de <i>Mentha piperita</i> (HE-MP) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.	61

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau 01 : Classification des entérobactéries les plus rencontrées en pathologie humaine	4
Tableau 02 : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés)	14
Tableau 03 : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques	19
Tableau 04 : Classification de la menthe poivrée	30
Tableau 05 : les souches uropathogènes utilisées et leurs origines	35
Tableau 06 : Antibiogramme des souches uropathogènes sélectionnées	36
Tableau 07 : Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des huiles essentielles	42
Tableau 08 : Aspect microscopique des bactéries lactiques isolées	45
Tableau 09 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques contre les souches uropathogènes par la méthode des puits	48
Tableau 10 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques contre les souches de références par la méthode des puits	51
Tableau 11 : Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées	53
Tableau 12 : Résultat des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HES de <i>Mentha piperita</i> et <i>Myrtus communis</i> sur les souches indicatrices.	55
Tableau 13 : résultats de l'interaction de la ciprofloxacine de l'huile de <i>Mentha piperita</i> (HE-MP) et de la bactériocine (FAC1).	58
Tableau 14 : Effet de combinaison de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.	60

Introduction générale

Introduction générale

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente l'un des plus importants problèmes rencontrés en thérapeutique hospitalière. Le nombre d'antibiotiques actifs se réduit et la résistance aux antibiotiques est donc devenu un problème de santé publique. L'idée de qu'il existera toujours des nouveaux antibiotiques commence à disparaître dans les années 90 (**Valcourt, 2016**).

Comme le déclare le microbiologiste Stuart Levy, « Il pourrait arriver un jour où les antibiotiques ne seront plus qu'un fait d'intérêt historique » (**Levy, 1992**).

L'émergence et la dissémination des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (ATB) suite à l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers, est devenue un véritable problème de santé publique. Les bactéries développent, de plus en plus, de la résistance en s'adaptant aux thérapeutiques antibactériennes et de ce fait l'échec de traitement.

Face à l'ampleur de ce problème, plusieurs plans d'actions sont menés. D'une part, il y a des actions de prévention et de sensibilisation aussi bien au niveau individuel que collectif (citoyens, responsables politiques, professionnels de santé...). D'autre part, il y a la recherche de nouveaux composés antimicrobiens afin d'identifier des moyens alternatifs de combattre les infections et/ou de réduire la résistance bactérienne. Parmi ces composés, on trouve entre autres ceux sécrétés par les bactéries lactiques et nommés « bactériocines » (**Amansag, 2019**).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" 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 (**Djadouni, 2013**). Les propriétés de conservation sont le résultat des activités 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 (**Mechai, 2009**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens qui permettent l'inhibition de la croissance d'espèces proches de la souche productrice et parfois d'espèces plus éloignées. Il existe différentes classes de bactériocines qui diffèrent notamment par leur taille, leur mode d'action et leur cible microbienne. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables (**Amansag, 2019**).

D'autre part, plusieurs chercheurs ont consacré des études à la recherche de nouvelles molécules d'origine végétale qui possèderait des propriétés antibactériennes. Des plantes utilisées dans la médecine ancienne, commencent à attirer l'intérêt des scientifiques qui trouvent dans leurs molécules chimiques, une nouvelle opportunité de lutter contre les bactéries (**Valcourt, 2016**).

L'objectif de notre travail consiste à l'étude de l'activité de la ciprofloxacine en combinaison avec les bactériocines produites par les bactéries lactiques et les huiles essentielles extraites de deux plantes médicinales à savoir *Mentha piperita* et *Myrtus comminus*. La stratégie suivie est axée sur les étapes suivantes.

- ✚ Isoler, purifier et identifier des bactéries lactiques bactériocinogènes à partir des produits laitiers fermentés de façon artisanale
- ✚ Recherche et criblage des fractions semi-pures de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre et d'un fromage artisanal Algérien (Jben), tout en déployant les moyens permettant d'optimiser leur production et leur détection.
- ✚ L'étude de l'activité des bactériocines, seules ou en combinaison avec la ciprofloxacine et les huiles essentielles de *Mentha piperita* et *Myrtus comminus* vis-à-vis de bactéries uropathogènes multi-résistantes aux antibiotiques.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Les entérobactéries

(Gram négatif)

Chapitre I : Les entérobactéries (Gram négatif)

Les entérobactéries sont des bactéries très incluses en pathologie infectieuse humaine isolées lors du diagnostic bactériologique (Goro, 2021). Le nom d'entérobactérie a été donné puisqu'ils sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux (Daffe, 2018). Au niveau phénotypique, ces bactéries sont des bacilles Gram négatif droits ; chimioorganohétérotrophes ; mobiles ou immobiles ; non sporulés ; aérobies facultatifs ; produisant de l'acide à partir du glucose ; pas de besoin en sodium, ni de stimulation ; possédant catalase ; dépourvus d'oxydase ; réduisent habituellement les nitrates en nitrite (pas en N₂) (Goro, 2021).

Certaines entérobactéries peuvent :

- Participer au cycle naturel des matières organiques.
- Coloniser et dégrader des produits agroalimentaires.
- Provoquer des maladies parfois graves chez l'homme ou chez l'animal.
- Utilisées dans les procédés industriels comme la fabrication des fromages, des alcools (Carip, 2008).

1- Classification des entérobactéries :

Les entérobactéries forment un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Rahn** en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Cette famille est très hétérogène sur le plan pathogénie et écologie où se trouve plus de 30 genres et 130 espèces (Tidrarine, 2019). Elle est classifiée en genres, selon les caractères biochimiques et métaboliques, puis en espèces surtout selon les caractéristiques antigéniques.

Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Salmonella*...), soit commensales (*Escherichia coli*, *Klebsiella*...), soit encore saprophyte (*Serratia*, *Proteus*) (Carip, 2008). Les principales genres et espèces de cette famille sont présentés dans le **tableau 01** :

Tableau 3 : Classification des entérobactéries les plus rencontrées en pathologie humaine (Debabza,2015).

Genres	Espèces
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter gergovia</i>
<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus mirabilis</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

2- Résistance bactérienne aux antibiotiques :

Des espèces bactériennes ou certaines souches d'une même espèce bactérienne peuvent être résistantes à l'action d'un ou de plusieurs antibiotiques. On parle alors, dans ce dernier cas, de **résistance croisée** ou de **résistance multiple**. La résistance bactérienne résulte toujours de l'incapacité de l'antibiotique à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis à vis de l'antibiotique, exprimée par divers mécanismes (Bousseboua, 2005).

2-1- Types de résistance :

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

2-1-1-Résistance naturelle :

La résistance naturelle, appelée aussi résistance intrinsèque est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Elle est programmée sur le génome bactérien, donc fixe et constante à l'intérieur du taxon et transmise à la descendance. A ce titre, elle constitue un critère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides (Doublet, 2004).

2-1-2-Résistance acquise :

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances acquises sont dues à des modifications génétiques, consistant en des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie (résistance par mutation chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (résistance extra-chromosomique) (**Leclerc *et al.*, 1995**).

2-1-2-1-Résistances par mutation chromosomique :

La résistance par mutation est peu répandue en clinique (moins de 20% des résistances acquises). Ce type de résistance est observé, entre autres, chez les mycobactéries. Les résistances mutationnelles sont :

- **Spontanées** : elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique.
- **Stables** : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien.
- **Spécifiques** : elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotiques.
- **Rares** : le taux de mutation se situe habituellement entre 10^{-7} et 10^{-8} (**Leclerc *et al.*, 1995**).

2-1-2-2 Résistances extra-chromosomiques :

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises), et contagieuses. Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides R ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant, même d'espèces différentes (**Belbel, 2014**). Du fait que les plasmides R codent le plus souvent pour plusieurs résistances aux antibiotiques, appartenant à des familles différentes, leur acquisition confère une résistance multiple qui pose de grands problèmes dans l'utilisation thérapeutique des antibiotiques (**Bousseboua, 2005**).

2-2-Niveaux de résistance :

Les bactéries résistantes peuvent exprimer leur résistance aux antibiotiques à des niveaux différents de concentration, selon les antibiotiques et les espèces bactériennes. On

parle de résistance de bas niveau lorsque la croissance des bactéries est arrêtée par de faibles doses d'antibiotique et de résistance de haut niveau lorsque cette croissance bactérienne est stoppée par de fortes concentrations d'antibiotique (**Bousseboua, 2005**).

2-3-Mécanismes de Résistance :

Huit mécanismes de résistance sont impliqués chez les bactéries à Gram négatif (**Figure 01**), certains étant médiés par un plasmide.

Ces mécanismes comprennent :

- La perte de porines, qui réduit le mouvement de l'antibiotique (ATB) à travers la membrane cellulaire.
- La présence de β -lactamases dans l'espace périplasmique, ce qui dégrade les β -lactamines.
- Une surexpression de la pompe d'efflux transmembranaire, ce qui expulse l'ATB à partir de la bactérie avant qu'il puisse avoir un effet.
- La présence des enzymes de modification des antibiotiques, ce qui rend l'ATB incapable d'interagir avec sa cible.
- Des mutations de la cible, qui empêchent l'ATB de se lier à son site d'action.
- Des mutations ou des modifications ribosomales qui empêchent l'ATB de se lier et d'inhiber la synthèse des protéines.
- Des mécanismes de contournement métabolique, qui utilisent une enzyme alternative résistante pour contourner l'effet inhibiteur de l'antibiotique.
- Une mutation dans le lipopolysaccharide (LPS), qui rend la classe des polymyxines incapable de se lier à cette cible (**Peleg et Hooper, 2010**).

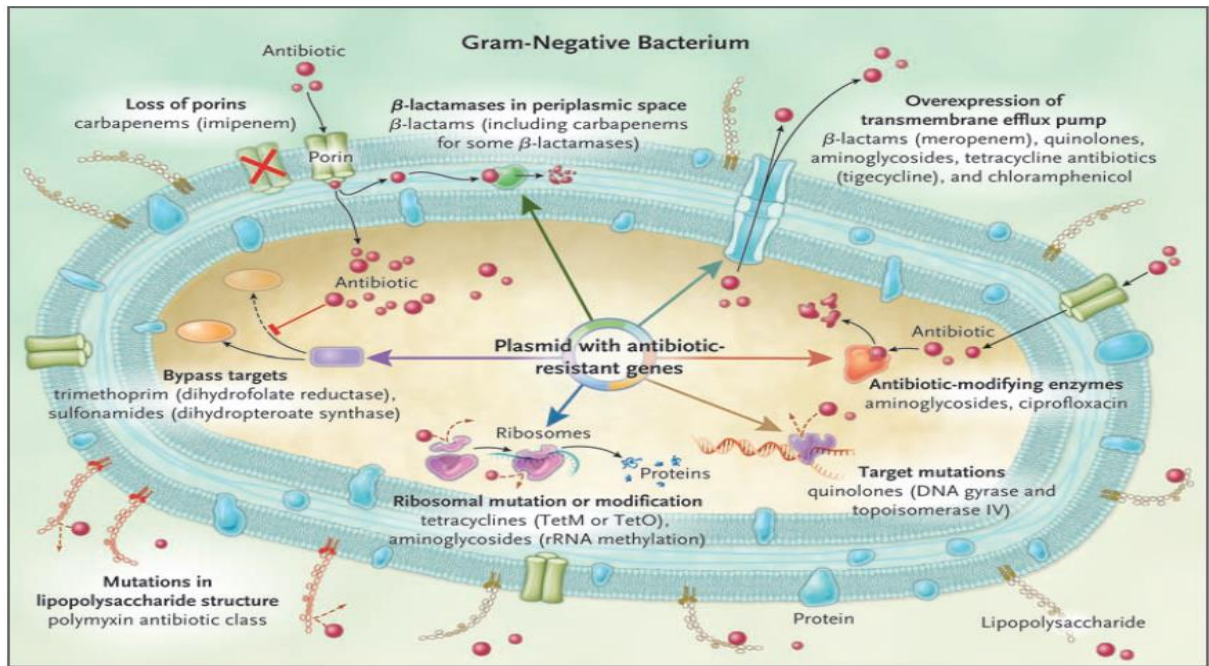


Figure 01 : Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les antibiotiques touchés (Peleg et Hooper, 2010).

2-4-Phénotype de résistance :

C'est l'expression de la résistance d'une souche, vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de même famille ou de familles différentes. Le choix judicieux des antibiotiques testés permet parfois de reconnaître le mécanisme de résistance et/ ou le génotype correspondant au phénotype observé. L'étude du phénotype de résistance est proposée pour identifier certaines souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales (Debabza, 2015).

2-4-1-Résistance des entérobactéries aux antibiotiques :

Les principaux mécanismes de résistance à détecter chez les entérobactéries sont :

- Résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique par les β -lactamases.
- Résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible.
- Résistance aux aminosides par inactivation enzymatique (Brahmia, 2022).

3-Définition et classification des β -lactamases :

Les entérobactéries peuvent résister aux β -lactamines par production des β -lactamases, des enzymes qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des β -lactamines, en donnant un produit qui perd totalement son activité antimicrobienne (Debabza 2015). Les gènes qui codent pour ces

enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénétiquement éloignées (**Belbel, 2014**).

Plus de 290 types de β -lactamases sont décrits, dont la plus grande partie des β -lactamases a été mise en évidence chez les BGN qui sont de plus en plus multirésistants (**Brahmia, 2022**).

Les β -lactamases sont classées suivant deux schémas :

- Elle est proposée en 1980 et basée sur la structure primaire de l'enzyme, notamment la séquence primaire en acide aminés d'éléments conservés du site actif. Elle individualise quatre classes moléculaires A, C, D (appelées sérines enzymes) et B (dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif) (**Belbel, 2014**).
- La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby- Medeiros (**Bush et al., 1995**) : où les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des β -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes.

Les β -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des β -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo- β -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (un ou deux ions de zinc).

La classe A est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram positif, les β -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les β -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les C3G et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisés en médecine.

Les principaux représentants de ce groupe sont les β -lactamases du type TEM, SHV et récemment le type CTX-M.

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame (**Doi et al., 2004**). Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains BGN. Au départ à médiation

chromosomique, les β -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique. Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type AmpC, FOX, ACT, CMY.

La classe D regroupe les β -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de β -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les β -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactame (**Debabza, 2015**).

Les β -lactamases de la classe B hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des β -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- β -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame). A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous classes, B1, B2, et B3 (**Benthabet, 2021**).

3-1- β -lactamases à spectre élargi :

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux C1G, C2G et C3G, à l'aztréonam (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique (**Bush et al., 1995**).

La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaenae*, en 1983 en Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (**Belbel, 2014**). Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et ceftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance préférentielle à la céfotaxime ou à la ceftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres β -lactamines telles que la ceftriaxone et l'aztréonam. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale (**Paterson et Bonomo, 2005**).

Les BLSE sont à médiation plasmidique et appartiennent à la classe moléculaire A de Ambler et au groupe 2be de la classification de **Bush-Jacoby- Medeiros** à l'exception des BLSE OXA (Classe D de Ambler et 2d de Bush-Jacoby-Meideros) (**Bush et al., 1995**).

De par leur propriété d'être inhibées par l'acide clavulanique elles se différencient des β -lactamases du groupe C produites par les bacilles à Gram-négatif tel *Enterobacter* qui peuvent posséder un spectre élargi par surproduction mais qui sont résistantes à l'acide clavulanique et sont sensibles aux C4G (céfépime, cefpirome) (**Brahmia, 2022**). Elles diffèrent aussi des métallob- β -lactamases qui quoique hydrolysant toutes les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) ne sont inhibées que par l'EDTA (**Debabza, 2015**).

3-2-Diversité des types de BLSE :

➤ **TEM**

Les BLSE de type TEM (TEMnoniera) dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Bien que les BLSE de ce type soient le plus souvent produites par *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez les autres espèces d'Entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* et *Salmonella spp*) et chez *Pseudomonas aeruginosa* (TEM-42) (**Debabza, 2015**).

➤ **SHV**

La β -lactamase SHV-1 (Sulfi Hydroxyl Variable) qui est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés est très fréquentes chez *K. pneumoniae*. Cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas les oxyimino-céphalosporines et l'aztréonam (Debabza, 2015). La majorité de ces enzymes ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*.

Toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter. freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa*.

➤ **CTX-M**

Les BLSE du type CTX-M font partie des BLSE non-TEM et SHV et possèdent moins de 40% d'homologie avec les BLSE TEM et SHV. Elles sont plasmidiques et confèrent une forte résistance au céfotaxime et au ceftriaxone et ont juste un effet marginal sur la CMI de la ceftazidime (**Benthabet, 2021**). Rapportées pour la première fois au milieu des années 1980, elles montrent un niveau de dissémination dans les bactéries et partout

dans le monde qui a augmenté dramatiquement depuis 1995. Les enzymes de la famille CTX-M sont isolées de nombreuses espèces d'entérobactéries et qui sur la base de leurs séquences protéiques sont divisés en cinq groupes, CTXM-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-9 et CTX-M-25) (**Benthabet, 2021**).

➤ **OXA**

Les BLSE OXA diffèrent des types TEM et SHV par le fait qu'elles appartiennent à la classe D et au groupe 2d (**Bush et al., 1995**). Contrairement à ce qui est observé dans les BLSE de la classe A qui sont produites le plus souvent par les entérobactéries, les BLSE OXA sont en grande majorité détectées chez *P. aeruginosa*. Plus d'une dizaine de ces enzymes ont été mises en évidence et la majorité provient de OXA-10 par mutation d'un ou de plusieurs acides aminés (**Bradford, 2001**).

➤ **Autres types de BLSE**

En plus des BLSE connues, de nouvelles familles classées parmi les BLSE non-TEM et non-SHV ont apparu. Ces BLSE appartiennent à la classe A d'Ambler et ont été isolées non seulement de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* mais aussi des entérobactéries. Parmi ces nouvelles familles, le type GES, le type PER et le type VEB (**Belbel, 2014**).

4-Une nouvelle alternative aux antibiotiques :

Les Entérobactéries multi-résistantes aux ATBs et productrices des bêta-lactamases de type BLSE constituent un problème majeur de santé public car elles entraînent des difficultés dans la prise en charge thérapeutique des infections, en raison de leur fréquence d'isolement et leur gravité en termes de morbidité et de mortalité. D'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les huiles essentielles extraites des végétaux qui ont toujours constitué une source potentielle de nouveaux composés bioactives d'intérêt thérapeutique (**Fares, 2023**).

Depuis quelques décennies, des efforts sont déployés afin d'étudier et de développer de nouvelles approches permettant l'émergence de traitements nouveaux et efficaces, qui serviront à compléter ou à remplacer l'utilisation des antibiotiques conventionnels. Parmi ces voies, la recherche de nouveaux agents anti-infectieux à travers l'exploration de la biodiversité microbienne. Plusieurs programmes sont lancés afin de mettre au point de nouvelles méthodes d'exploration et de valorisation du potentiel antimicrobien des souches bactériennes, et notamment celles des bactéries lactiques (**Amensag, 2019**).

Parmi les substances à potentiel anti-microbien secrétées par les bactéries lactiques, il y a les bactériocines. Il s'agit de peptides ou de complexes de peptides possédant une activité antimicrobienne. L'innocuité des bactériocines et leur mode d'action qui diffère de celui des antibiotiques conventionnels, font que leur utilisation comme alternatives à ces derniers dans la prévention et/ou le traitement de l'antibiorésistance est de plus en plus d'actualité (Mami, 2013).

Chapitre II :
Les bactéries lactiques et
probiotique

Chapitre II : Les bactéries lactiques et probiotiques

1-Bactéries lactiques probiotiques :

La notion de " probiotiques" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Marteau, 2002).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par **Lilly et Stillwell (1965)** pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon **Parker (1974)**, « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par **Fuller (1989)** qui redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale". Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**Rapport du FAO/WHO, 2002**), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (**Benreguiég, 2015**).

1-1-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé :

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans **le tableau 02** et expliqués ci-dessous.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques

existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau 04 : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés). (Moroni, 2007).

Evidences scientifiques fortes	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action de la β- galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse ▪ Stimulation du système immunitaire ▪ Dégradation des protéines allergènes
Evidences scientifiques prometteuses	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Activité hypocholestérolémiant	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Assimilation du cholestérol ▪ Déconjugaison des sels biliaires
prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Production de composés antimutagéniques ▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ▪ Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène
Effet antihypertenseur	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

2-Les bactéries lactiques bactériocinogènes comme alternative aux antibiotiques :

2-1-Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques font partie des groupes de micro-organismes les plus importants utilisés dans les fermentations alimentaires. Elles sont utilisées de manière empirique depuis des millénaires. Des traces archéologiques ont été retrouvées en Egypte, indiquant que l'Homme maîtrise les procédés de caillage du lait depuis le néolithique (Carée-Mlouka, 2019).

Très rapidement dans l'histoire de l'Homme, les bactéries lactiques ont été exploitées pour la production d'aliments fermentés lactés comme les yaourts ou les fromages, mais également des produits à base de légumes, de céréales, de poissons ou de viande, ils contribuent au goût et à la texture des produits fermentés et inhibent les bactéries d'altération des aliments en produisant des substances inhibant leur croissance. (Mokdad et al., 2020).

2-2-Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

2-2-1-Les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Hadeif, 2012).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

- ✓ **Groupe I « *Thermobacterium* »** : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* (Mechai, 2009).

- ✓ **Groupe II** « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*.
- ✓ **Groupe III** « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.
- ✓ Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou parfois en courtes chaînes. Il est non sporulé, mobile ou immobile, aéro-anaérobie facultatif, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique). Les *Carnobacterium* sont incapables de croître sur des milieux à base d'acétate, ne peuvent pas croître ni en présence de 8 % NaCl ni à 45°C et peuvent croître à 10°C et parfois à 0°C. Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. (Mami, 2013).

2-2-2-Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* :

Les différentes espèces appartenant à ces genres étaient, il y a encore peu de temps, regroupées en un seul genre qui est *Streptococcus*. Ce genre regroupe de nombreuses bactéries en forme de coques et ayant pour principales caractéristiques : Gram+, asporogènes, métabolisme homofermentaire produisant principalement de l'acide lactique et un contenu en CG% de 35% à 46%. La présence dans leur enveloppe d'antigène spécifique a été d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupes sérologiques de **Lancefield (1933)** (Mechai, 2009). **Schleifer & Kilper-Balz (1987)** ont proposé de subdiviser le genre *Streptococcus* en 4 genres. Il s'agit de *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Enterococcus*. Le genre *Sreptococcus sensu stricto* comprend la majorité des espèces et en particulier :

- **Le groupe pyogènes** : comprend 5 espèces α et/ou β hémolytique, pathogènes pour l'homme et/ou les animaux.
- **Le groupe oralis comprend** : *Sc. viridans*, *Sc. mitior*, *Sc. intermedius*, *Sc. Pneumoniae* souvent α hémolytiques pathogènes opportunistes.

- **Le groupe des autres streptocoques** et en particulier *Sc. salivarius* subsp. *salivarius* qui est étroitement apparenté à *Sc. thermophilus*. C'est la raison pour laquelle **Farrow & Collins, (1984)** proposent de considérer *Sc. thermophilus* comme sous espèce de *Sc. salivarius*. Cette proposition était renforcée par les résultats d'étude de l'hybridation ADN / ADN (**Axelsson, 1998**).

Le groupe des Lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. Cependant pour l'espèce *Lactococcus lactis* trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (**Axelsson, 1998**).

La capacité des lactocoques à croître à une température de 10°C et pas à 45°C est une caractéristique qui les distingue des autres *Enterococcus* des *Streptococcus*. La plupart des lactocoques réagissent avec les anti-sérums du groupe N.

Le genre *Enterococcus* de groupe sérologique D, présent dans le tube digestif de l'homme et des animaux et dont certaines espèces sont pathogènes opportunistes, le genre

Enterococcus n'était pas inclus dans la classification de **Bergey**, cependant quelques espèces étaient incluses dans le genre *Streptococcus*. **Schleifer & Kilpper-Bälz (1987)**. Ont proposé de transférer certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre: *Enterococcus*. Il s'agit de *Streptococcus faecalis*, et *Streptococcus faecium*, qui sont devenues ainsi *Enterococcus faecalis* (espèce type), et *Enterococcus faecium* (**Leclerc et al., 1996**).

Enfin, les traits phénotypiques caractéristiques des *Enterococcus* (croissance entre 10°C et 45°C, en présence 6,5% de NaCl et à pH 9,2) ont été confirmés par des études sur l'hybridation ADN/ADN et sur le catalogue de ARNr.16S (**Gasser et al, 1994**). [Thèse 2014]

2-2-3-Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* :

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella*.

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (**Hadef, 2012**).

2-2-4-Le genre *Bifidobacterium* :

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C.

Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (**Axelsson et al., 2004**).

Les principaux genres des bactéries lactiques sont montrés dans **le tableau 03** :

Tableau 03 : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Dérivée à partir de Axelsson, 2004).

Caractéristiques	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weisella</i>
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Coques	Coques	coques	Coques ovales	coques	coques	Coques /bacilles
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Gaz à partir de glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Croissance 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	±
Croissance 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Isomère d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	D, DL
Hydrolyse d'arginine	+	±	ND	±	-	-	±	±	-
Mdap	+	±	ND	-	-	-	-	-	-

+ positive ; - négative ; ± résultats variés selon l'espèce ; ND, non déterminé.

2-3-Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques :

La conservation des aliments peut être assurée artificiellement par l'ajout d'inhibiteurs tels que le sel, la fumée, les composés chimiques (nitrate, nitrite...) mais aussi par la présence de bactéries lactiques. Elles ont en effet des propriétés inhibitrices intéressantes liées à différents mécanismes comme la compétition nutritionnelle et la production de métabolites qu'elles produisent naturellement lors de la fermentation (Dotru, 2008). Parmi les métabolites produits par les bactéries lactiques, figurent les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'acide acétique, les acides gras insaturés et les bactériocines.

2-3-1-Les acides organiques :

Sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules. Des chercheurs ont testé l'inhibition de *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* et *Lb. sakei*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia liquefaciens* par les acides, acétique, lactique, citrique, propionique, benzoïque et sorbique en milieu de culture. Les quatre premiers acides, les plus solubles, ont montré une inhibition efficace de la croissance à des concentrations comprises entre 0,1 et 1% (p/v). Dans cette étude, *Brochothrix thermosphacta* et *Carnobacterium piscicola* étaient les bactéries les plus sensibles aux acides. (Dortu, 2008).

2-3-2-Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Produit en présence d'oxygène, a tendance à s'accumuler en raison de l'absence de catalase chez les bactéries lactiques. Les enzymes impliquées dans cette production peuvent être la NADH oxydase, l' α -glycérophosphatase, la pyruvate oxydase, et la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène a un potentiel oxydatif capable d'inhiber certains microorganismes en altérant les acides nucléiques et en oxydant les lipides (Hadeif, 2013).

2-3-3-Le dioxyde de carbone (CO₂) :

Le dioxyde de carbone (CO₂) produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation hétérolactique, crée une atmosphère anaérobie qui est toxique pour les bactéries aérobies strictes qui ont besoin d'oxygène comme seul accepteur final d'électrons lors de la respiration (Mechai, 2009).

2-3-4-Le diacétyle (C₄H₆O₂) :

Le diacétyle est issu du métabolisme du citrate et est produit principalement par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Ce composé possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et des propriétés aromatiques qui sont intéressantes dans le domaine des produits laitiers. L'acidification qui a lieu lors de la production de yaourt par exemple, augmente l'action du diacétyle qui tend alors à inhiber préférentiellement les bactéries à Gram négatif ainsi que les levures, mais son effet reste limité, car le diacétyle présent dans les produits fermentés n'est généralement pas en quantité suffisante pour contribuer efficacement à une activité antimicrobienne (Djadouni, 2013).

- L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la fermentation, ses formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, une grande quantité de l'acide lactique est contenue dans sa forme non dissociée et est toxique pour beaucoup de bactéries, levures et moisissures. Des chercheurs ont montré qu'à différentes valeurs de pH, la concentration minimale inhibitrice (MIC) de la forme non dissociée était différente à l'encontre de *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterobacter sp* et *Propionibacterium freudebreichii* subsp. *shermanii*. En outre, les stéréoisomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne. L'acide lactique est plus inhibiteur que l'isomère D (-) (Mami, 2013).

- L'acide acétique, produit à faible échelle lors de la fermentation du saucisson, peut interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique. L'acide acétique est plus inhibiteur de *L. monocytogenes* que l'acide lactique. L'acide acétique agit de manière synergique avec l'acide lactique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu favorisant ainsi l'augmentation de la toxicité de l'acide acétique. (Dortu, 2008).

2-4-Les bactériocines des bactéries lactiques :

2-4-1-Définition :

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique dont l'activité inhibitrice est dirigée contre des espèces taxonomiquement proches du microorganisme producteur (**Mechai, 2009**). La détection des bactériocines remonte à 1925 par **André Gratia** qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicine V. La colicine V a été caractérisée comme composé peptidique thermostable. **Tagg et al., (1976)** suggéraient qu'un composé antimicrobien ne doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants :

- ✚ L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
- ✚ Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- ✚ La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
- ✚ Un mode d'action bactéricide.
- ✚ Un site d'attachement (récepteurs) spécifique sur les cellules sensibles.
- ✚ La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.
- ✚ Les bactériocines sont codées par des plasmides.

2-4-2-Mode d'action des bactériocines :

L'activité inhibitrice des bactériocines se manifeste essentiellement par une interaction avec les lipides anioniques constituant les membranes bactériennes. Elle aboutit dans la majorité des cas à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles, à la chute du potentiel de membrane menant à la perte de leur force proton motrice, à une rupture du métabolisme énergétique (exemple de la colicine E1) et à l'arrêt de la synthèse de macromolécules conduisant à la mort des cellules cibles (**Proutière, 2020**).

Chapitre III :
les huiles essentielles

Chapitre III : Les huiles essentielles

1-Définition des huiles essentielles :

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

1-1-L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants :

Depuis la première mise en évidence de l'action des HEs contre les bactéries, par Delacroix en 1881, de nombreuses études ont été réalisées sur cette activité, et plusieurs huiles ont été définies comme antimicrobiennes (**Bakkali et al., 2008**). Toutes les huiles essentielles testées jusqu'à présent, possèdent une certaine activité antimicrobienne. Cette dernière, varie d'une huile à l'autre et d'une souche testée à l'autre, mais elle est toujours dépendante de la dose (**Kalembe et Kunicka, 2003**).

Plusieurs HEs montrent un spectre d'action très étendu. Cela a été constaté depuis longtemps (**Oussalah et al., 2007**), et confirmé par des études plus récentes. Par exemple, l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*), de coriandre (*Coriandrum sativum*) et de l'anis (*Pimpinella anisum*) ont été actives contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) (**Bazargani et Rohloff, 2016**).

De plus, **Khoddami et al. (2018)**, a révélé grâce à la méthode de diffusion sur gélose, que l'HE de *Semenovia suffruticosa* avait une très bonne activité contre différentes souches dont, *B. subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii*. En fin, l'HE de cannelle, de clou de girofle, d'eucalyptus, d'origan, de thym et de romarin, ont démontré, également, une activité contre, *E. coli*, *S. aureus*, *Trueperella pyogenes* et *Fusobacterium necrophorum*.

Ces exemples, démontrent bien, la bonne activité antibactérienne des HEs, qui s'étale sur un grand nombre de genres bactériens, ce qui leur permettrait ainsi, d'avoir une large gamme d'application comme agents antibactériens (**Owen et Laird, 2018**). L'activité antibactérienne des HEs est strictement liée à leur composition chimique (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Dans de nombreux cas, cette activité résulte de l'interaction complexe entre les différentes classes de composants présents dans l'huile essentielle (**Bassolé et Juliani, 2012**).

1-2-Mécanismes d'action des huiles essentielles :

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 (**Djilani et Dicko, 2012**) :

- ✚ 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

1-3-Interaction entre les huiles essentielles et les probiotiques :

Les plantes médicinales et les probiotiques ont tous deux un potentiel très élevé en termes d'activité antimicrobienne contre les pathogènes entériques (**Shipradeep et al., 2013**). Une approche suggère que l'utilisation de multiples conservateurs en petites quantités est préférable à l'utilisation d'une grande quantité d'un seul conservateur, car cela permet de garantir la stabilité microbienne et la sécurité des consommateurs tout en préservant les propriétés sensorielles, nutritionnelles et économiques des aliments (**Mahmoudi et al., 2017**).

D'après des études récentes, 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 (**Shipradeep et al., 2013**) Par exemple, **Hashem et al., (2019)** ont montré qu'une combinaison de bactéries lactiques acidifiantes avec des HEs conduisait à une activité synergique contre *S. aureus*. La plupart des combinaisons d'huiles essentielles étudiées ont présenté une activité synergique marquée contre *S. aureus*, *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Dans une autre étude, **Kim et al., (2022)** ont rapporté le potentiel antibactérien synergique des bactéries lactiques associées à un extrait de rhizome de *Curcuma longa* contre *Cutibacterium acnes*.

D'autre part l'ajout d'huiles essentielles dans les aliments peut avoir une action antimicrobienne contre les micro-organismes pathogènes et d'altération, mais peut également affecter la viabilité des bactéries probiotiques qui peut être affectée par la concurrence avec d'autres micro-organismes contaminants, il est donc important d'inactiver les cellules indésirables sans interférer avec le développement des bactéries bénéfiques (**Nait mahmoud et Souiga, 2023**).

2-Association Antibiotique-huile essentielle :

2-1-Généralités :

L'utilisation des antibiotiques aujourd'hui doit être mesurée et limitée car les agents infectieux contre lesquels ils sont sensés lutter s'avèrent de plus en plus résistants à leur action, en effet l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne. Les plus importants sont les plantes et leurs dérivés, tels que les HEs, ces dernières sont souvent utilisées dans la médecine populaire, et contiennent une grande variété de métabolites secondaires capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries. (**Bouyahya et al, 2017**).

2-2-La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques :

Le synergisme entre les huiles essentielles et les antibiotiques a été rapporté dans plusieurs études. C'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels

En effet les huiles essentielles peuvent sensibiliser le microbe pathogène à un antibiotique précédemment inefficace (**Aiyegoro et Okoh, 2009**). Il a été démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cela pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et de réduire leurs doses (**Fadli et al., 2012**).

L'association des huiles essentielles aux antibiotiques peut être employée pour augmenter le spectre antimicrobien (**Fadli et al., 2012**), empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique, ce qui pourrait être une alternative à la monothérapie pour des patients présentant des infections envahissantes difficile à traiter, comme ceux dues aux espèces multirésistantes (**Aiyegoro et Okoh, 2009**).

Partie II : Etude Expérimentale

1-Cadre d'étude et Objectif générale :

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie Appliquée de la faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie, de l'Université Larbi Tebessi de Tébessa pendant l'année universitaire 2024.

Le présent travail a été réalisé en trois parties :

- ✓ La première partie a porté sur l'isolement et l'identification des souches de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de type bactériocines à partir des produits laitiers
- ✓ La deuxième partie est consacrée à l'extraction des huiles essentielles de 2 plantes médicinales (*Mentha piperita* et *Myrtus communis*) et l'étude de leurs activités antimicrobiennes contre les bactéries uropathogènes.
- ✓ Nous avons consacré la dernière partie à l'étude de l'effet combiné de la ciprofloxacine, des huiles essentielles, et les bactériocines contre les souches Gram négatif multirésistantes aux antibiotiques isolés des prélèvements urinaires.

2-Matériel et méthodes :

2-1-Matériel :

2-1-1-Matériel non biologiques :

2-1-1-1-Appareillages :

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

- Agitateur.

2-1-1-2-Verrerie :

- Bêchers (500 ml).
- Flacons stériles 250 ml.
- Pipettes graduées 10ml.
- Pipettes Pasteur.
- Tubes à essai.

2-1-1-3-Outils :

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

2-1-1-4-Milieus de culture :

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

2-1-2-Matériels biologiques :

2-1-2-1-Matériels végétales :

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, nous sommes intéressés à l'extraction de *Mentha piperita* et *Myrtus communis* provenant de la région **Tébessa et Souk Ahras**. Notre choix est porté sur ces plantes aromatiques, car elles sont très répandues en Algérie et largement utilisées en plusieurs domaines (**Figure 02**).



Figure 02 : *Mentha piperita* avant séchage

2-1-2-2-La Menthe poivrée (*Mentha piperita*) :

Appartient à la famille des Labiateae et est originaire des régions méditerranéennes. Il est largement cultivé dans le monde et est une Menthe hybride, un croisement entre la Menthe aquatique et la Menthe verte. La plante, indigène à l'Europe, est maintenant répandue dans la culture dans toutes les régions du monde. Il est parfois trouvé sauvage avec ses espèces parentes. La menthe poivrée a été décrite pour la première fois en 1753 par Carolus Linnaeus à partir de spécimens recueillis en Angleterre ; il l'a traité comme une espèce, mais il est maintenant universellement accepté d'être un hybride (**Moghtader ,2003**).

2-1-2-3-Classification botanique :

Tableau 04 : classification de la menthe poivrée

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	Mentha
Espèce :	Mentha piperita

2-1-2-4-*Myrtus communis* :

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

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

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

Le Myrte commun est doté de vertus médicinales notamment utilisé comme antiseptique et désinfectant mais également pour ses propriétés balsamiques. Ce sont les qualités aromatiques et médicinales du myrte qui favorisent son utilisation dans les

industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. D'après **Mimica-Dukic et al., (2010)**, le *Myrtus* est utilisé pour lutter contre les bronchites et les dilatations bronchiques, les catarrhes muco-purulentes des voies respiratoires et urinaires, la tuberculose pulmonaire, la sinusite, les otites, les diarrhées, les prostatites, et les hémorroïdes. Il est connu également par leur effet hypoglycémique (**Figure 03**).

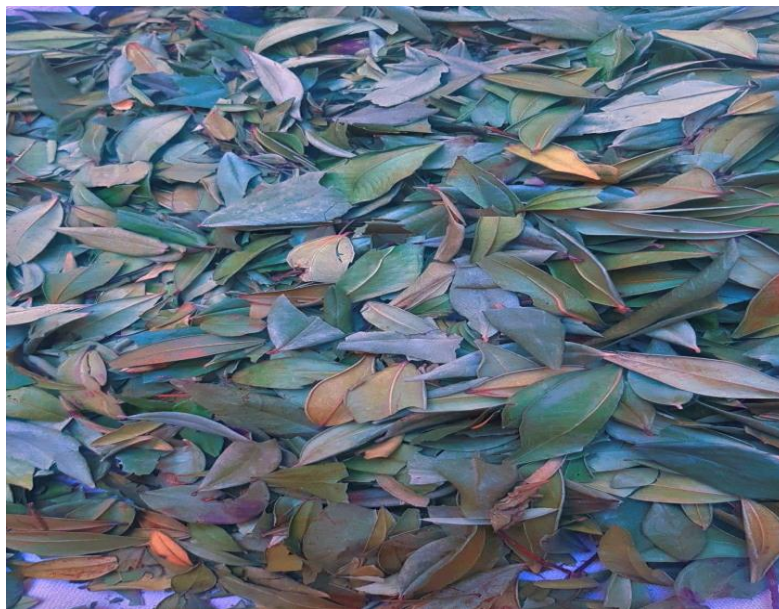


Figure 03 : *Myrtus communis* après séchage.

2-1-3-Souches bactériennes :

Les souches uropathogènes utilisées :

- ✓ *E. coli* ATCC 25422
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Enterobacter cloacae* UPT11
- ✓ *E. coli* UPT15
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT20
- ✓ *E. coli* UPT 30
- ✓ *Raoultella terrigena* UPT78

2-2-Méthodes et protocoles utilisés :

2-2-1-Les bactéries lactiques :

2-2-1-1-Collecte des échantillons :

Les échantillons du lait cru de chèvre proviennent des fermes d'élevage situées dans la ville de Tébessa et ceux du fromage traditionnel « Jben » sont collectés de la ville de Tébessa. Les prélèvements sont réalisés durant le mois de Mars de l'année 2024, dans des conditions aseptiques transportés le jour même au laboratoire afin d'effectuer les analyses microbiologiques (**figure 04**).



Figure 04 : échantillon de Jben (la région de Tébessa).

2-2-1-2-Isolement, purification et conservation des souches lactiques :

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 ensemer le milieu de culture solide MRS coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées. Les temps et les températures d'incubation sont adaptés à chaque genre :

- Incubation à 30°C pendant 48h pour l'isolement des espèces du genre *Streptococcus* sur MRS.
- Incubation à 37°C pendant 72h pour l'isolement des espèces du genre *Lactobacillus* (Leveau *et al.*, 1991).

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

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 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.

2-3-Identification des bactéries lactiques isolées :

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par **Larpent (1997)**, **Idoui et Karam (2008)** et **Gusils et al. (2010)**.

3-Examen microscopique :

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

4 Tests physiologiques et biochimiques :

Les tests d'identification phénotypique (fermentation des glucides, production d'enzymes) ont été réalisés selon les protocoles proposés par **Schillinger and Lücke (1987)** et **Stiles et Holzapfel (1997)**.

5-Souches indicatrices 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.

5-1-Souches de références :

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi trois micro-organismes pathogènes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25422.

5-2-Souches uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques :

Les souches d'entérobactéries uropathogènes utilisées dans notre travail (08 souches) sont isolées et identifiées par **Dr Fares Roufaïda** dans le cadre d'une thèse de doctorat sous la direction de **Pr. Mechai Abdelbasset** et **Pr. Debabza Manel** (**tableau 05**). L'antibiogramme est réalisé vis à vis de 22 antibiotiques selon la recommandation de la CASFM 2018 (**tableau 06**).

Tableau 05 : les souches uropathogènes utilisées et leurs origines.

Espèces	Souches	Age	Sexe	Service	Hôpital
<i>Enterobacter cloacae</i>	UPT11	46	Femme	Dialyse	EPH Cheria
<i>E. coli</i>	UPT 15	15	Homme	Médecine homme	EPH Bir El Ater

<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>ssp pneumoniae</i>	UPT 20	47	Homme	Médecine homme	EPH Cheria
<i>E. coli</i>	UPT 30	79	Femme	Chirurgie femme	EPH Tébessa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>ssp. Pneumoniae</i>	UPT 32	/	/	Dialyse	EPH Bekkaria
<i>Enterobacter cloacae</i>	UPT 42	48	Femme	Médecine femme	EPH Bir El Ater
<i>E. coli</i>	UPT 51	18	Femme	Médecine femme	EPH Bekkaria
<i>Raoultella terrigena</i>	UPT 78	33	Homme	Médecine homme	EPH Cheria

Tableau 06 : Antibiogramme des souches uropathogènes sélectionnées.

Souches	AMX	PRL	TIC	TTC	AMC	CL	FOX	CAZ	CTX	CFM	FEP	ATM	IPM	ETP	AK	GN	TOB	OFX	CIP	NIT	FOS	COT	
<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>E. coli</i> UPT15	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R	S	S	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp UPT20	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	S	S	R	R	R
<i>E. coli</i> UPT30	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp UPT32	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i> UPT 40	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> UPT 51	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>Raoultella terrigena</i> UPT 78	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	I	S	R	I	I	R	I	S	S	S	R

Amoxicilline : **AMX**, Pipéracilline : **PIP**, Ticarcilline : **TIC**, Amoxicilline Acide clavulanique : **AMC**, Ticarcilline-Acide-clavulanique : **TCC**, Céfalexine : **CL**, Céfoxitine : **FOX**, Ceftazidime : **CAZ**, Cefotaxime : **CTX**, Céfixime : **CFM**, Céfépime : **FEP**, Aztréonam : **ATM**, Ertapénème : **ETP**, Imipénème : **IPM**, Amikacine : **AN/AK**, Tobramycine : **TOB**, Gentamicine : **GM/GN**, Ofloxacine : **OFX**, Ciprofloxacine : **CIP**, Sulfaméthoxazole- Triméthoprimine : **SXT**, Nitrofurantoïne : **NIT**, Fosfomycine : **FOS**

6-Activité antibactérienne des bactéries lactiques :

6-1-Méthode de détection indirecte (Méthode direct par test des puits) :

Les souches purifiées sont testées pour la production de substances antimicrobiennes autres que les acides organiques suivant la méthode des puits (méthode indirecte) de méthode de **Barefoot et Klaenhammer, (1983) (figure 05)**. Un bouillon MRS est inoculé par la souche à tester au $1/10^3$ à partir d'une culture de 18 h à 37°C (fin de la phase exponentielle) de façon à obtenir 10^2 à 10^3 UFC/ml, puis incubé pendant 18 h à 37°C.

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

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

Après diffusion complète de ce dernier dans la gélose (1 à 2 h à température ambiante), les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C, puis examinées pour la présence de zones d'inhibition (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie indicatrice) autour des puits.

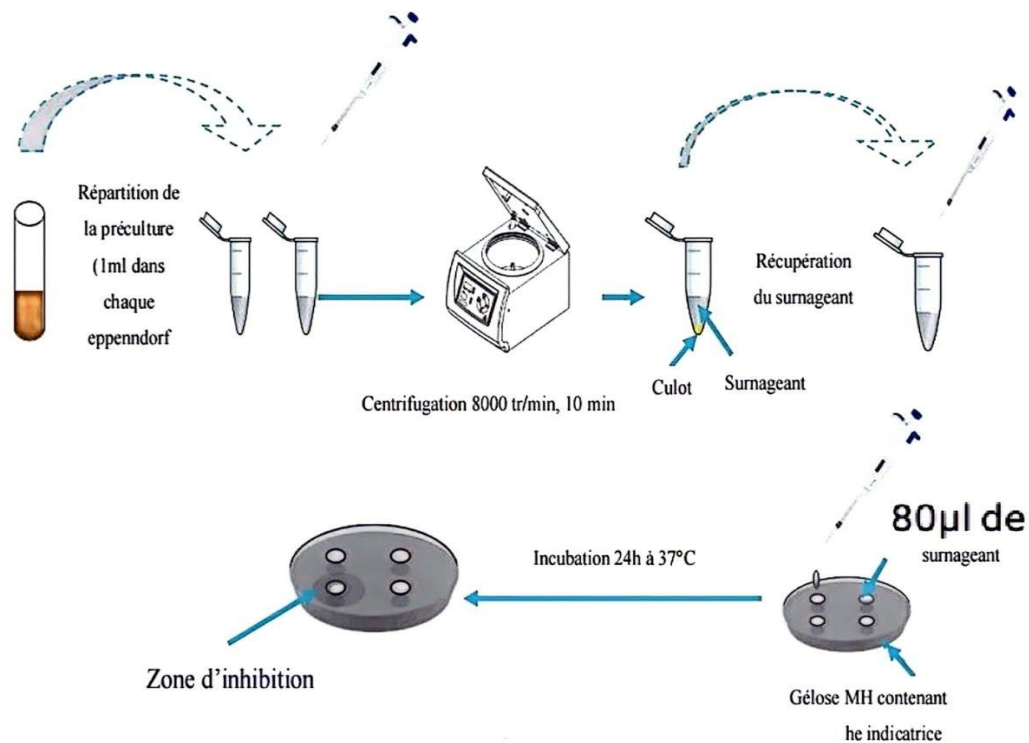


Figure 05 : Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits.

6-2-La lecture :

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 :

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

7-Extraction des huiles essentielles :

L'huile essentielle de chaque plante a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**Figure 06**), comme décrit par (**Elyemni *et al.*, 2019**). Dans un ballon de 2L, 100g de la plante sèche est imprégné dans un litre d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1h 30 jusqu'à 2h de temps, le ballon est lié à une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargée de gouttelettes d'HE, et la chute de ces derniers dans une ampoule à décanter, où l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Figure 06 : Dispositif de l'hydrodistillation de type Clevenger.

Une fois l'extraction d'HE terminée, la partie huileuse flottante est récupérée puis conservée à 4 °C dans des flacons en verre ambré hermétiquement fermés (**Do Evangelho *et al.*, 2019**).

7-1-Détermination des rendements en huiles essentielles :

Selon (**Laib, 2012**), le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre le poids de l'huile essentielle obtenu et le poids du matériel végétal traité. Le rendement en pourcentage (R) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Rdt % : Rendement en huile essentielle

M : Masse d'huile essentielle récupéré (g)

M0 : Masse de matière végétale à traiter (g)

8-Activité inhibitrice des HE des plantes sur les Entérobactéries productrice de bêta-lactamases :

8-1-Aromatogramme : La méthode de Vincent :

8-1-1-Technique :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été testée par la méthode de diffusion de disque en milieu gélosé selon les recommandations de la Comité National pour les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 2002). Des cultures bactériennes jeunes pour les souches indicatrices ont été mises en suspension dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl). Ces inoculum ont été étalés avec des écouvillons stériles sur la surface de boîtes de Pétri contenant de la Mueller-Hinton Agar.

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

8-1-2-Lecture :

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

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

9-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles :

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

9-1-Principe :

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

9-2-Technique :

Une micro-dilution des huiles essentielles à tester, a été réalisée dans des microplaques à 96 puits selon le protocole décrit par (Oumaskour et al., 2021). Le milieu de culture utilisé est constitué de Muller Hinton bouillon avec 0,5% de tween 80. 10 µl d'huile essentielle sont ajoutés dans le premier puits qui contient 180 µl de bouillon Mueller-Hinton (tween 80 : 0,5%) les autres puits contiennent déjà 95µl MHB (tween 80 : 0,5%). Après homogénéisation du premier puits, 95 µl du mélange du premier puits sont transférés dans le deuxième puits et ainsi de suite, les 95 µl du dernier puits sont retirés (une dilution géométrique de base 2). Ensuite, chaque puits a été inoculé avec 5µl de la suspension bactérienne à tester ($3,5 \times 10^7$ UFC/ml). Des puits contenant de MHB (tween 80 : 0,5%) ont été inoculés par la souche à tester sont utilisés comme contrôles positifs, ceux contenant le HE et BMH (tween 80 : 0,5%) non inoculés sont utilisés comme contrôle négatif.

Après 18 heures d'incubation à température de 37° C, Les résultats sont lus à l'œil nu, la CMI de l'huile essentielle est défini comme la plus faible concentration de l'huile essentielle à laquelle le micro-organisme testé ne présente pas de croissance visible dans le bouillon. (Kengne et al., 2019 ; Oumaskour et al., 2021) (tableau 07).

Tableau 07 : Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des huiles essentielles

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

10-Détermination de types d'interaction entre HEs les fractions antimicrobiennes actives (FAC) et la ciprofloxacine :

Les boîtes de Pétri préalablement coulées par la gélose MH sont ensemencées par la suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon. A l'aide d'une pince stérile on dépose :

1. Un disque imprégné de 05µl de l'huile essentielle au centre de la boîte, comme témoin positif.
 2. Un disque de ciprofloxacine Comme témoin positif
 3. Un disque de ciprofloxacine imprégné de 05µl de l'huile essentielle.
 4. Un disque de ciprofloxacine imprégné de 05µl de FAC
 5. Un disque imprégné de 05µl de FAC et de 05µl l'huile essentielle
 6. Un disque de ciprofloxacine imprégné de 05µl de l'huile essentielle + 05µl de FAC.
- La distance entre chaque disque est de 2.5 cm et de 1 cm de la périphérie de la boîte.
 - Les essais sont effectués en trois fois pour chacune des deux huiles.
 - Les boîtes de pétries sont ensuite fermées et sont laissées diffuser à 4°C pendant 3h, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

10-1-La lecture :

Après incubation la lecture est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition en mm formée autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Le résultat étant la moyenne de trois essais (**Kwiatkowski *et al*, 2018**).

Les résultats sont analysés comme suit :

- Cas de deux molécules :
 - ✚ **Indifférent** : (A+B) = Effet A ou Effet B.
 - ✚ **Addition** : (A+B) = Effet A + Effet B

✚ **Synergie** : $(A + B) > \text{Effet A} + \text{Effet B}$.

✚ **Antagonisme** : $(A + B) < \text{Effet A} \text{ ou Effet B}$

- Cas de trois molécules :

✚ **Indifférent** : $(A+B+C) = \text{Effet A} \text{ ou Effet B} \text{ ou Effet C}$

✚ **Addition** : $(A+B+C) = \text{Effet A} + \text{Effet B} + \text{Effet C}$

✚ **Synergie** : $(A+B+C) > \text{Effet A} + \text{Effet B} + \text{Effet C}$

✚ **Antagonisme** : $(A + B + C) < \text{Effet A} \text{ ou Effet B} \text{ ou Effet C}$

Résultats

Et

Discussion

Chapitre II : Résultats et Discussion

1-Isolement et purification des bactéries lactiques :

1-1-Observation macroscopique des cultures bactériennes :

Des colonies suspectes présentant des formes et des tailles variées ont été observées sur la gélose. Certaines sont petites et rondes, tandis que d'autres sont plus grandes et irrégulières. Elles peuvent être bombées ou plates. Malgré ces différences de forme, toutes les colonies partagent des caractéristiques communes : une texture laiteuse, crémeuse et blanchâtre, ainsi qu'une odeur caractéristique rappelant le lait fermenté. Ces observations sont en accord avec l'aspect typique des bactéries lactiques. Il est à noter la présence minime de quelques colonies de type contaminant (**Figure 07**).

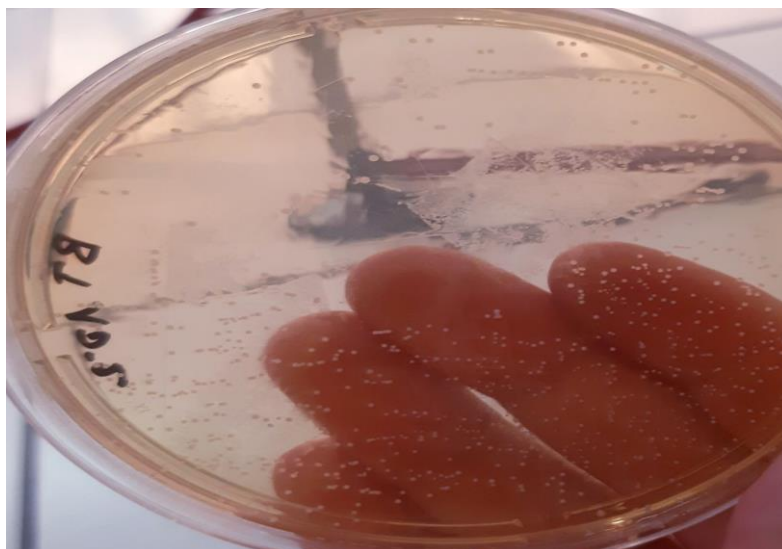


Figure 07 : Aspects macroscopiques des colonies de bactéries lactiques de la dilution 10^{-2} cultivées sur le milieu MRS.

1-2-Observation microscopique après coloration de Gram :

L'examen microscopique des 32 isolats présumés être lactiques a montré la présence des cocci isolées, groupés en diplocoques et en chaînettes plus au moins longues ou sous forme des amas de cellules. Ces dernières ont en général une forme sphérique, parfois ovoïde, de diamètre variable. En revanche d'autres se sont montrés de cellules en forme de bâtonnets ou des bâtonnets plus au moins allongés (cocobacilles) parfois lenticulaires (**Figure 08**), de taille variable, des cellules isolées, en paires et en chaînettes plus au moins longues (**tableau 08**).



Figure 08 : Bactéries Gram positif de forme bacille, agrandissement x 100.

Tableau 08 : Aspect microscopique des bactéries lactiques isolées

Souches	Aspect microscopique	Souches sur gélose incliné
LAB1	Cocci en chainettes	+
LAB2	Cocci en diplo Cocci en chainettes	+
LAB3	Cocci en diplo	+
LAB4	Cocci en amas	+
LAB5	Bacilles	-
LAB6	Cocci en chainettes	+
LAB7	Cocci en amas	+

LAB8	Cocci en diplo	+
LAB9	Bacilles en chainettes	+
LAB10	Bacilles en chainettes	+
LAB11	Cocci	+
LAB12	Cocci en amas	+
LAB13	Cocci	+
LAB14	Coccoïdes	+
LAB15	Bacilles en chainettes	+
LAB16	Coccoïdes	+
LAB17	Cocci en chainettes	+
LAB19	Cocci en amas	+
LAB20	Cocci en chainettes	+
LAB21	Coccoïdes	+
LAB22	Cocci en chainettes	+
LAB24	Cocci en diplo en amas	+
LAB25	Coccoïdes en chainettes	+
LAB26	Cocci en chainettes	+
LAB27	Coccoïdes en diplo	+
LAB28	Cocci isolées, en diplo, en amas	+
LAB29	Cocci isolées, en diplo, en amas	+
LAB30	Cocci en amas	+
LAB31	Bacilles en chainettes	+
LAB32	Bacilles en chainettes	+
LAB33	Bacilles en chainettes	+
LAB34	Coccoïdes en diplo	+

2-Activité antimicrobienne des bactéries lactiques :

L'activité antagoniste des surnagents neutralisés des 14 souches lactiques sélectionnées parmi les isolats de la collection a été étudiée vis-à-vis des souches uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques par la méthode indirecte (méthode des puits). L'inhibition se traduit par la formation d'une zone claire autour des puits. Les résultats des interactions sont présentés dans **les tableaux 09 et 10.**

Tableau 09 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques contre les souches uropathogènes par la méthode des puits

	<i>E. coli</i> UPT 15	<i>Enterobacter cloacae</i> UPT 42	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> UPT 32	<i>E. coli</i> UPT 51	<i>Raoultella terrigena</i> UPT 78	<i>E. coli</i> UPT 30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> UPT 20	<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11
LAB9	00	00	00	00	01	00	00	00
LAB17	00	00	00	00	01	00	00	00
LAB19	00	00	00	00	03	04	00	00
LAB21	00	00	00	00	00	00	00	00
LAB22	00	00	00	00	00	00	00	00
LAB23	19	20	26	17	03	00	05	06
LAB24	00	00	00	00	00	00	00	09
LAB25	00	00	00	00	01	00	04	06
LAB26	00	00	00	00	02	00	00	00
LAB27	00	00	00	00	00	00	00	03
LAB28	00	00	06	06	06	06	10	06
LAB31	06	06	00	00	00	00	04	04
LAB32	00	00	00	00	00	00	00	09
LAB34	23	24	33	26	00	00	00	05

Une activité nulle :

Les souches lactiques LAB9 et LAB17 envers les souches *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 32, *E. coli* UPT 51, *E. coli* UPT 30, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 20, *Enterobacter cloacae* UPT11.

- ✓ La souche lactique LAB21 envers toutes les souches.
- ✓ La souches lactiques LAB envers toutes les souches sauf la souche *Enterobacter cloacae* UPT11.
- ✓ La souche lactique LAB25 envers les souches *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 32, *E. coli* UPT 51, *E. coli* UPT 30.
- ✓ La souche lactique LAB26 envers toutes les souches sauf la souche *Raoultella terrigena* UPT 78.
- ✓ La souche lactique LAB28 envers les souches *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42.
- ✓ La souche lactique LAB31 envers les souches *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 32, *E. coli* UPT 51, *E. coli* UPT 30.
- ✓ La souche lactique LAB34 envers les souches *Raoultella terrigena* UPT 78, *E. coli* UPT 30, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 20.

Une activité minime :

- ✓ Les souches lactiques LAB9, LAB17, LAB26 envers la souche *Raoultella terrigena* UPT 78.
- ✓ La souche lactique LAB19 envers les souches *Raoultella terrigena* UPT 78 et *E. coli* UPT 30.
- ✓ Les souches lactiques LAB23 et LAB25 envers les souches *Raoultella terrigena* UPT 78, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 20, *Enterobacter cloacae* UPT11.
- ✓ Les souches lactiques LAB27 et LAB34 envers la souche *Enterobacter cloacae* UPT11.
- ✓ La souche lactique LAB28 envers les souches *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* UPT 32, *E. coli* UPT 51, *Raoultella terrigena* UPT 78, *E. coli* UPT 30, *Enterobacter cloacae* UPT11.

- ✓ La souche lactique LAB31 envers les souches *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20, *Enterobacter cloacae* UPT11.

Une activité moyenne :

- ✓ Les souches lactiques LAB24 et LAB32 envers la souche *Enterobacter cloacae* UPT11.
- ✓ La souche lactique LAB28 envers *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20.

Une activité bonne :

- ✓ Les souches lactiques LAB23 et LAB34 envers *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 32 et *E. coli* UPT 51.

Tableau 10 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques contre les souches de références par la méthode des puits.

	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698
LAB9	11	00	17	00
LAB17	09	00	00	00
LAB19	07	00	00	00
LAB21	00	00	00	00
LAB22	14	00	00	00
LAB23	00	07	00	00
LAB24	00	00	00	00
LAB25	00	00	00	00
LAB26	00	00	00	00
LAB27	00	00	00	00
LAB28	00	00	00	00
LAB31	17	00	00	14
LAB32	00	00	00	00
LAB34	00	17	28	00

D'après les résultats de ce test nous avons constaté que les 14 souches testées ont montré une activité qualifiée de :

➤ **Bonne :**

La souche lactique LAB 34 envers la souche *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 avec un diamètre égal 28 mm.

➤ **Moyenne :**

LAB1 envers la souche *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, LAB 22 envers la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778, LAB 31 envers les souches *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698 et LAB 34 envers la souche

Staphylococcus aureus ATCC 25923 avec des zones d'inhibitions qui fluctuent 14 et 17mm.

➤ **Minime :**

LAB 23 envers la souche *Staphylococcus aureus ATCC 25923* et *LAB1*, *LAB17* et *LAB19* envers la souche *Bacillus cereus ATCC 11778* avec des zones d'inhibition allant de 7 à 11mm.

➤ **Nulle :**

LAB 21, LAB 24, LAB 25, LAB 26, LAB 27, LAB 28 et LAB 32 envers toutes les souches indicatrices. LAB 17, LAB 19 et LAB 22 envers les souches *Staphylococcus aureus ATCC 2592*, *Listeria monocytogenes ATCC 7644* et *Micrococcus luteus ATCC 4698*. LAB 1 envers les souches *Staphylococcus aureus ATCC 2592* et *Micrococcus luteus ATCC 4698*. LAB 23 envers les souches *Bacillus cereus ATCC 11778*, *Listeria monocytogenes ATCC 7644*, *Micrococcus luteus ATCC 4698*. LAB 31 envers les souches *Staphylococcus aureus ATCC 25923* et *Listeria monocytogenes ATCC 7644*. LAB 34 envers les souches *Micrococcus luteus ATCC 4698* et *Bacillus cereus ATCC 11778*.

2-1-Résultats de l'Activité antibactérienne des Huiles essentielles par aromatoigramme :

L'activité antibactérienne des deux huiles essentielles a été évaluée vis-à-vis de deux souches microbiennes (*E. coli ATCC 25422* et *Staphylococcus aureus 25923*) et contre des souches uropathogènes productrices de BLSE par la méthode de diffusion sur gélose sont résumés dans le **tableau 11** et **la figure 09**.

Tableau 11 : Les diamètres d'inhibition en mm de l'activité anti-bactérienne des huiles essentielles sur les bactéries testées.

Souches	<i>Mentha piperita</i>	<i>Myrtus communis</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25422	06 mm	09 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	20 mm	13 mm
<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11	35 mm	08 mm
<i>E. coli</i> UPT15	08 mm	15 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> UPT20	25 mm	15 mm
<i>E. coli</i> UPT 30	10 mm	09 mm
<i>Raoultella terrigena</i> UPT78	07 mm	25 mm

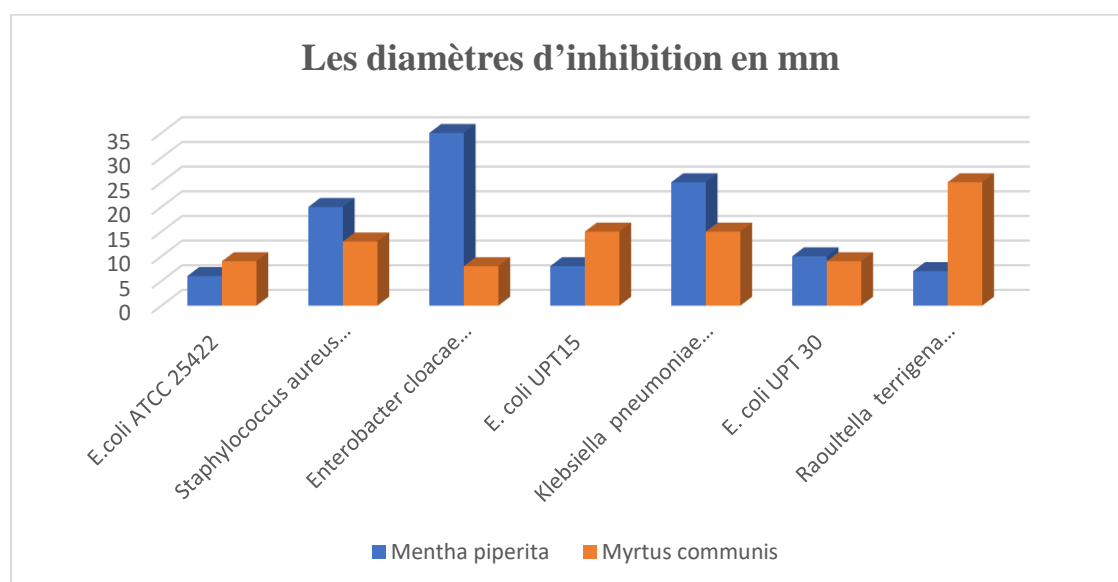


Figure 09 : Représentation graphique de test de sensibilité des bactéries indicatrices vis-à-vis les huiles essentielles testées.

D'après les résultats du **tableau 11** l'huile essentielle des feuilles de *Mentha piperita* a montré une activité remarquable contre la majorité des espèces testées. En effet, cette huile a donné des zones d'inhibitions qui fluctuent entre 07 et 35 mm de diamètre pour toutes les souches testées à l'exception de la souche *E. coli* ATCC 25422 qui a été résistante à l'HE de *Myrtus communis*.

Concernant l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *M. communis*, ce dernier présente des activités antibactériennes intéressantes principalement contre les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* UPT15, *Klebsiella pneumoniae* ssp

UPT20 et *Raoultella terrigena* UPT78. En revanche, cette huile s'est révélée une petite inactive contre les souches *E. coli* ATCC (25422), *Enterobacter cloacae* UPT11 et *E. coli* UPT 30 (**Figure 10**).

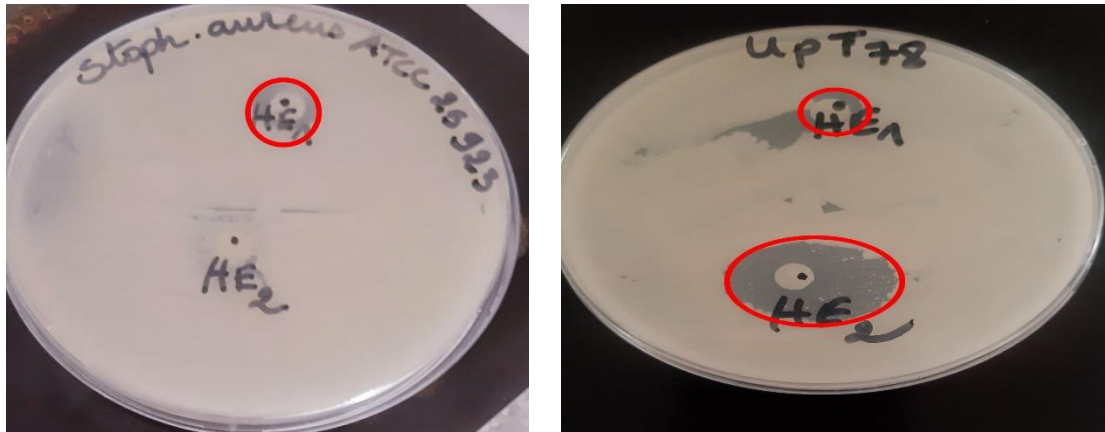


Figure 10 : Effet de l'HEs de MP et MC sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Raoultella terrigena* UPT78.

2-2-Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles :

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée selon la méthode de micro dilution sur microplaque de 96 puits. La CMI est basée sur l'observation de la présence ou l'absence d'une croissance bactérienne autour du puits. Les huiles essentielles de MP et MC ont été testées contre 7 souches : *Escherichia coli* ATCC 25422, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Enterobacter cloacae* UPT11, *E. coli* UPT 15, *Klebsiella pneumoniae* ssp. UPT 20, *E. coli* UPT 30, *Raoultella terrigena* UPT 78. Les résultats sont représentés sur **les figures 11,12 et le tableau 12**.

Ces résultats montrent que les huiles essentielles des plantes MP et MC ont une activité antibactérienne pour toutes les souches testées. Ces huiles agissent différemment sur les bactéries testées, leurs CMI varient entre 0.32 et 2.5 μ l/ml pour l'HE de MP, et entre 0.32 et 1.25 μ l/ml pour l'HE de MC (**tableau 12**).

D'après le **tableau 12**, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 est la moins sensible vis-à-vis l'HE de MP, par contre avec l'HE de MC la souche *E. coli* UPT 30 est la moins sensible.

Tableau 12 : Résultat des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HEs de *Mentha piperita* et *Myrtus communis* sur les souches indicatrices.

HEs	Souches	CMI ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Mentha piperita</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25422	1.25
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	0.62
	<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11	2.5
	<i>E. coli</i> UPT 15	0.32
<i>Myrtus communis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> UPT 20	1.25
	<i>E. coli</i> UPT 30	0.32
	<i>Raoultella terrigena</i> UPT 78	0.62



Figure 11 : Lecture de la microplaque de MP vis-à-vis les souches indicatrices.



Figure 12 : Lecture de la microplaque de MC vis-à-vis les souches indicatrices.

3-Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles de la ciprofloxacine et des bactériocines :

Dans le but d'explorer le spectre d'activité antibactérienne des bactériocines produites chez les bactéries lactiques vis-à-vis certaines bactéries uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques et souches de référence , une étude de synergie entre une fraction semi pure de bactériocine (FAC1) extraite d'une souches lactiques qui a montré une bonne activité antagoniste contre les souches indicatrice (BL34) et les huiles essentielles *Mentha piperita* (HE-MP), *Myrtus communis* (HE-MC) et l'antibiotique ciprofloxacine (CIP) est lancée.

Les résultats obtenus des combinaisons entre la fraction (FAC1), huile essentielle HE-MP et l'antibiotique CIP sont illustrés dans **le Tableau 13**. L'analyse de ces résultats nous ont permet de constater que la combinaison CIP +HE-MP dans un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Enterobacter cloacae* UPT11. Cependant la combinaison CIP+FAC1 nous a permet de constater l'existence d'un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* UPT 20. En revanche la combinaison HE-MP +FAC1 donne une activité synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20, *E. coli* UPT 30, *Raoultella terrigena* UPT 78 et *Escherichia coli* ATCC 25422.

La triple combinaison CIP+ HE-MP+FAC1 affiché une synergie (diamètre de zone d'inhibition entre 13 et 40 mm) chez *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20 respectivement. Cependant les combinaisons ont montré un effet antagonisme contre *Escherichia coli* ATCC 25422 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et un effet indifférent envers les deux souches *Enterobacter cloacae* UPT11 et *Enterobacter cloacae* UPT11 (**figure 13**).

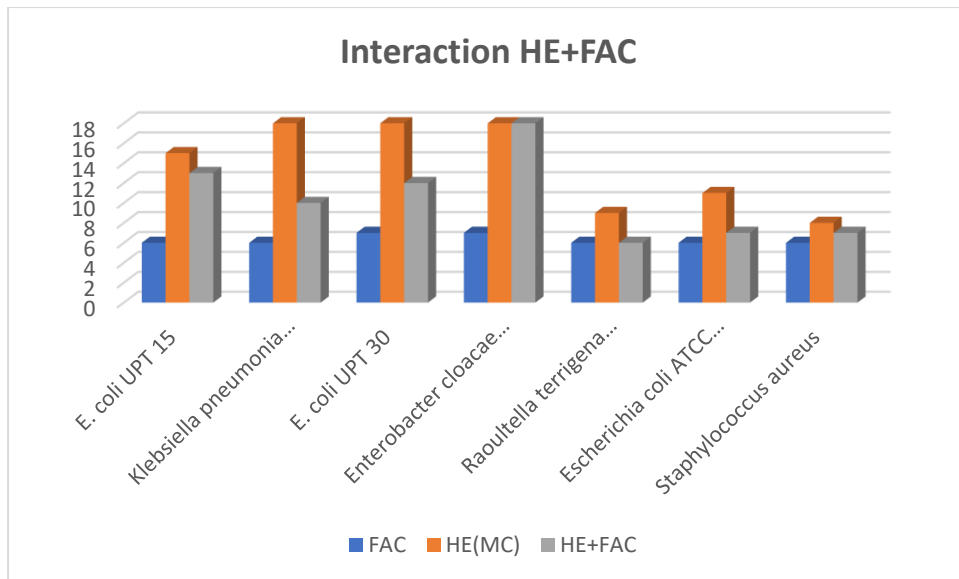


Figure 13 : Représentation graphique de de la ciprofloxacine de l'huile de *Mentha piperita* (HE-MP) et de la bactériocine (FAC1).

Tableau 13 : résultats de l'interaction de la ciprofloxacine de l'huile de *Mentha piperita* (HE-MP) et de la bactériocine (FAC1).

	Interactions										
	CIP	HE-MP	FAC1	CIP+HE-MP		CIP-FAC1		HE-MP+ FAC1		CIP+HE-MP+FAC1	
Souches	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison
<i>E. coli</i> UPT 15	20 mm	09 mm	07 mm	22 mm	Synergie	21 mm	Synergie	10 mm	Synergie	23 mm	Synergie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> UPT 20	19 mm	10 mm	08 mm	21 mm	Indifférent	21 mm	Synergie	14 mm	Synergie	24 mm	Synergie
<i>E. coli</i> UPT 30	13 mm	06 mm	07 mm	13 mm	Indifférent	13 mm	Indifférent	12 mm	Synergie	13 mm 22 mm	Indifférent
<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11	25 mm	20 mm	07 mm	25 mm	Synergie	25 mm	Indifférent	11 mm	Antagonisme	40 mm	Indifférent
<i>Raoultella terrigena</i> UPT 78	ND	09 mm	08 mm	ND	/	ND	/	12 mm	Synergie	23 mm 32 mm	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25422	16 mm	09 mm	06 mm	15mm	Antagonisme	15 mm	Antagonisme	14 mm	Synergie	15 mm	Antagonisme
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25mm	09 mm	07 mm	13 mm	Antagonisme	13 mm	Antagonisme	07 mm	Indifférent	29 mm	Antagonisme

Les résultats obtenus des combinaisons entre la fraction (FAC1), huile essentielle de *Myrtus comminus* (HE-MC) et l'antibiotique CIP sont illustrés dans le **Tableau 14** ces résultats montrent que la combinaison CIP +HE-MP dans un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Enterobacter cloacae* UPT11. D'autre part, la combinaison CIP+FAC1 nous a permet de remarquer l'existence d'un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20 (**figure 14**). Toutefois la combinaison HE-MC +FAC1 donne un effet antagoniste avec les souches *E. coli* UPT 15, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20, *E. coli* UPT 30, *Escherichia coli* ATCC 25422 et *Staphylococcus* et un effet indifférent avec les souches *Enterobacter cloacae* UPT11 et *Raoultella terrigena* UPT 78 (**figure 15**).

La triple combinaison CIP+ HE-MC+FAC1 affiché une synergie (diamètre de zone d'inhibition entre 21 et 32 mm) chez toutes les souches indicatrices testées (**Figure 16**).

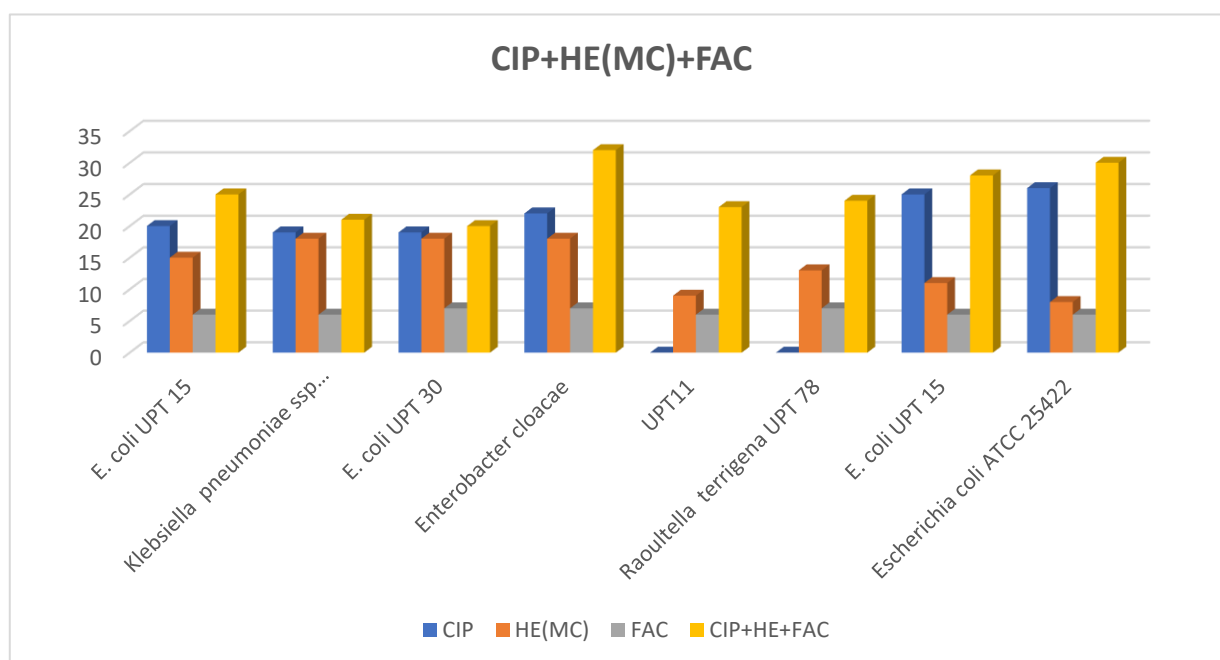


Figure 14 : Représentation graphique de l'interaction de l'huile essentielle de *Myrtus comminus* (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.

Tableau 14 : Effet de combinaison de l'huile essentielle de *Myrtus comminus* (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.

	Interactions										
	CIP	HE-MC	FAC1	CIP+ HE-MC		CIP-FAC1		HE-MC + FAC1		CIP+ HE-MC +FAC1	
Souches	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison	Diamètre en mm	Effet de combinaison
<i>E. coli</i> UPT 15	20 mm	15 mm	06 mm	22 mm	Synergie	22 mm	Synergie	13 mm	Antagonisme	25 mm	Synergie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> UPT 20	19 mm	18 mm	06 mm	18 mm	Indifférent	20 mm	Synergie	10 mm	Antagonisme	21 mm	Synergie
<i>E. coli</i> UPT 30	19 mm	18 mm	07 mm	18 mm	Indifférent	18 mm	Antagonisme	12 mm	Antagonisme	20 mm	Synergie
<i>Enterobacter cloacae</i> UPT11	22 mm	18 mm	07 mm	27 mm	Synergie	29 mm	Addition	18 mm	Indifférent	32 mm	Synergie
<i>Raoultella terrigena</i> UPT 78	–	09 mm	06 mm	–	/	–	/	06 mm	Indifférent	23 mm	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25422	25 mm	11 mm	06 mm	20 mm	Antagonisme	–	/	07 mm	Antagonisme	28 mm	Synergie
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26 mm	8 mm	06 mm	19 mm	Antagonisme	22 mm	Antagonisme	07 mm	Antagonisme	30 mm	Synergie

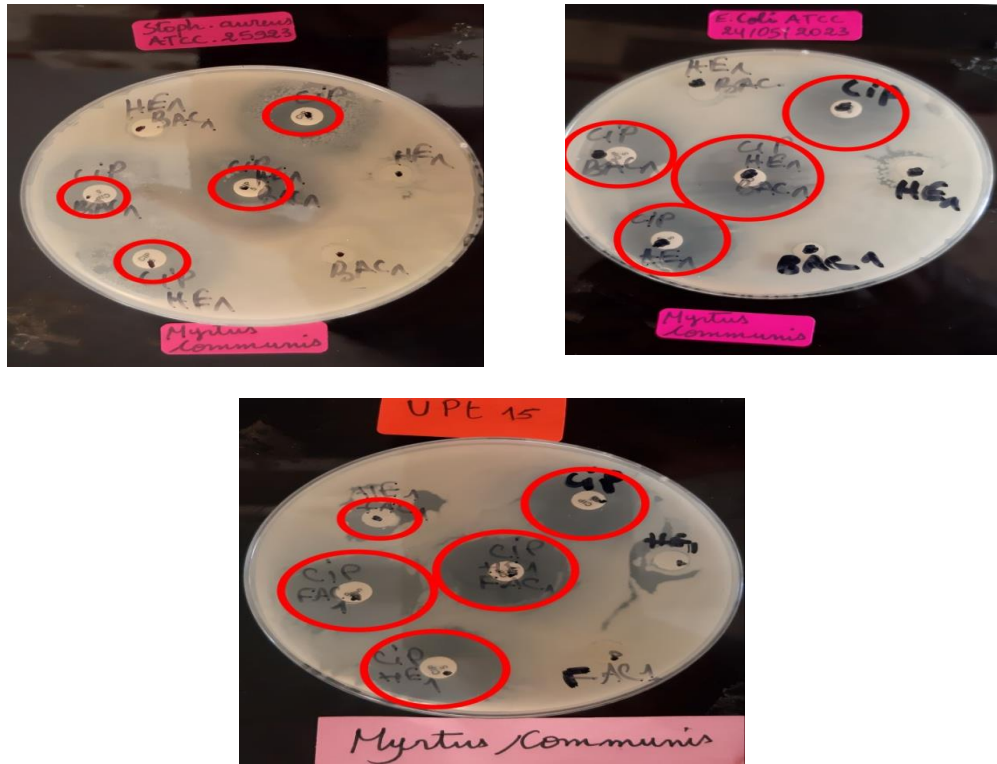


Figure 15 : l'interaction de l'huile essentielle de *Myrtus communis* (HE-MC) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.

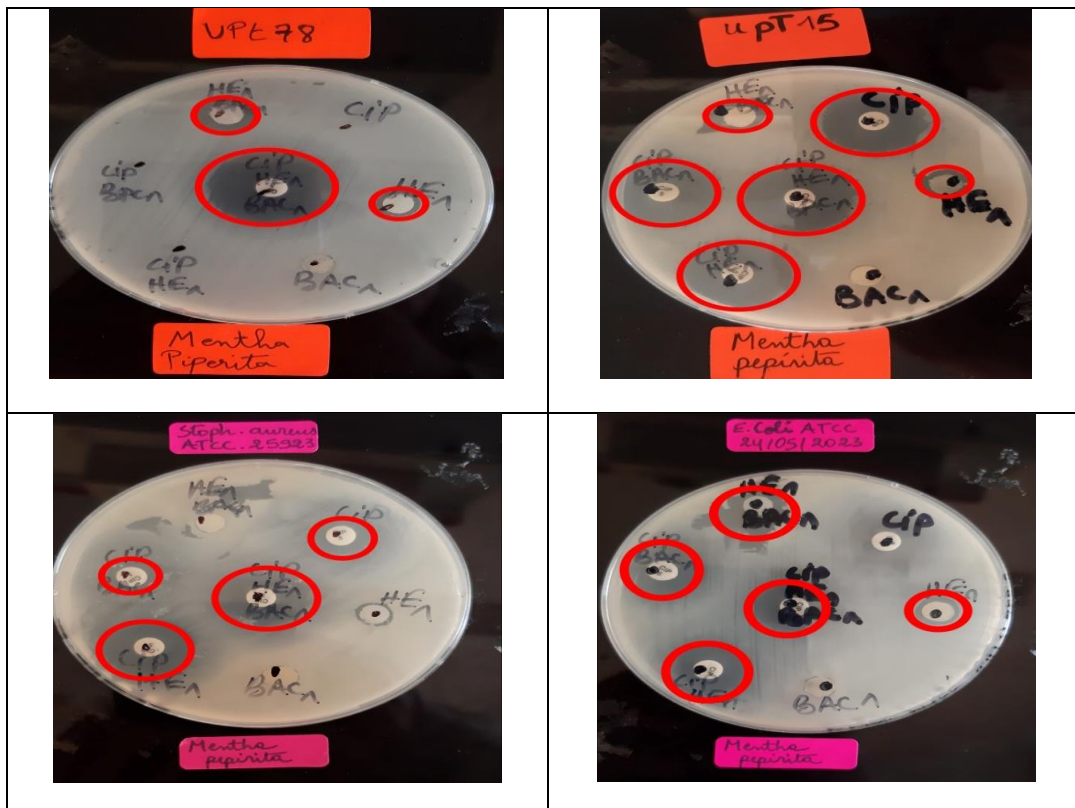


Figure 16 : l'interaction de l'huile essentielle de *Mentha piperita* (HE-MP) de la fraction semi pure de la bactériocine (FAC1) et de la ciprofloxacine (CIP) contre les souches indicatrices.

Discussion générale :

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les microorganismes responsables d'infections nosocomiales (Pagès, 2004). Ces pathogènes, appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* etc), les *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), les *Acinetobacter* (*A. baumannii*) et les *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*). Différant par leur virulence, ils présentent en commun la propriété d'avoir naturellement (résistance naturelle), ou de développer (résistance acquise) des résistances aux antibiotiques (Debabza, 2015).

Toutefois, l'émergence de la résistance aux antibiotiques engendre de graves conséquences sanitaires et économiques. Elle est responsable d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et conduit à utiliser des médicaments plus onéreux et souvent plus toxiques (Mekri, 2016).

Devant cette situation, le développement d'alternatives aux antibiotiques et la découverte ou la valorisation des molécules bioactives d'origine végétale ou microbienne semble être une stratégie potentiellement proposée. L'une des possibilités et de combiner les antibiotiques avec d'autres médicaments non antibiotique (Mekri, 2016). Les huiles essentielles (HE), et les extraits de plantes peuvent être constituées une alternative thérapeutique contre les microorganismes pathogènes, car elles présentent des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales et elles sont obtenues facilement à partir de diverses plantes par différentes techniques, notamment la fermentation, l'enfleurage, l'extraction et la distillation à la vapeur (hydro-distillation) (Nait Mahmoud et Souiga, 2023).

Plusieurs études récentes ont rapporté que les bactériocines des bactéries lactiques sont utilisés pour le bio-control de divers agents responsables de toxoinfectieux alimentaires démontrée par plusieurs auteurs, après expression vis-à-vis d'une bactérie cible appartenant le souvent aux genres suivants *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*, *salmonella spp*, *clostridium botulinum*, *bacillus cereus* (Metrouh, 2022).

Dans notre étude L'évaluation du pouvoir antagoniste des 16 souches lactiques a été étudié vis à vis 04 souches bactériennes cibles indicatrices et 08 souches uropathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Les résultats des interactions ont montré que les souches LAB23 et LAB 34 exercèrent une activité inhibitrice nettement remarquable contre les souches *E. coli* UPT 15, *Enterobacter cloacae* UPT 42, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 32 et *E. coli* UPT 51.

L'utilisation combinée des huiles essentielles et les bactériocines des bactéries lactiques offre une perspective prometteuse. 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. Cette association peut ainsi être exploitée pour la création de produits laitiers fermentés aromatisés aux huiles essentielles, tels que les boissons au caillé ou les yaourts aromatisés (Metrouh, 2022).

Dans ce contexte, l'étude de l'effet combiné de HE-MP et la fraction semi pure de la bactériocine extraite d'une souche lactique de notre collection a montré un effet synergétique vis-à-vis des souches *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20.

Dans une étude similaire **Razavi Rohani et al. (2011)**, ont rapporté que la combinaison entre les huiles essentielles de l'ail et la nisine n'ont montré aucune activité antagoniste vis-à vis de *Listeria monocytogenes*. Par contre, cette combinaison a montré une forte activité antibactérienne à une température de 30°C, à une valeur de pH de 5,6 et en présence d'une concentration de 10g/ml de NaCl.

Turgis et ses collaborateurs (2012) ont rapporté que la combinaison de la pédiocine avec les huiles essentielles de *Satureja Montagna* ont manifesté une excellente activité synergique contre *E. coli* O157 : H7 et un effet additif contre *Bacillus cereus*. Par ailleurs, la combinaison de la pédiocine avec les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* a révélé un effet additif contre *L. monocytogenes* et un effet antagoniste contre *B. cereus*, *E. coli* O157 : H7.

Le mécanisme réel de la synergie entre les huiles essentielles et la bactériocine n'est pas parfaitement éclairci. Cependant, les huiles essentielles utilisées peuvent contribuer à la stimulation de l'action des bactériocines par l'augmentation du nombre

des pores élaborés au niveau de la des membranes cytoplasmiques et le développement de leur taille, ce qui conduit à une réduction considérable des cellules viables (**Pol & Smid 1999**).

La combinaison des HEs avec les antibiotiques, est une nouvelle méthode proposée pour tuer les bactéries résistantes, via le renforcement de l'activité antimicrobienne (**Yap et al., 2014**). En effet, les combinaisons, qu'il s'agisse de huiles essentielles simples ou de mélanges de composants principaux purifiés, permettraient l'exposition de la bactérie à de nombreux composés chimiques, qui exercent différents mécanismes d'action antibactériens, simultanément, sur plusieurs cibles de la bactérie. Cela, conduiraient probablement, d'une part, à une meilleure activité, et d'autre part, à la diminution du risque de développement d'une résistance adaptative à ces combinaisons. Une résistance à plusieurs mécanismes d'action antibactériens simultanés, est moins probable par rapport à la monothérapie (**Belounis et Saudi, 2020**).

Dans une combinaison, l'interaction entre les agents antimicrobiens peut aboutir à trois résultats différents, synergie, addition ou antagonisme. La synergie est obtenue lorsque le mélange des deux composés antimicrobiens produit une activité antibactérienne supérieure à la somme de l'activité des composants individuels. Un effet additif se produit lorsque la combinaison des antimicrobiens donne un effet égal à la somme des composés individuels. Un effet antagoniste est obtenu lorsque les deux composés ont un effet combiné inférieure à la somme des deux effets individuels (**Burt, 2004**).

Les HE de *Mentha piperita* a montré la meilleure activité antibactérienne contre la plupart des espèces testées avec des zone d'inhibition entre 10 à 43 mm de diamètre, et des concentrations minimales inhibitrices allant de 2,34 à 100 µl/ml. Les données de valeurs de CMI ont confirmé la bonne activité des HE *Mentha piperita* contre ces souches multi-résistantes aux antibiotiques.

En termes de pouvoir inhibiteur, l'huile essentielle de la feuille de *M. communis* a exercé également une bonne activité antimicrobienne contre la plupart des souches d'Entérobactéries testées en exerçant une activité inhibitrice qui se traduit par des zones de lyse entre 8 et 25mm avec des valeurs de 0.62 à 1.25 µl/ml pour la CMI.

Nos résultats sont confirmés aussi par plusieurs études antérieures portant sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles de *Myrtus communis*. Dans lesquelles, la différence observée dans la sensibilité des différents microorganismes est essentiellement due à la composition chimique d'HE de myrte, notamment la présence de monoterpènes tels que l'Eucalyptol, 1,8-cinéole et l' α -pinène. Ces composés appartiennent aux groupes des éthers et des hydrocarbures, et ils sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Mekri, 2015).

Plusieurs HEs montrent un spectre d'action très étendu. Cela a été constaté depuis longtemps (Oussalah *et al.*, 2006), et confirmé par des études plus récentes. Par exemple, l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*), a été active contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) (Bazargani et Rohloff 2016).

Iseppi *et al.*, (2021), ont rapporté que l'inhibition par les HE de la croissance bactérienne, y compris des souches multirésistantes aux antibiotiques, pourrait être due à leur capacité à dégrader les protéines membranaires et la perméabilité cellulaire. Dans la présente étude, le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des feuilles de *Mentha piperita* et de *M. communis* a été testé vis-à-vis de 08 souches d'Entérobactéries multirésistantes et productrices des bêta-lactamases de type BLSE. Il s'agit d'une étude menée pour évaluer l'effet inhibiteur des huiles.

Dans une étude récente, Knezevic *et al.* (2015) ont révélé que l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*, montre une activité synergique avec la ciprofloxacine, ainsi qu'avec la polymexine B contre deux souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de plaies. De plus, le test time-kill a révélé que la combinaison synergique d'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*/polymexine B réduit rapidement le nombre de bactéries sous le seuil de détection (c'est-à-dire après seulement 6 h d'incubation). Cet effet synergique a été, partiellement attribué aux terpènes polaires et auspathulenol (alcool sesquiterpénique) qui composent cette HE. Dans une autre étude réalisée sur des bactéries multirésistantes (*A. baumannii* et *E. coli* (BLSE)) et trois souches SARM, isolées de différents patients, il a été rapporté que trois HEs de plantes endémiques du Nordafricain (*Pituranthos chloranthus*, *Teucrium ramosissimum* et *Pistacia lentiscus*) montrent des effets synergiques avec certains antibiotiques standards.

Selon **Kwiatkowski et al. (2018)**, la combinaison de l'HE de menthe et la gentamicine montre un effet synergique sur des isolats de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE, et l'HE de carvi combiné avec cet antibiotique, exerce le même effet contre d'autres souches de *K. pneumoniae* résistantes à la gentamicine et productrices de BLSE.

Dans une étude réalisée par **Aelenei et al. (2018)**, l'huile essentielle de coriandre a montré de bons effets synergiques avec certains antibiotiques conventionnels, contre des bactéries à gram positif et des bactéries à gram négatif. En effet, cette HE agit en synergie avec l'amoxicilline et la gentamicine contre des souches de SARM, ainsi qu'avec l'oxacilline et la tétracycline contre *S. aureus* ATCC 33591, en réduisant les CMI de ces antibiotiques 8 et 16 fois. Tandis que, la souche *S. aureus* ATCC 43300 est devenue très sensible à la tétracycline en présence de l'HE (diminution de 50 fois de sa CMI).

Nos résultats concernant l'effet de l'association entre trois molécules à savoir la ciprofloxacine, fraction semi-purifiée d'une bactériocine et l'huile essentielles de *Mentha piperita* ou celle de *Myrtus comminus* nous ont permis de constater l'existence d'un effet synergétique nettement remarquable de la combinaison (CIP + FAC+ HE-MP) sur deux souches uropathogènes panrésistantes aux antibiotiques et productrices de BLS, il s'agit notamment de *E. coli* UPT15 et *Enterobacter cloacae* UPT11 avec des zones d'inhibition de 22 mm et 25 mm respectivement. Cependant l'effet synergétique a été noté pour la combinaison (CIP + FAC+ HE-MC) envers toutes les souches uropathogènes testées.

Il est à signaler que ces résultats prometteurs ouvrent les voies à de nouvelles perspectives de recherche pour la lutte contre les bactéries résistantes aux antibiotiques.

**Conclusion
et
perspectives**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de déterminer l'étendue de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles (*Mentha Piperita* et *Myrtus communis*) et l'activité antagoniste de 16 souches lactiques sur huit souches cliniques uropathogènes 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 et la ciprofloxacine ; le but final étant de trouver des synergies entre les composants utilisés et permettre la recherche d'alternative aux antibiotiques pour la lutte contre l'antibiorésistance.

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques par la méthode de diffusion en puits a montré que les 3 souches lactiques sur les 14 souches testées exercent une activité inhibitrice dirigée contre des souches indicatrices à Gram négatives.

Les deux huiles utilisées ont montré un effet inhibiteur contre les souches indicatrices. une excellente activité antibactérienne d'HE *Mentha piperita* vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterobacter cloacae* UPT11 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT20 et une bonne activité d'HE *Myrtus communis* vis-à-vis toutes les bactéries indicatrices testées.

Les résultats obtenus des combinaisons entre la fraction (FAC1), huile essentielle HE-MP et l'antibiotique CIP nous ont permis de constater que la combinaison CIP +HE-MP donne un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Enterobacter cloacae* UPT11. Cependant la combinaison CIP+FAC1 nous a permis de constater l'existence d'un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20. En revanche la combinaison HE-MP +FAC1 donne une activité synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20, *E. coli* UPT 30, *Raoultella terrigena* UPT 78 et *Escherichia coli* ATCC 25422

L'effet combiné de CIP+ HE-MP+FAC1 a affiché une synergie (diamètre de zone d'inhibition entre 19 et 20 mm) chez *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20 respectivement. Cependant les combinaisons ont montré un effet antagonisme contre *Escherichia coli* ATCC 25422 et *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, et un effet indifférent envers les deux souches *Enterobacter cloacae* UPT11 et *Raoultella terrigena* UPT 78.

Nos résultats montrent aussi que la combinaison CIP+HE-MP donne un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Enterobacter cloacae* UPT11. D'autre part, la combinaison CIP+FAC1 nous a permis de remarquer l'existence d'un effet synergétique avec les souches *E. coli* UPT 15 et *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* UPT 20.

La triple combinaison CIP+ HE-MP+FAC1 affichée une synergie (diamètre de zone d'inhibition entre 21 et 32 mm) chez toutes les souches indicatrices testées.

Les résultats que nous avons obtenus ouvrent une multitude de perspectives d'utilisation ;

Pour lutter contre l'antibiorésistance des souches dans les hôpitaux ; il serait intéressant de valoriser les biomolécules d'origines microbiennes et végétales. Se pencher davantage sur ce type de travail en utilisant les huiles d'autres plantes locales et des bactériocines pures extraites des souches lactiques probiotiques autochtones pour minimiser les effets des antibiotiques et freiner la propagation et la dissémination des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2009).** Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1147-1152.
2. **Ambler, R. P. (1980).** The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289, 321-331.
3. **Amensag, K. (2019).** Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains : Production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes multirésistants aux antibiotiques [Doctoral dissertation, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah].
4. **Axelsson, L. (1998).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria* (pp. 1-72). Marcel Dekker.
5. **Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3rd ed., pp. 1-66). Marcel Dekker, Inc.
6. **Azargani, M. M., & Rohloff, J. (2016).** Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.
7. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
8. **Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012).** Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.
9. **Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016).** Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>.
10. **Belbel, Z. (2014).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba [Doctoral dissertation, Université de Badj-Mokhtar].
11. **Belounis, Y., Saoudi, B. (2020).** Les huiles essentielles et leurs effets synergiques : lutte contre les bactéries multirésistantes. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 122p.

12. **Benreguieg, M. (2015).** Propriétés antibactériennes et probiotiques de bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache, de chèvre et de brebis dans la région de l'Ouest Algérien [Doctoral dissertation, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem].
13. **Benthabet, J. (2021).** Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi à l'hôpital Ibn Tofail [Doctoral dissertation, Université Kadi Ayadh Maroc].
14. **Bousseboua, H. (2005).** Éléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie (2nd ed.). Edition Campus-Club.
15. **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., & Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
16. **Brahmi, S. (2022).** Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées du service de chirurgie urologique au CHU d'Annaba [Doctoral dissertation, Université de Badj-Mokhtar].
17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004 Aug 1;94(3):223-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. PMID: 15246235.
18. **Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995).** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211–1233.
19. **Carée-Mlouka, A. (2019).** Bactéries lactiques et métabolismes fermentaires. Muséum national d'Histoire naturelle. Consulté le 26/05/2024, à partir de <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=8038&lang=en>
20. **Carip, C. (2008).** Microbiologie hygiène base microbiologiques de la diététique. Paris, France : Edition Tec & Doc Lavoisier.
21. **Daffe, F. M. (2018).** Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017 (Thèse de doctorat). Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako.

22. **Debabza, M. (2015).** Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire (Thèse de doctorat). Université de Badj-Mokhtar.
23. **Djadouni, F. (2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération (Thèse de doctorat en Microbiologie appliquée). Université d'Oran.
24. **Djilani, A., & Dicko, A. (2012).** The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Dans J. Bouayed (Éd.), *Nutrition, Well Being and Health* (pp. 3-17). InTech.
25. **Dortu, C. (2008).** Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires (Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique). Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
26. **Doublet, B. (2004).** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au flor-fénicol flor chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* (Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé). Université François Rabelais.
27. **Doumandji, A., Hellal, A., Saidi, N. (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4(2) : 25-47.
28. **Echchaoui, M. (2018).** Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Thèse de doctorat). Université Mohammed-V Rabat.
29. **Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012).** Antibacterial Activity of *Thymus Maroccanus* and *Thymus Broussonetii* essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19, 464–471.
30. **Fuller, R. (1989).** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
31. **Gasser, F., Montel, M. C., Talon, R., & Champoier, M. (1994).** Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques. Dans H. Deroissart & F. M. Luquet (Éds.), *Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques* (Vol. 1, pp. 127-139). Technique & Documentation
32. **Goro, A. A. (2021).** Étude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à Bamako de janvier 2020 à juin 2020 (Thèse de doctorat). Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (U.S.T.T.B).

33. **Hadef, S. (2012).** Évaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries locales (Mémoire de Magister en microbiologie appliquée). Université Kasdi Merbah-Ouargla.
34. **Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., & Zubair, M. (2019).** Essential oils. Dans *Essential oil research* (pp. 3-17). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-16546-8_1
35. **Hashem, M. S., Ahmed, A. F., Soliman, W., & Gad, G. F. M. (2019).** Combinatorial effect of probiotics and some medicinal oils on pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2, 121-128.
36. **Iseppi, R., Mariani, M., Condò, C., Sabia, C., & Messi, P. (2021).** Essential Oils: A Natural Weapon against Antibiotic-Resistant Bacteria Responsible for Nosocomial Infections. *Antibiotics*, 10(4), 417. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040417>
37. **Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
38. **Khoddami, M., Hosseini, M. S., & Hassanshahian, M. (2018).** Antibacterial Activity of *Semenovia suffruticosa* (Essential Oil) Against Pathogenic Bacteria and Determination of Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography Mass Spectrometry Analysis in Four Regions of Kerman. *Journal of Dietary Supplements*, 1-11.
39. **Kim, S., Song, H., Jin, J. S., Lee, W. J., & Kim, J. (2022).** Genomic and phenotypic characterization of *Cutibacterium acnes* bacteriophages isolated from acne patients. *Antibiotics*, 11, 1041.
40. **Knezevic, P., Verica, A., Natasa, S., Emilija, S., Aleksandra, P et Neda Mimica-D. (2015).** Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 178: 125-136.
41. **Kwiatkowski, P., Pruss, A., Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Dolegowska, B., Giedrys-Kalemba, S., Kochan, E. et Sienkiewicz, M. (2018).** Preliminary study on the Antibacterial Activity of Essential oil Alone and in Combination with Gentamicin Against Extended- Spectrum β -Lactamase-Producing and New Delhi

- Metallo- β -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microbial Drug Resistance*,00: 1-8.
42. **Leclerc, H., Deveriese, L. A., & Mmsel, D. A. A. (1996).** Txonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water.
 43. **Leclerc, H., Gaillard, J. P., & Simonet, M. (1995).** Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Paris, France : Edition Doin.
 44. **Levy, S. B. (1992).** Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36 :4, 695.
 45. **Mahmoudi, R., Azziminia, M., Ghajarbeygi, P., & Pakbin, B. (2017).** An Introductory Review on Increasing the Survival of Probiotic Bacteria in Dairy Products Using Essential Oil. *Journal of Dental and Oral Health*, 3(4), 069.
 46. **Mami A (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat en Microbiologie appliquée, université d'Oran, 176p.
 47. **Marteau, P. and Boutron-Ruault, M. C. (2002).** Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S153-S157.
 48. **Mechai, A (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat en Biochimie, université de Badj-Mokhtar, 186p.
 49. **Metrouh, R. (2022).** Caractérisation d'une collection de bactéries lactiques autochtones : étude des propriétés biotechnologiques et probiotiques. Thèse de doctorat. Université E.C.L.T Tébessa. 192p.
 50. **Mokdad, A., Lalmi, A., et Messai, L. (2020).** Evaluation des propriétés probiotiques des bactéries lactiques : isolées à partir d'un fromage artisanal produit localement « *Jben* ». Mémoire de Master université ECLT. Tébessa. 112p.
 51. **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*. *Revue agrobiologia*, 7(1), 363-370.
 52. **Nait Mahmoud, K., Souiga, S (2023).** Etude de l'effet antimicrobien de l'association des huiles essentielles de plantes médicinales et souches probiotiques. Mémoire de Master. Université A. MIRA – Béjaia. 92p.

53. **Nait mahmoud, K., Souiga, S. (2023).** Etude de l'effet antimicrobien de l'association des huiles essentielles de plantes médicinales et souches probiotiques. Mémoire de Master en microbiologie appliquée Université A. MIRA - Béjaia
54. **NCCLS. (2002).** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard. 2nd Edition, NCCLS Document M31-A2 22(6), Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
55. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L et Lacroix, M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.
56. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006).** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.019>.
57. **Owen, L. et Laird, K. (2018).** Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Crit Rev Microbiol*.44(4): 414-435
58. **Parker, R. B. (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4-8.
59. **Paterson DL, Bonomo RA. (2005).** Extended-spectrum beta lactamases: A clinical update. *Clin MicrobiolRev*; 18:657-86.
60. **Peleg AY, Hooper DC. (2010).** Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*; 362 (19): 1804-13
61. **Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
62. **Proutière, A. (2020).** Biosynthèse, mécanisme d'action et régulation d'une bactériocine sécrétée par *Streptococcus gallolyticus* [Doctoral dissertation, Université de Paris]. 198p.
63. **Razavi Rohani S.M., Moradi M., Mehdizadeh T., Siavash Saei-Dehkordi S., Griffiths M.W. (2011).** The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential

- oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Technology* 44: 2260-2265.
64. **Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1987)**. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4, 199–208.
65. **Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R. (1987)**. Molecular and chromotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci. *Rev. Sys. Appl. Microbiol.*, 10, 1-19.
66. **Shipradeep, Karmakar, S., Khare, R. S., Ojha, S., Kundu, K., & Kundu, S. (2013)**. Development of Probiotic Candidate in Combination with Essential Oils from Medicinal Plant and Their Effect on Enteric Pathogens: A Review. *BioMed Research International*, Article ID 628903, 9 pages.
67. **Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997)**. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 1-29.
68. **Tagg, J. R., Dajana, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976)**. Bacteriocins of Gram-positive. *Bacterial. Rev.*, 40, 722-756.
69. **Tidrarine, S. (2019)**. Epidémiologie des enterobactéries productrice de carbapenemase à l'Hôpital Ibn Tofail [Doctoral dissertation, Université Cadi Ayad Marrakech]. 132 p.
70. **Valcourt, C. (2016)**. Contribution à l'étude du traitement de bactéries multirésistantes : Associations de composants aromatiques d'huiles essentielles nanoencapsulés avec des antibiotiques [Doctoral dissertation, Université d'Angers sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans]. 233p.
71. **Yap. Polly Soo Xi, Yiap. Beow Chin, Ping. Hu Cai, Lim. Swee Hua Erin, (2014)**. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance, *The Open Microbiology Journal*, 8, 6-14, doi: <https://doi.org/10.2174%2F1874285801408010006>



Fait à Tébessa, le : 14/07/2024,
 Signature de l'étudiant (e)

Département de... *biologie appliquée*
 Filière : .. *science biologique*
 Spécialité : .. *Microbiologie appliquée*
 Année universitaire 2023/2024

Formulaire de levée de réserves après soutenance d'un Mémoire de Master

Données d'identification du candidats (es) :

Nom et prénom du candidat : .. *Selbat Baya et Rabah Taqwa* ..

Intitulé du Sujet :

*Activité de la cytochrome des huiles essentielles des bactéries
 contre des souches à gram négatif. Uropathogènes productives
 de biofilm - Lactomase à spectre étendu*

Données d'identification du membre de jury :

Nom et prénom :

M. M. Abdelbasir

Grade :

Prof

Lieu d'exercice : Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi – Tébessa-

Vu le procès-verbal de soutenance de la thèse sus citée comportant les réserves suivantes :

R.A.S

Et après constatation des modifications et corrections suivantes :

*le résumé de conclusion
 modification de diagraph qui se trouve dans le page de garde
 la numérotation des tableaux et des figures*

[Signature]





Département de Biologie appliquée
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Année universitaire 2023/2024

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat (A joindre obligatoirement avec le mémoire)

Je, soussigné(e)

Nom et prénom : Sellat Baya

Régulièrement inscrit (e) : en master au département des sciences de la maternelle et la vie

N° de carte d'étudiant : 191034017883

Année universitaire : 2023/2024

Domaine : Sciences de la maternelle et la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé : Activité de la population de microbes aéroportés et des bactéries contre les

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité, je certifie également que je n'ai ni copié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets. sources à quantifier et à citer

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité de plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année de Master.
- L'exclusion définitive.

09
جويلية 2024
رئيس المجلس الشعبي البلدي
المهادي بوعلام

Fait à Tebessa, le : 9.7.2024

Signature de l'étudiant (e)

Sellat



Département de *Biologie Appliquée*
Filière : *Sciences biologiques*
Spécialité : *Microbiologie Appliquée*
Année universitaire 2023/2024

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat (A joindre obligatoirement avec le mémoire)

Je, soussigné(e)

Nom et prénom : *Rabah Taqwa*

Régulièrement inscrit (e) : *en Master au département des sciences de la nature et la vie*

N° de carte d'étudiant : *401034017886*

Année universitaire : *2023/2024*

Domaine : *Sciences de la nature et la vie*

Filière : *Sciences biologiques*

Spécialité : *Microbiologie Appliquée*

Intitulé : *Activité de la riproformine, des huiles essentielles et des bactéries en contre de soches à gram (-) copathogènes*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité, je certifie également que je n'ai ni copié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité de plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année de Master.
- L'exclusion définitive.

09 جويلية 2024

Fait à Tébessa, le : *3.7.2024*

Signature de l'étudiant (e)

Rabah Taqwa
رئيس المجلس الشعبي البلدي
المهادي بوعلام