

Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Etude de l'effet antimicrobien de  
l'association des huiles essentielles de  
plantes médicinales et souches probiotiques**

Présenté par :

**NAIT MOHAND Kenza & SOUIGA Siham**

Soutenu le : 25/06/2023

Devant le jury composé de :

Mr BELHADI.Dj

MCB

Président

Mme FARADJI.S

MCA

Encadrante

Mme TETILI.F

MCB

Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

# Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions Allah pour nous avoir donné de la force, la patience et la volonté d'accomplir ce travail modeste.*

*Nos sincères remerciements sont adressés premièrement à notre promotrice Mme FARADJI, qui nous guidés lors de l'élaboration de ce travail notre profond respect et entiers dévouements.*

*Nous tenons à remercier profondément Mlle TERKI Syfia la doctorante de Mme FARADJI pour son suivi au cours de la manipulation de ce travail avec ses encouragements, sa patience et ses conseils judicieux, nous la prions d'accepter nos sincères remerciements.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer notre travail, Mr BELHADJ tant que président de jury et Mme TETILI d'avoir pris de son temps pour examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont également aux doctorantes Rania & Wissam et toute l'équipe de laboratoire de microbiologie appliquée*

*Enfin, on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



*- Siham & Kenza -*

# *Dédicace*

*À mes très chers parents, ma mère Djidjiga et mon père  
L'hacene*

*Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par  
excellence, la source de tendresse et l'exemple du  
dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Je vous  
dédie ce travail en témoignage de mon profond amour !*

*A mes sœurs et mes frères qui m'ont aidé beaucoup durant  
toutes les années universitaires.*

*A ma nièce nesrine et mes neveux Ilyas, Aylane, Md.arab,  
Anis et le petit Dylane que j'aime beaucoup.*

*En fin, je dédie ce travail à ma binôme Kenza.  
Ma copine laquelle j'ai trouvé à mes côtés tout au long de  
ce travail.*

 *Siham -*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes chers parents Hayet et Karim,*

*Cette dédicace est un hommage vibrant à votre amour, votre soutien inconditionnel et votre dévouement sans faille. Vous avez été mes guides et mes piliers tout au long de ce parcours. Votre confiance en moi m'a donné la force de poursuivre mes rêves et d'atteindre ce jalon important de ma vie. Je vous suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous avez sacrifié pour moi.*

*À mes chers frères Amar et Mounir,*

*Vous avez été mes compagnons de route, mes amis et mes confidents. Votre présence chaleureuse et votre soutien constant ont été une source de motivation et de réconfort.*

*À mes tantes, Oncles, mes cousins et cousines,*

*Vous avez été des membres essentiels de ma famille, toujours présents pour m'encourager et me soutenir. Votre affection, vos conseils et votre soutien indéfectible ont été des sources d'inspiration pour moi.*

*À mes chères amies*

*Votre amitié m'a donné de la force, du soutien et du réconfort tout au long de mon parcours. Je suis reconnaissante pour chaque moment partagé, chaque éclat de rire et chaque épreuve surmontée ensemble.*

*À ma binôme Siham*

*Notre collaboration a été une clé essentielle de mon parcours universitaire. Ensemble, nous avons surmonté les défis, partagé nos connaissances et apporté une force supplémentaire à nos projets communs.*

 *- Kenza -*

# *Sommaire*

# Sommaire

---

## Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction ..... 1**

## Chapitre I

### Généralités sur les plantes médicinales et huiles essentielles

I.1. Définition des plantes aromatiques et médicinales: ..... 4

I.2. Généralités sur les Huiles essentielles ..... 4

I.2.1. Définition ..... 4

I.2.2. Méthodes d'extraction ..... 5

I.2.3. La composition des Huiles essentielles ..... 5

I.2.3.1. Les terpénoïdes ..... 6

I.2.3.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane ..... 6

I.2.4. Activité antimicrobiennes des Huiles essentielles ..... 6

I.2.4.1. Les composants antibactériens des huiles essentielles ..... 6

I.2.4.2. Mode d'action ..... 7

I.2.5. Application dans le domaine alimentaire ..... 8

## Chapitre II

### Les probiotiques

II.1. Généralités sur les probiotiques ..... 11

II.1.1. Historique et définition ..... 11

II.2. Les Critères de sélection des probiotiques ..... 11

II.3. L'activité antimicrobienne des probiotiques ..... 12

II.3.1. Acide lactique ..... 13

II.3.2. Le peroxyde d'hydrogène ..... 13

II.3.3. Les bactériocines ..... 14

II.3.4. Le dioxyde de carbone ..... 15

II.3.4.1. Le diacétyle ..... 15

II.3.4.2. Les biosurfactants ..... 15

II.4. Mécanismes d'action des probiotiques ..... 16

## Chapitre III

## *Sommaire*

---

### **L'association entre les huiles essentielles et Les souches probiotiques**

III.1. Interaction entre les composants des Huiles essentielles.....	19
III.2. Interaction entre les huiles essentielles et les les Probiotiques.....	20

### **Matériel et méthodes**

1. Objectif du travail.....	22
1.1. Revivification des souches .....	22
1.2. Tests de confirmation microbiologiques de la pureté des souches microbiennes .....	22
1.2.1. Examen macroscopique.....	22
1.2.2. Examen microscopique .....	22
1.2.3. Test de Catalase.....	23
2. Activités antibactérienne des Huiles essentielles .....	23
2.1. Standardisation des inocula bactériens .....	24
2.2. Préparation de la suspension bactérienne .....	24
2.3. Test d'Aromatogramme.....	24
2.4. Lecture .....	25
2.5. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice CMI des huiles essentielles .	25
3. Activité antibactérienne des bactéries lactiques .....	27
3.1. Standardisation des inocula bactériens .....	27
3.2. Préparation de la suspension bactérienne .....	27
3.3. Préparation des surnageant natifs .....	28
3.4. Test des puits .....	28
3.5. Lecture des résultats .....	28
3.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des surnageantsnatifs sur les souches pathogènes .....	28
4. Etude de l'effet antibactérien combiné des huiles essentielles avec les surnageants natifs des lactobacilles.....	30
4.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des Huiles essentielles combinés au surnageant natifs des Lactobacilles.....	30

### **Résultats et discussions**

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes.....	33
2. Résultats de l'Activité antibactérienne des Huiles essentielles par aromatogramme.....	33
2.1. Standardisation .....	33
2.2. Activité antibactérienne.....	33
3. Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles .....	38

## *Sommaire*

---

4. Résultats de l'activité antibactérienne des surnageant natifs des bactéries lactiques.....	40
5. Résultats de la concentration minimale inhibitrice des surnageant des souches de Lactobacilles sur les souches pathogènes.....	42
6. Résultats de L'effet combiné des huiles essentielle avec les surnageant natifs des bactéries lactiques.....	46
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la combinaison de l'huile essentielle est les surnageant natifs des souches lactiques.....	49
<b>Conclusion .....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>55</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>67</b>



## *Liste d'abréviation*

---

### **Liste d'abréviation**

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine-triphosphate

BMRS: bouillon Man Rogosa Sharp

BN : bouillon nutritif

CMI : concentration minimale inhibitrice

CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone

DMSO: Dimethyl sulfoxide

*E. coli*: *Escherichia coli*

FAO: Food and Agriculture Organization

GRAS: generally recognized as safe

HEs: Huiles essentielles

ICIF: Indice de concentration inhibitrice fractionnel

Lb: Lactobacilles

mm: millimeter

MRS: Man Rogosa Sharp

O<sub>2</sub> : oxygène.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAM : Plantes aromatiques et médicinales.

pH : potentiel hydrogène

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*Sp* : Espèce non précisée

*Spp* : plusieurs espèces non précisées

## *Liste d'abréviation*

---

UFC : unité formant colonie

ul /ml : microlitre/millilitre

## *Liste des tableaux*

---

### **Liste des tableaux**

<b>Tableau I:</b> Principaux critères de sélection des probiotiques. ....	12
<b>Tableau II :</b> Les Huiles essentielles testées .....	23
<b>Tableau III :</b> Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des huiles essentielles .....	26
<b>Tableau IV:</b> Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des surnageant natifs des souches de Lactobacilles .....	29
<b>Tableau V :</b> Caractères morphologiques des souches bactériennes testées.....	33
<b>Tableau VI:</b> Résultats des CMI des cinq huiles essentielles testées sur les deux souches bactériennes pathogènes .....	38
<b>Tableau VII :</b> Effet des différentes concentrations des surnageant de souches lactiques sur <i>Staphylococcus aureus</i> sur microplaque. ....	42
<b>Tableau VIII :</b> Effet des différentes concentrations des surnageant de souches lactique sur <i>Escherichia coli</i> sur microplaque. ....	43
<b>Tableau XI :</b> Indice des concentrations inhibitrices fractionnaires (ICIF) des combinaisons de l'HE de thym avec les surnageant des lactobacilles (Lb2 et Lb3).....	49

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Illustration du procédé d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau .....	5
<b>Figure 2 :</b> Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	7
<b>Figure 3 :</b> Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et leurs composants dans la cellule bactérienne .....	8
<b>Figure 4 :</b> Mode d'action des acides organiques sur les bactéries pathogènes .....	13
<b>Figure 5 :</b> Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les bactéries pathogènes .....	14
<b>Figure 6 :</b> Mécanismes d'inhibition des bactéries pathogènes par effet barrière des biosurfactants.....	16
<b>Figure 7 :</b> Schéma de microplaque utilisée dans la détermination de la CMI des Huiles essentielles.....	26
<b>Figure 8 :</b> Schéma de la microplaque utilisée dans la détermination des CMI des surnageants natifs des souches de Lactobacilles. ....	29
<b>Figure 9 :</b> Schéma de microplaque utilisée dans la détermination des CMI de la combinaison de l'huile essentielle et surnageant natif vis-à-vis des souches pathogènes.....	31
<b>Figure 10 :</b> Représentation graphique de l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées vis-a-vis des souches pathogènes.....	34
<b>Figure 11 :</b> Photographies de la sensibilité des souches bactérienne pathogènes référencées vis-à-vis des huiles essentielles utilisées .....	35
<b>Figure 12 :</b> Représentation graphique de l'activité antibactérienne des six huiles essentielles testées sur les huit souches de lactobacilles.....	35
<b>Figure 13 :</b> Photographies de l'activité antibactérienne des six huiles essentielles testées sur les huit souches de lactobacilles .....	36
<b>Figure 14 :</b> Représentation graphique de la sensibilité des deux souches bactérienne vis-à-vis des souches de Lactobacilles testées.....	41
<b>Figure 15 :</b> Photographies présentant la sensibilité de <i>E. coli</i> vis-à-vis des surnageant des souches lactiques .....	41
<b>Figure 16 :</b> Photographies présentant la sensibilité de <i>S. aureus</i> vis-à-vis des surnageant des souches lactiques .....	42

## *Liste des figures*

---

<b>Figure 17 :</b> Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de thym avec les surnageant natifs.....	46
<b>Figure 18 :</b> Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaisons de l'huile essentielle de romarin avec les surnageant natifs .....	46
<b>Figure 19 :</b> Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de eucalyptus avec les surnageant natifs.....	47
<b>Figure 20 :</b> Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de myrte avec les surnageant natifs.....	47
<b>Figure 21 :</b> Photographies de la sensibilité des souches pathogènes aux combinaisons de l'huile essentielle de sauge avec les surnageant natifs.....	48

# *Introduction*

## *Introduction*

---

Actuellement, la préservation et la sécurité des aliments sont des préoccupations majeures tant pour les consommateurs que pour les producteurs. Les méthodes de conservation traditionnelles comportent des risques pour la santé, peuvent altérer la qualité sensorielle des aliments et entraîner une perte de nutriments essentiels. En conséquence, de nouvelles technologies sont en développement. Les techniques de bio-conservation s'avèrent prometteuses pour améliorer la qualité et la sécurité des aliments. Elles permettent de prolonger la durée de conservation des aliments tout en préservant leur hygiène et en minimisant les effets indésirables sur leur valeur nutritionnelle et leurs caractéristiques sensorielles (**Khalil et al., 2021**).

L'intérêt pour la bioconservation des aliments est en augmentation constante grâce à l'utilisation de combinaisons de technologies innovantes, y compris les systèmes antimicrobiens. Ces approches exploitent les interactions microbiennes pour garantir la sécurité des aliments et réduire de manière significative la présence de micro-organismes indésirables et nuisibles (**Rajanikar et al., 2021**). Les bactéries lactiques ont un potentiel significatif pour être utilisées dans la bioconservation des aliments et peuvent présenter plusieurs caractéristiques probiotiques, cela est due à Leur capacité à produire divers métabolites antimicrobiens tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique, etc.), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol et les bactériocines explique en partie cette propriété (**Klaenhammer, 1988 ; Abee et al., 1995**).

Les probiotiques sont des micro-organismes et leurs métabolites, qui affectent l'organisme hôte de manière bénéfique. Dans la plupart des cas, les probiotiques comprennent des micro-organismes qui pourront se développer et fonctionner dans le tractus intestinal de l'hôte (**Samedi et Charles, 2019**). Ils servent d'obstacles physiques aux pathogènes, favorisent la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes, maintiennent l'intégrité des jonctions adhérentes des cellules épithéliales de l'intestin, produisent des facteurs antimicrobiens et stimulent le système immunitaire (**Yan et Goldman, 2020**).

En complément de l'utilisation des bactéries lactiques et de leurs métabolites, les techniques de bioconservation des aliments font également appel à de nombreux composés naturels extraits de plantes médicinales et aromatiques, qui ont démontré des activités biologiques. Parmi ces composés, les huiles essentielles qui suscitent de plus en plus d'intérêt dans divers secteurs de l'industrie en raison de leurs propriétés biologiques et pharmacologiques variées, notamment leurs activités antimicrobiennes (**Zhaleh et al., 2018**). Les huiles essentielles présentent généralement une activité bactériostatique, c'est-à-

## *Introduction*

---

dire qu'elles inhibent la croissance bactérienne, plutôt qu'une activité bactéricide, qui tuerait les bactéries. Cependant, certaines substances chimiques contenues dans les huiles essentielles ont démontré des propriétés bactéricides (**Bouyahya et al., 2017**). Par conséquent, elles peuvent constituer un puissant outil de réduction de développement et de dissémination de la résistance bactérienne (**Stefanakis et al., 2013**).

L'utilisation combinée des huiles essentielles et des probiotiques dans les produits alimentaires 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. Ces produits laitiers fermentés aromatisés aux huiles essentielles fournissent des nutriments essentiels au corps humain, tout en prévenant la détérioration microbienne. De plus, ils agissent en tant que produits de santé probiotiques et antimicrobiens préventifs contre les pathogènes intestinaux (**Shipradeep et al., 2013**).

Dans ce contexte que s'inscrit l'objectif de cette étude qui consiste à l'étude de l'effet antimicrobien de l'association des extraits de plantes qui sont les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Citrus reticulata*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Myrtus communis* et des souches probiotiques du genre *Lactobacillus* vis-à-vis de deux souches bactériennes qui sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Le document est structuré comme suit : une synthèse bibliographique qui consiste à donner un aperçu général sur les plantes, les huiles essentielles, les probiotiques et l'association biologiques entre ces derniers et une partie expérimentale dans laquelle la méthodologie du travail est expliquée ainsi que les résultats obtenus.



*Chapitre I*

*Généralités sur les plantes  
médicinales et huiles  
essentiels*

## **I.1. Définition des plantes médicinales :**

Selon la **définition de l'Organisation mondiale de la santé**, une plante médicinale est une plante ou une partie de celle-ci, qui contient des substances pouvant être utilisées directement à des fins thérapeutiques ou comme précurseurs pour la fabrication d'autres médicaments utiles. Les propriétés curatives de ces plantes sont validées par des preuves scientifiques ou par leur utilisation traditionnelle en médecine empirique.

Les plantes aromatiques et médicinales possèdent des substances chimiques complexes biologiquement actives telles que saponines, tanins, huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes et autres composés chimiques (**Sofowora, 1993**), qui ont des propriétés curatives. Ces substances chimiques complexes de différentes compositions se trouvent sous forme de métabolites secondaires dans une ou plusieurs parties de ces plantes (**Tyler, 1999**).

## **I.2. Généralités sur les Huiles essentielles**

### **I.2.1. Définition**

Les huiles essentielles sont des concentrés de molécules aux propriétés thérapeutiques bien établies, extraites de plantes dites "aromatiques". Ces plantes renferment une grande diversité de molécules aromatiques dans leurs différentes parties, telles que les feuilles, les fruits, les graines, les écorces ou les racines, ce qui constitue le principe essentiel de leur utilisation (**Zaibet, 2016 ;Tiphaigne, 2019**).

Selon la Pharmacopée Européenne, une HE est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (**Alleman et al., 2013**)

### I.2.2. Méthodes d'extraction

Il existe diverses méthodes d'extraction des huiles essentielles, parmi lesquelles figurent des approches novatrices telles que l'extraction au dioxyde de carbone liquide, l'extraction assistée par ultrasons ou microondes ainsi que des méthodes plus courantes, telles que la distillation à la vapeur, l'hydro-distillation, l'expression à froid pour les agrumes ou L'effleurage pour les fleurs .(Cherrat, 2013) La distillation à la vapeur (figure 1 )est la méthode la plus couramment utilisée pour extraire les huiles essentielles végétales. Environ 93 % des huiles essentielles sont extraites par distillation à la vapeur, tandis que les 7 % restants peuvent être obtenus par d'autres méthodes (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). La vapeur d'eau traverse la matière végétale, provoquant l'éclatement des cellules et la libération des huiles essentielles qui se vaporisent. Le mélange d'eau et d'huile est ensuite séparé en phases aqueuse et organique. Cette méthode prévient les phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui pourraient altérer la qualité de l'huile (Zaibet, 2016).

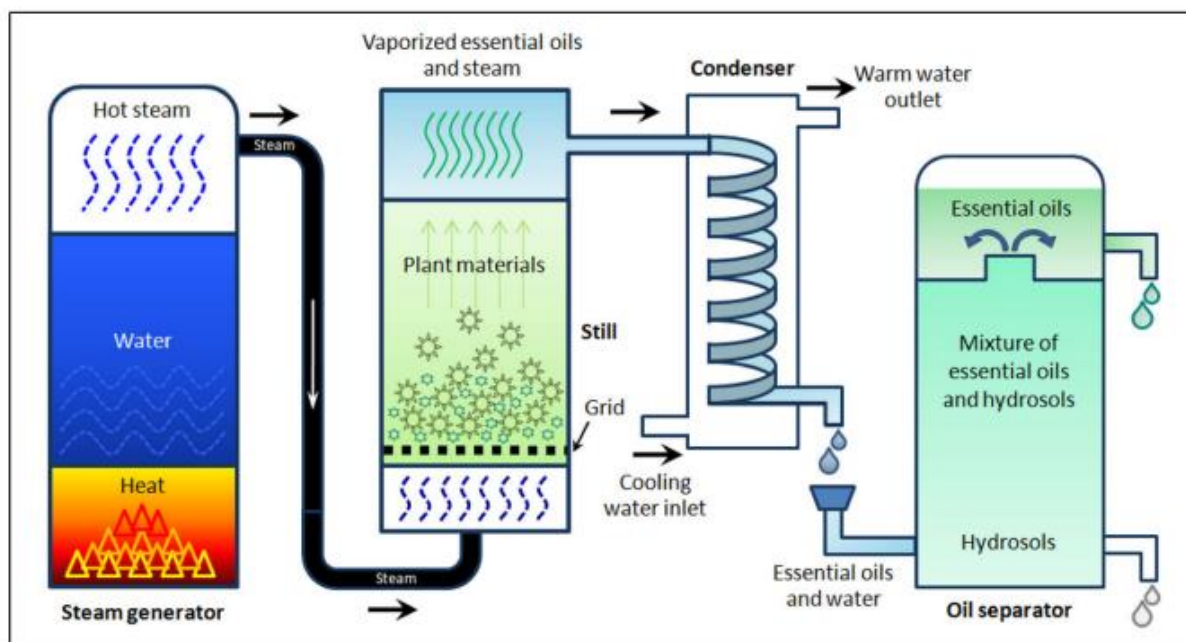


Figure 1 : Illustration du procédé d'extraction des huiles essentielles par entrainement à la vapeur d'eau ((Tongnuanchan et Benjakul, 2014)

### I.2.3. La composition des Huiles essentielles

Les HE contiennent une variété de métabolites secondaires qui peuvent inhiber ou ralentir la croissance des micro-organismes (Semeniuc et al., 2017). Leur composition varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Daouda, 2015). Elles sont

réparties en deux classes en fonction de leurs voies de biosynthèse : les terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Chaib, 2021)

### **I.2.3.1. Les terpénoïdes**

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont fait de la combinaison de plusieurs unités de 5 carbones-bases appelés isoprène ( $C_5H_8$ ) et peuvent être à chaîne ouverte ou cyclique (Cherrat, 2013). Les terpénoïdes sont des terpènes modifiés par l'ajout d'au moins un groupement oxygéné (Hervé, 2017). Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesquiterpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes (Daouda, 2015).

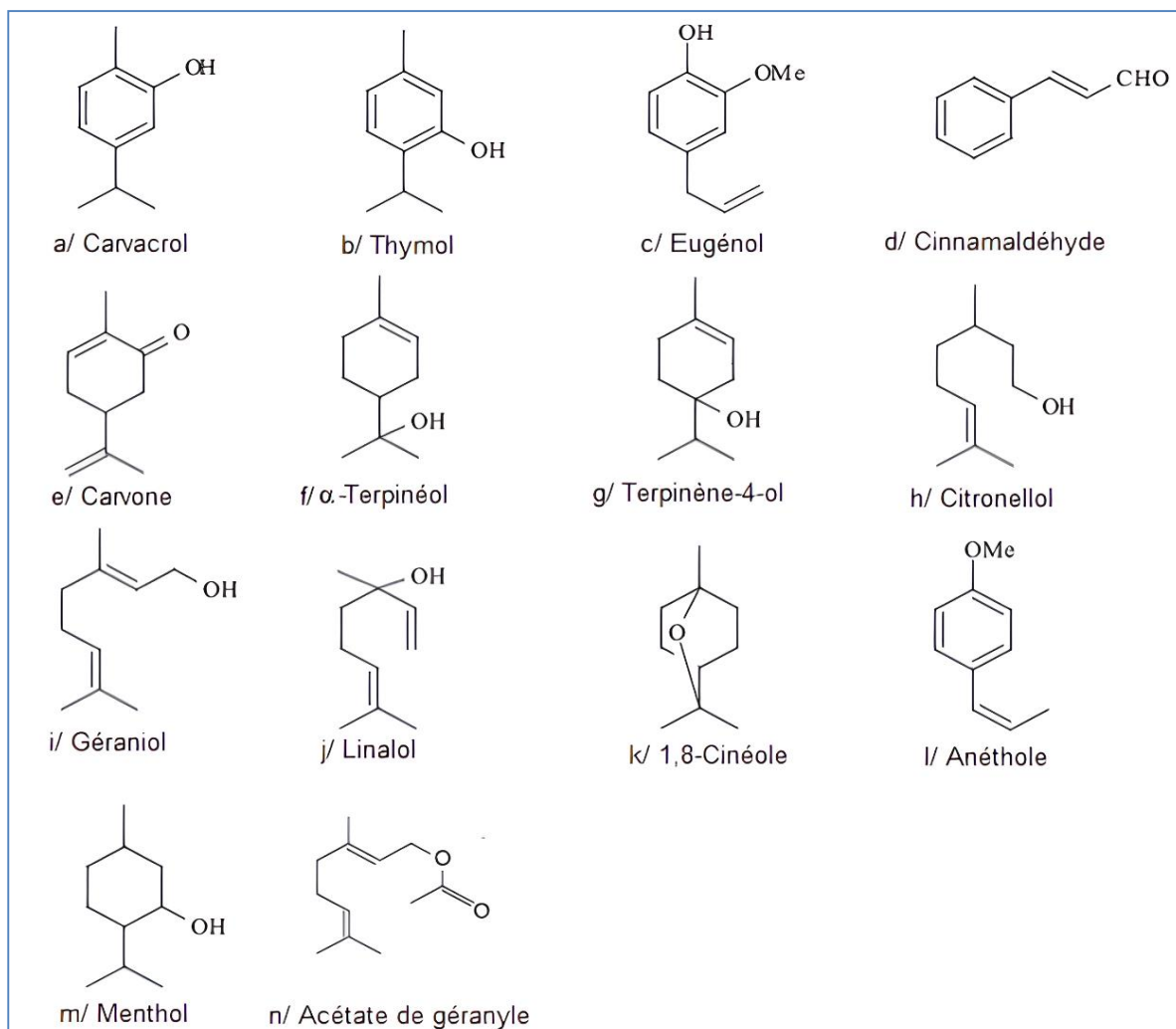
### **I.2.3.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane**

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont moins fréquents dans les HEs que les monoterpènes et ses quiterpènes (Chaib, 2021). Ils sont caractérisés par un noyau aromatique lié à une chaîne de trois atomes de carbone propène (Cherrat, 2013), Les phénylpropènes sont une sous-famille de composés organiques appelés phénylpropanoïdes, qui sont synthétisés à partir de la phénylalanine dans les plantes (Hyldgaard *et al.*, 2012). L'eugénol, l'iso-eugénol, le cinnamaldéhyde, la vanilline et le safrole appartiennent à cette sous-famille (Hervé, 2017), On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles (Bouزيد, 2018).

## **I.2.4. Activité antimicrobiennes des huiles essentielles**

### **I.2.4.1. Les composants antibactériens des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont constituées de très nombreuses molécules, et seulement quelques-unes d'entre-elles (Figure 2) exercent un effet antibactérien avéré (Hervé, 2017), les composés phénoliques sont en tête de liste comme l'eugénol, thymol, carvacrol. D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes : certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (p-cymène)(Piochon, 2008).

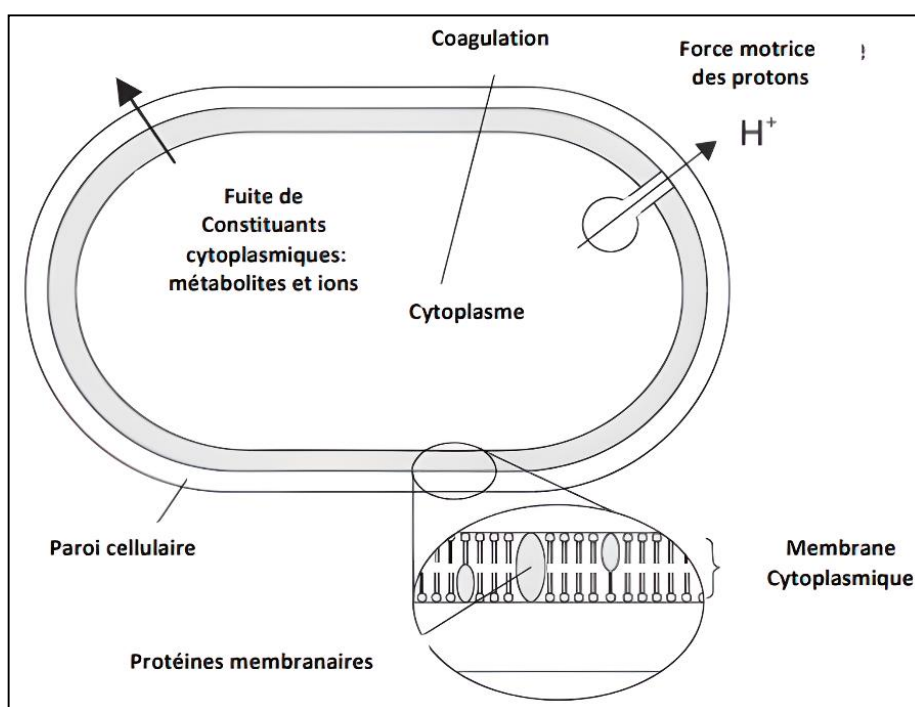


**Figure 2 :** Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles (Guinoiseau, 2010)

#### I.2.4.2. Mode d'action

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positive et les bactéries à Gram négative. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positive les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (**Bouزيد, 2018**). En raison du nombre important des constituants qu'elles contiennent, les huiles essentielles n'ont pas de cibles cellulaires spécifiques (**Randrianarevelo, 2010**) (figure 3). Les mécanismes impliqués dans le mode d'action antimicrobien ne sont pas encore totalement éclaircis (**Cherrat, 2013**). Cependant, Une caractéristique importante des HE et de leurs composants est leur hydrophobicité, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne, perturbant ainsi leur structure. (**Burt, 2004**). Ceci a de nombreuses conséquences : une augmentation de la perméabilité membranaire, une fuite d'ions potassium et de protons avec une acidification

du milieu intracellulaire, un épuisement de la réserve intracellulaire d'ATP, une modification de l'espace périplasmique des bactéries Gram négatif, une perte de contenu cellulaire, une coagulation du contenu cytoplasmique, et une lyse cellulaire (**Gabriel et al., 2013**). Les HE contiennent aussi des groupes hydroxyles qui peuvent entraver la synthèse du matériel génétique (**Ghabraie, 2014**). Certains composés peuvent également inhiber l'activité des enzymes métaboliques comme les lipases et coagulases et aussi dénaturer les protéines et enzymes impliqués dans la synthèse d'ATP (**Hervé, 2017**).



**Figure 3 :** Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et leurs composants dans la cellule bactérienne (Cherrat, 2013)

### **I.2.5. Application dans le domaine alimentaire**

Les maladies d'origine alimentaire représentent un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Afin d'assurer un contrôle efficace, diverses techniques de conservation sont utilisées lors de la fabrication et du stockage des produits alimentaires. Cependant, en raison de la perception négative des consommateurs à l'égard des additifs synthétiques, il existe un intérêt croissant pour trouver des alternatives naturelles (**Cherrat, 2013**). Notamment des extraits de plantes qui sont considérés comme des sources naturelles d'agents antimicrobiens, sûrs sur le plan nutritionnel et facilement dégradables (**Mostafa et al., 2018**).

Dans les industries alimentaires, on se sert essentiellement des propriétés

aromatisantes des HE. Certains de leurs composants, linalool, thymol, eugénol, carvone, aldéhyde cinnamique, vanilline, carvacrol, citral, et limonène ont été acceptés par la Commission européenne pour leur usage dans ce cadre-là (**Fahed, 2016**). Cette source naturelle est utilisée pour conférer des caractéristiques organoleptiques spécifiques aux aliments, notamment leur goût et leur odeur. Par exemple, l'huile essentielle de citron est largement utilisée dans divers domaines tels que la pâtisserie, les desserts et les arômes. Elle est également employée pour inhiber la croissance de certaines bactéries responsables de la détérioration de certains produits alimentaires tels que la viande, les poissons, les fruits, les légumes et les produits laitiers. Parmi les huiles essentielles les plus couramment utilisées, on retrouve la menthe, la vanille, le poivre, le basilic, le gingembre, l'eucalyptus, ainsi que les diverses odeurs de fruits, qui sont largement utilisées dans l'industrie de la confiserie, de la confiture, de la liquoristerie, des biscuits, de la crème glacée et des sirops (**Moumene, 2016**).

Bien que les HEs aient le statut GRAS et aient montré des effets antimicrobiens prometteurs, leur application est limitée en raison de leur goût et de leur odeur prononcée. Par rapport au système *in vitro*, ils devraient être utilisés à une concentration plus élevée dans le système alimentaire pour provoquer la même activité d'inhibition mais à haute concentration des HEs va modifier les propriétés organoleptiques des aliments (**Ghabraie, 2014**).

*Chapitre II*  
*Les probiotiques*



## **II.1. Généralités sur les probiotiques**

### **II.1.1. Historique et définition**

Les travaux de **Metchnikoff en 1907** ont contribué au développement de la notion de probiotiques. Metchnikoff, lauréat du prix Nobel, a avancé l'idée que la consommation de produits laitiers fermentés par les paysans bulgares était responsable de leur bonne santé et de leur longévité. Selon lui, l'ingestion de *Lactobacillus* avait un effet positif sur la microflore intestinale, réduisait la « putréfaction » et les activités microbiennes toxiques. Il a donc suggéré l'utilisation de bactéries lactiques pour atténuer les troubles intestinaux, améliorer l'hygiène digestive et, par conséquent, augmenter l'espérance de vie.

En **1965**, **Lilly et Stillwell** ont introduit le terme "probiotique" pour désigner les substances produites par un microorganisme qui favorisent la croissance d'autres microorganismes.

La définition actuellement adoptée par le groupe de travail conjoint de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2002 décrit « les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, apportent des bienfaits pour la santé de l'hôte ».

## **II.2. Les Critères de sélection des probiotiques**

Pour qu'une souche présente un potentiel probiotique, elle doit posséder plusieurs caractéristiques souhaitables qui lui permettent d'exercer ses effets bénéfiques. Plusieurs critères de base ont été identifiés pour les souches de microorganismes pouvant être utilisées comme probiotiques (tableauI) :

**Tableau I** : Principaux critères de sélection des probiotiques (Wedajo, 2015 ; Mehrabani et al., 2014 ; Feng et al., 2017).

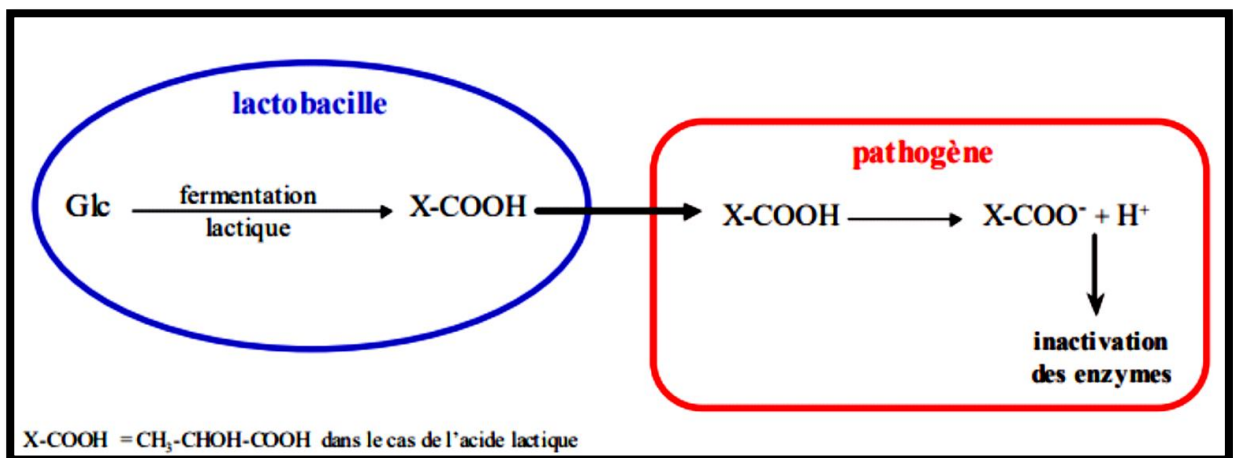
Critères de sécurités	Critères fonctionnels	Critères technologiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Origine humaine.</li> <li>-La capacité pour influencer les activités métaboliques.</li> <li>-Propriétés intrinsèques.</li> <li>-Absence de toxicité ou pathogénie.</li> <li>-bénéfiques pour la santé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tolérance à l'acidité gastrique et à la bile.</li> <li>-Immunomodulation.</li> <li>-Adhérence au tissu épithélial de l'intestin.</li> <li>-La capacité à coloniser le tractus gastro-intestinal</li> <li>-La production de substances antimicrobiennes.</li> <li>-Stimulation de système immunitaire.</li> <li>-Activité antagoniste vis-à-vis de la gastro-intestinale pathogènes.</li> <li>-Effets sur la santé validés et documentés.</li> <li>-Propriétés anti-mutagènes et anticarcinogènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Souches génétiquement stables.</li> <li>-Bonnes propriétés sensorielles.</li> <li>-Résistance aux phages.</li> <li>-Production à grande échelle.</li> <li>-Viabilité souhaitée pendant le traitement et le stockage.</li> </ul>

### II.3. L'activité antimicrobienne des probiotiques

L'activité antimicrobienne à l'égard des agents pathogènes est l'un des critères couramment utilisés pour la sélection des souches probiotiques. Ces organismes peuvent agir comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux en entrant en compétition avec eux pour les sites de liaison, en modulant le système immunitaire de l'hôte et en produisant des substances antimicrobiennes (Marianelli et al., 2010).

### II.3.1. Acide lactique

L'acide lactique et l'acide acétique sont efficaces contre les micro-organismes pathogènes intestinaux impliqués dans les cas de diarrhées (**Servin, 2004**). L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement dû à leur forme non dissociée, qui peut traverser passivement la membrane cellulaire et perturber les fonctions métaboliques essentielles dans le cytosol alcalin. Les effets toxiques de l'acide lactique et de l'acide acétique comprennent la diminution du pH intracellulaire et la perturbation du potentiel membranaire (figure 4). (**Šušković et al., 2010**).

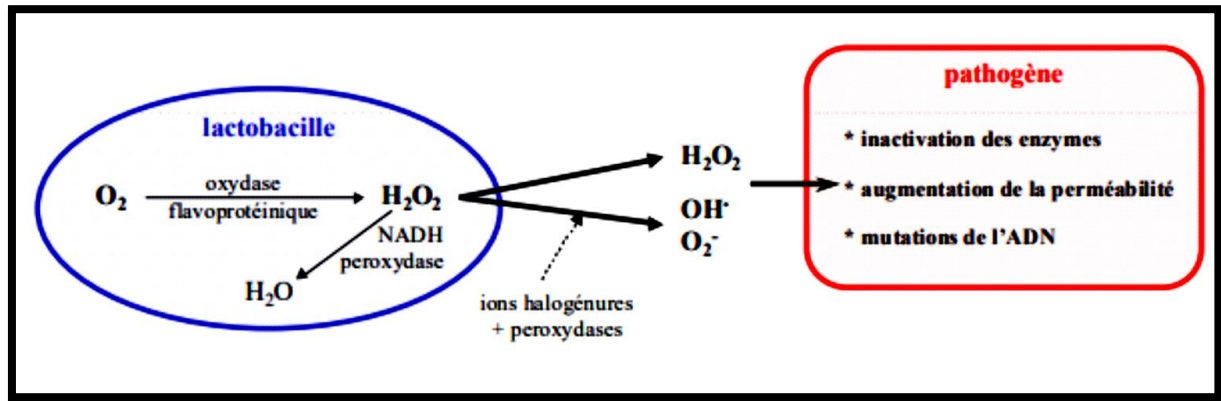


**Figure 4 :** Mode d'action des acides organiques sur les bactéries pathogènes (**Rousseau, 2004**).

### II.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

L'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène est attribuée à son puissant effet oxydant sur la cellule bactérienne, ce qui entraîne la destruction des protéines cellulaires (**Šušković et al., 2010**).

La toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de son pouvoir oxydant intrinsèque ainsi que de ses métabolites, tels que le radical hydroxyle (OH·) et les anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) générés par des agents réducteurs et des enzymes peroxydases. Ces molécules peuvent agir sur les protéines, entraînant l'inactivation des enzymes cytoplasmiques. Les réactions correspondantes sont illustrées dans la figure 5. Cependant, les lactobacilles et les lactocoques évitent l'autodestruction par une NADH peroxydase qui convertit le peroxyde d'hydrogène. (**Migdal et Serres, 2011**).



**Figure 5 :** Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les bactéries pathogènes (Rousseau, 2004).

### II.3.3. Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par certaines bactéries par le biais de la voie de synthèse ribosomale. Elles présentent une activité antimicrobienne, pouvant être bactéricide en provoquant la mort des bactéries cibles, ou bactériostatique en inhibant leur croissance. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques, qui sont connues pour leur rôle dans la conservation des aliments (Lagha et al., 2017).

Ces molécules, de poids moléculaire variable, sont produites par les bactéries lactiques et ont une activité inhibitrice spécifique envers les bactéries proches de la souche productrice. Parmi les bactériocines les plus connues, on trouve la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et le bulgarican (Samedi et Charles, 2019).

Certains lactobacilles produisent des bactériocines ayant une activité bactéricide contre des espèces apparentées (à spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (à large spectre) (Šušković et al., 2010).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques agissent de manière similaire. Elles ciblent principalement la membrane externe des bactéries visées en formant des pores, ce qui entraîne la libération du contenu intracellulaire et la mort de la bactérie affectée (Samedi et Charles, 2019).

L'efficacité de ces bactériocines est principalement due aux interactions électrostatiques avec les groupes de phosphate chargés négativement présents sur les membranes cellulaires cibles. Cette liaison initiale conduit à la formation de pores et à la

destruction des cellules, ce qui provoque des dommages irréversibles et active les autolysines responsables de la digestion de la paroi cellulaire (Singh, 2018).

#### II.3.4. Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en tant que métabolite secondaire lors de la fermentation de certains substrats. L'accumulation de CO<sub>2</sub> dans l'environnement crée des conditions anaérobies qui peuvent entraîner l'élimination des bactéries strictement aérobies (Samedi et Charles, 2019).

L'activité antifongique du CO<sub>2</sub> est attribuée à deux mécanismes principaux. Tout d'abord, il inhibe les réactions de décarboxylation enzymatique, ce qui perturbe le métabolisme des champignons. De plus, le CO<sub>2</sub> s'accumule dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, ce qui altère la perméabilité et entraîne un dysfonctionnement des fonctions membranaires (Šušković et al., 2010).

##### II.3.4.1. Le diacétyl

Les bactéries lactiques hétéro fermentaires génèrent de l'acétaldéhyde actif en décarboxylant le pyruvate. Cet acétaldéhyde réagit ensuite avec du pyruvate pour former de l' $\alpha$ -acétolactate, qui est ensuite converti en diacétyl par des enzymes appelées  $\alpha$ -acétolactatesynthases (Šušković et al., 2010).

Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un composant aromatique essentiel. Sa formation atteint son maximum à un pH légèrement acide. Le diacétyl possède des propriétés antimicrobiennes qui ciblent certains microorganismes, bien que ceux-ci soient moins sensibles à ses effets. Il est capable d'inhiber la croissance des bactéries Gram positives non lactiques, ainsi que des bactéries Gram négatives, des levures et des moisissures (Stoyanova et al., 2012).

##### II.3.4.2. Les biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés à la fois hydrophiles et hydrophobes qui se concentrent à la surface des interfaces, indiquent les tensions interraciales et forment des agrégats tels que des micelles (Xu et al., 2011).

De nombreux micro-organismes ont la capacité de produire des biosurfactants de manière extracellulaire. Ces composés ont été classés en différentes catégories en fonction de leur composition chimique, de leur poids moléculaire, de leurs propriétés physico-

chimiques, de leur mode d'action et de leur origine microbiologique (Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

La surlactine est un biosurfactant sécrété par des souches spécifiques de *Lactobacillus* sp. Lors des phases stationnaires. Elle est principalement associée aux cellules riches en protéines. La surlactine a la capacité d'interférer avec l'adhésion des bactéries uropathogènes (figure 6). Selon le type de micro-organismes, les différents types de surlactine interagissent avec les surfaces bactériennes de manière spécifique (Satpute et al., 2016).

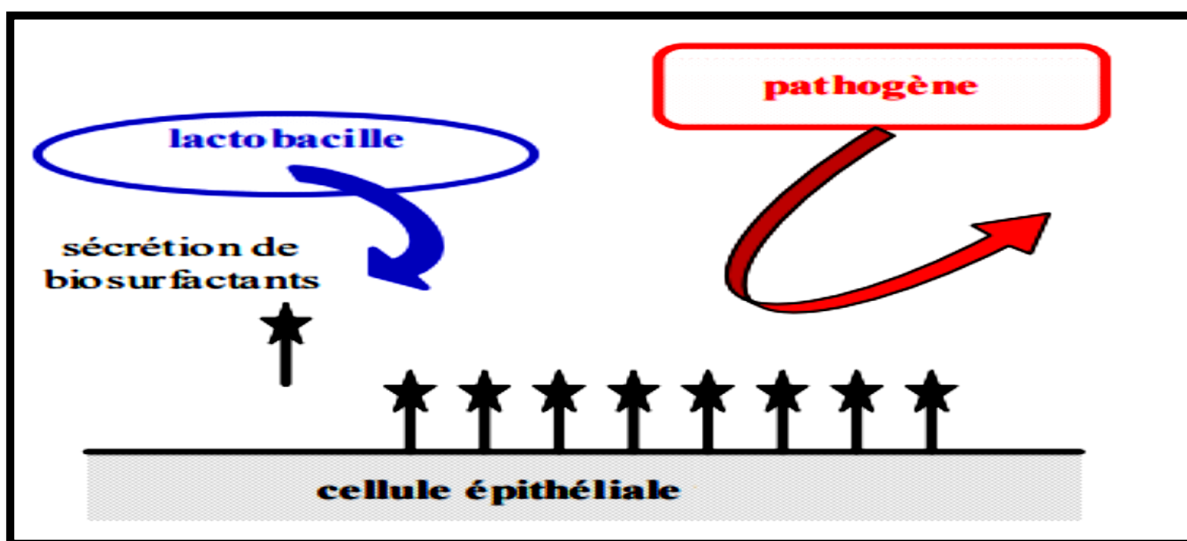


Figure 6 : Mécanismes d'inhibition des bactéries pathogènes par effet barrière des biosurfactants (Rousseau, 2004).

#### II.4. Mécanismes d'action des probiotiques

Il existe différents mécanismes d'action par lesquels les probiotiques exercent un antagonisme vis-à-vis plusieurs microorganismes (Yan et Polk, 2009). Parmi ces mécanismes

- **Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes :**

Les probiotiques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, l'acide, le peroxyde d'hydrogène et les défensines, ce qui leur permet d'exercer des effets antagonistes directs sur les microorganismes (Yan et Polk, 2009),

Les probiotiques peuvent également exercer des effets indirects en prévoyant un environnement favorable à l'implantation et à la prolifération de bactéries pathogènes spécifiques. Cela est accompli par une modification du pH intestinal. Les probiotiques

inhibent la production d'acides organiques tels que l'acide lactique, acétique, propionique, succinique, etc., qui acidifient le milieu intestinal. Cette acidification empêche la croissance des microorganismes sensibles à l'environnement acide (**Faure et al., 2013**). L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Les probiotiques entrent en compétition avec les pathogènes vis-à-vis des nutriments disponibles dans le milieu (**Coudeyras et Forestier, 2010**).

## *Chapitre III*

# *L'association entre les huiles essentielles et Les souches probiotiques*



### **III.2. Interaction entre les composants des Huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes contenant une grande diversité de composants, et leur activité antimicrobienne dépend de leur composition, de leur configuration, de leur quantité et de leurs interactions. On observe trois types d'effets : l'effet additif, l'effet antagoniste et l'effet synergique. L'effet additif correspond à une combinaison dont l'effet est équivalent à la somme des effets individuels des composants. La synergie se produit lorsque l'activité combinée des substances est supérieure à la somme de leurs activités individuelles. L'effet antagoniste se produit lorsque l'activité des composants dans la combinaison est inférieure à celle observée lorsqu'ils sont utilisés individuellement **(Fleiro, 2011)**

Les études ont révélé que les composés phénoliques et alcooliques dans les huiles essentielles ont principalement des effets additifs et synergiques. En général, les composés ayant des structures similaires ont tendance à avoir un effet additif plutôt que synergique. Dans certaines huiles essentielles, les interactions additives sont liées à leur composition principale en composés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol. L'effet antagoniste est attribué à l'interaction entre les hydrocarbures monoterpéniques non oxygénés et oxygénés. **(Bassolé et Juliani, 2012)** d'autres études ont conclu que les huiles essentielles entières ont une activité antibactérienne plus élevée que celle des composants majeurs mélangés, suggérant ainsi que les composants mineurs sont essentiels à cette activité et peuvent avoir un effet synergique ou potentialisateur. **(Burt, 2004)**.

En combinant différentes huiles essentielles ou en utilisant des assaisonnements contenant des concentrations élevées d'huiles essentielles, il est possible de créer la méthode à base d'huile la plus efficace pour de nombreux produits alimentaires. Cette approche permet non seulement d'inhiber la croissance des bactéries altérantes, mais aussi de préserver des profils de saveur et d'odeur plus subtils, évitant ainsi les saveurs très concentrées et potentiellement répréhensibles. Ainsi, les huiles essentielles ou leurs combinaisons offrent une alternative prometteuse pour la conservation des aliments, en garantissant à la fois leur sécurité et leur qualité organoleptique. **(Laurel, 2013)**.

### **III.3. Interaction entre les huiles essentielles et les 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**) les huiles essentielles de ces plantes ont suscité un intérêt particulier dans la conservation des aliments cependant beaucoup de recherches ont été menées sur l'utilisation d'huiles essentielles (HE) comme moyen naturel pour lutter contre la détérioration des aliments. Mais, peu d'études ont examiné les effets des huiles essentielles sur les micro-organismes bénéfiques pour la transformation et la conservation des aliments. (**De Souza, 2021**),

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 contaminant, il est donc important d'inactiver les cellules indésirables sans interférer avec le développement des bactéries bénéfiques. (**Moritz et al., 2012**)

# *Matériels et méthodes*

### **1. Objectif du travail**

#### **1.1. Revivification des souches**

Les 8 souches de bactéries lactiques utilisées dans cette étude sont du genre *Lactobacillus* (Lb1, .., Lb8) font partie de la collection du laboratoire LMA.

A partir des souches conservées en Cryo tubes à -18°C, des repiquages successifs ont été réalisés en bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe). 1ml a été prélevé à chaque fois et ensemencé dans 5ml de bouillon MRS stérile puis incubée 24h à 30°C.

Les souches pathogènes utilisées (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) dans notre étude sont des souches référenciées fournies par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Bejaia. Ces souches appartiennent à l'**American Type Culture Collection (ATCC)**, leur revivification est réalisée en utilisant le bouillon nutritif et en incubant à 37°C.

#### **1.2. Tests de confirmation microbiologiques de la pureté des souches microbiennes**

A partir de la culture des cultures revivifiée, un isolement en stries a été réalisé respectivement sur gélose MRS pour les bactéries lactiques et sur gélose nutritive pour les souches pathogènes. L'incubation est faite respectivement à 30°C pendant 48h à 72h et à 37 pendant 24h pour les souches pathogènes.

##### **1.2.1. Examen macroscopique**

Ce test consiste en une observation directe à l'œil nu des colonies obtenues sur milieux MRS solide et de la croissance sur milieux liquide. Il permet de nous renseigner sur l'aspect et la couleur des colonies sur milieu solide ainsi que leurs troubles dans le milieu liquide (**Badis et al., 2005**).

##### **1.2.2. Examen microscopique**

Cet examen permet de décrire la forme et le mode d'association des cellules des souches utilisées à l'aide d'une observation au microscope optique du frottis coloré avec la coloration de Gram (**Singleton, 1999**).

##### **1.2.3. Test de Catalase**

Elle est mise en évidence en émulsionnant une colonie à tester dans une solution fraîche d'eau oxygéné à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant traduit la décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de l'enzyme à tester. (Guiraud, 2003)

## 2. Activités antibactérienne des Huiles essentielles

Les six Huiles essentielles utilisées (Tableau II) ont été achetées par Mr YAHIAOUI ALLAOUA propriétaire de EURL Terroir Sahel, leurs activités antibactériennes a été évaluée sur deux souches pathogènes contaminant les denrées alimentaires et responsables de certaines infections ainsi que sur huit souches de Lactobacilles

**Tableau II** : Les Huiles essentielles des plantes testées

<b>Huile essentielle</b>	<b>Nom latin de plante</b>	<b>Provenance</b>	<b>Méthode d'extraction</b>
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Village Tabellout, Aokas	Entrainement à la vapeur d'eau
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>		
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>		
Sauge	<i>Salvia officinalis</i>		
Myrte	<i>Myrtus communis</i>		
Feuilles de mandarine	<i>Citrus reticulata</i>		

### Principe :

La méthode repose sur la diffusion d'un composé antimicrobien dans un milieu solide, généralement dans une boîte de Petri, créant ainsi un gradient de concentration après un certain temps de contact avec le microorganisme cible. L'effet du composé antimicrobien sur la cible est évalué en mesurant la zone d'inhibition, c'est-à-dire le diamètre de la zone sans croissance bactérienne autour du produit. En fonction de ce diamètre, la souche bactérienne est qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

### 2.1. Standardisation des inocula bactériens

Le but de cette étape est de pouvoir travailler avec une même charge bactérienne dans 1mL de culture durant toutes les étapes de l'étude. Afin d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches de *Lactobacillus*, d'*E.coli* et de *S.aureus*, une standardisation des inocula est réalisée comme suit :

Après un isolement sur gélose MRS et une incubation à 30°C pendant 48h, six colonies bien isolées de la souche sont repiquées dans 10 ml du bouillon MRS puis incubées à 30°C pendant 18 h. Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ). Un ml des dernières dilutions ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) sont ensemencés en masse dans la gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48 h. En parallèle la même standardisation est réalisée pour les souches pathogènes en prenant une colonie à partir d'une culture sur gélose nutritive de 24h dans de bouillon nutritif afin de réaliser les dilutions. Le dénombrement est réalisé sur gélose nutritive après une incubation de 24h à 37°C.

### 2.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir d'une culture par stries, des colonies du pathogène et des Lactobacilles ont été inoculées dans 10ml du bouillon nutritif et bouillon MRS respectivement puis incubées à 37°C pour le pathogène et à 30°C pour les lactobacilles pendant 24h. Au terme de l'incubation 1ml de chaque culture fraîche est transféré dans 9ml d'eau physiologique stérile, pour avoir une concentration bactérienne de  $10^6$  UFC/ ml pour *Escherichia coli* et pour *Staphylococcus aureus* et une concentration de  $10^8$  UFC/ml pour les lactobacilles (Lb1, Lb2, Lb3, Lb4, Lb5, Lb6, Lb7, Lb8)

### 2.3. Test d'Aromatogramme

- Ensemencer en masse 1ml de la suspension bactérienne des souches pathogènes séparément dans la gélose Muller Hinton (MHA). La même procédure est suivie pour les huit souches de Lactobacilles dans la gélose MRS.
- Des disques de papier Wattman stérilisés, d'un diamètre de 6 mm sont placés délicatement à la surface des boîtes de Petri préalablement ensemencés à l'aide d'une pince stérile et une quantité de 20ul d'huile essentielle est soigneusement versée sur les disques.

– Les boîtes de Petri sont conservées à 4 °C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des huiles essentielles à travers la gélose. Puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Pour les pathogènes et à 30°C pendant 48h pour les souches de Lactobacilles (**Anelo et al., 2016**)

### **2.4. Lecture**

La sensibilité des souches aux différentes huiles essentielles a été classée en fonction du diamètre des zones d'inhibition de la manière suivante :

- Non sensible ( ) pour les diamètres inférieurs à 8 mm
- Sensible (+) pour les diamètres compris entre 9 et 14 mm
- Très sensible (++) pour diamètres compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20 mm (**Ponce et al., 2003**).

### **2.5. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice CMI des huiles essentielles**

La CMI a été déterminé comme la concentration la plus faible de l'agent antibactérien qui inhibe la croissance bactérienne. C'est le paramètre le plus utilisé pour mesurer *in vitro* l'activité d'un antibiotique (**Belhadj et al., 2023**).

La détermination de la CMI est réalisée par la technique de micro dilution en milieu liquide, en utilisant une microplaque stérile de 96 puits (8 × 12 puits). Une gamme de concentration allant de 4% à 0,008%, a été préparée par la méthode de double dilution (Tableau III)

Déposer stérilement, 8µl de chaque l'HE, 2µl DMSO à raison de 1% et 190µl du Bouillon Nutritif stérile dans le puits 1. Ensuite déposer 100µl de (BN) stérile dans le puits 2 à 10. Pour les pathogènes. La même procédure est suivie avec le Bouillon MRS pour les souches de Lactobacilles.

Une série de dilutions d'un facteur 1/2 a été réalisée extemporanément dans les milieux liquides à partir de la solution mère du premier puits, par le transfert de 100µl de puits en puits jusqu'au puits N°10. A chaque dilution, le contenu du puits mélanger le contenu du puits.

Du fait du non miscibilité des HES à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion dans le DMSO a été réalisée afin de favoriser le contact germe/HE.

## *Matériels et méthodes*

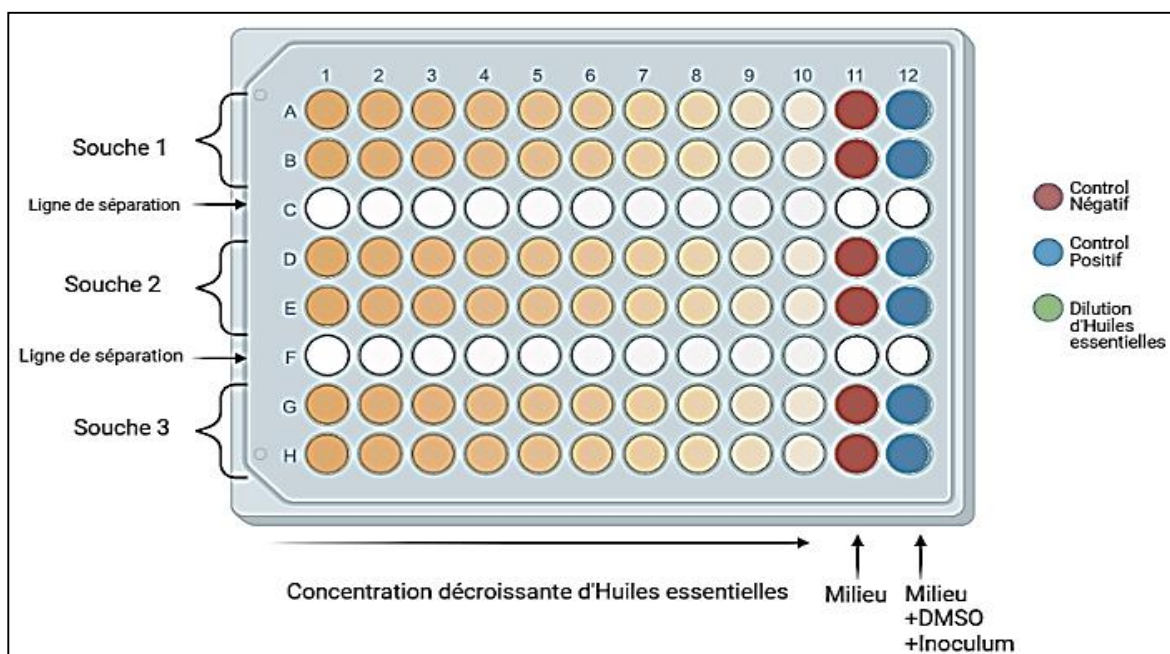
**Tableau III** : Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des huiles essentielles

	Puit1	Puit2	Puit3	Puit4	Puit5	Puit6	Puit7	Puit8	Puit9	Puit10
<b>Facteur de dilution d'HE</b>	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
<b>HE ul /ml</b>	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125

Enfin, déposer 100µl de l'inoculum préalablement dilué au 1/10 (environ 10<sup>6</sup> UFC/ml) dans chaque puits

La 11ème colonne de la plaque qui contient uniquement le milieu nutritif (200µl) sert de témoin négatif. Et la 12ème colonne qui contient 100µl du milieu et 92µl de l'inoculum et 8µl DMSO sert de témoin positif.

Les différents échantillons de bactéries ont été espacés par des lignes de puits vides, tous les essais ont été effectués en double (figure7)



**Figure 7** : Schéma de microplaque utilisée dans la détermination de la CMI des Huiles essentielles



Incubation de l'ensemble des Microplaques à 30°C pour les pathogènes et à 30°C pour les lactobacilles pendant 18h puis observation de la présence ou l'absence de croissance bactérienne à l'œil nu (apparition ou pas d'un trouble/dépôt)

En utilisant les critères de classification de **Puvaca et al., (2021)**

Une CMI < 100 µg/mL : activité élevée,

100 < CMI < 500 µg/mL activité active,

500 < CMI < 1000 µg/mL : activité modérément active,

1000 < CMI < 2000 µg/mL : activité faible,

CMI supérieur à 2000 µg/mL /inactif.

### 3. Activité antibactérienne des bactéries lactiques

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries lactiques est réalisée selon la méthode des puits. Cette technique consiste à mettre en contact le surnageant des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes avec les souches cibles.

#### 3.1. Standardisation des inocula bactériens

Après un isolement sur gélose MRS et une incubation à 30°C pendant 48h, six colonies bien isolées de la souche sont repiquées dans 10 ml du bouillon MRS puis incubées à 30°C pendant 18h. Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ). Un ml des dernières dilutions ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) sont ensemencées en masse dans la gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48 h. En parallèle, la même standardisation est réalisée pour les souches pathogènes en prenant 1 colonie à partir d'une culture sur gélose nutritive de 24h dans du bouillon nutritif afin de réaliser les dilutions. Le dénombrement est réalisé sur gélose nutritive après une incubation de 24h à 37°C.

#### 3.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures fraîches des deux souches pathogènes et celles des 8 souches de *Lactobacillus*, 1ml de chaque culture fraîche est transférée dans 9ml d'eau physiologique stérile, pour avoir une culture bactérienne de  $10^6$  UFC/ ml pour *Escherichia coli* et

*Staphylococcus aureus* et une culture de  $10^8$  UFC/ml pour les lactobacilles (Lb1, Lb2, Lb3, Lb4, Lb5, Lb6, Lb7, Lb8).

### **3.3. Préparation des surnageant natifs**

Les bactéries lactiques ont été repiquées dans du bouillon MRS et incubées pendant 24 Heures à 30°C. Après incubation, les cultures ont été soumises à une centrifugation à 8000 tr/min pendant 20 min à 4°C, ensuite le surnageant a été récupéré et filtré à l'aide d'un filtre à seringue (0,45µm).

### **3.4. Test des puits**

On a utilisé des boîtes de Petri contenant une fine couche de gélose nutritive, recouvertes de 10 ml de gélose Muller Hinton en surfusion préalablementensemencée avec 1 ml de chaque souche cible (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) à une concentration de  $10^7$  UFC/ml. Une fois la gélose solidifiée, des puits de 5 mm ont été creusés de manière stérile et remplis avec 100µl de chaque surnageant. Les boîtes ont été placées à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées à 37°C pendant 24 heures (**Kesen et Aiyegoro, 2018**).

### **3.5. Lecture des résultats**

Les puits entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive. (**Guessas, 2007**).

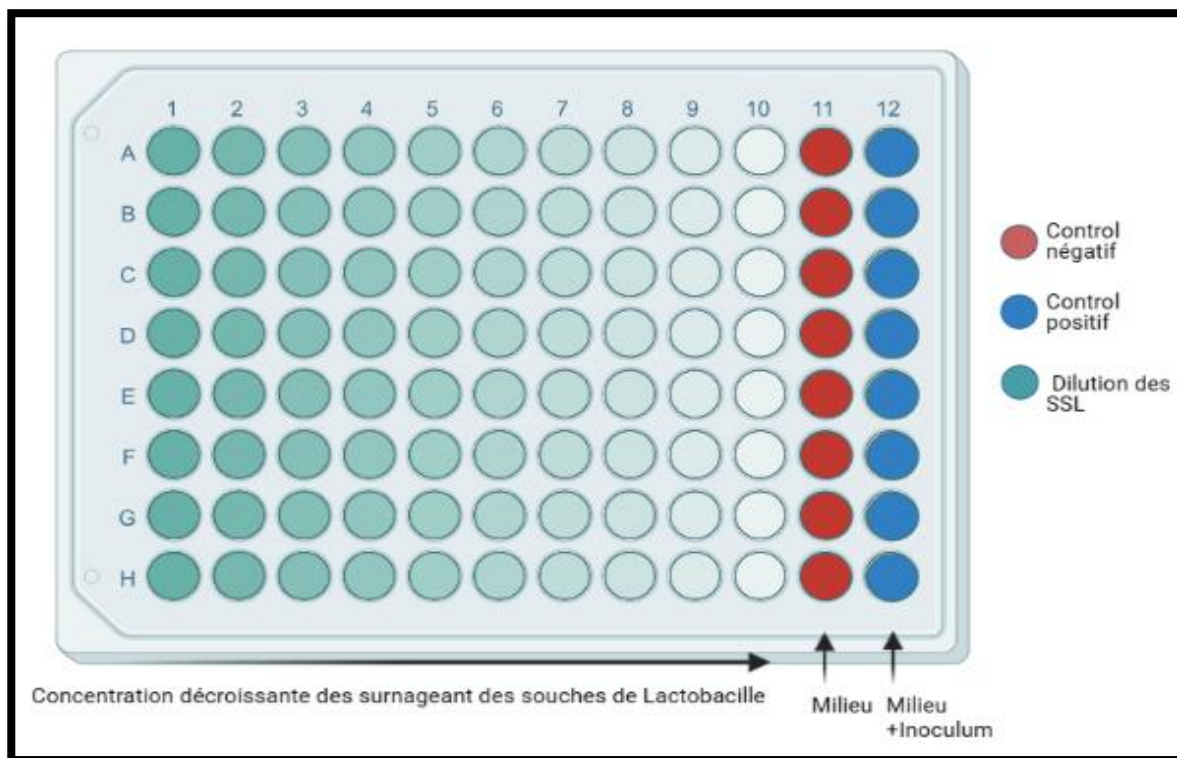
### **3.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des surnageants natifs sur les souches pathogènes**

La détermination des CMI des surnageants a été également déterminée selon la méthode de micro dilution en milieu liquide et selon le protocole suivant (figure8) :

Déposer stérilement, 110µl de chaque surnageant et 90µl du Bouillon Nutritif stérile dans le puits 1. Ensuite déposer 100µl de (BN) stérile dans le puits 2 à 10.

Une série de dilution d'un facteur 1/2 a été réalisée extemporanément dans le milieu liquide à partir de la solution mère du premier puits, par le transfert de 100µl de puits en puits jusqu'au puits 10 (les 100µl du dernier puits sont jeté). Une gamme de concentration allant de 55% à 0,4296% a été générée (TableauIV)

En dernier, 100µl de l'inoculum préalablement dilué au 1/10 ( $10^6$  UFC/ml) ont été déposés dans chaque puits. (**Dopazo et al., 2023**)



**Figure 8 :** Schéma de la microplaque utilisée dans la détermination des CMI des surnageants natifs des souches de Lactobacilles.

**Tableau IV:** Valeurs des dilutions utilisées dans la détermination des CMI des surnageant natifs des souches de Lactobacilles

	<b>Puit1</b>	<b>Puit2</b>	<b>Puit3</b>	<b>Puit4</b>	<b>Puit5</b>	<b>Puit6</b>	<b>Puit7</b>	<b>Puit8</b>	<b>Puit9</b>	<b>Puit10</b>
<b>Facteur de dilution du surnageant</b>	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
<b>Surnageant ul /ml</b>	550	275	137,5	68,5	34,375	17,187	8,593	4,296	2,148	1,074

Incubation de l'ensemble des Microplaques à 37°C pendant 18h puis observation de la présence ou l'absence de croissance bactérienne à l'œil nu (apparition ou pas d'un trouble/dépôt)

#### **4. Etude de l'effet antibactérien combiné des huiles essentielles avec les surnageants natifs des lactobacilles**

Dans cette étude, nous avons également réalisé les mêmes étapes expliquées précédemment pour évaluer l'effet combiné des surnageants des huit souches de bactéries lactiques et des six huiles essentielles sur les souches bactériennes par la méthode d'aromatogramme.

Des disques de papier Whattman stériles ont été imprégnés avec un mélange composé de 50% d'huiles essentielles et de 50% du surnageant de chaque souche de Lb.

Ces méthodes ont permis d'évaluer l'effet synergique des souches de Lb et des huiles essentielles sur les souches bactériennes étudiées.

D'après **Pibiri (2005)**, il existe quatre effets antimicrobiens de l'association des HEs,

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

##### **4.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des Huiles essentielles combinés au surnageant natifs des Lactobacilles**

La méthode de dilution de damier est utilisée pour la détermination des effets antimicrobiens de combinaisons sélectionnées d'HEs et des surnageant des souches lactiques. La mise en évidence est effectuée par dilution des HEs et les surnageants dans une orientation verticale, horizontale, respectivement (figure 9).

Huit concentrations ont été préparées pour chaque substance : cinq concentrations inférieures à la valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI), une égale à la valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et deux concentrations supérieures à la valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les plaques sont ensuite inoculées avec les solutions de pathogènes (100µL d'inoculum par puits) selon le même protocole que pour le test de micro dilution. Les microplaques inoculées sont incubées à une température de 37°C pendant 18 heures et la croissance bactérienne est évaluée par observation à l'œil nu et le calcul des indices

## Matériels et méthodes

concentration inhibitrice fractionnaires (ICIF) pour l'évaluation des effets antimicrobiens (Fahed, 2016 ; Ehsani et al., 2019)

L'indice de concentrations inhibitrices fractionnaires (ICIF) de l'association a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

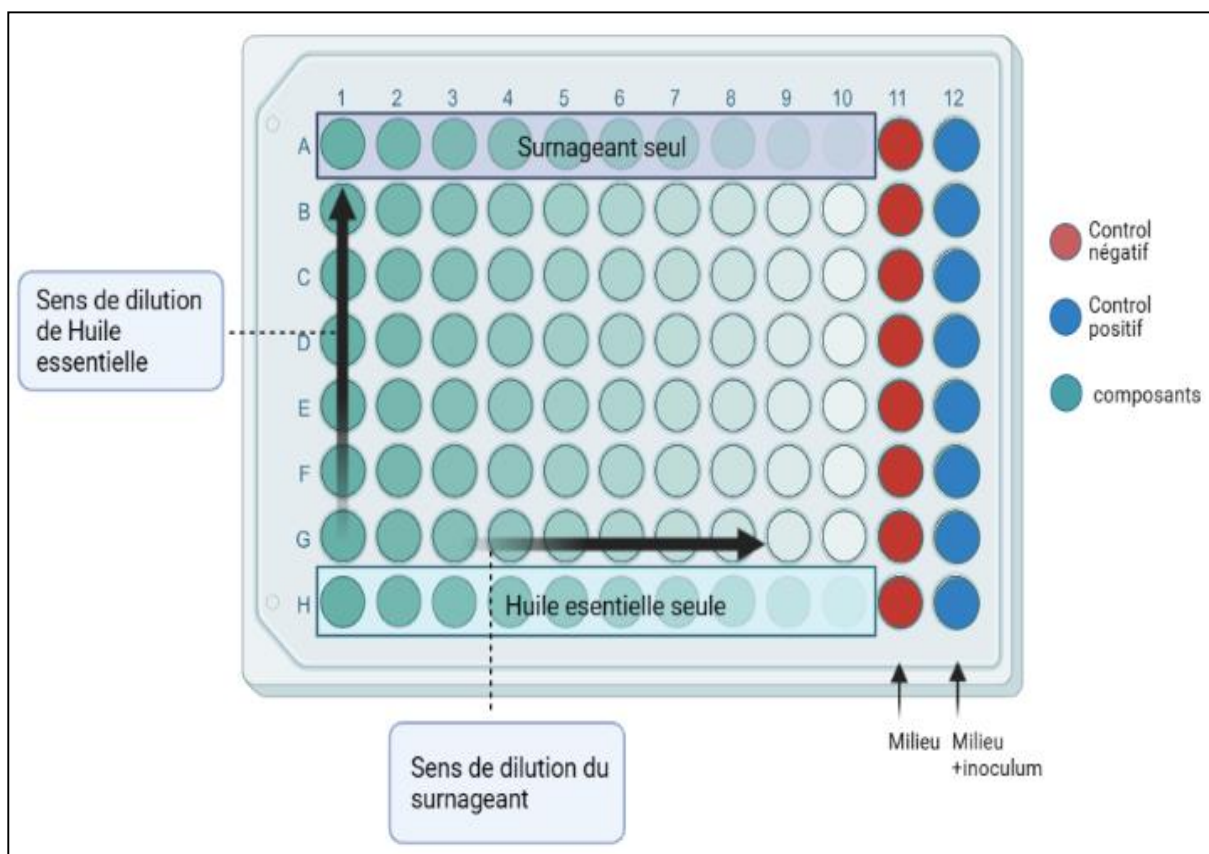
$$ICF = ICF(A) + ICF(B)$$

$$ICF(A) = (CMI \text{ de la combinaison} / CMIA)$$

$$ICF(B) = (CMI \text{ de la combinaison} / CMIB).$$

Le résultat est interprété par Ehsani et al., (2019) comme suit :

- ICF  $\leq$  0,5 : association synergique
- 0,5 < ICF < 1 : association additif
- 1 < ICF < 4 : absence d'association
- ICF > 4 : association antagoniste.



**Figure 9 :** Schéma de microplaque utilisée dans la détermination des CMI de la combinaison de l'huile essentielle et surnageant natif vis-à-vis des souches pathogènes

## *Résultats et discussions*

## 1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes

Le repiquage successif des cultures bactériennes pathogène et lactique) sur leurs bouillons de culture respective (GN et MRS) ont permis d'obtenir une bonne croissance. Les caractères Morphologiques des souches étudiées observés après la coloration différentielle de Gram sont Représentés dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Caractères morphologiques des souches bactériennes testées

<b>Souches bactérienne</b>	<b>Catalase</b>	<b>Gram</b>	<b>Aspect</b>
<i>E. coli</i>	Catalase positif	Négatif	Cocco-bacille
<i>S. aureus</i>	Catalase positif	Positif	Cocci en grappe de raisin
<b>Lactobacilles</b>	Catalase négatif	Positif	Bacilles

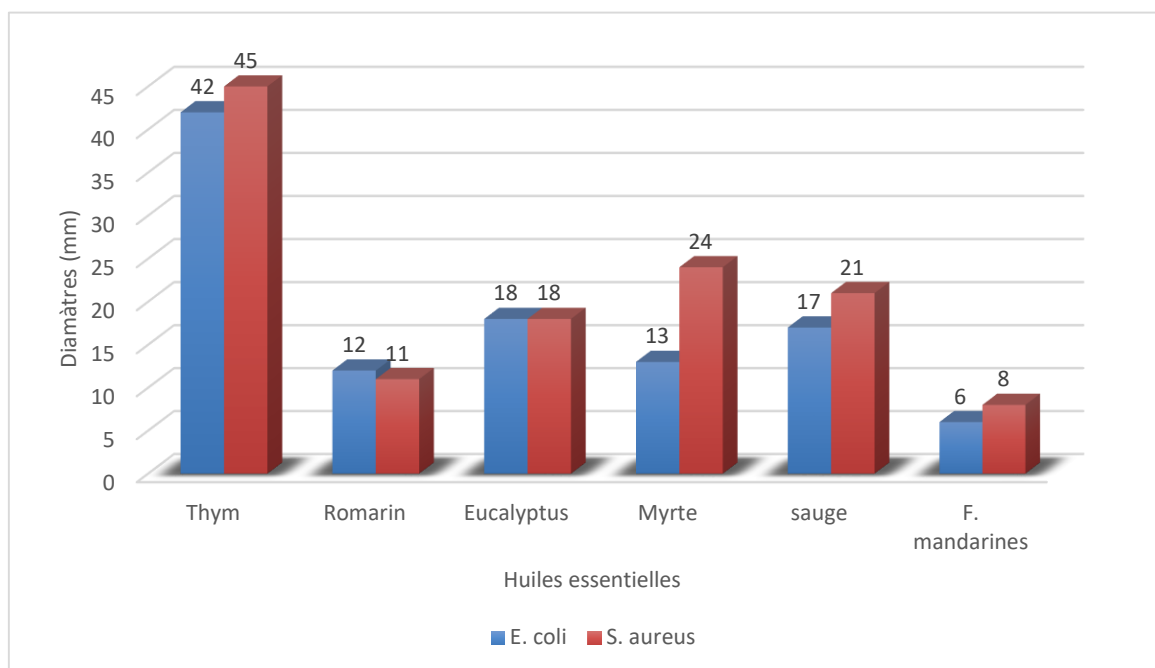
## 2. Résultats de l'Activité antibactérienne des Huiles essentielles par aromatoigramme

### 2.1. Standardisation

Les résultats de la standardisation des inocula ont permis de donner un inoculum de  $10^8$  UFC/ml pour les bactéries pathogènes et  $10^9$  UFC/ml pour les bactéries lactiques.

### 2.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des six Huiles essentielles a été évaluée sur deux souches microbiennes (*E. coli* et *S. aureus*) et sur huit souches de Lactobacilles (Lb1, Lb2, Lb3, Lb4, Lb5, Lb6, Lb7, Lb8) par la méthode de diffusion sur gélose sont résumés dans la figure 10

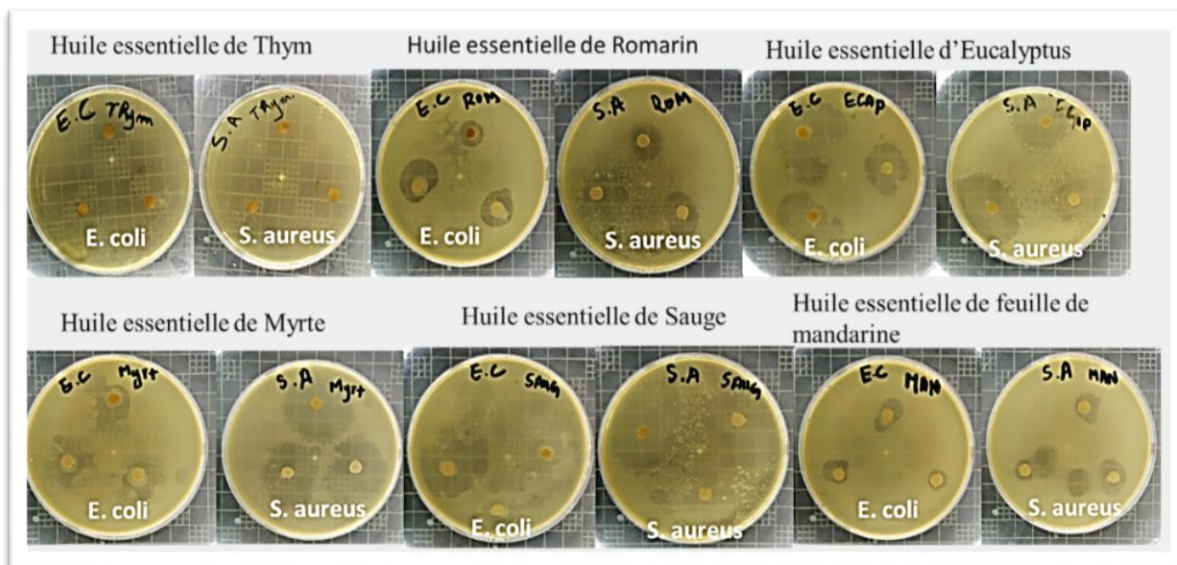


**Figure 10 :** Représentation graphique de l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées vis-à-vis des souches pathogènes

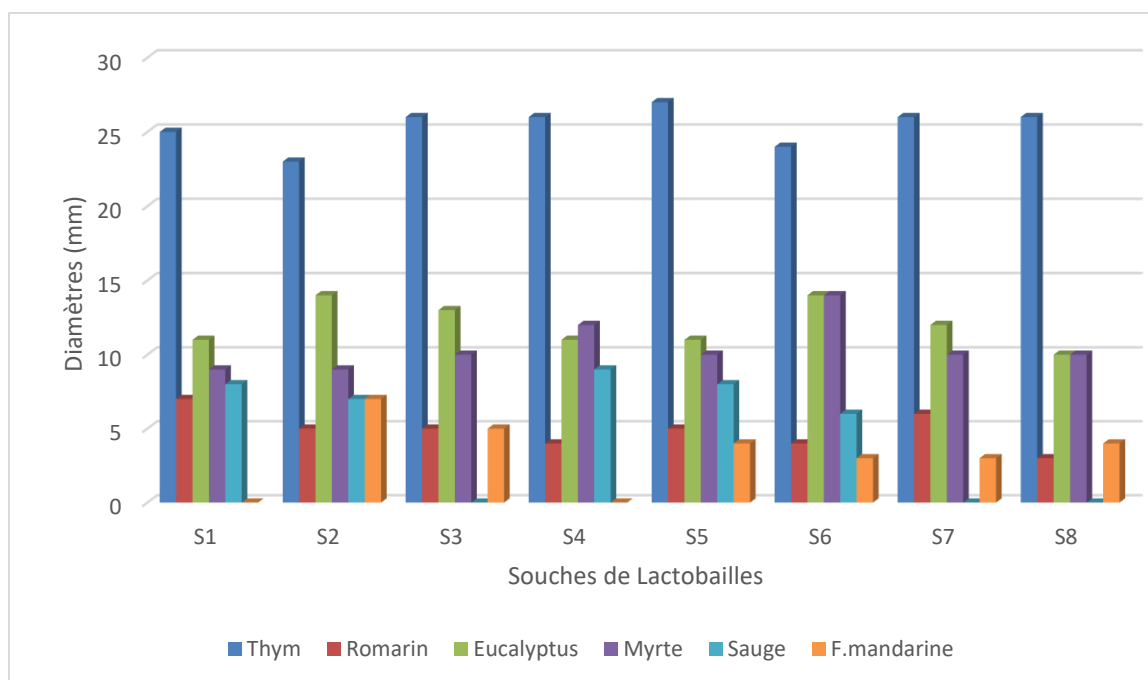
D'après les figures 10 et 11, toutes les souches bactériennes ont montré une sensibilité aux différentes huiles essentielles, mais la taille de la zone d'inhibition variait en fonction de l'HE utilisée et de la souche bactérienne. L'huile essentielle pure de *Thymus* a présenté une forte activité antibactérienne, inhibant complètement la croissance des deux souches. L'huile essentielle de *Myrtus* a montré une activité plus importante sur *S. aureus* que sur *E. coli*, indiquant une plus grande sensibilité de *S. aureus* à cette HEs. L'HEs d'*Eucalyptus* a montré des zones d'inhibition similaires pour les deux souches. L'HEs de sauge a inhibé la croissance des deux souches, mais *S. aureus* s'est révélé plus sensible que *E. coli*. Les zones d'inhibition de l'HE de *Rosemarinus* étaient proches pour les deux souches, tandis que l'HEs de *Citrus* avait une activité inhibitrice plus faible. Dans l'ensemble, l'extrait de *Thymus* a montré la plus grande activité inhibitrice, suivi par les HE de *Myrtus*, *Salvia* et *Eucalyptus*, tandis que *Rosemarinus* et *Citrus* avaient des activités inhibitrices plus faibles. Les deux souches bactériennes, *E. coli* (Gram-) et *S. aureus* (Gram+), étaient sensibles aux huiles essentielles, Mais *S. aureus* était plus sensible que *E. coli*.



## Résultats et discussion



**Figure 11** : Photographies de la sensibilité des souches bactérienne pathogènes référenciées vis-à-vis des huiles essentielles utilisées



**Figure 12** : Représentation graphique de l'activité antibactérienne des six huiles essentielles testées sur les huit souches de lactobacilles

Selon les résultats de la figure 12 et 13, les huit souches de Lactobacilles présentent des sensibilités différentes aux différentes huiles essentielles utilisées. L'HEs de *Thymus* a montré une forte activité antibactérienne sur toutes les souches, avec des zones d'inhibition allant de 23 mm à 27 mm, indiquant une sensibilité élevée de ces souches à cette huile. En

## Résultats et discussion

revanche, l'HEs de *Rosemarinus* a une activité inhibitrice légère sur les huit souches, avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 3 mm à 7 mm, ce qui suggère un potentiel de résistance élevé de ces souches à cette huile. Les souches de Lactobacilles sont sensibles à l'activité inhibitrice de l'HEs d'*Eucalyptus*, avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 10 mm à 14 mm. L'HEs de *Myrtus* a également montré une activité antibactérienne contre toutes les souches de Lactobacilles, avec des diamètres de zones d'inhibition variant de 9 mm à 14 mm. En revanche, l'HEs de *Salvia* n'a montré aucune activité inhibitrice contre certaines souches et une activité très faible contre les autres, indiquant une résistance de ces souches à cette huile. L'HEs de *Citrus* a montré des zones d'inhibition minimales sur certaines souches et aucune zone d'inhibition sur d'autres, indiquant une absence d'activité antibactérienne. En conclusion, l'HEs de *Thymus* présente la plus grande activité inhibitrice sur les souches de Lactobacilles, suivie de l'HEs d'eucalyptus, myrte et romarin quant au HEs de sauge et F.mandarines ont présente aucune activité antibactérienne



**Figure 13 :** Photographies de l'activité antibactérienne des six huiles essentielles testées sur les huit souches de lactobacilles

Nos résultats étaient similaires à ceux trouvées **En 2022 par Galgano** et son équipe qui ont mené une étude in vitro pour évaluer l'activité antibactérienne de différentes huiles essentielles telles que *Citrus lemon*, *Pinus sylvestris*, *Foeniculum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, et *Zingiber officinalis* à différentes concentrations (de 1,25 % à 40 % v/v) contre des souches d'*E. coli* et de *S. aureus*. Les résultats ont montré un effet dose-dépendant des HEs sur la croissance des bactéries Gram-négatives, tandis que la plupart d'entre elles ont présenté un effet bactéricide sur les bactéries Gram-positives, à l'exception de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* qui n'était pas liée à sa concentration. Même à de faibles concentrations, une inhibition complète de la croissance des deux souches d' *E. coli* a été observée.

Une autre étude réalisée par **Puvaca et al., (2021)** visait à évaluer l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles de l'arbre à thé, du romarin, de l'eucalyptus et de la lavande contre différentes bactéries pathogènes, notamment *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhi* et *C. koseri*. Les résultats ont montré que le romarin, l'eucalyptus et la lavande présentaient une activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *S. Typhi*, mais aucune activité contre *E. coli* ou *C. koseri*. Seule la souche *S. aureus* ATCC 25923 a montré une sensibilité au romarin, à l'eucalyptus et à la lavande.

Une étude plus récente menée par **Bowbe et al., (2023)** a évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Myrtus communis*, ainsi que de leur combinaison contre *S. aureus* ATCC 25923. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été mesurées pour chaque agent, avec une CMI de 11,25 mg/mL pour l'huile essentielle de romarin, 0,7 mg/mL pour l'huile essentielle de myrte et 5,63 mg/mL pour la combinaison des deux. Toutes les substances testées ont démontré une activité inhibitrice contre *S. aureus*, avec des concentrations minimales nécessaires pour inhiber la croissance bactérienne.

Dans l'étude menée par **Saeb et al., (2016)** qui visait à évaluer l'activité antimicrobienne des huiles et extraits *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus grandis* contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* *Salmonella typhi*. Les huiles essentielles de *C. grandis* ont montré une activité significative contre les quatre pathogènes, tandis que les huiles essentielles de *C. limon* et *C. reticulata* étaient efficaces contre *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis*. De plus, les huiles essentielles de *C. grandis* étaient plus actives contre les bactéries Gram négatives (comme *E. coli* et *S. typhi*) que contre les bactéries Gram

positives (comme *S. aureus* et *B. subtilis*). Les huiles essentielles de *C. limon* ont montré une activité antibactérienne significativement plus élevée contre les bactéries Gram positives que contre les bactéries Gram négatives.

### 3. Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles

Les valeurs des CMI des cinq huiles essentielles testées sont déterminées lors de l'utilisation de la technique de micro-dilution sur milieu de culture liquide sont illustrées dans le tableau. Il ressort que les des huiles essentielles extraites de Thym ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches bactériennes pathogènes testées avec des faibles valeurs de CMI (Annexe IV)

Les CMI obtenues avec l'HEs de Thym sont de 10ul/ml pour *E. coli* et 1.25 ul/ml pour *S. aureus*, suivis de l'huile essentielle de Myrte avec des CMI de 40ul/ml pour *E. coli* et 10ul/ml pour *S. aureus*, vient l'huile essentielle d'Eucalyptus avec des CMI de 40ul/ml et 20ul/ml sur *E. coli* et *S. aureus* respectivement

Les CMI obtenues avec les HEs de Romarin et Saugé sont élevé pour les deux souches bactériennes testées, elles sont de 40ul/ml (tableau VI)

**Tableau VI:** Résultats des CMI des cinq huiles essentielles testées sur les deux souches bactériennes pathogènes

	CMI des Huiles essentielles en (ul/ml)				
HE Souches	Thym	Romarin	Eucalyptus	Myrte	Saugé
<i>E. coli</i>	10	40	40	40	40
<i>S. aureus</i>	1,25	40	20	10	40

Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles extraites de Thym, Myrte et Eucalyptus ont présenté des faibles valeurs de CMI vis-à-vis de *S. aureus* allant de 1.25, 10, 20 ul/ml respectivement, contrairement à *E. coli* qui nécessite des CMI plus élevées pour produire le même effet.

## Résultats et discussion

---

En revanche Les valeurs des CMI des cinq huiles essentielles testées sur les huit souches de Lactobacilles n'ont pas été déterminées (Annexe III), en effet il a été observé l'apparition d'un dépôt au fond de tous les puits à différentes concentrations, ceci ressort que les des huiles essentielles utilisées n'ont montré aucune activité antibactérienne avec les même concentration testées sur les souches pathogènes, ce qui signifie que les souches de Lactobacilles nécessitent des CMI plus élevées pour produire le même effet attendu sur les souches pathogènes

D'après ces résultats on constate que les souches de Lactobacilles sont plus résistantes aux huiles essentielles utilisées que les souches pathogènes.

Nos résultats sont cohérents avec Une étude menée par **Ouwehand et al., (2010)** qui visait à évaluer l'effet de 13 huiles essentielles, y compris l'huile de romarin et de thym, sur différentes souches bactériennes, dont trois sérotypes de *Salmonella enterica*, trois souches de *Clostridium perfringens*, *Streptococcus epidermis*, *Lactobacillus reuteri*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*, *B. longum*, *B. breve* et *Escherichia coli* (K88+). Les huiles essentielles (HE) ont montré des effets sur *Escherichia coli* ainsi que sur *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus fermentum*, *E. coli* s'est révélé sensible à la plupart des HEs testées, y compris à des concentrations plus faibles (5 et 50 mg/l). En ce qui concerne *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus fermentum*, ces espèces étaient moins sensibles à la plupart des HEs testées, bien que certaines HEs à des concentrations plus faibles (5 et 50 mg/l) aient montré une certaine inhibition de leur croissance. Il est donc important de noter que les huiles essentielles peuvent avoir une influence modérée sur la croissance de *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus fermentum*, tandis qu'elles ont démontré une plus grande efficacité contre *Escherichia coli*.

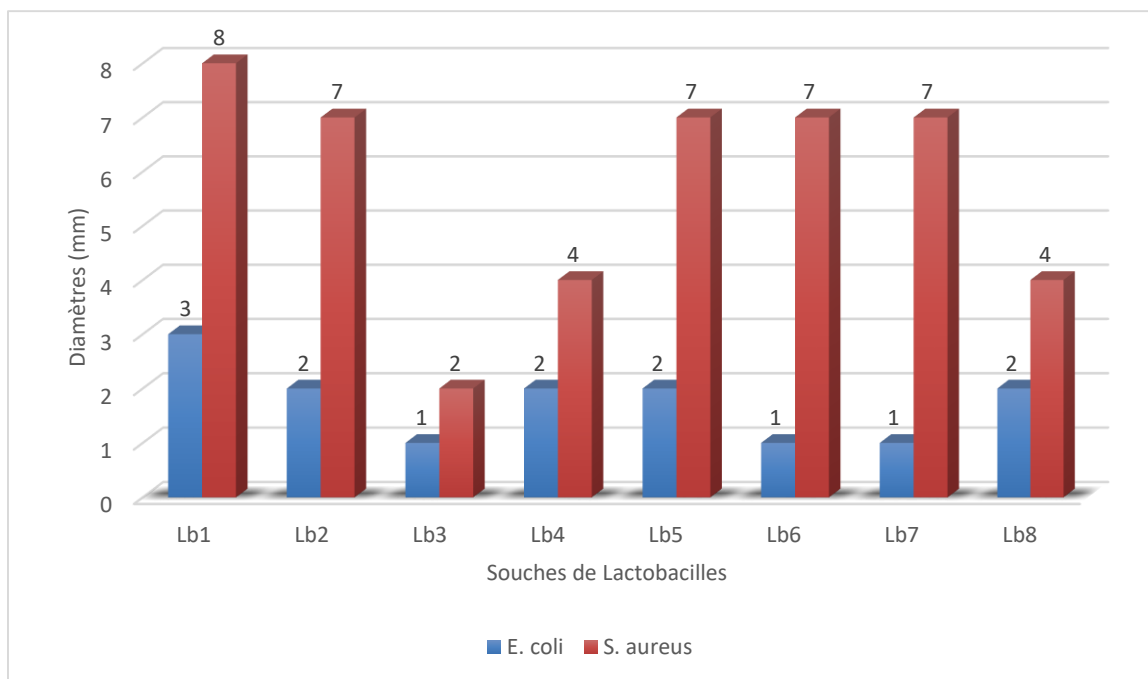
Une autre étude menée par **Roldán LP et al., (2010)** qui a évalué l'activité antibactérienne de six huiles essentielles extraites de plantes cultivées dans les Andes colombiennes : *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus vulgaris*. La concentration bactéricide minimale (MBC) a été mesurée contre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium breve* en utilisant la méthode de dilution en gélose. Les huiles d'*Origanum vulgare* et de *Thymus vulgaris* ont démontré une forte activité antibactérienne avec une faible MBC ( $MBC \leq 5$  mg/ml) contre toutes les bactéries testées, y compris les micro-organismes bénéfiques. En revanche, l'huile de basilic a montré une

activité plus marquée contre les bactéries pathogènes (MBC  $\leq$  10 mg/ml) par rapport aux bactéries bénéfiques (MBC de 80 mg/ml). Ces résultats soulignent que le potentiel antimicrobien des huiles essentielles dépend à la fois de leur composition chimique et de l'espèce bactérienne ciblée

Dans une étude récente menée par **Sidiropoulou et ses collègues en 2022**, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de thym, d'origan et de sauge sur *E. coli*, *S. aureus* et *Lactobacillus fermentum* a été évaluée. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de thym a présenté une activité inhibitrice élevée contre *S. aureus* et *E. coli*, tandis que l'huile essentielle de sauge a montré la plus faible activité inhibitrice en raison de sa concentration en carvacrol relativement faible. Pour *Lactobacillus fermentum*, l'HEs de thym a montré une inhibition similaire à celle de l'huile essentielle d'origan. En termes de valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (MBC) l'HE de thym a montré les meilleures valeurs de CMI et CMB contre *S. aureus*, En revanche, l'huile essentielle de sauge n'a pas présenté d'effet significatif. Pour les souches *E. coli* et *L. fermentum*, l'huile essentielle d'origan a obtenu les meilleurs résultats, tandis que l'huile essentielle de sauge a montré des effets antimicrobiens plus marqués sur *E. coli* que sur *S. aureus* et *L. fermentum*. Cependant, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de sauge s'est avérée inférieure à celle des deux autres huiles essentielles.

#### **4. Résultats de l'activité antibactérienne des surnageant natifs des bactéries lactiques**

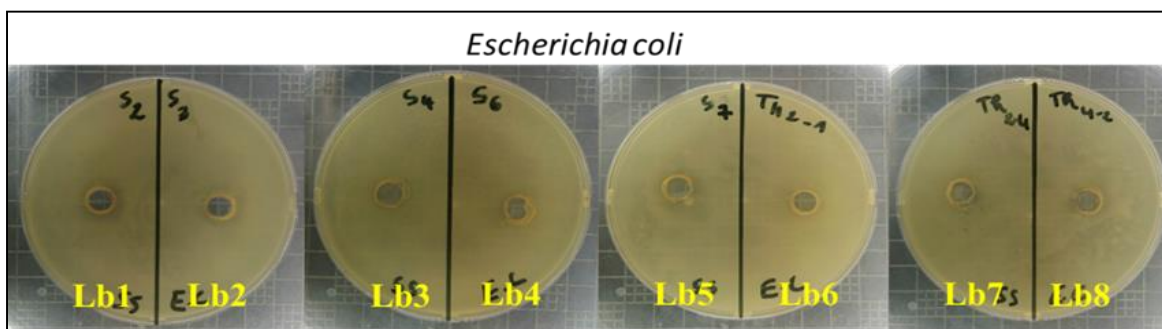
L'activité antimicrobienne des huit souches de Lb a été évaluée sur deux souches microbiennes (*E. coli* et *S. aureus*) par la méthode de diffusion sur gélose.



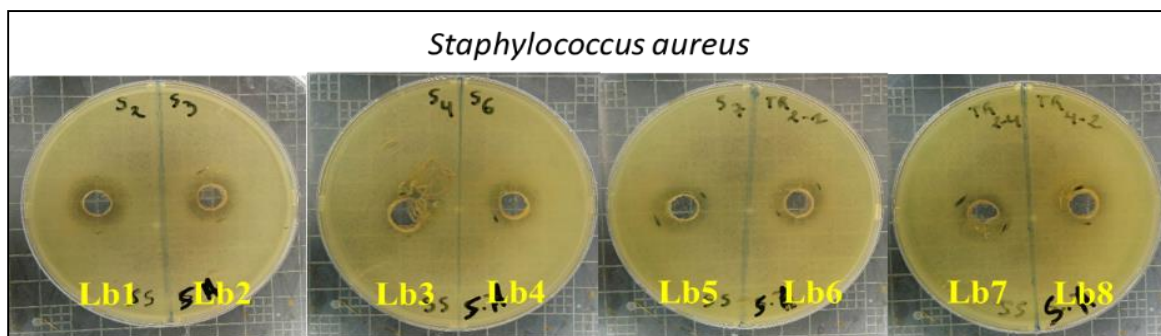
**Figure 14 :** Représentation graphique de la sensibilité des deux souches bactérienne vis-à-vis des souches de Lactobacilles testées

Les résultats obtenus (Annexe V), ont montré que toutes les souches ont été efficaces contre les bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives testées (figure 14). Les diamètres des zones d'inhibition varient entre les souches, une zone d'inhibition maximale était de 8 mm avec *S. aureus* par le surnageant de la souche Lb2 et le diamètre minimal observé contre *E. coli* à 1 mm par les surnageant des souches Lb3, Lb6 et Lb7.

D'après ces résultats (figure 15 et 16) les surnageant des souches lactiques possèdent un haut spectre d'action contre *Staphylococcus aureus*, alors qu'elles présentent à un faible spectre d'action par rapport à *Escherichia coli* qui est plus résistante



**Figure 15 :** Photographies présentant la sensibilité de *E. coli* vis-à-vis des surnageant des souches lactiques



**Figure 16 :** Photographies présentant la sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis des surnageant des souches lactiques

### 5. Résultats de la concentration minimale inhibitrice des surnageant des souches de Lactobacilles sur les souches pathogènes

Les valeurs des CMI des huit souches de Lactobacilles testées sont déterminées lors de l'utilisation de la technique de micro-dilution sur milieu de culture liquide et les résultats des microplaques sont illustrés dans les tableaux suivant :

**Tableau VII :** Effet des différentes concentrations des surnageant de souches lactiques sur *Staphylococcus aureus* sur microplaque.

Puits S.souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-	T+
Lb1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lb8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

(-): Absence de dépôt (+): Présence de dépôt



## *Résultats et discussion*

**Tableau VIII :** Effet des différentes concentrations des surnageant de souches lactique sur *Escherichia coli* sur microplaque.

Puits S .souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-	T+
<b>Lb1</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb2</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb3</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lb4</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb5</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb6</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb7</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Lb8</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

(-): Absence de dépôt (+): Présence de dépôt

La croissance de différentes souches des bactéries a été influencée par les concentrations des surnageant testées. Les puits ne présentent pas de dépôts et d'un aspect clair indiquent une inhibition totale de croissance bactérienne. En revanche les puits présentent une croissance microbienne indiquent que le surnageant des souches lactiques n'a pas un effet sur la croissance des bactéries à la concentration testée. (Annexe VI)

La méthode de microplaque nous a permis de déterminer les valeurs de concentrations minimales inhibitrices lors de la lecture grâce aux troubles de croissance bactérienne. Les résultats sont présentés dans le tableau IX

Il ressort que les souches Lb2 et Lb3 ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches bactériennes pathogènes testées avec une valeur de CMI=137,5(ul/ml). .

## Résultats et discussion

**Tabelau IX** : CMI des surnageant de huit souches de Lactobacilles sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (ul/ml).

Surnageant Microorganisme	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4	Lb5	Lb6	Lb7	Lb8
E. coli	275	137,5	137,5	275	275	275	550	550
S. aureus	137,5	137,5	137,5	137,5	275	275	275	275

Il est accepté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice contre de multiple microorganismes entéropathogènes (**Drago et al., 1997**).

Parmi les bactéries indicatrices testées, *Staphylococcus aureus* a été la plus sensible envers l'action inhibitrice des souches de *Lactobacillus*.

Divers facteurs peuvent être impliqués dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, parmi ces facteurs la concurrence pour les nutriments, la diminution du pH suite à la production d'acides organiques notamment l'acide lactique et acétique, en plus de la production de divers composés tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est connu comme l'agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques particulièrement celle des lactobacilles, le diacétyle (2,3-butanedione) qui est plus actif quand le pH du milieu est inférieur à 7 (**Salminen et al., 2004**), des substances avec une action bactéricide ou bactériostatique y compris les bactériocines et les bactériocine-like. (**Ammor et al., 2006; tulumoglou, 2013**).

**Messi et al., (2001)** ont rapporté les *Lactobacillus plantarum* pouvaient produire des bactériocines, De même, **Lash (2005) et Millette et al., (2007)** ont décrit une bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* qui inhibait *S.aureus*, *E. coli*, et *P.aeruginosa*. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à effet probiotique sont capables d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes in vivo et in vitro (**Lin et al., 2007; Mahdhi et al., 2010**).

D'après le tableau nous constatons que les surnageant de huit souches lactiques sont actives envers les souches testées, avec des valeurs de CMI qui sont : 137,5 pour *S. aureus* ATCC 1253, et *E. coli* ATCC 1825,

Les résultats obtenus sont très différents et présentent une inhibition contre la souche pathogène *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. On remarque que cette inhibition est très faible à cause de la faible concentration de surnageant par rapport à la concentration de bactéries pathogènes.

Ceci suggère que les propriétés de Lb fonctionnement permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine (Maghnia, 2011).

Par contre Menad, (2017) montre que les souches *Lactococcus lactis subsp lactis* ont une inhibition totale de la souche pathogène (*Staphylococcus aureus*) mais pour les autres dilutions (*Lactococcus lactis subsp cremoris*) on a noté que l'effet inhibiteur est nul alors que les dilutions (*Lactobacillus plantarum*) ont un effet d'inhibition faible.

Evivie et al., (2020) ont observé que le surnageant de la culture bactérienne de la souche *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* KLDS 1.0207, obtenu après filtration et élimination des cellules exerce un effet inhibiteur contre les pathogènes *Escherichia coli* ATCC25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Abdel-Bar et al., (1987) ont mis en évidence que le surnageant des cultures de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* contenait une substance antibiotique qui inhibait la croissance de *Pseudomonas frugi* et *Staphylococcus aureus*; différente de l'acide lactique, non polypeptidique, de poids moléculaire  $\leq 700$ , stable jusqu'à 1h à une température de 100 °C et qui possède dans sa structure un noyau aromatique.

Evivie et al., (2020) ont également démontré que le surnageant de culture d'une souche de *S. thermophilus*, la KLDS 3.1003 inhibe aussi *Escherichia coli* ATCC25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923, une analyse génomique faite par ces chercheurs a montré que cette bactérie possède des peptides codant pour de la bactériocine ce qui explique l'effet antimicrobien observé.

## 6. Résultats de L'effet combiné des huiles essentielle avec les surnageant natifs des bactéries lactiques

L'objectif de la présente étude est de déterminer le pouvoir antibactérien des effets synergiques ou antagonismes entre les cinq huiles essentielles avec les surnageant des huit bactéries lactiques présentant une activité antibactérienne détecté par le test d'aromatogramme, le résultat de cette combinaison est illustré dans les figures suivantes :

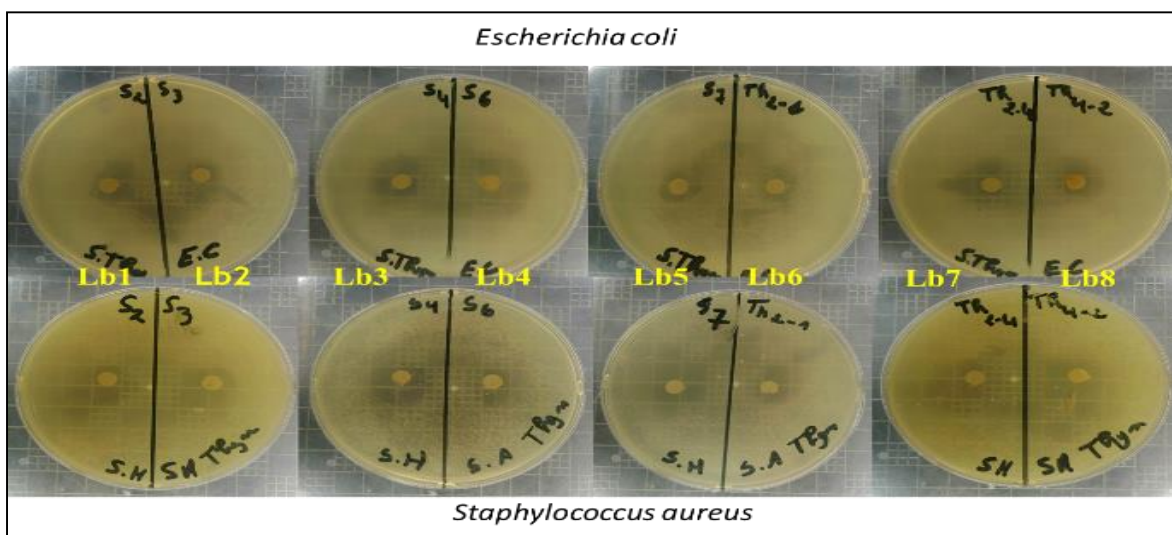


Figure 17 : Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de thym avec les surnageant natifs

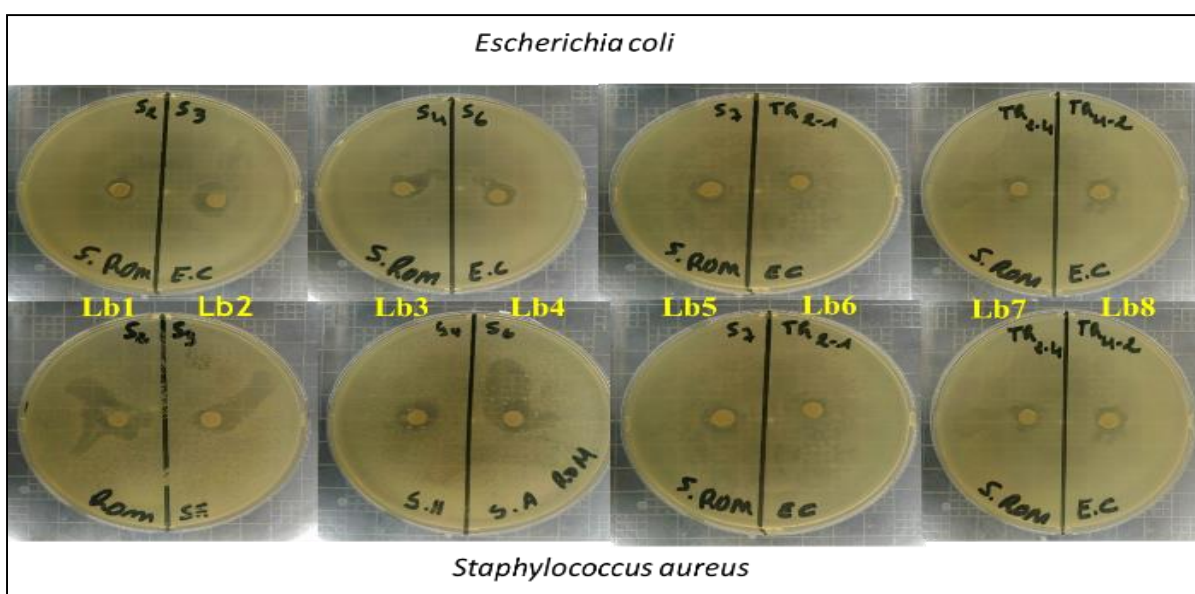
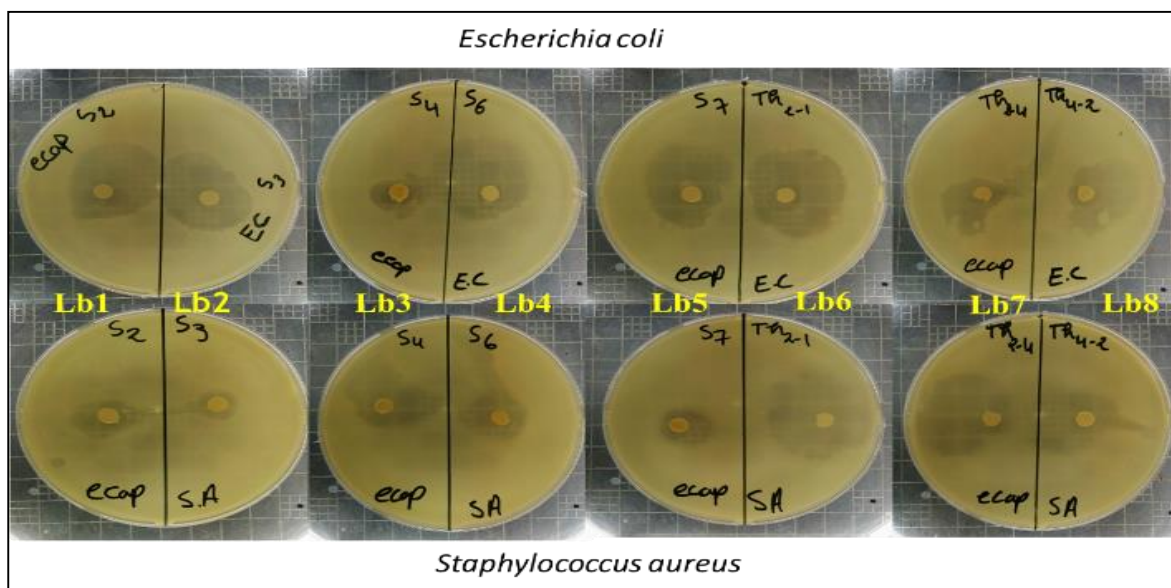
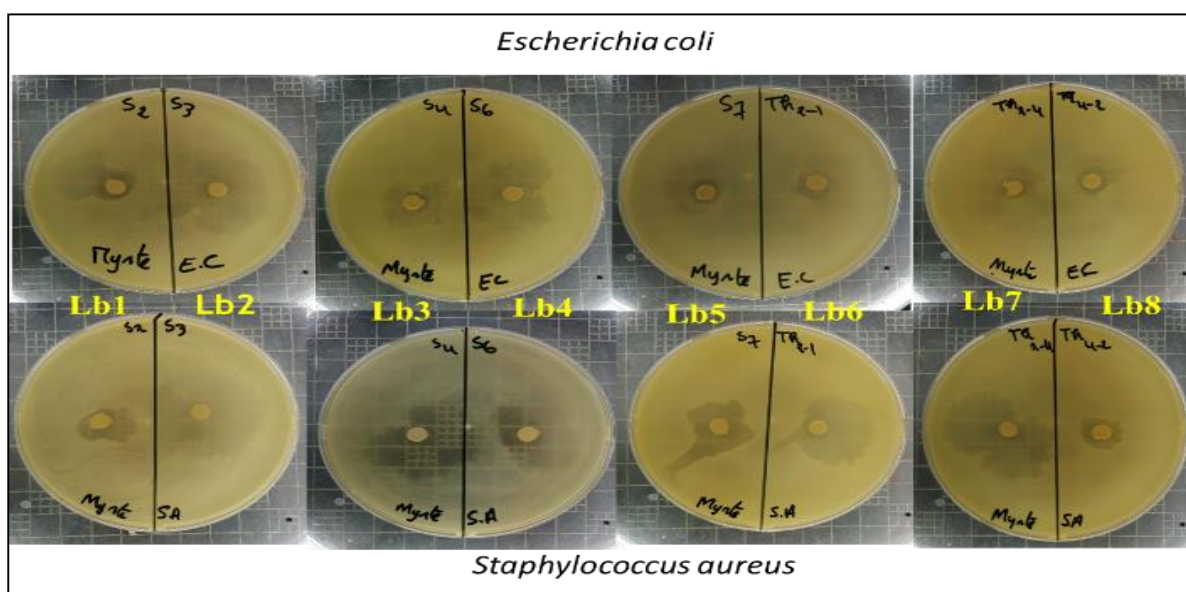


Figure 18 : Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de romarin avec les surnageant natifs

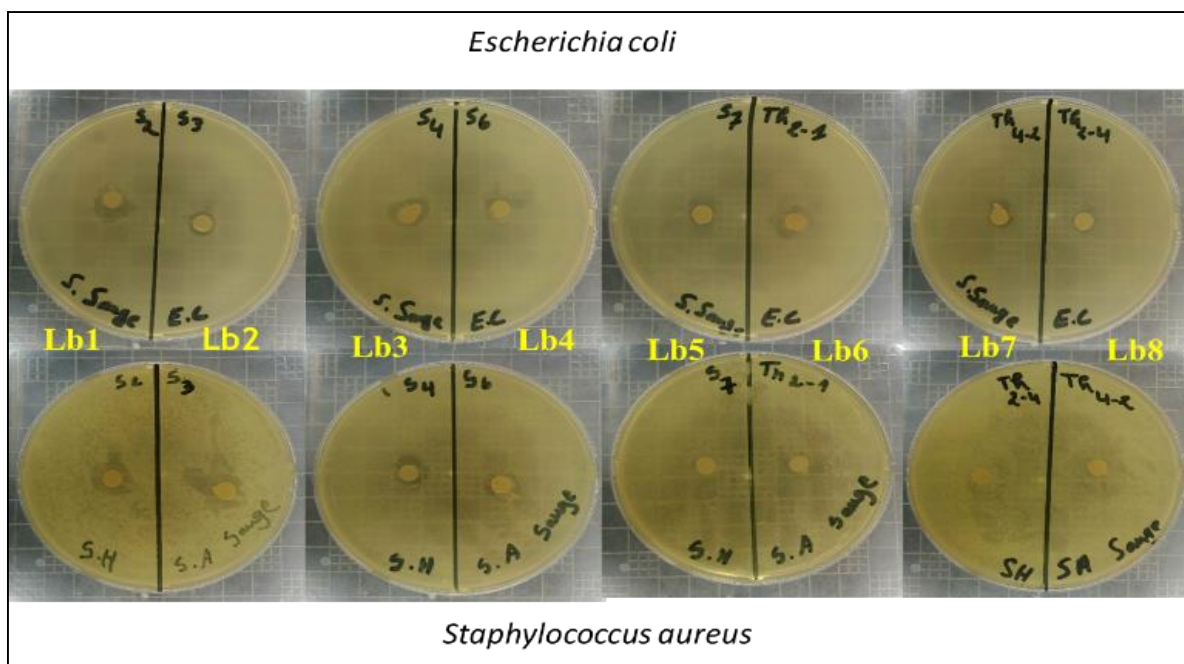
## Résultats et discussion



**Figure 19 :** Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de eucalyptus avec les surnageant natifs



**Figure 20 :** Photographies de la sensibilité des souches pathogènes à la combinaison de l'huile essentielle de myrte avec les surnageant natifs



**Figure 21** : Photographies de la sensibilité des souches pathogènes aux combinaisons de l'huile essentielle de sauge avec les surnageant natifs

D'après les figures (17, 18, 19, 20, 21) on constate qu'il n'y a pas vraiment d'effet synergiques entre les différentes huiles essentielles en combinaison avec les surnageants natifs des bactéries lactiques bien qu'il y ait certaines combinaisons qui présentent une activité antibactérienne notamment celles avec le thym, l'eucalyptus et le myrte mais ceci peut être dû à l'activité de l'huile seule vu que ces dernières présentent des activités fortes lorsqu'elles ont été testées seules.

Cependant pour l'huile essentielle de sauge en combinaison avec le surnageant natif des bactéries lactiques on remarque une diminution considérable des zones d'inhibition. Ce résultat signifie que les combinaisons avec cette huile présentent un effet antagoniste entre les différents constituants biologiques.

D'autre part les combinaisons avec l'huile essentielle de romarin n'ont pas donné de fortes zones d'inhibition, en effet il semble que les zones d'inhibition de l'huile de romarin seul sont similaires à celles obtenues en combinaison ont suggéré qu'il y a un effet additif

## 7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la combinaison de l'huile essentielle est les surnageant natifs des souches lactiques

La méthode de dilution de damier est utilisée pour la détermination des effets antimicrobiens de combinaisons sélectionnées d'HEs et des surnageant des souches lactiques

Le choix des huiles essentielles utilisées pour la combinaison avec les surnageant est porté sur leur efficacité qui se traduit par CMI obtenues dans les tests de microplaque réalisés préalablement

Pour cela nous avons choisis l'huile essentielle de Thym en synergie avec les surnageant des deux souches lactique Lb2 et Lb3. (Annexe VII)

Les résultats obtenus sur les indices de FICI des combinaisons entre les surnageant natifs et l'huile essentielle selon le test de Damier, sont illustrés dans le (tableauXI). En se référant à l'échelle des FICI, les combinaisons testées ont affiché un effet additif de (FICI <0.5) chez *Staphylococcus aureus*, La combinaison entre l'huile essentielle et les surnageant n'ont montré aucune association avec une FICI ( $1 \leq FICI \leq 4$ ) contre *E. coli*.

**Tableau XI** : Indice des concentrations inhibitrices fractionnaires (ICIF) des combinaisons de l'HEs de thym avec les surnageant des lactobacilles (Lb2 et Lb3)

HE+Surnageant Microorganisme	ICIF de la combinaison	
	Huile essentielle Thym +Surnageant (Lb2)	Huile essentielle de Thym + Surnageant (Lb3)
<i>Escherichia coli</i>	1,03	1,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,75	0,89

Peu d'études ont été réalisées sur l'activité antibactérienne de l'association des huiles essentielles avec les surnageant des bactéries lactiques in vitro, cependant une étude menée par **Hashem et al., (2019)** évalue les effets antibactériens in vitro des combinaisons de probiotiques (PB) et d'huiles médicinales (MO) contre des souches pathogènes. Trois souches probiotiques (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus*) et cinq huiles médicinales (amande amère, clou de girofle, eucalyptus, menthe poivrée et thym) sont testées pour leur activité antibactérienne à l'aide de la méthode de

diffusion en puits d'agar. Les combinaisons de surnageant acellulaire (CFS) de PB et de MO montrent des effets variables contre les souches pathogènes testées, avec les huiles de thym et de clou de girofle présentant l'activité la plus élevée. Pour *Staphylococcus aureus*, les combinaisons de CFS de PB et de MO révèlent une activité synergique, notamment avec les huiles de clou de girofle, de menthe poivrée et de thym. Par la méthode de dilution en damier, ces combinaisons réduisent les concentrations minimales inhibitrices (MIC) des MO contre les bactéries testées. Les indices de concentration inhibitrice fractionnelle (FICI) pour ces combinaisons varient de 0,12 à 0,75, indiquant une activité synergique marquée contre *S. aureus*, *E. coli* et *K. pneumoniae*.

D'autres part des études sur un modèle alimentaire ont été réalisées, par exemple En **2021** une étude a été réalisée par **Denkova et al.** qui avait pour objectif d'évaluer l'effet synergique de certaines bactéries lactiques probiotiques (LAB) et d'huiles essentielle de citron et pamplemousse contre les micro-organismes d'altération, pour la bio conservation d'une émulsion alimentaire de mousse au chocolat durant 20jours de stockage, les résultats ont montrer que l'association de ces deux composants ont permis de maintenir des quantités inférieures à 10 UFC/g et 100UFC/g de *E. coli* et *S. aureus* respectivement. Cela indique que ces ingrédients ont été efficaces pour prévenir la croissance de ces bactéries pathogènes dans les mousses au chocolat.

Une autre étude menée par **Teneva et al., (2021)** Dans la quelle différentes variantes de mayonnaise sans œuf contenant des cellules de *Lactobacillus plantarum* (LBRZ12) ainsi que des huiles essentielles extraites de basilic et d'aneth ont été préparées et les variations de la microflore pendant le stockage ont été étudiées, Les résultats ont montré que la concentration de la microflore indésirable a diminué progressivement jusqu'à atteindre zéro après le 20e jour dans la mayonnaise conservée avec des lactobacilles et des huiles essentielles. Cette diminution peut être expliquée par la baisse du pH et l'activité antimicrobienne de la souche probiotique *L. plantarum* LBRZ12 contre les micro-organismes aérobies mésophiles et anaérobies facultatifs, ainsi que par les effets bénéfiques des huiles essentielles de basilic et d'aneth.

Par contre plusieurs études ont été effectuée entre les huiles essentielles et les métabolites des bactéries lactique ,Une étude récente réalisée en **2023** par **Belhadj et al.** visant à évaluer le potentiel antibactérien de la bactériocine (BacLP01) produite par *Lactobacillus plantarum* et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L (ROEO)



individuellement et en association. Contre des agents pathogènes d'origine alimentaire *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, l'effet de synergie observé dans leur combinaison contre *B. subtilis* ATCC11778 était fort. Les CMI pour la bactériocine (BacLP01) et ROEO étaient respectivement de 5 et 6,25 µL/mL. Le résultat du coefficient d'interaction de la fraction inhibitrice (FICI) pour la combinaison de BacLP01 et ROEO était de 0,49, suggérant un effet d'interaction synergique contre *B. subtilis*. Cette étude conclut qu'une combinaison de BacLP01 et ROEO pourrait être une approche efficace pour contrôler la présence de bactéries pathogènes dans les aliments.

L'effet de la combinaison de la nisine et des huiles essentielles a été étudié dans différentes études. Par exemple, **Rajkovic et al., (2005)** ont observé une inhibition de la croissance de *B. cereus* et *Bacillus circulans* grâce à la combinaison de nisine et l'huile essentielle de carvacrol dans un milieu de bouillon BHI et une purée de pommes de terre conditionnée sous vide. De même, **Moosavy et al., (2008)** ont rapporté une activité antimicrobienne plus élevée contre *S. typhimurium* et *S. aureus* avec la combinaison de l'huile essentielle de *Zataria multiflora Boiss* et de la nisine à des concentrations plus faibles par rapport à l'utilisation des huiles essentielles seules à des concentrations plus élevées. **Pajohi et al., (2011)** ont également observé un effet synergique de l'huile essentielle de *C. cyminum* combinée à de faibles concentrations de nisine sur la croissance bactérienne de *B. cereus* et *B. subtilis* dans une soupe d'orge commerciale.

# *Conclusión*

## Conclusion

---

Notre étude a porté sur l'activité antibactérienne de six huiles essentielles *Thymus vulgaris*, *Rosemarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis*, *Salvia officinalis* et *Citrus reticulata* et l'activité antibactérienne de huit souches de bactéries lactiques ainsi que de leurs combinaisons sur deux souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).

Les résultats obtenus ont montré la sensibilité des souches testées vis-à-vis des six huiles essentielles. Cependant, HEs de thym possède un pouvoir antibactérien naturellement puissant sur les souches testées suivis respectivement de celui de myrte, sauge et eucalyptus d'où l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne. En revanche, l'HEs de romarin et citrus n'a pas une efficacité antibactérienne considérable où les diamètres des zones d'inhibition sont trop faibles. L'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques à l'égard des deux bactéries cibles a montré un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* mais moins marquée vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

L'étude de l'activité antibactérienne de la combinaison de l'huile essentielle de Thym et deux souches de bactéries lactiques (Lb2, Lb3) a montré un effet additif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un ICIF de 0,75 et 0,89 avec des surnageants de Lb2 et Lb3 respectivement. Néanmoins, pour *Escherichia coli* aucune association n'a été observée avec des ICIF de 1,03 et 1,01 avec les surnageants de Lb2 et Lb3 Respectivement

Subséquentement, nous pouvons conclure que cette huile peut être considérée comme un agent conservateur alternatif aux conservateurs synthétiques déjà employé, très prometteur pour l'industrie alimentaire est capable d'empêcher la prolifération des bactéries pathogènes responsable de contamination des aliments. Les résultats obtenus montrent également que les combinaisons d'huile essentielle de thym et les métabolites produites par les bactéries lactiques ont un effet plus au moins considérable que leurs utilisations seules particulièrement vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

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

- La caractérisation des huiles essentielles testées ;
- La détermination de l'origine de l'activité antibactérienne des surnageants des bactéries lactiques ;
- Etude de l'activité antioxydante de ces huiles essentielles ;

## *Conclusion*

---

- Elargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : anti-inflammatoire, anticoagulant et anticancéreuse.
- Tester la combinaison de toutes les huiles avec les bactéries lactiques dans un modèle alimentaire (confiserie, produits laitier, viandes ..... etc.)

Innovation de nouvelles méthodes de conservation des produits alimentaires avec des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits de cette huile pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place des conservateurs de synthèse.

*Références  
bibliographiques*

### A

- Abdel-Bar, N., Harris, N. D., & Rill, R. L. (1987).** Purification and Properties of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 52(2), 411-415.
- Abee, T., Krockel, L. et Hill, C. (1995).** Bactériocines : modes d'action et potentiels dans la conservation des aliments et le contrôle des intoxications alimentaires. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 28 (2), 169-185.
- Alleman, F., Gabriel, I., Dufourcq, V., Perrin, F., & Gabarrou, J.-F. (2013).** Performances de croissance et réglementation. *INRA Prod. Anim.*, 26(1), 3-12.
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*. 17, 6, 454-461.
- Ângelo Luís, Andreia Duarte, Jorge Gominho, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte. (2016) .** Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils, *Industrial Crops and Products*, Volume79, Pages274-282, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>.

### B

- Badis, A., Laouabdia-sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caracterisation Phenotypique Des Bacteries Lactiques Isolees A Partir De Lait Cru De Chevre De Deux Populations Caprines Locales "Arabia Et Kabyle". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 0(23), 30-37.
- Bassolé IH, Juliani HR. (2012)** Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules.*, 17(4):3989-4006.
- Belhadj, K. Oussama, Sahnouni, Fatima, Bouhadi, Djilali, Benamara, Rym. (2023).** The Combined effect of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and Bacteriocin BacLP01 from *Lactobacillus plantarum* against *Bacillus subtilis* ATCC11778. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(3), 2551-2557.
- Ben Moussa O, Mankäi M, Setti K, Boulares M, Maher M, Hassouna M. (2008).** Characterisation and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria strains isolated from Tunisian raw milk. *Annals of microbiology*. 58, 3, 461-469.

## Références bibliographiques

---

**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.

**Bouzid, D. (2018).** Evaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique *Helichrysum italicum* (Roth) G. DON . Thèse de doctorat en sciences, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 105p.

**Bowbe, K.H., Salah, K.B.H., Moumni, S., Ashkan, M.F., Merghni, A. (2023).** Anti-Staphylococcal Activities of *Rosmarinus officinalis* and *Myrtus communis* Essential Oils through ROS-Mediated Oxidative Stress. *Antibiotics*, 12, 266. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020266>.

**Burt, S. (2004)** Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

### C

**Chaib, S. (2021).** « Encapsulation d'une huile essentielle extraite de *Thymus vulgaris* : Effet sur ses propriétés physicochimiques et biologiques ». Thèse de doctorat en biotechnologie microbienne, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi, Algérie, 132p.

**Cherrat, L., (2013).** « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques et médicinales du Maroc et évaluation de leurs effets combinés avec des méthodes de conservation alimentaire ». Thèse de doctorat en sciences et technique de l'ingénieur, Université Abdelmalek Essaadi Faculté des Sciences et Techniques, Tanger, 165p.

**Coudeyras, S., & Forestier, C. (2010).** Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 611-650.

### D

**Denkova-Kostova, R.S., Goranov, B.G., Teneva, D.G., Tomova, T.G., Denkova, Z.R., Shopska, V., Mihaylova-Ivanova, Y. (2021).** Bio-preservation of chocolate mousse with free and immobilized cells of *Lactobacillus plantarum* D2 and lemon (*Citrus lemon* L.) or grapefruit (*Citrus paradisi* L.) zest essential oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 20(1), 5-16. <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0872>.

**Dopazo, V., Illueca, F., Luz, C., Musto, L., Moreno, A., Calpe, J., Meca, G. (2023).** Revalorization by lactic acid bacterial fermentation of goat whey from cheese industry as a

## Références bibliographiques

---

potential antifungal agent. Food Bioscience, 53, 102586.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102586>.

**Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, de Haen C, Gozzini L. (1997).** Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*. 153: 45.

### E

**Ehsani, A., Rezaeiyan, A., Hashemi, M., Aminzare, M., Jannat, B., Afshari, A. (2019).** Antibacterial activity and sensory properties of *Heracleum persicum* essential oil, nisin, and *Lactobacillus acidophilus* against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Veterinary World*, 12(1), 90-96.

**El Hartiti, Hajar; El Mostaphi, Amine; Barrahi, Mariam; Ben Ali, Aouatif; Chahboun, Nabila; Amiyare, Rajaa; Zarrouk, Abdelkader; Bourkhiss, Brahim; Ouhssine, Mohammed (2020).** "Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrtus communis* leaves." *Karbala International Journal of Modern Science*, 6(3), Article 3. Disponible sur : <https://doi.org/10.33640/2405-609X.1546>.

**Evivie, S. E., Ogwu, M. C., Abdelazez, A., Bian, X., Liu, F., Li, B., & Huo, G. (2020).** Suppressive effects of *Streptococcus thermophilus* KLDS 3.1003 on some foodborne pathogens revealed through in vitro, in vivo and genomic insights. *Food Funct*, 11(7), 6573-6587.

### F

**Fahed, L. (2016).** Diversité chimique et potentiel antimicrobien d'huiles essentielles de plantes libanaises. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé, Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme, France, 173p.

**Faleiro, M.L. (2011)** The Mode of Antibacterial Action of Essential Oils. In: Mendez-Vilas, A., Ed., *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Formatex Research Center, Badajoz, 1143-1156.

**Faure, S., Pubert, C., Rabiller, J., Taillez, J., & Yvain, A. L. (2013).** Que savons-nous des probiotiques?. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(528), 18-21.

**Feng Y., Qiao L., Liu R., Yao H and Gao C. (2017).** Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Annals of Microbiology*, 67(3), 239-253.



**G**

**Gabriel, G., Alleman, F., Dufourcq, V., Perrin, F., & Gabarrou, J.-F. (2013).** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim.*, 26(1), 13-24.

**Galgano, M., Capozza, P., Pellegrini, F., Cordisco, M., Sposato, A., Sblano, S., Camero, M., Lanave, G., Fracchiolla, G., Corrente, M., et al. (2022).** Antimicrobial Activity of Essential Oils Evaluated In Vitro against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 11, 979.

**Ghabraie, M. (2014).** Antimicrobial effect of Essential Oils against pathogenic bacteria and optimization of its formulations combined with other preservative agents ». Thèse de doctorat en sciences, Université du Québec, Canada, 160p.

**Guessas, B. (2007).** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire. Université d'Oran Es-Senia, Algérie, 144p.

**Guiraud JP. (1998).** Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyses microbiologiques. Éd. Du-nod . 576p.

**Guiraud JP. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. 651p.

**H**

**Haddouchi, F., Benmansour, A. (2008).** Huiles essentielles, obtentions, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les Technologies de Laboratoires*, Vol. 3, No 8, 20-27.

**Hashem, A., Tabassum, B., and Abd Allah, E. F. (2019).** *Bacillus subtilis*: A plant growth promoting *rhizobacterium* that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1291–1297.

**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.

**Hervé, C. (2017).** Potentialité in vitro de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées . Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Limoges, France, 137p.

**K**

- Kesen MA, Aiyegoro OA (2018)** Beneficial Characteristics and Evaluation Criteria of Probiotics. *Int J Food Biosci* Vol: 1, Issu: 1 (19-26).
- Khalil, N., Dabour, N. et Kheadr, E. (2021)**. Bio-conservation des aliments : un aperçu avec une attention particulière à *Lactobacillus plantarum*. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 18 (1), 33-50.
- Kim, S., Song, H., Jin, J. S., Lee, W. J., and Kim, J. (2022)**. Genomic and phenotypic characterization of *Cutibacterium acnes* bacteriophages isolated from acne patients. *Antibiotics* 11:1041.
- Klaenhammer, T. R. (1988)**. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.

**L**

- Lagha, A. B., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017)**. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 48(1), 22.
- Lash B.W., T.H. Mysliwicz., and H. Gourama. (2005)**. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiol.*22:199- 204.
- Laurel, G.D. (2013)** Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components Against Lactic Acid Bacteria. Thèse de doctorat en sciences, Université de Tennessee, Knoxville, 70p.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965)**. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. 1965 Feb 12;147(3659):747-8. doi: 10.1126/science.147.3659.747. PMID: 14242024.

**M**

- Maghnia, D. (2011)**. Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels Algériens. Mémoire de magister en microbiologie Alimentaire, Université d'Oran Es-Senia, Oran, 77p.
- Mahdhi A., Harbi B., Angeles Esteban M., Chaieb K., Kamoun F., et Bakhrouf A. (2010)**. Using mixture design construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci Techn.* 20: 983- 996.

## Références bibliographiques

---

- Mahmoudi, R., Kazeminia, 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.
- Marianelli, C., Cifani, N., & Pasquali, P. (2010)**. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, 161(8), 673-680.
- Menad, N.(2017)**. Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse de doctorat en science, Université de Mostaganem, Mostaganem, 196p.
- Messi P., M Bondi., C Sabia., R Battini., and G Manicardi. (2001)**. Detection and preliminary characterization of bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Int.J.Food. Microbiol.* (64): 193-198
- Metchnikoff, E. (1907)**. The prolongation of life, William Heinemann, London, UK.  
Microorganisms in Pharmaceutical and Dairy Products. *International Journal of Enteric Pathogens*, 1(2), 53-62.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011)**. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine Sciences*, 27(4), 405-412.
- Millette M., C Dupont., F Shareck., M.T Ruiz., D Archambault., and M Lacroix. (2007)**. Purification and identification of the Pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*. 104(1) :269-75. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03583.x. Epub 2007 Oct 9. PMID: 17927747.
- Moosavy M-H, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Mousavi Ebrahimzadeh HA, et al. (2008)** Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Res Int.* 41(10):1050–7
- Moritz, C. M. F., Rall, V. L. M., Saeki, M. J., & Fernandes Júnior, A. (2012)**. Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1147-1156. ISSN 1517-8382
- Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. (2018)**. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J Biol Sci.*, 25(2):361-366

## Références bibliographiques

---

**Moumene, F. (2016).** Valorisation des plantes condimentaires cultivées et spontanées dans l'ouest algérien : cas du genre *Allium*. Thèse de doctorat en sciences de l'environnement, Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, Algérie, 142p.

### O

**OMS (2014).** Resolution –Promotion and Development of Training and Research in Medicinal and Aromatic plants of the OMS.

**Ouwehand, A.C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., Rautonen, N. (2010).** In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinarni Medicina*, 55(2), 71-78.

### P

**Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011).** Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633-654.

**Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA, Hadian M. (2011)** Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. *J Appl Microbiol.* 110(4):943–51

**Pibiri P., (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL, Suisse, 177p.

**Piochon, M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Thèse en ressources renouvelables, Université du Québec, 200p.

**Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C.E., Roura, S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36, 679–684.

**Puvać, N.; Milenković, J.; Galonja Coghil, T.; Bursić, V.; Petrović, A.; Tanasković, S.; Pelić, M.; Ljubojević Pelić, D.; Miljković, T.(2021)** Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Selected Pathogenic Bacteria: In Vitro Study. *Antibiotics* 2021, 10, 546. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050546>

### R

**Rajanikar, RV, Nataraj, BH, Naithani, H., Ali, SA, Panjagari, NR, & Behare, PV (2021).** Acide phényllactique : Un composé vert pour la bioconservation des aliments. *Contrôle alimentaire*, 128, 108184.

**Rajkovic A, Uyttendaele M, Courtens T, Debevere J. (2005).** Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiol.* 22(2-3):189–97

**Randriana, R. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosma fragrans* », Alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat en sciences de la vie, Université d'Antananarivo, Madagascar, 179p.

**Roldán, L.P., Díaz, G.J., Durringer, J.M. (2010).** Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 451-461.

**Rousseau, V. (2004).** *Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale.* Thèse de Doctoral dissertation, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. 33p.

### S

**Saeb, S., Amin, M., Seyfi Gooybari, R., Aghel, N. (2016).** Evaluation of Antibacterial Activities of *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, and *Citrus grandis* Against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(4), e37103.

**Salminen S, Wright A V, Ouwehand A. (2004).** Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.5–463.

**Samedi, L., & Charles, A. L. (2019).** Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 7(1), 9-19..

**Satpute, S. K., Kulkarni, G. R., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Mone, N. S., Patil, R. H., & Cameotra, S. S. (2016).** Biosurfactants from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*, 56(11), 1140-1158.

**Schillinger, U., Lucke, Friedrich-Karl. (1989).** Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.

## Références bibliographiques

---

- Semeniuc, C. A., Pop, C. R., Rotar, A. M. (2017).** Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 403-408.
- Servin, A. L. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440
- Shipradeep, Karmakar S., Khare RS., 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*, vol. 2013, Article ID 628903, 9 pages.
- Sidiropoulou, E., Marugán-Hernández, V., Skoufos, I., Giannenas, I., Bonos, E., Aguiar-Martins, K., Lazari, D., Papagrighiou, T., Fotou, K., Grigoriadou, K., et al. (2022).** In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, Anticoccidial, and Anti-Inflammatory Study of Essential Oils of *Oregano*, *Thyme*, and *Sage* from Epirus, Greece. *Life*, 12, 1783. <https://doi.org/10.3390/life12111783>.
- Singh V. P. (2018).** Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104–111..
- Singleton P., (1999),** Bactériologie, Edition Duonod 4<sup>ème</sup> édition Paris. 415 p.
- Sofowora AE (1993).** Medicinal Plants and Traditional Medicines in Africa..2nd edition.Spectrum Books, Ibadan, Nigeria. p. 289
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013).** Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food control*, 34(2), 539-546.
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012).** Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 229-243.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., LebošPavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010).** Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.

*T*

**Teneva, D., Denkova, Z., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Kostov, G., Slavchev, A., Hristova-Ivanova, Y., Uzunova, G., Degraeve, P. (2021).** Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils. *Food Chemistry*, 344, 128707. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128707>.

**Tiphaigne E. (2019).** État des lieux de la place de l'aromathérapie dans la prise en charge des troubles de la flore intestinale au comptoir. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Rennes 1, France, 136p.

**Tongnuanchan P., Benjakul S. (2013)** Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J Food Sci.*, 79(7): R1231-49.

**Toure, D. (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat en biologie humaine tropicale, Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire, 116p.

**Tyler VE (1999).** Phytochemicals: back to the future. *J. Nat. Prod.*, 62: 1589-1592

*W*

**Wedajo B. (2015).** Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *Probiotics & Health*, 3(2), 1-9.

*X*

**Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., & Shiina, T. (2011).** Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 462–475.

*Y*

**Yan, T., & Goldman, R. D. (2020).** Les probiotiques pour la diarrhée liée aux antibiotiques chez l'enfant. *Canadian Family Physician*, 66(1), e9-e11.

**Z**

**Zaibet, W. (2016).** Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *Daucus aureus* (Desf) et de *Reutera lutea* (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD). Thèse de doctorat en sciences, Université Ferhat abbes-Setif-1, Algeria, 126p.

**Zhaleh, M., Sohrabi, N., Zangeneh, MM, Zangeneh, A., Moradi, R. et Zhaleh, H. (2018).** Composition chimique et effets antibactériens de l'huile essentielle de fruits de *Rhus coriaria* dans l'ouest de l'Iran (Kermanshah). *Journal des plantes à huile essentielle*, 21 (2), 493-501.



# *Annexes*

**Annexe I : Les milieux de cultures (Guiraud, 1998)**

**Tableau I :** Composition du MRS (Bouillon et gélose)

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Acétate de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O	2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O	0,05g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Agar (dans le cas de la gélose)	15g
Eau distillée	1L
pH : 6,2 ±0,2	
Autoclavage à 121°C/20min	

**Tableau II:** composition du Muller Hinton

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
extrait de levure.	2g
hydrolysate acide de caséine	17,5g
amidon	1,5g
agar	10g
pH:7,2± 0,2	
Autoclavage à 121°C/20min	

**Tableau III** : composition de la gélose nutritif (GN)

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Extrait de viande □	1g
Peptone	15g
□Chlorure de sodium	5g
□Agar (gélose)	15g
pH:7,2± 0,2 Autoclavage à 121°C/20min	

**Tableau IV** : composition du bouillon nutritif(BN)

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Peptone	15g
Extrait de levure	05g
naCl	05g
eau distillée	1000ml
pH:7,2± 0,2 Autoclavage à 121°C/20min	

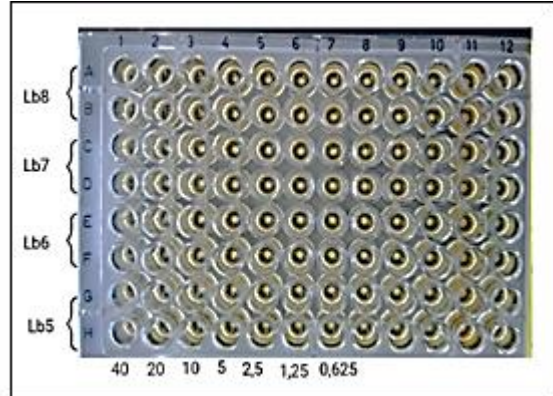
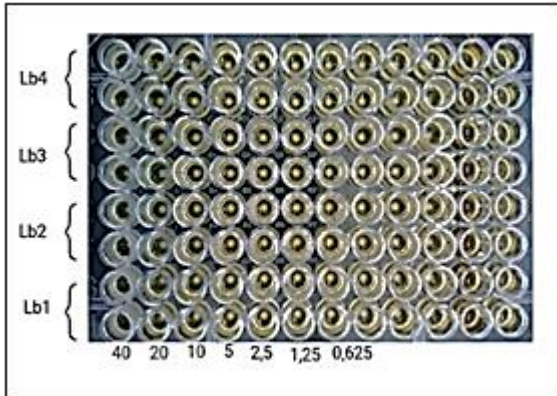
## *Annexes*

---

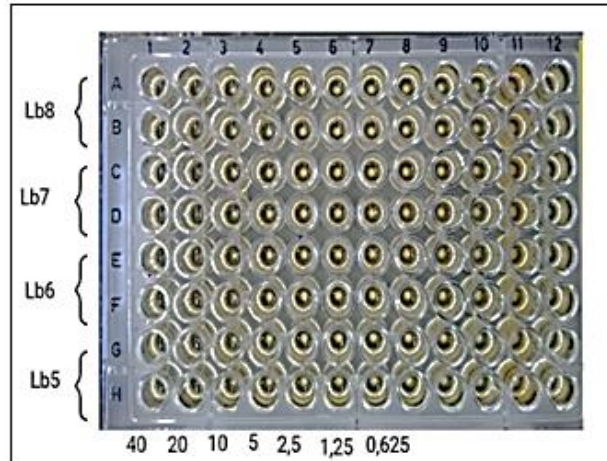
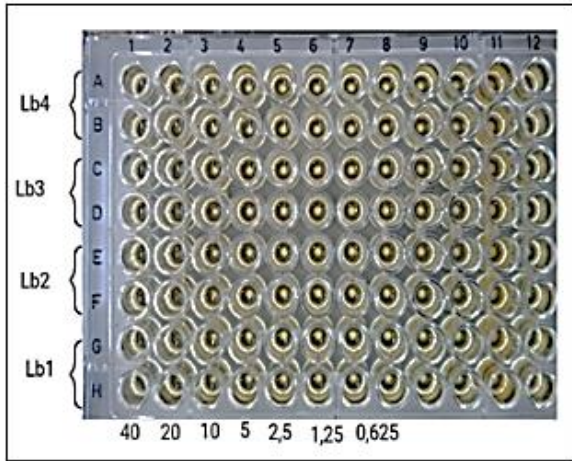
**ANNEXE II :** Résultats récapitulatifs des diamètres des zones d'inhibition sur test des disques

<b>Souches bactériennes</b>	<b>Les huiles essentielles utilisées et les diamètres des zones d'inhibition (mm)</b>					
	<b>Thym</b>	<b>Romarin</b>	<b>Eucalyptus</b>	<b>Myrte</b>	<b>Sauge</b>	<b>F. mandarine</b>
E. coli	42	12	18	13	17	6
S. aureus	45	11	18	24	21	8
Lb1	25	7	11	9	8	0
Lb2	23	5	14	9	7	7
Lb3	26	5	13	10	0	5
Lb4	26	4	11	12	9	0
Lb5	27	5	11	10	8	4
Lb6	24	4	14	14	6	3
Lb7	26	6	12	10	0	3
Lb8	26	3	10	10	0	4

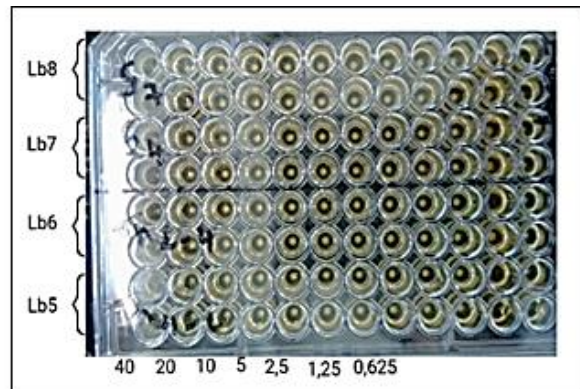
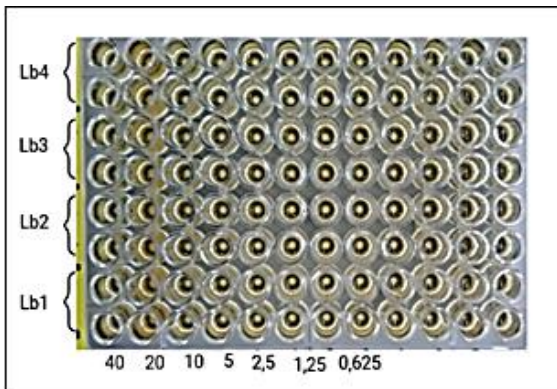
**Annexe III : Résultats des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles sur les bactéries lactiques sur microplaque**



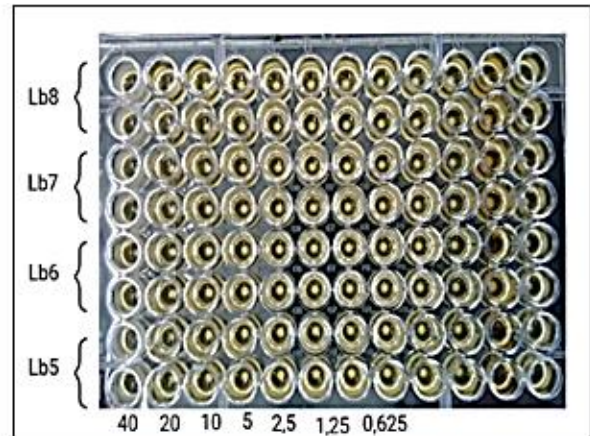
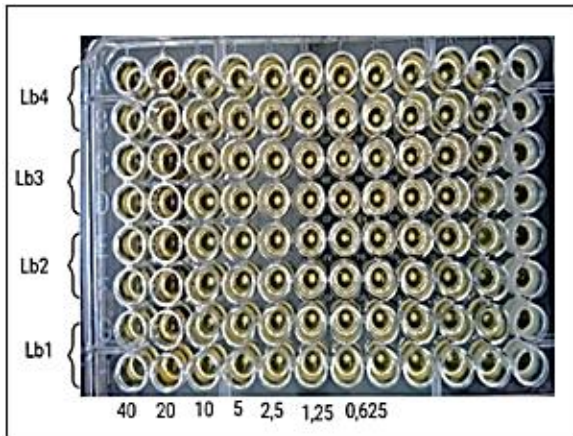
Activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym contre les bactéries lactiques



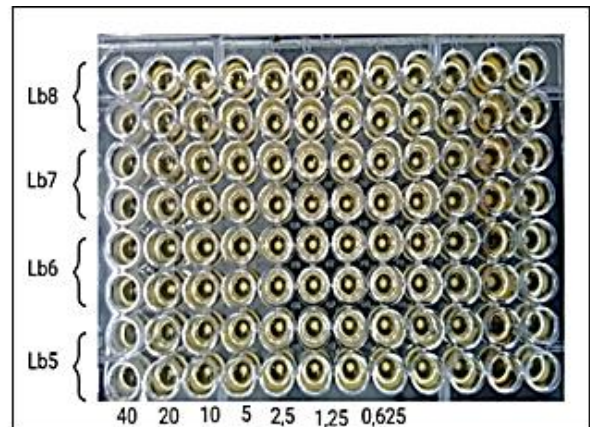
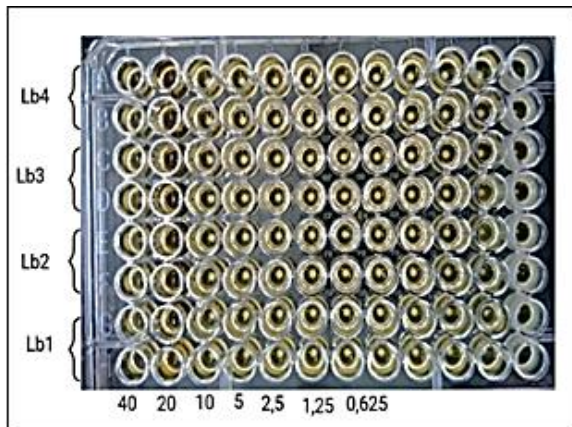
Activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin sur les bactéries lactique



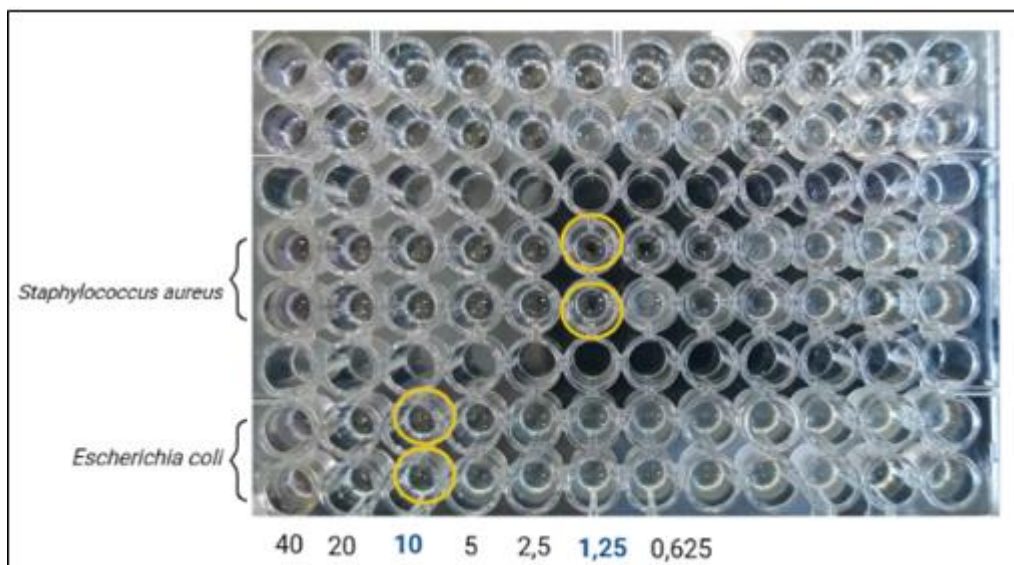
Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'eucalyptus sur les bactéries lactiques



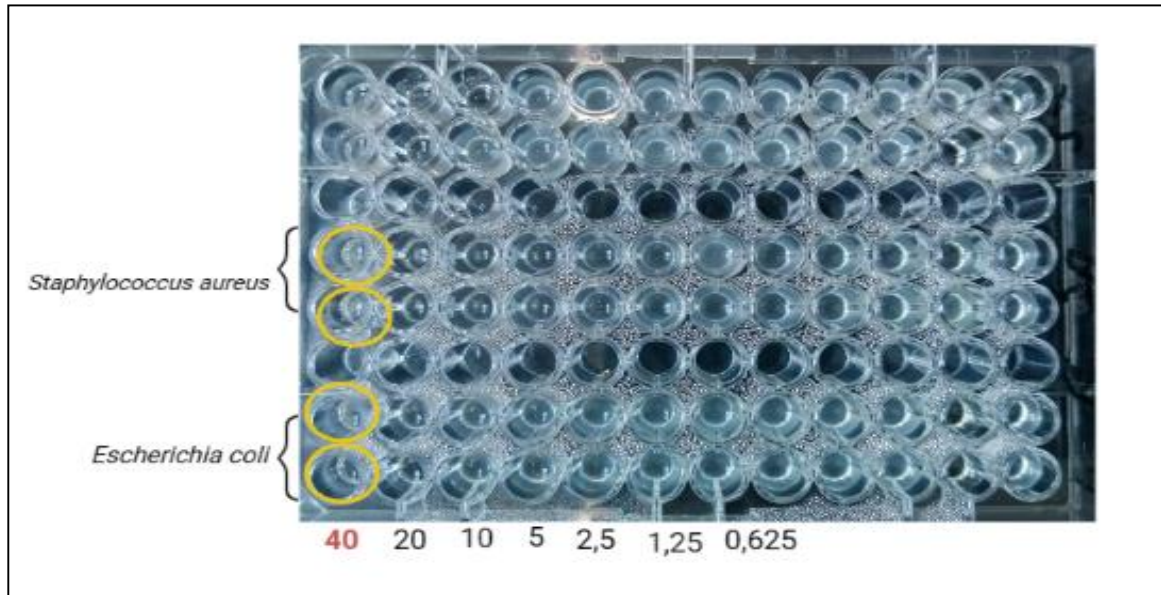
Activité antibactérienne de l'huile essentielle de myrte sur les bactéries lactique



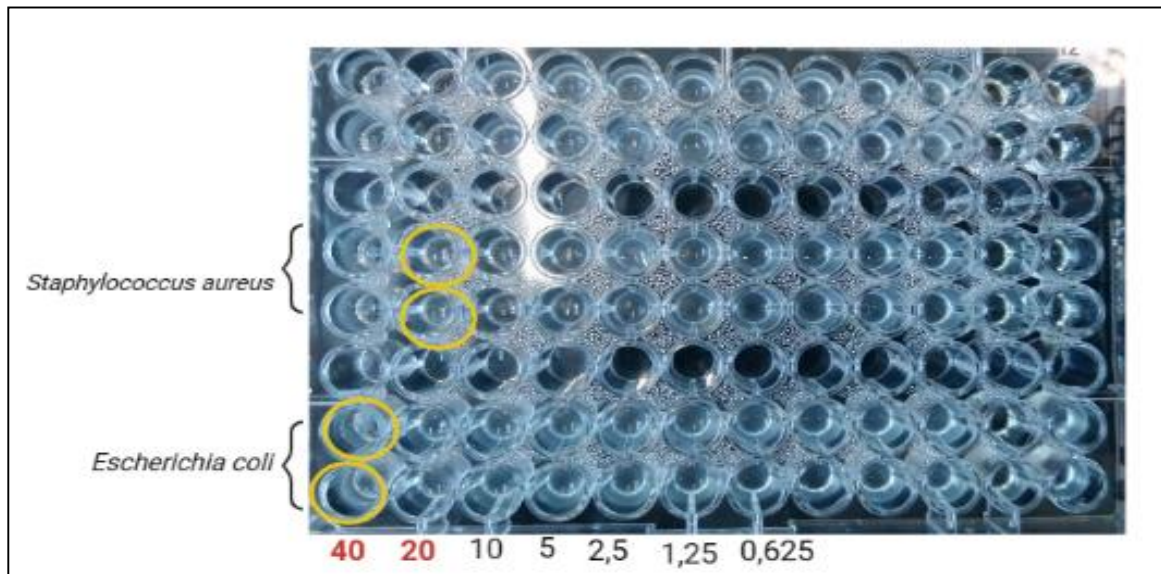
Activité antibactérienne de l'huile essentielle de sauge sur les bactéries lactique



**Annexe IV** : Résultats des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles sur les bactéries pathogènes sur microplaque



**Figure** : Résultats sur microplaque de l'activité antibactérienne de l'huiles essentielle de thym sur les deux souches pathogènes



*Figure* : Résultats sur microplaque de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin sur les deux souches pathogènes

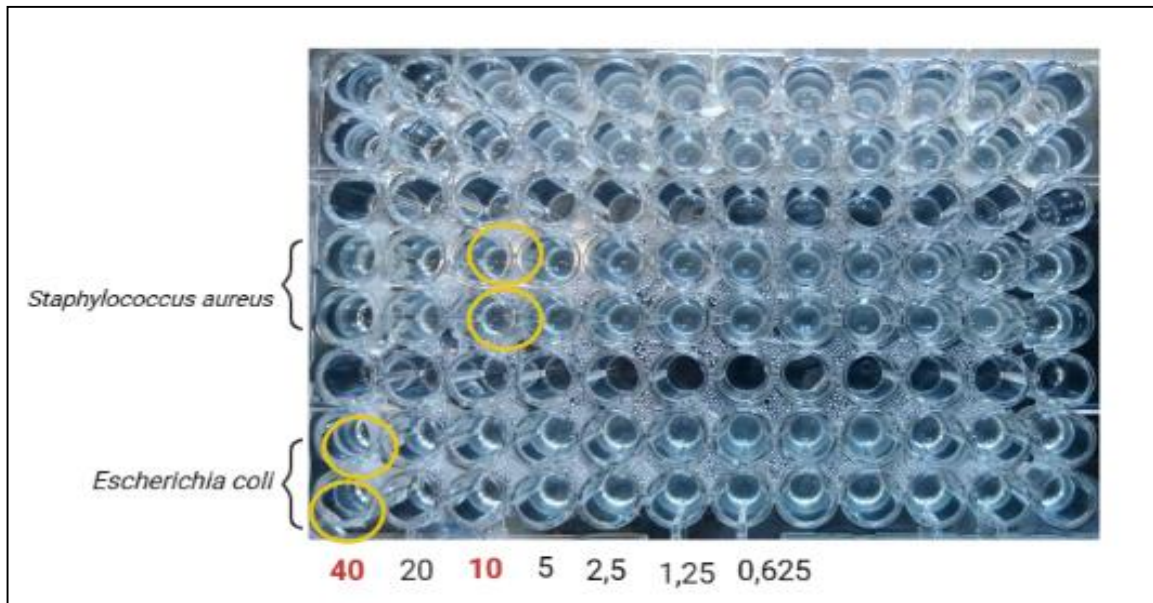


Figure : Résultats sur microplaque de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'eucalyptus sur les deux souches pathogènes

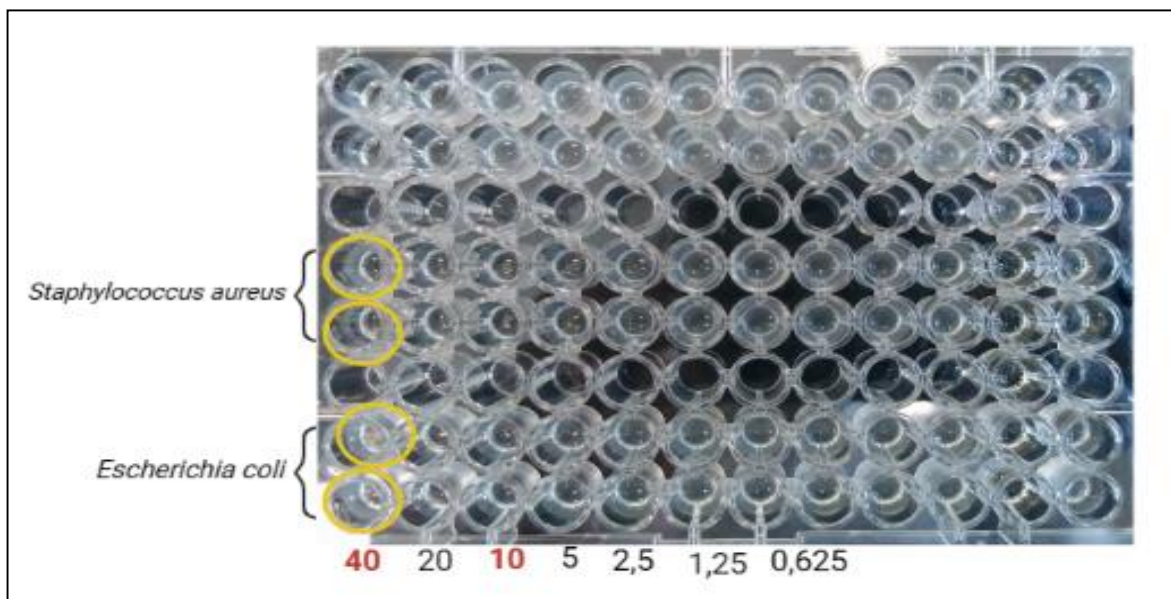


Figure : Résultats sur microplaque de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de sauge sur les deux souches pathogènes

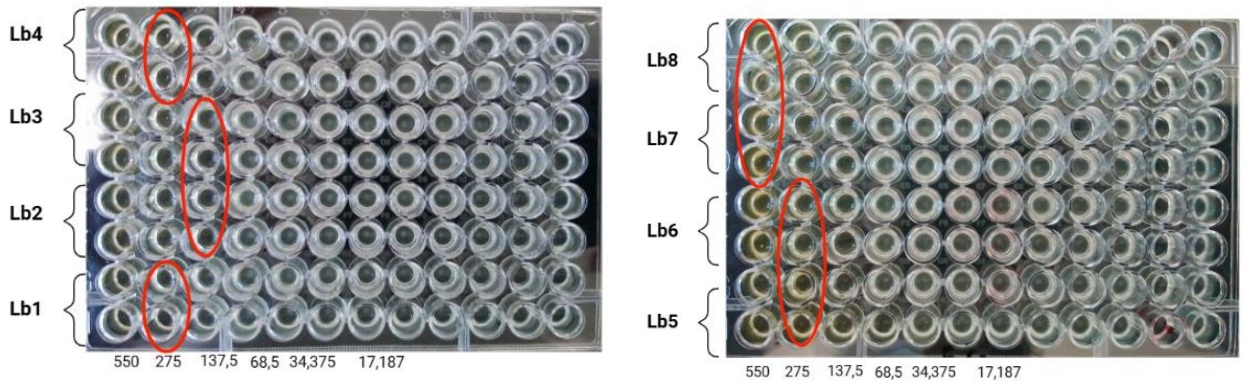


## Annexes

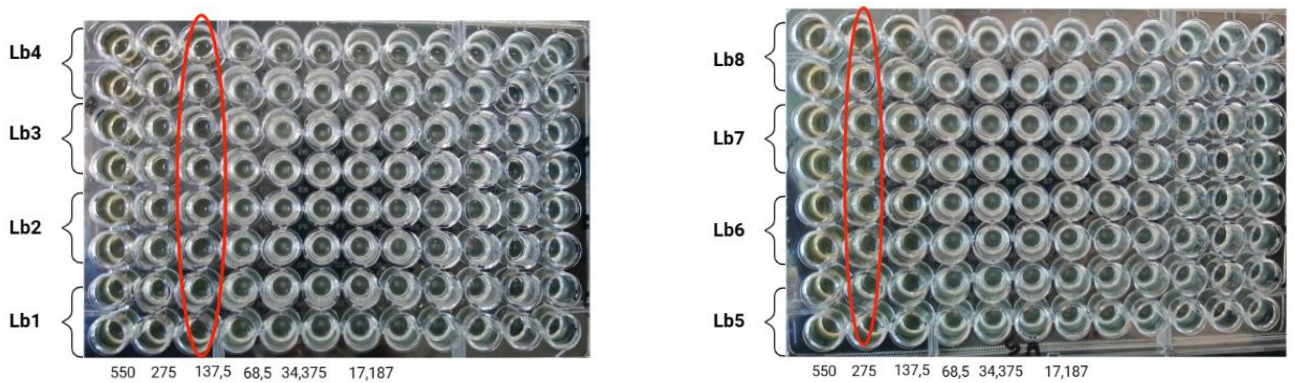
**Annexe V :** tableau récapitulatifs des zones d'inhibition des surnageant natifs des Lb vis-à-vis des souches pathogènes.

Surnageant Microorganismes	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4	Lb5	Lb6	Lb7	Lb8
<i>E. coli</i>	3	2	1	2	2	1	1	2
<i>S. aureus</i>	8	7	2	4	7	7	7	4

**Annexe VI :** Résultats des CMI des surnageant natifs des lactobacilles vis-à-vis des souches pathogènes sur microplaque



*Figure : Résultats des CMI des surnageant natif de bactéries lactique sur E. coli*



*Figure : Résultats des CMI des surnageant natifs de lactobacilles sur S. aureus*

**Annexe VII** : Résultats des CMI de la combinaison de l'huile essentielle de thym et les surnageant natifs des bactéries lactique vis-à-vis des souches sur microplaque

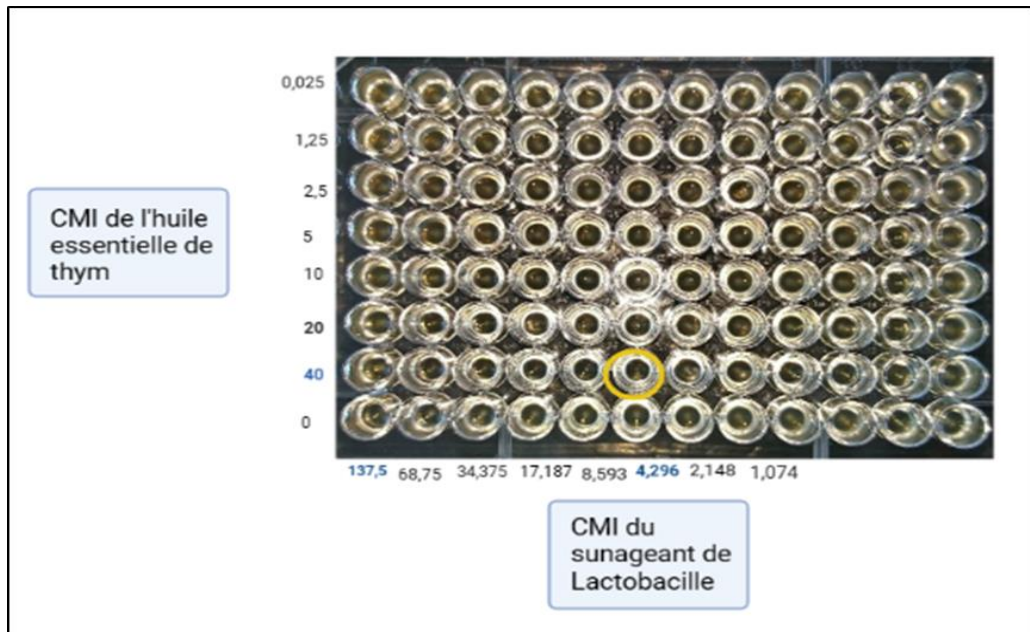


Figure : Test du damier sur l'inhibition de croissance de *E. coli* par la combinaison des différentes concentrations de l'huile essentielle de thym et le surnageant de la souche lactique (Lb2)

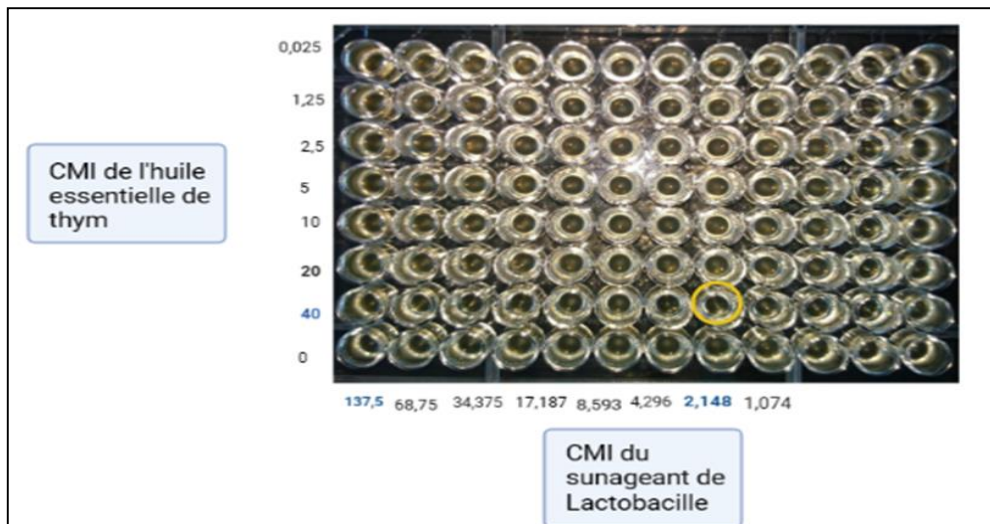


Figure : Test du damier sur l'inhibition de croissance de *E. coli* par la combinaison des différentes concentrations de l'huile essentielle de thym et le surnageant de la souche lactique (Lb3)

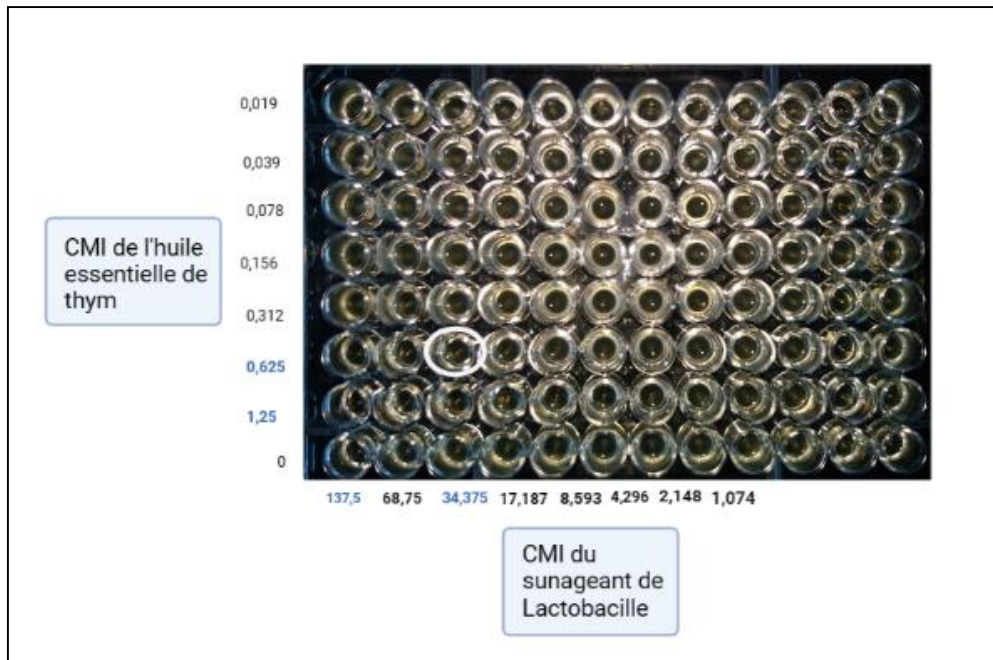


Figure : Test du damier sur l'inhibition de croissance de *S. aureus* par la combinaison des différentes concentration de l'huile essentielle de thym et le surnageant de la souche lactique (Lb2)

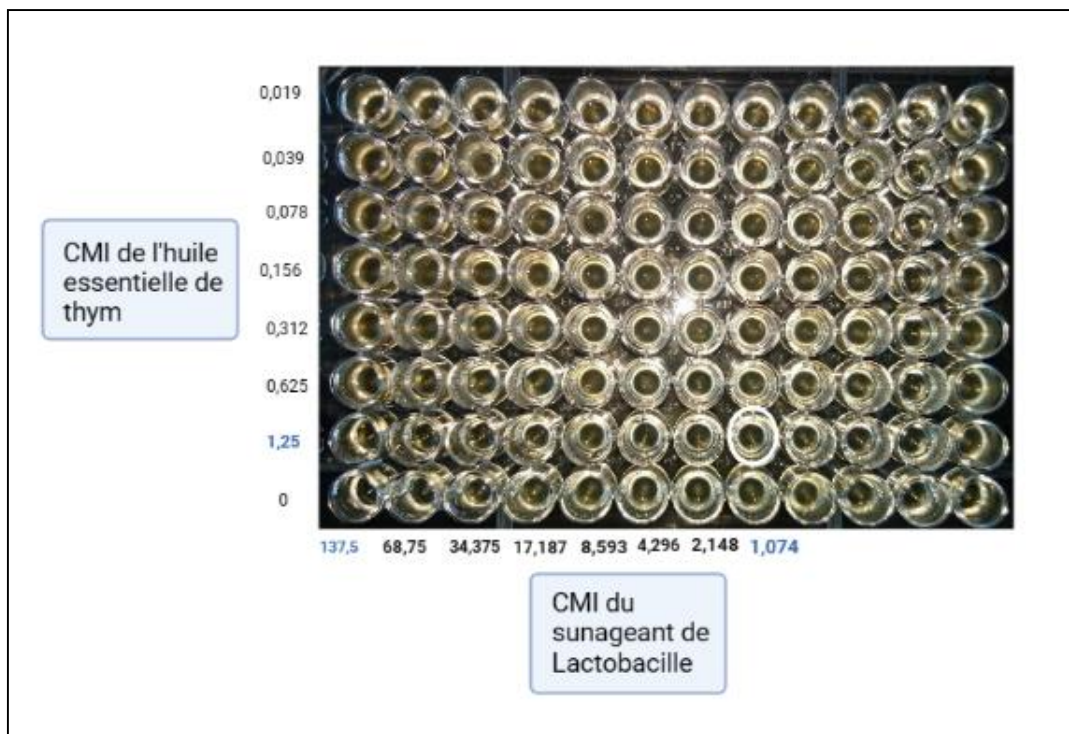


Figure : Test du damier sur l'inhibition de croissance de *S. aureus* par la combinaison des différentes concentration de l'huile essentielle de thym et le surnageant de la souche lactique (Lb3)

# *Etude de l'effet antimicrobien de l'association des huiles essentielles de plantes médicinales et souches probiotique*

## *Résumé*

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de thym, sauge, romarin, eucalyptus, feuilles de mandarines et le myrte vis-à-vis de deux souches pathogènes *S.aureus* et *E.coli* et huit souche probiotiques du genre *Lactobacillus*. Les résultats obtenus ont démontré que les concentrations testées les huiles essentielles ont une activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches pathogènes testées. Cependant, l'huile essentielle de thym a montré la plus grande activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes. Néanmoins, une activité inhibitrice est notée également pour les souches probiotiques. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'association de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec respectivement deux souches de bactéries lactiques (Lb2, Lb3) a montré un effet additif vis-à-vis *Staphylococcus aureus* avec un ICIF de 0,75 et 0,89 avec les surnageants de Lb2 et Lb3 respectivement et à *Escherichia coli*. Aucun effet additif n'a été observé avec des ICIF de 1,03 et 1,01 et les surnageants de Lb2 et Lb3. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent l'utilisation de l'huile essentielle de thym comme agent conservateur antibactérien en bioconservation des aliments.

**Mots clé :** L'huile Essentielle De Plantes, Bioconservation, Activite Antibacterienne, Souches Probiotiques, Effet Additif, *Thymus vulgaris*.

## *Abstract*

The aim of our study was to evaluate the antibacterial activity of essential oils from thyme, sage, rosemary, eucalyptus, mandarin leaves, and myrtle against two pathogenic strains, *S. aureus* and *E. coli*, and eight probiotic strains of *Lactobacillus*. The results showed that the tested concentrations of essential oils exhibited antibacterial activity against both pathogenic strains. However, thyme essential oil demonstrated the highest inhibitory activity against the pathogenic strains. Additionally, inhibitory activity was also observed against the probiotic strains. The study of the antimicrobial activity of the combination of *Thymus vulgaris* essential oil with two lactic acid bacteria strains (Lb2, Lb3) showed an additive effect against *Staphylococcus aureus* with a fractional inhibitory concentration index (FICI) of 0.75 and 0.89 with Lb2 and Lb3 supernatants, respectively, and against *Escherichia coli*. No additive effect was observed with FICI values of 1.03 and 1.01 with Lb2 and Lb3 supernatants, respectively. The findings of this study suggest the use of thyme essential oil as an antibacterial preservative for food bioconservation.

**Keywords:** Plant essential oil, Bioconservation, Antibacterial activity, Probiotic strains, Additive effect, *Thymus vulgaris*.