

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique**  
**Université A. Mira Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Microbiologie**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Fondamentale**



**Mémoire** de Fin de Cycle en vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

*Thème*

**Etude comparative de l'effet antibactérien des substances bioactives à l'égard des souches d'*Escherichia coli* de différentes niches écologiques.**

**Présenté par : Zebboudj Narimane et Ziani Lydia**

**Soutenance le : 02 Juillet 2025**

*Devant le jury composé de :*

<b>Président de jury :</b>	Mr Bendjeddou K.	MCA
<b>Encadreur :</b>	Mme Benachour K.	MAA
<b>Examineur :</b>	Mme Zenati K.	MCA

*Année universitaire : 2024/2025*

# *Dédicaces*

*Louange à Dieu, le tout puissant qui m'a donné la force et le courage d'avoir accomplir*

*Ce travail est dédié à :*

*À mes chers parents,*

*Pour leur amour inconditionnel, leur patience infinie, leurs sacrifices silencieux et leur soutien de chaque instant. Ce travail est avant tout le fruit de tout ce qu'ils m'ont transmis, de leur force et de leur bienveillance.*

*À mon frère Lamine, mes sœurs*

*À mes chères amies : Kenza, Leticia, Cherifa, Madina, Massi, Yudas et Mohand.*

*Pour leur présence réconfortante, Pour leur amitié sincère, leurs encouragements constants et leur capacité à me faire sourire, même quand les moments étaient plus difficiles. Ce travail est aussi un peu le vôtre, car vous avez été à mes côtés tout au long de ce chemin.*

*À mon binôme et chère amie Narimane qui m'a supporté toute au long de notre travail au laboratoire et en rédaction.*

*À tous les amies et toute la promotion dont on a passé des agréables moments.*

*À tous ce qui ont collaboré à ce travail de près ou de loin.*

**Lydia**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*À mes magnifiques parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et tous les sacrifices qu'ils ont faits pour moi.*

*À mon cher père, qui a fait tout ce qu'il pouvait pour moi, et bien plus encore. Sans toi, je ne serais pas là aujourd'hui. Merci pour ta force, ton courage et ton soutien indéfectible.*

*À ma douce mère, pour tous ses efforts, sa tendresse, sa présence rassurante et son amour sans limites.*

*À mon frère Halim, pour sa générosité, ses conseils et son soutien constant tout au long de ce parcours.*

*À mon frère Mokrane, pour sa belle âme, son affection et la joie qu'il apporte dans ma vie.*

*À Lamiya, ma belle-sœur adorée, pour sa bienveillance et sa présence réconfortante.*

*Et à Léa, ma petite nièce récemment arrivée, source de joie et d'inspiration.*

*À ma binôme Lydia,*

*Merci pour ta précieuse collaboration, ton soutien constant et ta bonne humeur tout au long de ce travail. Ce mémoire est aussi le fruit de notre belle complicité et de nos efforts partagés.*

*Ce mémoire est le fruit de votre amour et de votre confiance. Merci du fond du cœur.*

*Narimane*

## ***Remerciements***

*Nous exprimons notre profonde gratitude à Dieu, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la santé, la force et la patience nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements les plus sincères vont à notre promotrice, Madame Benachour K., pour sa disponibilité, ses précieux conseils et son accompagnement tout au long de ce mémoire. Sa rigueur et son engagement ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*Nous adressons également nos remerciements aux membres du jury, à Madame Zenati K., à Monsieur Bendjeddou K., qui nous ont fait l'honneur d'accepter et d'évaluer ce travail. Nous leur exprimons notre sincère reconnaissance pour le temps qu'ils y ont consacré ainsi que pour l'intérêt porté à notre étude.*

# Sommaire

*Liste des abréviations*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

**Introduction.....01**

## ***Partie 01 : Synthèse bibliographique***

**I. Données sur *Escherichia coli*..... 03**

I.1. Historique..... 03

I.2. Taxonomie..... 03

I.3. Habitat..... 04

I.4. Caractères bactériologies..... 05

I.4.1. Caractères morphologiques et culturels..... 05

I.4.2. Caractères biochimiques..... 06

I.4.3. Caractères antigéniques ..... 07

I.4.4. Classification des pathovars ..... 07

I.4.5. Facteurs de virulence..... 08

I.5. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques... 09

**II. Substances bioactives.....11**

II.1. Molécules bioactives d'origine bactérienne ..... 11

II.1.1. Bactériocines... 11

II.1.2. Acides organiques..... 12

II.1.3. Antibiotiques..... 12

II.2. Molécules bioactives d'origine fongique... 13

II.3. Molécules bioactives d'origine végétale..... 14

II.3.1. Alcaloïdes.....	14
II.3.2. Flavonoïdes .....	15
II.3.3. Polyphénols .....	15
II.3.4. Huiles essentielles.....	15
II.3.5. Peptides antimicrobiens.....	15

## *Partie 02: Matériel et méthodes*

<b>I. Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées .....</b>	<b>17</b>
I.1. Origine des souches bactériennes... ..	17
I.2. Revivification... ..	18
I.3. Vérification de la pureté des souches.....	18
I.4. Etude de caractère morphologique .....	19
I.4.1. Examen macroscopique.....	19
I.4.2. Examen microscopique .....	19
I.5. Test catalase .....	19
<b>II. Préparation des extraits de plante .....</b>	<b>20</b>
<b>III. Détermination de l'activité antibactérienne .....</b>	<b>20</b>
III.1. Etude de la sensibilité des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques .....	20
III.2. Etude de la sensibilité des souches de <i>Lactobacillus</i> aux antibiotiques.....	21
III.3. Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactique à l'égard <i>E. coli</i> .....	22
III.3.1. Test des spots.....	22
III.3.2. Test des surnageants de bactéries lactiques .....	22
III.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes .....	24
III.4.1. Test des puits .....	24
III.4.2. Test des disques.....	24
III.4.3. Méthode des microplaques .....	24

## ***Partie 03 : Résultats et discussion***

<b>I. Revivification et vérification de la pureté des souches.....</b>	<b>26</b>
I.1. Revivification des souches <i>E.coli</i> .....	26
I.2. Revivification des souches lactiques .....	26
I.3. Vérification de la pureté des souches.....	26
I.3.1. Aspect macroscopique.....	27
I.3.2. Aspect microscopique .....	27
<b>II. Test de la catalase.....</b>	<b>27</b>
<b>III. Test d'activité antibactérienne .....</b>	<b>27</b>
III.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques d' <i>E.coli</i> .....	27
III.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Lactobacillus</i> (LB).....	30
III.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	31
III.3.1. Test des spots .....	31
III.3.2. Test d'activité des surnageant de bactéries lactiques.....	33
III.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits de plantes.....	36
III.4.1. Test des puits .....	36
III.4.2. Test des disques.....	37
III.4.3. Activité antimicrobienne sur microplaque .....	39
<b><i>Conclusion</i>.....</b>	<b>41</b>

### ***Références bibliographiques***

### ***Annexes***

### ***Résumé***

## *Liste des abréviations*

- **ABC** : ATP-Binding Cassette (Cassette de liaison à l'ATP).
- **ADH** : Alcool déshydrogénase.
- **AIEC** : Adherent-Invasive *E. coli* (*Escherichia coli* adhérent-invasif).
- **ARN** : Acide ribonucléique.
- **ARNm** : ARN messenger.
- **ARNt** : ARN de transfert.
- **ARS** : Antimicrobial Resistance Surveillance (Surveillance de la résistance antimicrobienne).
- **BRA** : Bactéries résistantes aux antibiotiques.
- **CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- **CFU / UFC** : Colony-Forming Units / Unités Formant Colonies.
- **CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire).
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- **DAEC** : Diffusely Adherent *E. coli* (*Escherichia coli* diffusément adhérent)
- **DEC** : Diarrhée-gènes *E. coli*.
- **DHF** : Dihydrofolate (Acide dihydrofolique).
- **EHEC** : Enterohemorrhagic *E. coli* (*E. coli* entérohémorragique).
- **EIEC** : Enteroinvasive *E. coli* (*E. coli* entéroinvasif).
- **EPC**: Extended-spectrum Penicillinase C.
- **EPEC** : Enteropathogenic *E. coli* (*E. coli* entéropathogène).
- **ESBL** : Extended-Spectrum Beta-Lactamase ( $\beta$ -lactamase à spectre étendu).
- **ETEC** : Enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* entérotoxigène).
- **ExPEC** : Extra-intestinal Pathogenic *E. coli*.
- **HGT / TH** : Horizontal Gene Transfer / Transfert Horizontal.
- **IL-8** : Interleukine 8
- **IMP** : Imipenemase
- **INRS** : Institut National de Recherche et de Sécurité
- **InPEC** : Intestinal Pathogenic *E. coli*
- **IU** : Infection urinaire
- **KPC** : Klebsiella pneumoniae Carbapenemase
- **LDC** : Lysine Décarboxylase
- **LB** : *lactobacillus sp*
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **LT / LT I / LT II** : Toxines labiles à la chaleur
- **MH** : Mueller-Hinton

- **NDM** : New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase
- **NMEC** : Neonatal Meningitis *E.coli* (*E. coli* responsable de la méningite néonatale)
- **ODC** : Ornithine Décarboxylase
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **Oxa** : Oxacillinase
- **PEP** : Phosphoénolpyruvate
- **PLP** : Protéines liant la pénicilline
- **PMNs** : Polynucléaires neutrophiles
- **Qnr** : *Quinolone resistance* (Résistance aux quinolones)
- **SHU** : Syndrome hémolytique et urémique
- **ST** : Toxine stable à la chaleur
- **stx1 / stx2**: Shiga toxins 1 and 2 (Toxines Shiga 1 et 2)
- **TDA**: Tryptophane Désaminase
- **THF**: Tétrahydrofolate
- **TMP**: Triméthoprim
- **Tn**: Transposon
- **toxB**: Toxine B
- **UPEC** : Uropathogenic *E.coli*
- **UV** : Ultraviolet
- **VIM** : VeronaIntegron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i> .....	<b>06</b>
<b>Tableau II :</b> Classification des pathovars d' <i>Escherichia coli</i> en fonction du site d'infection et des symptômes.....	<b>08</b>
<b>Tableau III :</b> Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques étudiés chez <i>E. coli</i> .....	<b>10</b>
<b>Tableau IV :</b> Origines des souches bactériennes utilisées... ..	<b>17</b>
<b>Tableau V:</b> Antibiotiques testés... ..	<b>21</b>
<b>Tableau VI :</b> Résultats du test des spots des souches de <i>Lactobacillus</i> à l'égard des souches de d' <i>E.coli</i> .....	<b>32</b>

## *Listes des figures*

<b>Figure 01 :</b> <i>E. coli</i> sous microscope électronique(A) et après coloration de Gram(B).....	<b>06</b>
<b>Figure 02 :</b> Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques .....	<b>23</b>
<b>Figure 03 :</b> Microplaque utilisée pour tester l'effet antibactérien des extraits de plantes.....	<b>25</b>
<b>Figure 04 :</b> Observation macroscopique <i>Escherichia coli</i> .....	<b>26</b>
<b>Figure 05 :</b> aspect des <i>Lactobacillus</i> sur gélose MRS .....	<b>27</b>
<b>Figure 06:</b> Fréquence des souches <i>d'E.coli</i> résistant aux antibiotiques.....	<b>28</b>
<b>Figure 07 :</b> Fréquence des souches <i>d'E.coli</i> résistant aux antibiotiques selon leurs origines.....	<b>28</b>
<b>Figure 08 :</b> Fréquence des souches de LB résistantes à différents antibiotiques... ..	<b>30</b>
<b>Figure 09:</b> Exemples de résultats obtenus par le test de spots sur <i>E. coli</i> .....	<b>31</b>
<b>Figure 10:</b> Résultats de l'activité antibactérienne des surnageant des souches de <i>Lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> obtenus par le test des disques .....	<b>33</b>
<b>Figure 11 :</b> Résultats de l'effet des surnageant des bactéries lactiques vis-à-vis <i>d'E.coli</i> étudier sur les microplaques... ..	<b>35</b>
<b>Figure 12 :</b> Résultats obtenus par le test des puits sur gélose remplie des extraits de plante vis-à-vis <i>d'E.coli</i> .....	<b>36</b>
<b>Figure 13 :</b> Résultats obtenus par le test de diffusion sur disque des extraits de plante vis-à-vis <i>d'E.coli</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 14 :</b> Résultats de l'effet des extraits de plantes vis-à-vis <i>d'E.coli</i> sur les microplaques.....	<b>39</b>

# *Partie bibliographique*

Les maladies infectieuses et contagieuses représentant depuis toujours l'une des principales causes de pathologies Humaines. Ces affections sont causées par des agents pathogènes capables de se développer au sein des tissus ou des organes de l'hôte. Parmi ces agents microbiens étudiés, *Escherichia coli* qui se distingue par son importance en microbiologie, en raison de son double rôle commensale et pathogène (**Bedrane et al., 2020**).

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*, largement présente dans la flore intestinale des mammifères. Elle est la bactérie la plus connue et la plus étudiée au monde. Cette bactérie a servi de modèle dans plusieurs découvertes scientifiques majeures (**Joly Guillou, 2016**).

Bien que généralement commensale, certaines souches pathogène peuvent provoquer des infections graves, parfois mortelles, notamment chez les personnes immunodéprimées ou lorsqu'elles colonisent des sites extra-intestinaux (**Blount.,2015**).

Par ailleurs, La résistance antimicrobienne d'*E.coli* constitue aujourd'hui une véritable menace sanitaire mondiale, affectant à la fois les populations Humaines et les élevages animaux. Cette bactérie joue un rôle central dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, agit ainsi comme un réservoir génétique compromettant l'efficacité des traitements en médecine Humaine et vétérinaire (**Poirel et al., 2018**).

La progression rapide de cette résistance, réduit considérablement les options thérapeutiques disponibles et alimente les inquiétudes quant à un possible retour à une situation similaire à celle de l'ère pré-antibiotique (**Anand et al., 2019**). Par conséquent, des méthodes alternatives pour lutter contre les pathogènes résistants aux antibiotiques sont urgemment nécessaires (**Gradisteanu Pircalabioru et al., 2021**).

Les substances bioactives constituent l'une des alternatives envisagées. Malgré les préoccupations liées à la sécurité, ces substances naturelles suscitent un intérêt croissant en raison de leur efficacité démontrée contre divers micro-organismes. De nombreux produits naturels purs, ainsi que leurs analogues synthétiques récents, ont confirmé leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs face aux bactéries résistantes (**Elmaidomy et al.,2022**).

Les composés d'origine végétale occupent une place essentielle dans cette approche. Les médicaments à base de plantes offrent une option naturelle intéressante, car durant l'ère pré-antibiotique, les plantes médicinales étaient largement utilisées pour le traitement de diverses maladies. Les plantes, facilement accessibles, ont toujours été un choix privilégié pour traiter les maladies infectieuses. Elles produisent des métabolites secondaires à des fins de défense, dont beaucoup possèdent des propriétés antimicrobiennes et sont encore couramment utilisés en médecine traditionnelle. (Ashraf et al., 2023).

Des approches plus récentes ont été développées, notamment le recours à des substances bioactives d'origine microbienne. En effet, les micro-organismes tels que les actinomycètes, les archées, les bactéries, les champignons, les levures et les microalgues représentent une source prometteuse de composés bioactifs aux propriétés essentielles pour la santé Humaine et animale (Gradisteanu Pircalabioru et al.,2021 ; Rani et al.,2021). La diversité des composés produits par ces micro- organismes constitue une ressource précieuse pour développer de nouveaux antimicrobiens capables de contourner les résistances existantes. Leur exploration approfondie pourrait mener à la découverte de molécules innovantes, réduisant ainsi l'émergence de la résistance aux traitements actuels (Danquah et al.,2022).

### Les objectifs de l'étude sont :

- La caractérisation des souches d'*Escherichia coli* déjà isolées de différentes niches écologiques (marines, cliniques et alimentaires).
- L'évaluation de la sensibilité de ces souches à différents antibiotiques.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne de deux extraits de plantes médicinales sur les souches caractérisées.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des souches du genre *Lactobacillus* à l'égard de *E. coli*.
- La réalisation d'une étude comparative de l'activité antimicrobienne de ces composés bioactifs.

### I. Données sur *Escherichia coli*

#### I.1. Historique

*Escherichia coli* a été décrit pour la première fois en 1885 par un pédiatre allemand Théodore Escherich (1857-1911) dans les entérites des nourrissons. Dénommée « *Bacterium coli* commune », « *Bacillus coli* » ou encore « *Bacterium coli* ». Cette bactérie fut identifiée par le même auteur, en 1894, dans des cas d'infections urinaires. En 1919 Castellani et Chalmers proposèrent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* en hommage aux travaux d'Escherich. Cette dénomination fut officiellement adoptée en 1958 (Grimont, 1987).

#### I.2. Taxonomie

Le genre *Escherichia* est constitué notamment par cinq autres espèces en plus d'*Escherichia coli* qui sont : *Escherichia abertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermani*, *Escherichia velneris* et *Escherichia blattae*. Les caractéristiques biochimiques permettent de les identifier et chaque espèce est caractérisée par des caractéristiques biochimiques spécifiques (Diassana, 2018). *Escherichia coli* appartient au phylum des protéobactéria, classe des gammaproteobactéria.

Le manuel de la systématique bactérienne de Bergey (2014) (Bergey's manual of systematic bacteriology), qui constitue une référence en matière de classification des bactéries, classe *Escherichia coli* comme suit :

Domaine.....Bacteria  
Phylum..... Proteobacteria  
Classe..... Gammaproteobacteria  
Ordre..... *Enterobacterales*  
Famille..... *Enterobacteriaceae*  
Genre .....*Escherichia*  
Espèce..... *Escherichia coli*

La souche références *E.coli* K-12 et ses dérivées ont joué un rôle clé dans les progrès de la génétique, de la biologie moléculaire, de la physiologie et de la biochimie (Tenailon et al., 2010).

L'analyse phylogénétique d'*Escherichia coli* a révélé la présence de quatre groupes principaux : A, B1, B2 et D. Les souches virulentes extra-intestinales (ExPEC) se trouvent principalement dans les groupes B2 et D. L'identification des groupes phylogénétiques se fait généralement par des techniques complexes et chronophages, telles que l'électrophorèse des enzymes multilocus ou le ribotypage (Clermont *et al.*, 2000).

### **I.3. Habitat**

L'habitat naturel d'*E. coli* est le tractus intestinal des vertébrés, où il vit en symbiose avec son hôte. Cette bactérie se retrouve principalement dans le cæcum et le côlon, intégrée à la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal. Elle bénéficie ainsi d'un environnement stable et riche en nutriments spécifiques, notamment des sucres dérivés du mucus intestinal, qui favorisent sa croissance et son métabolisme (Tenailon *et al.*, 2010).

Son abondance varie considérablement selon l'espèce hôte et l'environnement intestinal. Chez l'Humain, *E. coli* est présente dans plus de 90 % des microbiotes intestinaux, avec une concentration estimée entre  $10^7$  et  $10^9$  UFC par gramme de fèces. Chez les mammifères sauvages, sa prévalence est plus faible, atteignant 56 %, tandis que chez les oiseaux et les reptiles, elle peut atteindre 10-23 %. Bien qu'elle soit une espèce aérobie facultative, elle coexiste avec une majorité de bactéries anaérobies strictes, qui la surpassent en nombre dans un rapport de 1/100 à 1/10000. *Escherichia coli* est excrété dans l'environnement via les fèces à une concentration élevée. Elle se propage dans les eaux environnementales par le biais d'effluents tels que les eaux usées, les lisiers et les fumiers issus de l'élevage, ainsi que par les déjections d'animaux domestiques ou sauvages (Tenailon *et al.*, 2010).

L'environnement représente un habitat secondaire pour *E. coli*, bien moins favorable à sa survie que son habitat primaire. Dans ce milieu, la bactérie est soumise à diverses pressions biotiques, comme la prédation et la compétition avec d'autres micro-organismes, ainsi qu'à des

pressions abiotiques, telles que l'exposition à la lumière, les variations de température, la rareté des nutriments et la salinité (Diassana, 2018).

La transmission d'*E.coli* pathogène se fait principalement par la consommation d'aliments contaminés, notamment la viande crue ou insuffisamment cuite et le lait non pasteurisé. L'eau souillée, les surfaces contaminées et le contact direct avec des animaux infectés sont également des sources d'infection. Certaines épidémies ont été liées à des produits alimentaires comme la laitue, les épinards et les graines germées. L'infection peut aussi se transmettre d'une personne à une autre, notamment via des porteurs asymptomatiques, avec une excrétion prolongée chez les jeunes enfants. Enfin, la visite de fermes pédagogiques où les visiteurs sont en contact avec des animaux constitue un facteur de risque (OMS, 2018).

Ces souches pathogènes suivent un processus de pathogenèse en plusieurs étapes : elles adhèrent à la muqueuse de l'hôte, se multiplient et provoquent des dommages tout en échappant aux défenses immunitaires de l'organisme (Kaper et al., 2004).

### I.4. Caractères bactériologies

#### I.4.1. Caractères morphologiques et culturels

*E.coli* est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4  $\mu\text{m}$  de longueur sur 0,4 à 0,6  $\mu\text{m}$  de largeur (figure 01). Ils se présentent soit seuls ou groupés le plus souvent par deux (diplobacilles), plus rarement ils sont rencontrés en amas. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. A l'exception du sérotype **O:111** est immobile parfois capsulée (Gueye, 2007).

Cette bactérie, non exigeant, sur gélose ordinaire, donne des colonies lisses, brillantes et homogènes à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sa température de croissance optimale est de 37 °C (Diassana, 2018).

Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (Avril et al., 1992). Ces caractéristiques morphologiques et culturelles sont illustrées dans la figure 01 ci-dessous, mettant en évidence l'aspect d'*E. coli* sous microscope électronique et après coloration de Gram.



**Figure 01 :** *E. coli* sous microscope électronique(a) et après coloration de Gram(b)

### I.4.2. Caractères biochimiques

*E. coli* possède une catalase mais dépourvu d'oxydase. Elle fermente le glucose, le lactose, le mannitol, le sorbitol avec production de gaz. Cette bactérie produit de l'indole et possède une  $\beta$ -galactosidase. *E. coli* ne possède ni uréase, ni TDA, ni gélatinase. Elle ne fermente ni l'adonitol, ni l'inositol. Elle ne produit ni H<sub>2</sub>S, ni acétoïne. Elle n'utilise pas le citrate de Simmons et il existe un certain nombre de souches d'*E. coli* qui possèdent une LDC, une ODC et une ADH (Avril *et al*, 1992) (tableau I).

**Tableau I :** Caractères biochimiques d'*E. coli* (Diassana, 2018).

Tests	Résultats
Glucose	+
Lactose	+
Hydrogène Sulfuré	-
Voges-Proskauer	-
Uréase	-
Indole	+
Citrate de Simmons	-
Orthonitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside	+
Citrate de Christensen	+
Arginine Dihydrolase	+/-
Gélatinase	-
Malonate	-
Phényl-Alanine Désaminase	-
Lysine Décarboxylase	+
Ornithine Décarboxylase	+
Tryptophane Désaminase	-
Nitrate Réductase	+

### **I.4.3. Caractères antigéniques**

Les caractères antigéniques d'*E.coli* sont essentiels pour son identification, sa classification et son pouvoir pathogène. Ils permettent de différencier les souches et de comprendre leurs rôles dans les infections Humaines et animales (Avril *et al*, 1992).

Selon Avril *et al*. (1992), les principaux antigènes révélés chez *E. coli* sont :

➤ **Antigènes O, somatiques ou lipopolysaccharidique**

Il existe environ 160 antigènes O différents. Au moyen d'immun-sérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches d'*E. coli* dans les groupes O. Cette sérotypie est la seule à être utilisée en routine pour reconnaître notamment les souches EPEC.

➤ **Antigènes K, capsulaires, polysaccharidiques**

Environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus. Leur subdivision en antigènes L, A et B semble devoir être abandonnée. La majorité des souches responsables de méningites possèdent l'antigène K 1. De ces antigènes capsulaires, on distingue les antigènes protéiques ou adhésines en rapport avec la présence de pili permettant l'adhérence aux bordures en brosse (K 88, K 99).

➤ **Antigènes H ou flagellaires, protéiques**

Un total de 52 types est distingué. Ils ne sont présents que chez les souches mobiles.

### **I.4.4. Classification des pathovars d'*E. coli***

Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* sont classées en deux grandes familles selon leur tropisme et leurs effets cliniques (Michaut, 2018) (tableau II).

- ***E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC)** : responsables d'infections diarrhéiques.

- ***E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)** : impliqués dans des infections urinaires, septicémies et méningites.

**Tableau II** : Classification des pathovars d'*Escherichia coli* en fonction du site d'infection et des symptômes (Michaut, 2018).

Site d'infection		Pathovar	Symptômes
<b>InPEC</b>  ( <i>E. coli</i> pathogène intra-intestinal)	<b>Intestin grêle</b>	EPEC ( <i>E. coli</i> entéropathogène)	Diarrhées aqueuses
		ETEC ( <i>E. coli</i> (entérotoxigène))	Diarrhées aqueuses
		DAEC ( <i>E. coli</i> à adhérence diffuse)	Diarrhées aiguës
	<b>Gros Intestin</b>	EHEC ( <i>E. coli</i> entérohémorragique)	Diarrhées hémorragiques, SHU
		EIEC ( <i>E. coli</i> entéroinvasif)	Diarrhées aqueuses, dysenterie
	<b>Intestin grêle et gros intestin</b>	EAggEC ( <i>E. coli</i> entéroaggrégatif)	Diarrhées persistantes
		AIEC ( <i>E. coli</i> à adhérence invasive)	Inflammation intestinale chronique
<b>ExPEC</b> ( <i>E. coli</i> pathogène extra-intestinal)	Système urinaire	UPEC ( <i>E. coli</i> uropathogène)	80% des infections urinaires, pyélonéphrites
	Système nerveux central	NMEC ( <i>E. coli</i> induisant des méningites néonatales)	Méningites, choc septique

#### I.4.5. Facteurs de virulence

Chaque pathotype d'*E. coli* possède ses propres mécanismes de pathogénicité et un profil spécifique de facteurs de virulence, encodé par des groupes de gènes distincts. Ces gènes liés à la pathogénicité peuvent être impliqués dans diverses fonctions, notamment l'adhésion, l'invasion, l'attachement, l'acquisition du fer, la motilité et l'activité toxique (Pakbin et al., 2021).

*Escherichia coli* est capable de produire une variété de facteurs de virulence, c'est-à-dire des molécules ou des structures qui permettent à la bactérie de provoquer une maladie chez son hôte. Parmi les facteurs ces facteurs :

- ✓ **Shiga toxines (Stx)** : produite par certaines souches d'*E. coli*, dont le sérotype O157:H7 (STEC). Elle est associée à de graves maladies d'origine alimentaire chez l'Homme, telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les souches STEC (*Escherichia coli* producteurs de Shiga toxines) produisent un ou plusieurs types de toxine Shiga, qui sont de puissantes cytotoxines pouvant endommager la paroi de l'intestin et d'autres tissus (Law, 2000).
- ✓ **Système de sécrétion de type III (T3SS)** : C'est un système de sécrétion de protéines spécialisées, produit par certaines souches d'*E. coli*, notamment *E. coli* entérotoxigène (EPEC) et *E. coli* entérohémorragique (EHEC). Le T3SS permet à la bactérie d'injecter des protéines directement dans les cellules hôtes, ce qui entraîne des dommages et des dysfonctionnements cellulaires (Tobe et al., 2006).
- ✓ **Adhésines** : Les Adhésines sont des protéines de surface produites par certaines souches d'*E. coli* qui leur permettent d'adhérer aux cellules et tissus de l'hôte, favorisant ainsi la colonisation et l'infection (Sokurenko et al., 1998). Les fimbriae de type 1 et les fimbriae P sont des exemples d'adhésines d'*E. coli*.

### I.5. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques

*E. coli* est intrinsèquement sensible à la plupart des agents antimicrobiens cliniquement pertinents, mais cette espèce bactérienne possède une grande capacité d'acquisition de gènes de résistance, principalement via le transfert horizontal de gènes (HGT) (Poirel et al., 2018).

La production de  $\beta$ -lactamases, notamment les BLSE, est le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *E. coli*. Ces enzymes inactivent les céphalosporines de large spectre, réduisant les options thérapeutiques et compliquant la prise en charge des infections, en particulier nosocomiales. Les infections sanguines par ces souches résistantes entraînent souvent un retard dans le traitement efficace (Lee et al., 2012).

Les *E. coli* productrices de BLSE se propagent via divers réservoirs, incluant les Humains et l'environnement, mais aussi les animaux d'élevage, de compagnie et sauvages, qui

jouent un rôle clé dans leur dissémination en médecine Humaine et vétérinaire (**Belmahdi et al., 2022**).

En milieu clinique, les BLSE les plus fréquemment retrouvées chez *E.coli* appartiennent au groupe CTX-M, notamment les variants CTX-M-15, CTX-M-14 et CTX-M-3. En Algérie, ces enzymes sont largement détectées, aussi bien dans les infections que chez les porteurs asymptomatiques, témoignant de leur dissémination importante (**Belmahdi et al., 2022**).

L'augmentation des souches productrice de carbapénémases (EPC) compromet l'efficacité des traitements antibiotiques, en particulier les carbapénèmes, souvent utilisés en dernier recours contre les infections à bacilles à Gram négatif multirésistants. Ces enzymes, qui hydrolysent la plupart des  $\beta$ -lactamines, incluent principalement les KPC (classe A), les VIM, IMP et NDM (classe B) ainsi que les OXA-48 (classe D) (**Ortega et al., 2016**). Parmi elles, la NDM et l'OXA-48 sont les plus fréquemment retrouvées chez *E. coli* à l'échelle mondiale (**Peirano et al., 2014**).

Les principaux mécanismes de résistance aux antimicrobiens d'*E. coli* sont résumés dans le tableau III.

**Tableau III** : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques étudiés chez *E. coli* (**Ochoa et Gómez-Duarte, 2016**).

Famille d'antibiotiques	Mécanisme de résistance	Gènes impliqués
<b><math>\beta</math>-lactamines</b>	Production de $\beta$ -lactamases : enzymes qui hydrolysent le noyau $\beta$ -lactame des antibiotiques, les rendant inactifs.	blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA, blaCARB, blaLRA-X et blaGES
<b>Fluoroquinolones</b>	Mutations ponctuelles altérant les enzymes cibles des antibiotiques.	Mutations dans gyrA (sous-unité de l'ADN gyrase) et parC (sous-unité de la topoisomérase IV)
	Altération des systèmes de perméabilité (pompes d'efflux et réduction des canaux de diffusion).	Système d'efflux de type AcrAB-like

	Gènes de résistance aux fluoroquinolones transportés par des plasmides.	Gènes de la famille qnr (A, B, C, D, S) : codent des protéines Qnr qui interfèrent avec la liaison de l'antibiotique à sa cible.
		Gène codant une enzyme inactivant les fluoroquinolones : variante de l'acétyltransférase 6' (aac(6')-Ib-cr)
<b>Tétracyclines</b>	Expulsion active des antibiotiques via des pompes d'efflux spécifiques.	Gènes tetA et tetB
<b>Chloramphénicol</b>	Inactivation enzymatique par acétylation.	Gène cat, codant la chloramphénicol acétyltransférase
	Réduction de la perméabilité membranaire.	Réduction de la perméabilité membranaire.
<b>Triméthoprim-Sulfaméthoxazole</b>	Mutations des enzymes cibles.	Gènes sul1 et sul2 (résistance au sulfaméthoxazole) ; dfr (résistance au triméthoprim)

## II. Substances bioactives

### II.1. Molécules bioactives d'origine bactérienne

#### II.1.1. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens ribosomique produits par des bactéries Gram positives, Gram négatives et certaines Archées. De structures variées, non immunogènes et biodégradables, Elles présentent un spectre d'action variable en fonction du peptide, souvent étroit et dirigé contre des bactéries proches du producteur. Par exemple, la nisine (produit par *Lactococcus*) est efficace contre de nombreux Gram positifs pathogènes (*Listeria*, *Staphylocoques*, *Entérocoques...*), tandis que les colicines (protéines >10 kDa de *E. coli*) ciblent spécifiquement d'autres *E. coli* et entérobactéries (**Sharma et al., 2021 ; Zheng et al., 2014**).

Certaines bactériocines, comme les colicines produites par *E. coli*, provoquent la lyse de la souche productrice lors de leur libération, tandis que d'autres, notamment les microcines

ou la plupart des bactériocines des Gram positifs, sont sécrétées sans entraîner la mort de la bactérie productrice (**Simons et al.,2020**).Les bactériocines tuent les bactéries cibles en perturbant des mécanismes essentiels à leur survie. Par exemple, la nisine (de *Lactococcus lactis*) forme des pores dans la membrane en ciblant le lipide II, provoquant une fuite des ions ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) et la mort de la cellule. Le Lcn972 (de *Lactococcus lactis*) inhibe la synthèse de la paroi en bloquant la construction du septum. D'autres, comme la colicine E3 (d'*E. coli*), détruisent l'ARN 16S du ribosome, stoppant ainsi la traduction des protéines.

La méésentéricine Y105 (de *Leuconostoc mesenteroides*) perturbe la chaîne respiratoire en inhibant l'ATP synthase, ce qui empêche la production d'énergie (**Sharma et al.,2021 ; Charest et al.,2024 ; Simons et al.,2020**).

### II.1.2. Acides organiques

En plus des bactériocines, les bactéries lactiques (LAB) fermentent les sucres en acide lactique, qui est un puissant inhibiteur des pathogène en plus des acides organiques (**Ibrahim et al.,2021**). Ces derniers exercent leur activité antimicrobienne principalement en pénétrant à l'état non dissocié à travers la membrane des microorganismes lorsque le pH du milieu est bas. Une fois à l'intérieur de la cellule, ils libèrent des protons ( $H^+$ ) acidifiant le cytoplasme, perturbant le métabolisme, inhibant des enzymes essentielles et provoquant des dommages aux protéines, à l'ADN ainsi qu'aux membranes. L'acide acétique réduit de manière significative *L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. aureus*, tandis que l'acide butyrique est actif contre des entérobactéries comme *E. faecium* et *K. pneumoniae*. De plus, l'acide caprylique, lorsqu'il est encapsulé, permet de neutraliser efficacement des biofilms de MRSA, *P. aeruginosa* et *C. albicans* (**Sorathiya et al.,2025**).

L'acide lactique est reconnu comme le principal responsable de l'activité antimicrobienne, non seulement par l'effet du pH bas, mais également grâce à la molécule elle-même qui inhibent la croissance, réduisent l'adhésion du pathogène et favorisent son déplacement (**Abedi et al., 2013**).

### II.1.3. Antibiotiques

Outre les bactériocines ribosomiques, certaines bactéries produisent des peptides non ribosomiques ou des lipopeptides antibiotiques. Par exemple, les lipopeptides cycliques de *Bacillus* (surfactines, iturines, fengycines) sont amphiphiles et fragmentent les membranes

cellulaires, ils sont surtout antifongiques (action sur membranes eucaryotes) et peu efficaces contre les bactéries du fait de leur composition lipidique différente (Tran et al., 2022).

Les fusaricidines constituent un autre groupe de lipopeptides cycliques produit par *Paenibacillus polymyxa*, principalement actif contre des champignons pathogènes (Mülner et al., 2021).

En revanche la polymyxine B (lipopeptide polycationique de *Paenibacillus polymyxa*) est un peptide antibiotique approuvé cliniquement pour tuer les Gram négatifs résistants. Elle se lie fortement au lipide A de la LPS et perturbe la membrane externe des bacilles à Gram négatif, aboutissant à la mort cellulaire (Roberts et al., 2013 ;Mülner et al., 2021).

### II.2. Molécules bioactives d'origine fongique

Les métabolites secondaires des champignons peuvent être regroupés en quatre grandes classes selon leur voie de biosynthèse. On distingue d'abord les alcaloïdes, comme l'ergotamine et les azaphilones produits par *Penicillium mallochii*, qui sont des composés azotés généralement dérivés d'acides aminés. Ces substances sont reconnues pour leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antipaludéennes et antivirales. Les terpènes, tels que les trichothécènes et les fumonisines, possèdent des effets antifongiques, toxiques, et assurent un rôle majeur dans la défense des champignons et des plantes hôtes. Les polycétides forment une famille extrêmement diverse de métabolites produits par des complexes enzymatiques spécifiques (PKS). Parmi eux figurent les aflatoxines (puissantes mycotoxines), la lovastatine (anticholestérolémiant), ainsi que de nombreux autres composés isolés de champignons comme *Drechslera*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*, dont certains sont prometteurs comme bioherbicides en inhibant la germination et la croissance racinaire des plantes. Enfin, les peptides non ribosomiques (NRP), tels que la pénicilline et la cyclosporine (immunosuppresseur), sont produits par des synthétases spécifiques (NRPS) indépendamment du ribosome et représentent une source majeure de molécules bioactives aux applications médicales variées (Wadhwa et al.,2024 ; Correia et al.,2023 ; Vallavan et al.,2020).

La découverte des antibiotiques fongiques, pénicilline, céphalosporines, griséofulvine, échinocandines a révolutionné le traitement des infections bactériennes et fongiques. Les antibiotiques  $\beta$ -lactamines, tels que la pénicilline, les céphalosporines et les carbapénèmes issus de champignons comme *Penicillium* et *Acremonium*, inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. La griséofulvine, isolée de *P. griseofulvum*, agit en perturbant la mitose des

champignons pathogènes. Les échinocandines, extraites notamment de *Glarealozoyensis*, ciblent la synthèse du  $\beta$ -glucane de la paroi des champignons comme *Candida* et *Aspergillus*. (Wadhwa et al.,2024 ; Correia et al.,2023 ; Vallavan et al.,2020).

*Saccharomyces boulardii* est un probiotique unique à base de levure, produit des métabolites spécifiques qui lui confèrent des propriétés antimicrobiennes uniques et contribuent à la protection du tractus gastro-intestinal. Elle sécrète notamment une protéine de 54 kDa, identifiée comme une sérine-protéase, capable de dégrader les toxines A et B de *Clostridium difficile*, ainsi que le récepteur entérocytaire responsable de leur fixation à la muqueuse intestinale. Ce mécanisme permet de limiter l'inflammation, la perméabilité intestinale ainsi que les lésions tissulaires provoquées par cet agent pathogène. Parallèlement, *S. boulardii* produit une phosphatase alcaline de 63 kDa ayant pour cible les lipopolysaccharides (LPS) de bactéries Gram négatif comme *E.coli*. En les déphosphorylant, elle réduit leur activité toxique ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . Grâce à la sécrétion de ces métabolites enzymatiques spécifiques, *S. boulardii* neutralise efficacement des toxines bactériennes majeures, protégeant ainsi la muqueuse intestinale des effets pathogènes tout en réduisant l'inflammation associée (Wadhwa et al.,2024).

### II.3. Molécules bioactives d'origine végétale

Les plantes médicinales, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, renferment une diversité de composés chimiques responsables de leur défense contre les agents pathogènes. La phytochimie vise à identifier, caractériser et comprendre ces molécules, souvent responsables de leurs effets biologiques. Chaque plante possède un profil chimique spécifique. Certaines des catégories les plus courantes de composés bioactifs présents dans les plantes médicinales incluent (Paul.,2023) :

**II.3.1. Alcaloïdes :** Ce sont des composés organiques basiques contenant de l'azote, dotés d'activités biologiques notables. Ils exercent une activité antibactérienne en perturbant la membrane cellulaire, en altérant la fonction de l'ADN et en inhibant la synthèse des protéines, avec un large spectre d'action, y compris sur des souches cliniques résistantes aux antibiotiques (Yan et al., 2021).

**II.3.2. Flavonoïdes :** Métabolites secondaires abondants chez les plantes, ils agissent par divers mécanismes : perturbation de la membrane bactérienne, inhibition de la formation de biofilms,

de la synthèse de l'enveloppe cellulaire, des acides nucléiques, de la chaîne respiratoire et de l'ATP. Ils ciblent un large éventail de bactéries, Gram positif et Gram négatif, notamment par inhibition de l'ADN gyrase (**Dias et al., 2021 ; Cushnie et Lamb, 2005**).

**II.3.3. Polyphénols :** Leur activité antibactérienne repose sur la perturbation de la membrane cytoplasmique, entraînant une altération de sa perméabilité et la mort cellulaire. Leur efficacité dépend de leur structure chimique, en particulier du degré d'hydroxylation (**Salamatullah, 2022**). Leur spectre d'action est large mais varie selon les espèces bactériennes (**Taguri et al., 2006**).

### II.3.4. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges volatils extraits des plantes médicinales et aromatiques (MAPs), elles sont composées de terpènes, d'aldéhydes, d'alcools, d'esters, de composés phénoliques, d'éthers et de cétones. Elles exercent une puissante activité antibactérienne en déstabilisant la membrane cellulaire des bactéries, ce qui augmente sa perméabilité, provoque la fuite d'ions et de macromolécules et compromet des fonctions vitales comme la production d'énergie et le transport membranaire. Cette efficacité, mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), varie selon la composition chimique de l'huile et la structure des bactéries (Gram-positives ou Gram-négatives). Parmi les plus actives figurent les huiles de clou de girofle (eugénol, carvacrol), de cannelle (cinnamaldéhyde), de thym et d'origan (thymol), de piment de la Jamaïque et de romarin, qui inhibent *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**Swamy et al., 2016**).

### II.3.5. Peptides antimicrobiens

Tout comme les autres molécules précédemment citées, ces peptides sont synthétisés via des voies métaboliques spécifiques. De nature généralement cationique, ils peuvent inhiber le transport des protéines, bloquer des canaux ioniques ou certaines enzymes, et interagir avec l'ADN ou l'ARN (**Bakare et al., 2022**).

Largement présents chez les plantes agricoles, ils jouent un rôle essentiel dans la résistance aux infections microbiennes. Leur distribution dans divers tissus végétaux, combinée à leur forte activité in vitro, suggère une fonction de protection généralisée. Leur expression, tant

locale que systémique lors d'une attaque pathogène, confirme leur implication dans les mécanismes de défense des plantes (**Kim *et al.*, 2009**). Parmi les peptides identifiés :

- **Snakin -1** : actif contre plusieurs bactéries Gram-positives et Gram-négatives.
- **Hispidulin** : peptide cationique actif contre différentes souches bactériennes.
- **Vulgarinin** : possède une activité antibactérienne significative contre des bactéries pathogènes (**Salas *et al.*, 2014**).

# *Matériel et méthodes*

Ce travail a été effectué au laboratoire de Microbiologie du département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Abderrahmane Mira de Bejaia ; dans le but de déterminer l'effet antibactérien de certaines substances bioactives à l'égard des souches bactériennes d'*E.coli* de différentes niches écologiques. Cette étude est réalisée pendant une durée de 03 mois, s'étalant du mois d'avril au mois de juin 2025.

## **I. Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées**

### **I.1. Origine des souches bactériennes**

Un total de 13 souches d'*E.coli* et de 09 souches appartenant au genre *Lactobacillus* est utilisé dans cette étude. Ces souches sont isolées au laboratoire de microbiologie de l'université de Bejaia, à partir de différents prélèvements, alimentaires, cliniques et marins (tableau IV). Elles été conservées à 4°C, respectivement dans un bouillon nutritif et bouillon MRS.

**Tableau IV : Origines des souches bactériennes utilisées**

<b>Code des souches</b>	<b>Origine</b>
<i>Escherichia coli</i>	
<b>E1</b>	Marine (eau de mer)
<b>E5</b>	
<b>E7</b>	
<b>E10</b>	
<b>E11</b>	
<b>E12</b>	
<b>E16</b>	
<b>E-01</b>	Alimentaire (lait cru)
<b>E-09</b>	
<b>E-16</b>	
<b>ECC2</b>	Clinique (selles des malades cancéreux)
<b>ECC3C</b>	
<b>ECC4C</b>	
<i>Souches de Lactobacillus</i>	

S1	Alimentaire (lait cru)
S2	
S3	
S4	Alimentaire (lait fermenté)
S5	
S6	
S7	Alimentaire (beurre traditionnel)
S8	
S9	

### **I.2. Revivification**

Les souches de *E.coli* conservées à 4 C, ont été revivifiées par un repiquage dans 5ml de bouillon nutritif (Diagnostic liofilchem, Italie), ensuite sont incubé à 37 C° pendant 24h. Le développement de ces bactéries se traduit par un trouble. Cette étape permet la croissance des bactéries soumises déjà au stress de la conservation, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement.

Les souches lactiques conservées sur bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (TM Media, Inde) à (4°C), sont revivifiées par le transfert de 1 ml de leur culture dans des tubes de 9 ml du bouillon MRS. Ensuite elles sont incubées à 37°C pendant 24h et 48 h. Le développement de ces bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube qui caractérise les bactéries lactiques

Cette opération est répétée plusieurs fois, afin d'avoir des cultures fraîches qui serontensemencées sur les géloses appropriées.

### **I.3. Vérification de la pureté des souches**

La purification des souches utilisée consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose appropriée, gélose Eosine Bleu de Méthylène EMB (Biotechlab) pour *E.coli* et MRS pour les bactéries lactiques. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention des colonies de même aspect, même forme indiquant la pureté des souches.

### **I.4. Etude de caractère morphologique**

#### **I.4.1. Examen macroscopique**

Ce test permet de mettre en évidence la morphologie des colonies obtenues sur les géloses appropriées, à partir de l'observation à l'œil nu qui permettra la détermination de l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies. L'observation macroscopique est faite après 24h d'incubation à 37°C sur gélose.

#### **I.4.2. Examen microscopique**

L'aspect microscopique consiste à observer la forme, taille, le mode d'association et le Gram des cellules après coloration de Gram. Elle permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire, entre les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif (Guiraud., 2012).

### **I.5. Test catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ainsi en protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs. Il permet de distinguer les bactéries capables d'utiliser l'oxygène (aérobies et anaérobies facultatives) de celles qui ne le tolèrent pas (anaérobie stricte) (Guiraud, 2012).

La méthode consiste à mettre en contact une colonie bactérienne d'une culture fraîche avec une goutte de  $H_2O_2$  et d'observer l'effervescence dans le /cas positif.

### II. Préparation des extraits de plante

Les feuilles de deux plantes médicinales *Rubus fruticosus* et *Rosa canina* qui ont été déjà collecté entre le 28 février et le 5 mars 2024, proviennent de deux régions différentes Tahamamth á Amizour et á El Fley Sidi Aich Wilaya de Bejaia, ont été séché dans une étuve à 40°C pendant 48h.

Les échantillons secs obtenus, ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisés, stockés et conservé dans des flacons en verre hermétiques à l'abri de la lumière et loin de l'humidité.

Pour l'extraction des composants bioactifs, on a utilisé l'eau distillé comme solvant d'extraction (milieu aqueux), et deux méthodes : la macération et l'infusion.

**II.1. Macération aqueuse :** 10 g de la poudre végétale (des feuilles de l'égantier et de la ronce) sec et broyé a été macéré à température ambiante dans un erlenmeyer avec 100ml d'eau distillé, ce mélange a été mis sous agitation continue pendant 24 heures. Après cela, le macérât a été filtré avec du papier wattman.

**II.2. Infusion :** 10 g de poudre végétale (des feuilles de l'égantier et de la ronce) a été mis dans un erlenmeyer avec 100ml de l'eau distillé bouillante, a été infusé jusqu'au refroidissement. Après refroidissement le mélange a été filtré avec du papier wattman.

Les quatre filtrats obtenus (E,EI, R et RI) ont été conservé à 4° C jusqu'à l'utilisation.

### III. Détermination de l'activité antibactérienne

#### III.1. Etude de la sensibilité des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

Selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en collaboration avec l'EUCAST (2024) ; L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) a été réalisée par la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton.

À partir d'une culture pure et fraîche sur milieu EMB, 2 à 3 colonies de mêmes morphologies ont été prélever à l'aide d'une anse de platine stérile, ensuite suspendre les colonies dans l'eau physiologique et mélanger pour obtenir une suspension homogène de densité bactérienne au standard 0,5 McFarlane ce qui correspond à  $10^8$  UFC/ml pour *E. coli*.

L'ensemencement a été réalisé dans les 15 minutes suivantes à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension. Après avoir éliminé l'excès de liquide, l'écouvillon a été passé sur

toute la surface de la gélose en stries serrées, en tournant la boîte de 60° à chaque passage. L'ensemencement s'est terminé par un passage sur la périphérie de la gélose.

Les disques d'antibiotique (tableau V) sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince préalablement stérilisée par flambage, en respectant une distance d'environ 30 mm entre disque. Une légère pression est exercée sur chacun d'eux afin d'assurer un contact homogène avec la surface du milieu.

Après le dépôt des disques, les boîtes doivent être retournées et incubées idéalement dans les 15 minutes suivantes, sans dépasser un délai de 60 minutes. L'incubation s'effectue en aérobiose, à une température de 37 °C, pendant une durée de 18 à 24 heures.

Afin de vérifier la qualité de la gélose MH et des disques d'antibiotiques, une souche de référence *E.coli* ATCC 25922 a été utilisée.

### III.2. Etude de la sensibilité des souches de *Lactobacillus* aux antibiotiques

Les souches de *Lactobacillus* ont été déjà À partir d'une culture pure et fraîche sur gélose MRS, 2 à 3 colonies de mêmes morphologies ont été prélevées et ensemencé dans 10ml de bouillon MRS. Après incubation à 37°C/24h, une dilution décimale a été réalisé pour obtenir une concentration cellulaire de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Ensuite un antibiogramme est effectué sur gélose MRS et les mêmes antibiotiques ont été testés.

**Tableau V** : Antibiotiques testés

Antibiotique	L'abréviation	La concentration	La marque	La famille
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20/10µg	Bioanalyse	Penniciline
Céfotaxime	CTX	30 µg	Liofilchem	Céphalosporine
Céfoxitine	FOX	30 µg	Liofilchem	
Ceftazidime	CAZ	10 µg	Liofilchem	
Ertapénème	ETP	10 µg	Liofilchem	

Imipénème	<b>IMP</b>	<b>10 µg</b>	<b>Liofilchem</b>	<b>Carbapénème</b>
Méropénème	<b>MRP</b>	<b>10 µg</b>	<b>Liofilchem</b>	
Colestine	<b>CT</b>	<b>10 µg</b>	<b>Bioanalyse</b>	<b>Polymexine</b>
Colestine-sulfate	<b>CT</b>	<b>10 µg</b>	<b>OXOID</b>	
<b>Clindamycine</b>	<b>DA</b>	<b>24 µg</b>	<b>CYPRESS DIAGNOSTICS</b>	<b>Lincosamide</b>
<b>Tétracycline</b>	<b>TE</b>	<b>30 µg</b>	<b>Liofilchem</b>	<b>tétracycline</b>
<b>Amikacine</b>	<b>AK</b>	<b>30 µg</b>	<b>HIMEDIA</b>	<b>Aminoside</b>

### III. 3. Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactique à l'égard d'*E. coli*

#### III.3.1. Test des spots

Ce test est réalisé pour vérifier l'effet inhibiteur de 9 souches différentes de *Lactobacillus* (LB) vis-à-vis d'*E.coli*. À partir d'une culture jeune de LB obtenus, après 18h d'incubation à 37°C, 5µl ont étéensemencés sous forme de spot sur une gélose MRS, pour chaque boîte 3 spots de différentes souches ont été réalisés. Ces boites ont été laissées sécher près du bec bensun, ensuite elles sont incubées pendant 24h à 37°C. Après 24h incubation, ces boites ont étéensemencées par 10 ml de gélose MH, inoculé par 1ml de 10<sup>7</sup> UFC/ml de souche d'*E.coli*. Les boites ont été examinées, après 24h d'incubation, afin de détecter les zones d'inhibition autour des spots et mesurer leur diamètre.

#### III.3.2. Test des surnageants de bactéries lactiques

##### A-Méthode des disques imprégnés

Les disques de papier stérile (d'environ 6 mm de diamètre) étaient imprégnés avec 50 µL de surnageant des cultures des bactéries lactique, après avoir été déposés sur une gélose MH préalablement inoculée avec une suspension standardisée à 10<sup>7</sup> UFC/ml de la souche *E.coli*. Pour chaque souche *E.coli*, 9 surnageant sont testé. Ces surnageant ont été obtenus, par centrifugation, des cultures fraîches à 4000 rpm, durant 15 min à 4°C, filtrés avec des filtres

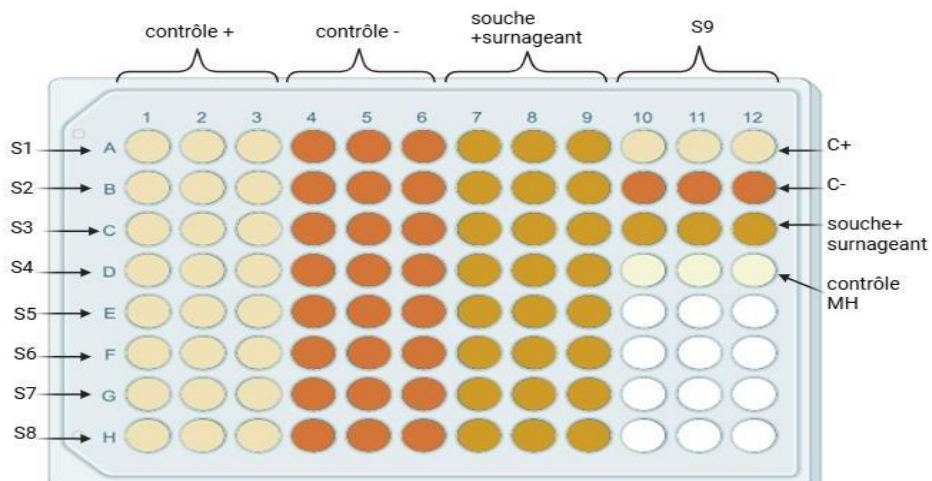
seringue de 0,22  $\mu\text{m}$ . Après une incubation à 37 °C pendant 18 à 24h, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré en mm.

### B-Méthode des puits

Cette méthode consiste à inoculer la surface d'une boîte de gélose MH par la souche *E.coli* de  $10^8$  UFC/ml, puis à y creuser 4 à 5 puits de 6 mm de diamètre, à l'aide d'un embout stérile. Dans ce protocole, une fine couche de gélose nutritive (1 mm) est d'abord coulée dans les boîtes de Pétri, puis une fois solidifiée, on ajoute une seconde couche de gélose MH (4 mm) (**Balouiri et al., 2016**). Ensuite, chaque puits été rempli avec 100  $\mu\text{L}$  des surnageants de cultures bactériennes, puis les boîtes sont incubées à 37 °C, et les diamètres de zones d'inhibition sont mesurés après 24h.

### C-Méthode des microplaques

Afin de tester l'effet des surnageants des bactéries lactiques sur *E. coli* en milieu liquide. Des microplaques de 96 puits ont été utilisé, chaque microplaque est utilisée pour une souche de *E.coli* (figure 02). D'abord, les puits sont remplis avec 100  $\mu\text{l}$  de bouillon MH. Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  de la souche pathogène et 50  $\mu\text{l}$  du surnageant testé sont ajoutés. Les tests sont réalisés trois fois. Les microplaques ont été incubé pendant 24h à 37°C et la mesure de la densité optique est réalisée à l'aide d'un lecteur microplaque (Biotek ELX808) à une longueur d'onde de 630 nm.



**Figure 02** : Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques

### **III. 4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes**

#### **II.4.1. Test des puits**

C'est une méthode de diffusion rapide sur milieu gélosé, elle sert pour l'évaluation de l'activité des extraits sur des bactéries utilisées.

Une fine couche de gélose nutritive est préalablement versée au fond de la boîte Pétri suivie du versement de la gélose Muller Hinton. Un ensemencement par écouvillon des souches d'*E.coli* à  $10^7$  UFC/ml est effectué. Des puits sont creusés puis rempli de 100µl de chaque extrait, en plus d'un témoin négatif d'eau distillée pour chaque boîte. Une pré-diffusion de 2heures à 4 °C, est faite avant l'incubation 37°C pendant 18 à 24 heures. L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition des zones d'inhibition.

#### **II.4.2. Test des disques**

La méthode de diffusion en milieu gélosé, également appelée "méthode des disques", est l'une des méthodes les plus utilisés pour évaluer la sensibilité des bactéries aux substances bioactives. Il s'agit d'une méthode manuelle dans laquelle il est indispensable d'utiliser un milieu Mueller-Hinton et un inoculum standardisé pour réaliser cette technique.

Nous avons utilisé dans cette procédure, les extraits aqueux de la ronce et de l'églantier en plus d'un témoin négatif d'eau distillée pour chaque boîte.

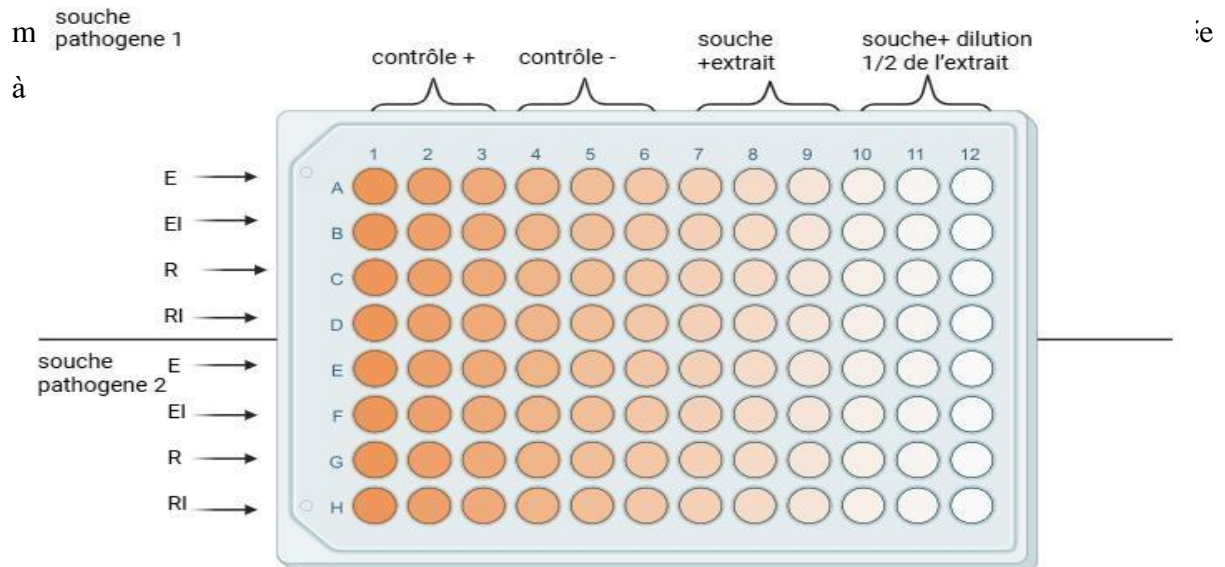
Les souches sont ensemencées sur milieu MH puis les disques sont déposés et sont imbibés de 50µl de chaque extrait ; après deux heures de pré-diffusion à 4°C les boîtes Petri seront incubées à 37°C pendant 18heures et les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés.

Les deux tests sont aussi réalisés à l'égard des bactéries du genre *Lactobacillus*.

#### **III.4.3. Méthode des microplaques**

Deux plantes ont été utilisées dans cette étude : la ronce (*Rubus fruticosus*) et l'églantine (*Rosa canina*). Pour chacune d'elles, deux méthodes d'extraction ont été mises en œuvre : une infusion classique, où une poudre de la plante est immergée dans de l'eau distillée bouillante (100°C) pour libérer les composés actifs, et une macération sous agitation toute une nuit, où la poudre de plante est mélangée à de l'eau distillée afin de maximiser l'extraction des principes actifs.

Dans le but de tester l'effet des quatre filtrats (E, EI, R et RI) contenant les extraits des deux plantes, en milieu liquide, la méthode des microplaques de 96 puits a été appliquée (figure 03). Dans chaque puits, 100  $\mu$ L de bouillon MH ont été ajoutés, suivis de 50  $\mu$ L de la souche *E.coli* et de 50  $\mu$ L de l'extrait de plante. Les tests ont été réalisés en triplicat. Les



**Figure 03 :** Microplaque utilisée pour tester l'effet antibactérien des extraits de plantes

## ***Résultats et discussion***

### I. Revivification et vérification de la pureté des souches

#### I.1. Revivification des souches *E.coli*

La croissance des souches d'*E.coli* se manifeste par la présence de trouble dans les tubes du bouillon nutritif ensemencés ce qui indique la croissance bactérienne.

#### I.2. Revivification des souches lactiques

L'apparition de trouble dans les tubes ensemencés de bactéries lactiques signifie la croissance des souches sur le bouillon MRS, dont le fond des tubes est plus dense en raison de recherche des conditions d'anaérobiose, et cela confirme la viabilité des bactéries en comparaison avec le tube témoin (absence de croissance).

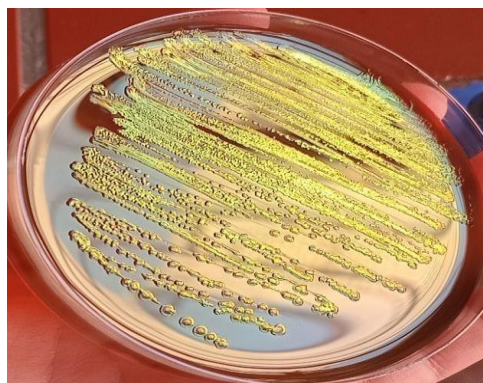
#### I. 3. Vérification de la pureté des souches

Les résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique, ont indiqués que toutes les souches utilisées sont pures et ne présentent pas de contaminations.

##### I.3.1. Aspect macroscopique

Cet examen consiste en une observation directe à l'œil nu, des colonies obtenues sur gélose EMB et MRS pour caractériser leur forme, couleur, taille et leur aspect (**Badis et al., 2005**).

Après incubation a 37°C pendant 24h sur milieu EMB, la croissance de *E.coli* a donnée des colonies arrondie, lisse, á bord régulier avec une couleur verdâtre et un éclat vert métallique sur la gélose qui est caractéristique (figure 04).



**Figure 04 :** Observation macroscopique *Escherichia coli* sur milieu EMB après incubation à 37°C pendant 24h

Les colonies des souches *Lactobacillus* obtenues sur gélose MRS, sont apparues de petite taille, lisses, de couleur blanchâtres et crémeuses, bombées (allongées ou à bords arrondis ou lenticulaires) (figure 05).



**Figure 05 :** aspect des *Lactobacillus* sur gélose MRS

### **I.3.2. Aspect microscopique**

L'observation d'un frottis coloré avec la coloration de Gram a révélé que toutes les souches d'*Ecoli* sont de Gram négatif et se présentent sous forme de bacilles souvent isolé. Cependant les souches de *Lactobacillus* sont à Gram positifs (couleur violet). D'autre part, nous a permis de distinguer la morphologie des bactéries lactiques qui se présentent sous forme des bacilles plus ou moins longues, ces formes sont disposées en paires, en chaînes de différentes longueurs ou en singulier simple.

### **II. Test de la catalase**

Les résultats du test de catalase révèlent une absence d'effervescence chez tous les *Lactobacillus*, ce qui signifie qu'elles sont catalase négative et présence d'effervescence chez toutes les souches d'*Ecoli* ce qui signifie qu'elles sont catalase positive.

### **III. Test d'activité antibactérienne**

#### **III.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques d'*E.coli***

Un total de 13 souches d'*E. coli* ont été soumises à un test de sensibilité à 12 antibiotiques issus de familles variées, selon la méthode standard de l'antibiogramme. Les résultats sont illustrés dans figures 06 et 07.

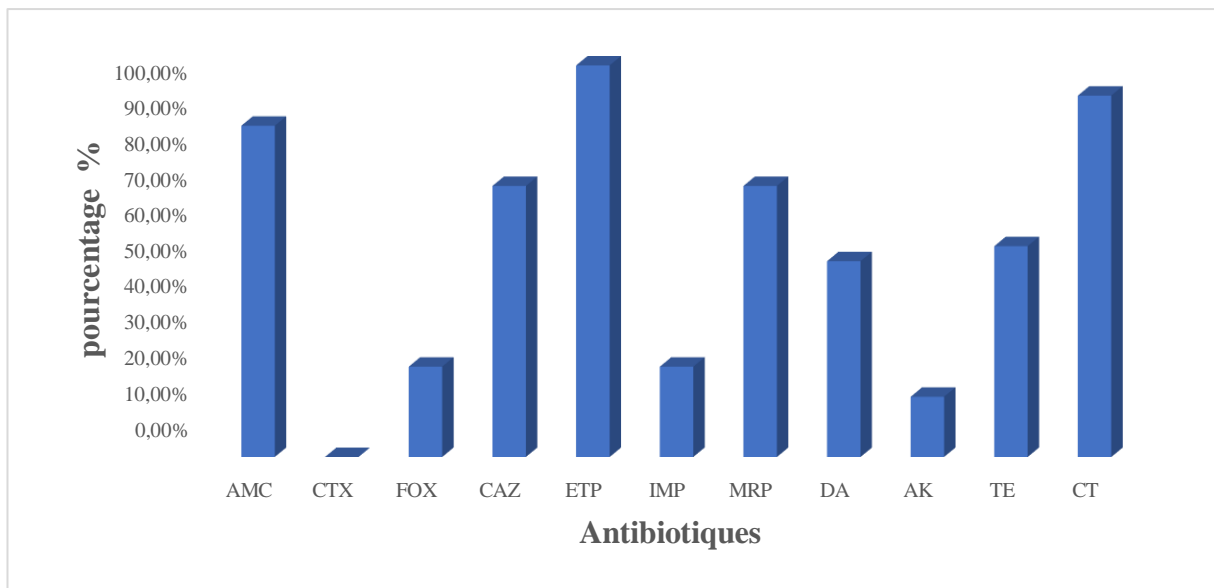


Figure 06: Fréquence des souches *d'E.coli* résistant aux antibiotiques

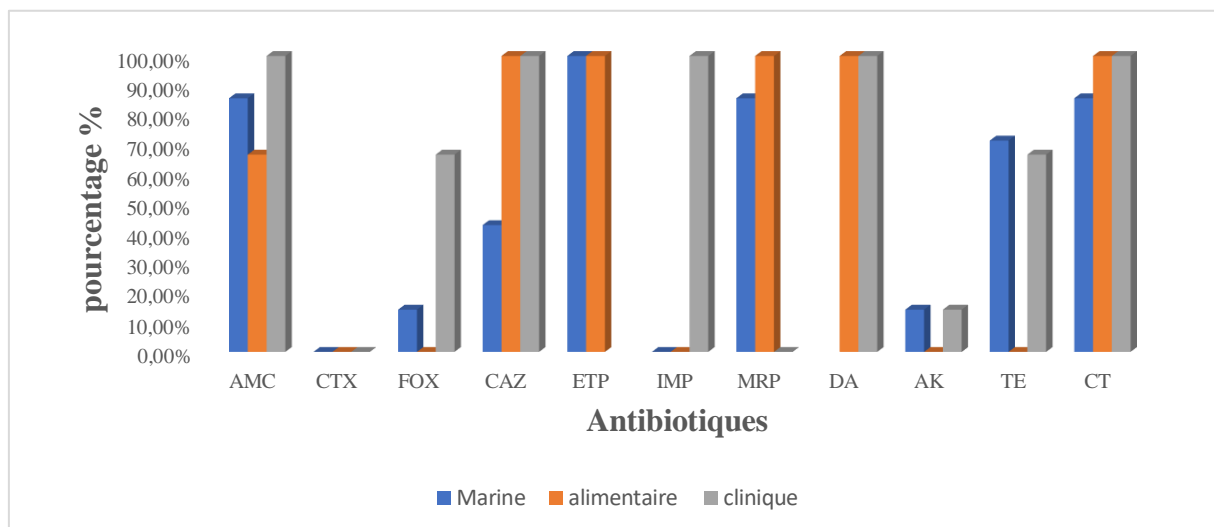


Figure 07 : Fréquence des souches *d'E.coli* résistant aux antibiotiques selon leurs origines.

Les souches présentent une résistance marqué vis-a-vis des carbapénème à savoir Ertapeneme et méropénème mais restent sensible à l'imipénème. Cette sensibilité est probablement du a la présence d'une carbapénémase (Ortega *et al.*,2016)

La forte résistance observée à l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC) (84,6 %) pourrait s'expliquer par la production d'AmpC, non inhibées par le clavulanate, associé ou non à une BLSE. Toutefois, la souche E16 se distingue par une synergie marquée entre AMC et CTX

indiquant une inhibition enzymatique par le clavulanate, compatible avec la production d'une BLSE classique (**Rossi ,2015**).

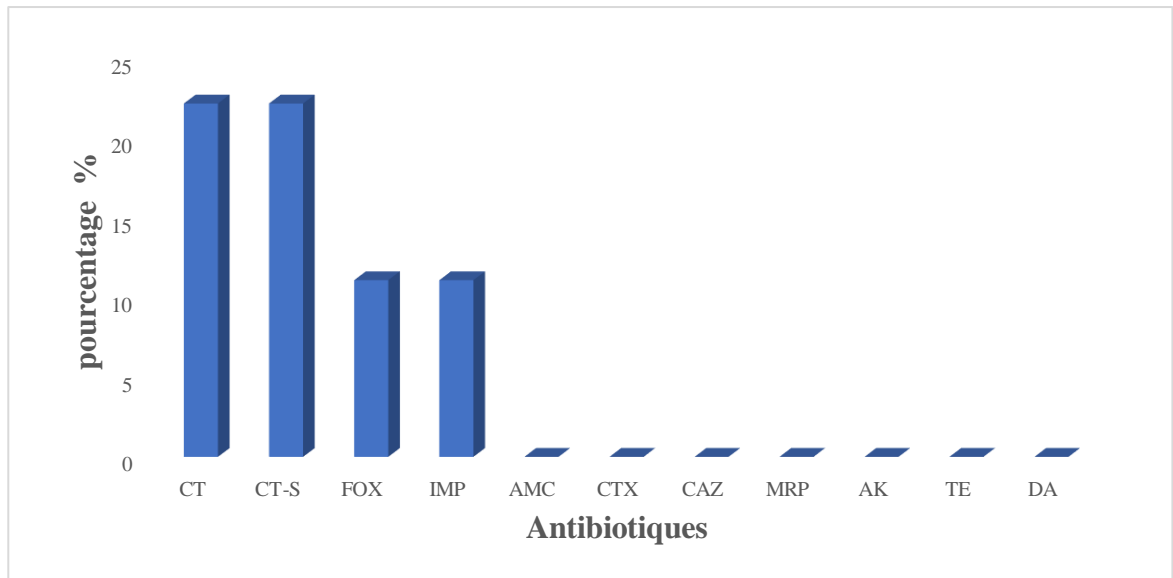
La résistance à la CAZ est probablement due à la présence d'une BLSE associée ou non à une AmpC en particulier chez la souche résistante à la FOX (**Judge et al.,2023**)

En revanche, l'amikacine (AK) demeure l'un des antibiotiques les plus efficaces, avec un faible taux de résistance (15,4 %), ce qui rejoint les résultats de **Singh et al. (2023)**, qui rapportent un taux de résistance de 24 % chez *E. coli*. Concernant la tétracycline (TE), une résistance modérée est observée (61,5 %), mais elle reste préoccupante. Cette résistance est principalement liée à l'acquisition de gènes *tet*, codant pour des pompes d'efflux ou des protéines de protection ribosomale (**Aihiokhai et al., 2023 ; Terzi et al., 2018**).

L'analyse de la figure 03, met en évidence des profils de résistance variables selon l'origine des souches (marine, alimentaire, clinique). Les souches cliniques sont les plus résistantes, avec des taux atteignant 100 % pour plusieurs antibiotiques (AMC, CTX, CAZ, ETP, IMP, MRP), utilisés pour le traitement des infections probablement en lien avec la forte pression de sélection des antibiotiques (**Kraupner et al., 2021 ;Huijbers et al., 2023**). Les souches alimentaires présentent également des résistances élevées, notamment à CAZ, ETP, MRP et DA, ce qui pourrait refléter une exposition aux antibiotiques en milieu agricole ou vétérinaire en raison de la mauvaise manipulation et condition d'hygiène lors de la préparation (**Li et al., 2020 ; Appau et al.,2024**). En comparaison, les souches marines sont globalement moins résistantes, bien que des résistances non négligeables soient observées pour AMC (85 %), MRP (85 %) et TE (70 %). Ces données indiquent que même des environnements moins exposés, comme le milieu marin, ne sont pas épargnés par la diffusion de la résistance, probablement en raison de rejets anthropiques (**Al-Sarawi et al.,2022**).

### III.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Lactobacillus*(LB)

Le profil de résistance de 9 souches de genre *Lactobacillus* a été déterminé par la méthode standard de l'antibiogramme à l'égard de 11 antibiotiques de différente famille, les résultats sont présentés dans la présentation 08.



**Figure 08** : Fréquence des souches de LB résistantes à différents antibiotiques.

L'analyse des profils de résistance de 9 souches de LB testées contre 11 antibiotiques révèle une faible fréquence de résistance globale. Les souches bactériennes de *Lactobacillus* montrent une sensibilité remarquable aux antibiotiques AMC, CTX, FOX, CAZ, MRP, AK et DA montrent (0 % de résistance). Cela indique une activité efficace de ces antibiotiques sur l'ensemble des souches testées. Une résistance modérée est observée à IMP(11.1 %), et à TE également (11.1 %), ce qui est cohérent avec la résistance naturelle ou acquise chez certaines bactéries face aux tétracyclines.

Les souches de *Lactobacillus* ont présenté une sensibilité élevée à la majorité des antibiotiques testés, ce qui constitue un indicateur positif du point de vue de la sécurité microbiologique. La résistance aux antibiotiques chez ces bactéries lactiques peut être

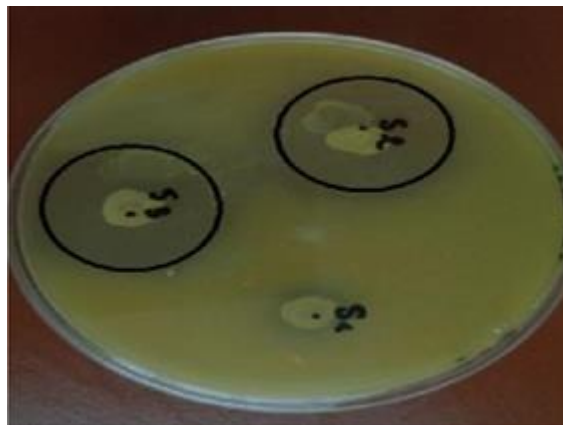
considérée comme acceptable lorsqu'elle est intrinsèque, car elle n'est ni acquise ni transmissible. En revanche, elle devient préoccupante lorsqu'elle est acquise, car elle peut être transférée à d'autres bactéries (Anisimova et al., 2022).

Dans cet étude, l'absence de profils de multirésistance suggère que ces souches ne jouent probablement pas le rôle de réservoirs de gènes de résistance. Toutefois, comme le soulignent Shahali et al. (2023), même en l'absence de résistance phénotypique apparente, la présence de gènes de résistance transférables ne peut être exclue, ce qui pourrait favoriser leur dissémination dans l'environnement bactérien.

### III. 3.Mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques

#### III.3.1. Test des spots

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des pathogènes apparaît sous forme de zones claires autour de chaque spot et qui diffèrent par leur diamètre (figure 09). L'inhibition est généralement considérée comme positive lorsqu'un halo d'au moins 1 mm de diamètre est observé autour de la zone testée (Khunajakr et al., 2008).



**Figure 09:** Exemples de résultats obtenus par le test de spots sur *E.coli*

Le test de spot de *Lactobacillus* (09 souches) réalisé à l'égard de 13 souches d'*E.coli* a mis en évidence une activité antibactérienne variable selon les associations bactériennes (Tableau IV).

**Tableau VI :** Résultats du test des spots des souches de *Lactobacillus* à l'égard des souches de *d'E.coli*

Souches d' <i>E.coli</i>	Souches de <i>Lactobacillus</i>								
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<b>E1</b>	-	-	++	-	-	-	+	+	+++
<b>E5</b>	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++
<b>E7</b>	-	+	-	-	-	-	++	-	+++
<b>E10</b>	-	-	+	-	-	-	++	++	++
<b>E11</b>	-	-	-	-	+	-	++	++	+++
<b>E12</b>	++	+++	+++	-	++	-	-	+	+
<b>E16</b>	-	-	++	++	+	-	-	-	-
<b>E-01</b>	-	-	-	++	-	-	-	-	-
<b>E-09</b>	-	-	-	++	-	-	-	-	-
<b>E-16</b>	-	++	-	+++	++	++	-	-	-
<b>ECC2</b>	-	+	+	++	++	++	-	+++	+
<b>ECC3C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ECC4C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : Absence ; (+) : diamètre entre 2 à 10mm ; (++) : diamètre entre 10 à 25 mm ;

(+++): diamètre entre 25 à 35mm

La meilleure activité antibactérienne a été observée avec la souche S9, qui a produit une zone d'inhibition de 34 mm contre les souches E1 et E7. La souche S3 a également montré une bonne activité contre E12, avec un diamètre de 31 mm.

Certaines souches *d'E. coli* se sont révélées particulièrement sensibles à plusieurs souches lactiques. Par exemple, E5 a été inhibée par l'ensemble des souches de *Lactobacillus*,

ECC2 par 7 souches, E12 par 6 souches, tandis que E1, E7, E10 et E-16 ont présenté une sensibilité à 4 souches. En revanche, ECC3C et ECC4C n'ont montré aucune sensibilité à l'ensemble des souches de *Lactobacillus* testées.

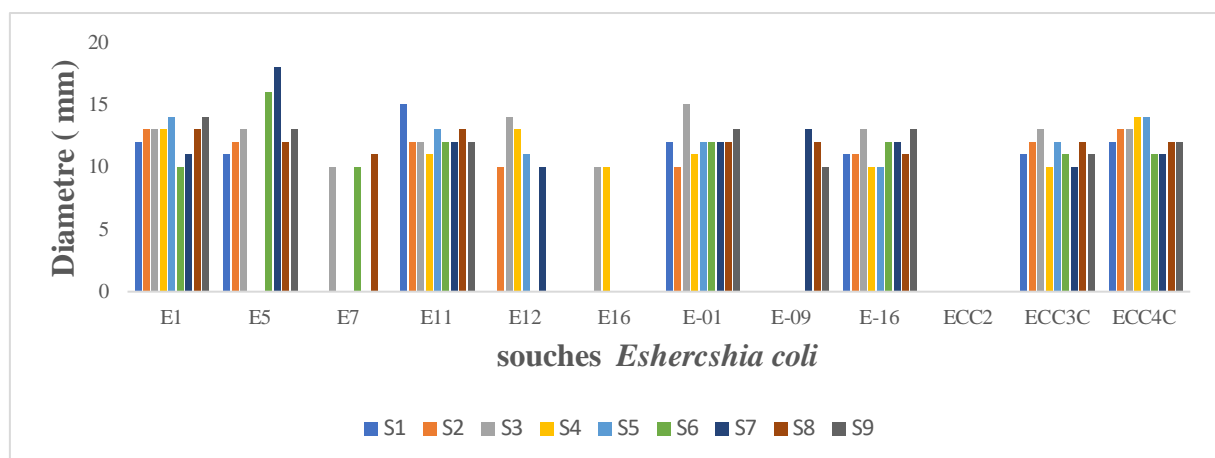
Les résultats obtenus mettent en évidence une forte activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* testées contre *E.coli*. Cette inhibition peut être expliquée par la production de composés antimicrobiens naturels, tels que les acides organiques, les bactériocines, et parfois le peroxyde d'hydrogène.

Selon **Abedi et al.(2013)**, la production de l'acide lactique est le principal inhibiteur de la croissance bactérienne par l'acidification du milieu. De même, **Poppi et al. (2015)** suggère que l'inhibition est liée à production d'acides organiques comme l'acide D-lactique et l'acide acétique. En plus, **Ibrahim et al. (2021)** a confirmé que selon d'autre étude l'effet inhibiteur est lié aux métabolites de *Lactobacillus*. Selon **Riaz et al. (2010 )** et **Imade et al. (2021)**, l'activité antibactérienne est également liée à la production des bactériocines stables à la chaleur capables d'inhiber des souches d'*E. coli* résistantes.

### III.3.2. Test d'activité des surnageant de bactéries lactiques

#### ✓ Test des disques

Le test des disques a été réalisé avec 9 surnageants de *Lactobacillus* à l'égard des 13souches de *E.coli*, afin d'évaluer leur activité antimicrobienne. Les diamètres des zones d'inhibitions mesurés, en mm, sont enregistrés dans la figure 10.



**Figure 10 :** Résultats de l'activité antibactérienne des surnageants des souches de *Lactobacillus* à l'égard d'*E. coli* obtenus par le test des disques.

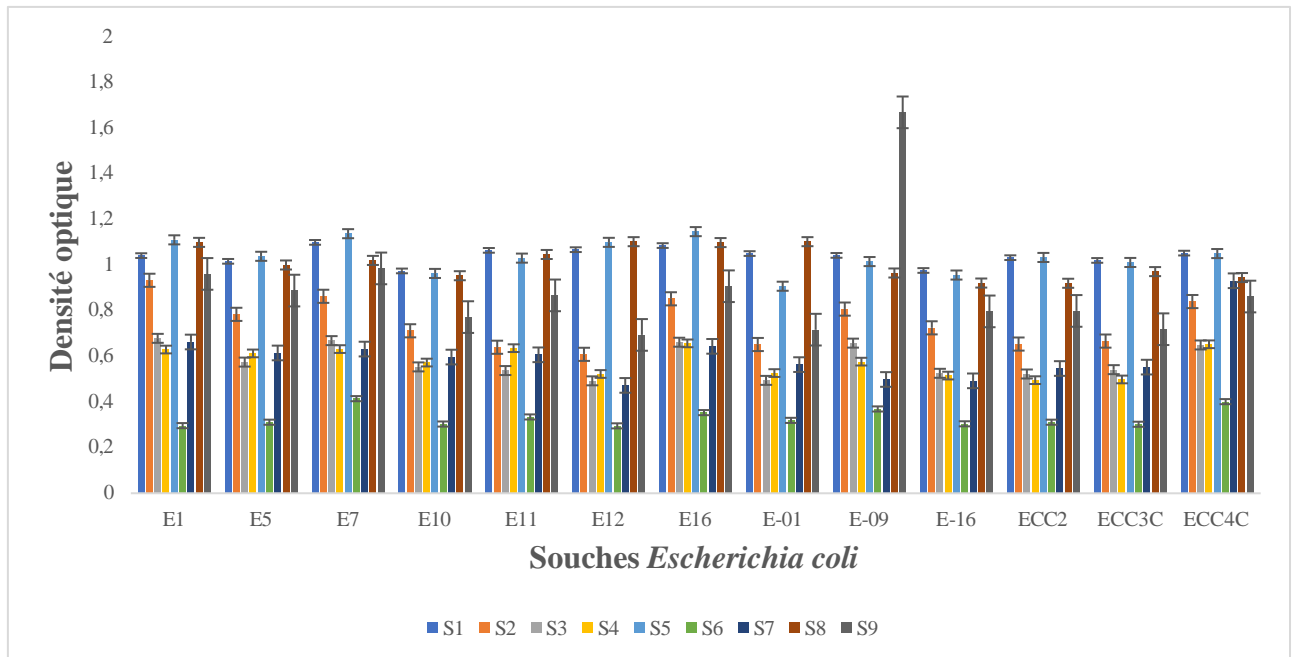
L'analyse comparative de l'activité antimicrobienne des surnageants de différentes souches de *Lactobacillus* met en évidence une hétérogénéité significative, tant en termes de spectre d'inhibition que de diamètre des zones d'inhibition. La souche S3 se distingue par son spectre d'action le plus étendu, avec l'inhibition de 10 souches sur 11 d'*E. coli*, et des zones comprises entre 10 et 15 mm, traduisant une activité antimicrobienne stable. En revanche, les souches S1, S2, S4, S8 et S9 montrent des effets plus modérés, et S5 se révèle être la moins performante en termes de spectre d'action.

Ces résultats confirment que l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur *E. coli* est lié à plusieurs composés antimicrobiens. D'une part, l'étude **d'Abedi et al. (2013)** a montré que l'acide lactique inhibe la croissance de *E. coli*. D'autre part, pour mieux comprendre la nature des composés responsables de cette inhibition, plusieurs études ont eu recours à des tests de neutralisation du pH des surnageant selon l'étude **d'Imade et al., (2021)** même après neutralisation des surnageant et l'élimination du peroxyde d'hydrogène, le surnageant conserve son pouvoir inhibiteur ce qui suggère que, au-delà de l'acidité, d'autres substances telles que les bactériocines jouent un rôle essentiel dans l'inhibition de la croissance bactérienne et **Poppi et al.(2015)** a démontré que ces bactériocines sont thermostables a la chaleur. Ainsi, la persistance de l'effet antimicrobien après neutralisation confirme que les bactéries lactiques produisent plusieurs types de composés inhibiteurs, dont certains conservent leur efficacité indépendamment du pH (**Scillato et al.,2021 ; Riaz et al.,2010**).

### ✓ Test sur microplaque

Le but de cette étape est de chercher l'activité antibactérienne dans les surnageant de culture de bactéries lactiques, et de savoir également s'il s'agit d'un effet bactériostatique ou bactéricide.

Plusieurs souches ont présenté une réduction marquée de la densité optique (DO), indiquant une inhibition de croissance bactérienne en présence de certains surnageants. Les souches E10, E11, E12, E16 et E-16 ont été particulièrement sensibles, avec des DO nettement inférieures à celles observées pour les autres souches, notamment lorsqu'elles sont exposées aux surnageant S3, S4, S6 et S7. Les différences de la densité optique sont toutes négatives pour tous les surnageant à l'égard des 13 souches de *E.coli* ce qui signifie que les surnageants ont inhibé leur croissance.



**Figure 11 :** Résultats de l'effet des surnageant des bactéries lactiques vis-à-vis d'*E.coli* étudié sur les microplaques.

Parmi tous les surnageants testés, S6 se distingue par son efficacité remarquable, entraînant une baisse importante de la DO sur la majorité des souches sensibles. Cela suggère que ce surnageant possède une activité antimicrobienne élevée et potentiellement exploitable pour limiter la prolifération de souches pathogènes d'*E. coli*. S3, S4 et S7 montrent également une certaine efficacité, bien qu'un peu plus variable selon les souches.

Selon **Aditya et al. (2020)**, les métabolites produits par *Lactobacillus* ont montré une activité antibactérienne efficace, confirmant leur potentiel inhibiteur. Ces résultats indiquent que l'inhibition d'*E. coli* est due à une action combinée de l'acide lactique et des bactériocines (**Abedi et al., 2013 ; Imade et al., 2021 ; Scillato et al., 2021 ; Riaz et al., 2010**).

De plus, **Poppi et al. (2015)** ont démontré, à travers un test en bouillon, que les surnageants de cultures de *Lactobacillus* réduisaient significativement la croissance d'*E. coli* O157:H7, confirmant l'effet inhibiteur des acides organiques (notamment D-lactique et acétique) produits au cours de la fermentation.

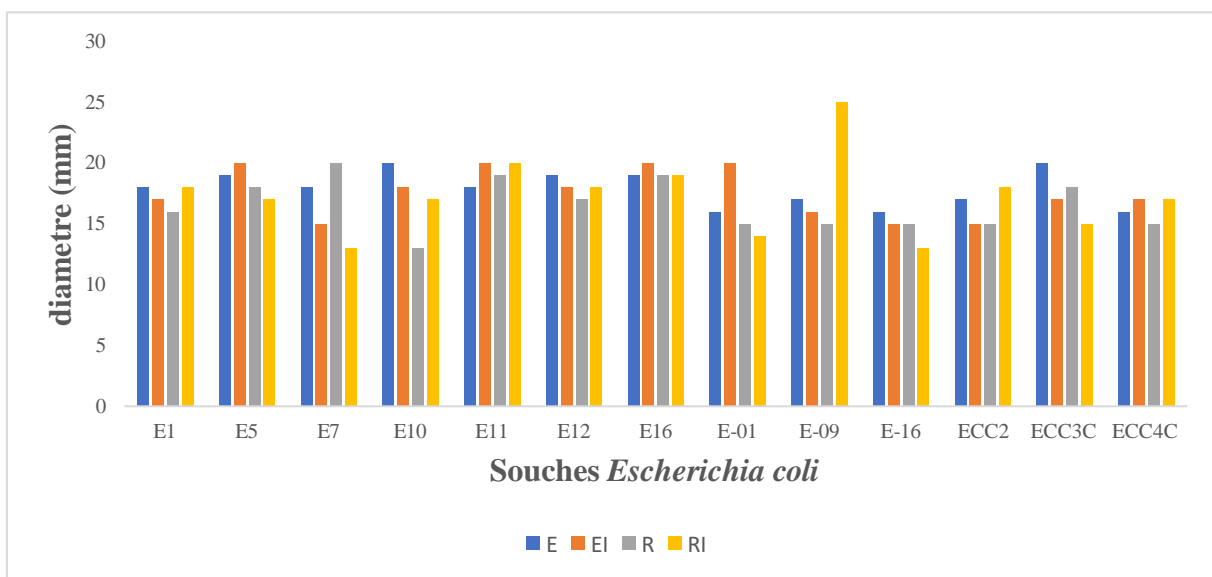
À l'inverse, les souches E1, ECC2 et ECC4C ont présenté des valeurs de DO élevées, proches de celles du témoin, même en présence de surnageants. Cela indique une résistance relative à l'action des métabolites bactériens présents dans les surnageants. Enfin, certains

surnageants, tels que S1, S8 et S9, semblent moins efficaces, avec une inhibition faible ou inexistante sur la majorité des souches testées.

### III.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits de plantes

#### III.4.1. Test des puits

Le test des puits en gélose a été utilisé pour évaluer l'effet de 4 filtrats d'extraits de plantes sur 13 souches d'*E. coli*. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus (Figure 12) traduisent le potentiel antimicrobien des extraits testés.



**Figure 12** : Résultats obtenus par le test des puits sur gélose remplie des extraits de plante vis-à-vis d'*E. coli*

Une activité antimicrobienne est généralement considérée comme significative lorsque le diamètre de la zone d'inhibition dépasse 2 mm (Kanarek et al., 2025). D'après Nostro et al. (2000), une activité antimicrobienne peut être considérée comme marquée lorsque le diamètre de la zone d'inhibition atteint ou dépasse 12 mm.

Dans ce contexte, l'ensemble des extraits testés ont présenté une telle activité, bien que leur efficacité varie selon les souches d'*E. coli* et le type d'extrait utilisé. Les zones d'inhibition observées allaient de 13 à 25 mm, l'extrait RI montrant la plus forte action, avec une inhibition maximale de 25 mm contre la souche E-09. Ces résultats rejoignent ceux rapportés dans d'autres travaux ayant évalué les mêmes plantes, où une activité

Antibactérienne marquée contre *E. coli* a également été mise en évidence (**YİĞİT et al., 2014 ; Živković et al., 2015**).

D'autres plantes médicinales, telles que *Thymus vulgaris* et *Syzygium aromaticum*, ont également révélé une activité antibactérienne marquée contre *E.coli*, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle de nombreux extraits végétaux possèdent un potentiel antimicrobien important, notamment vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (**Sateriale et al., 2022**).

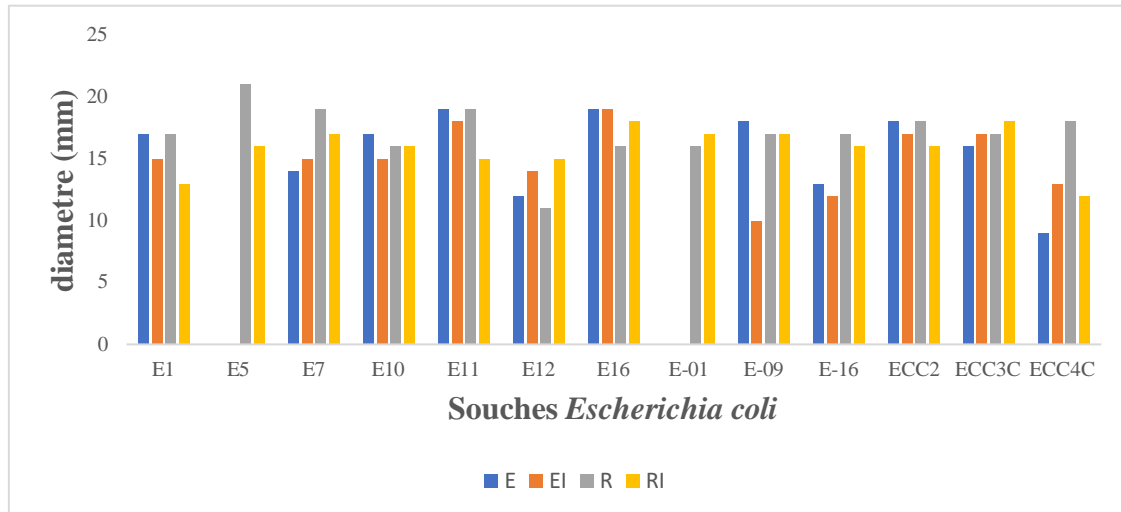
Selon **Khameneh et al., (2019)**, l'activité antibactérienne de nombreux agents repose principalement sur deux mécanismes : l'interférence avec les fonctions vitales bactériennes (comme la synthèse des protéines ou l'intégrité de la membrane), et la capacité à contourner les mécanismes classiques de résistance développés par les bactéries. Les composés naturels d'origine végétale suscitent un intérêt croissant, en raison de leur capacité à inhiber la croissance bactérienne tout en présentant peu d'effets secondaires.

L'efficacité antimicrobienne des extraits de plantes repose notamment sur la présence de molécules bioactives telles que les alcaloïdes, flavonoïdes, tanins et terpènes. Ces composés agissent en perturbant la paroi cellulaire, en inhibant la synthèse des protéines bactériennes, ou en provoquant des dommages intracellulaires. En plus de leur efficacité biologique, ces extraits sont accessibles, peu coûteux et généralement bien tolérés, ce qui en fait des alternatives prometteuses dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques (**Khameneh et al., 2021**).

### III.4.2. Résultats de test des disques

Les zones d'inhibition ont été mesurées afin de déterminer l'activité antibactérienne des extraits sur des souches pathogènes d'*E.coli* (figure 13).

Les 4 extraits testés ont présenté une activité antibactérienne globalement satisfaisante à l'encontre des souches d'*E.coli*, avec des zones d'inhibition variant entre 9 et 21 mm. L'extrait R s'est distingué par une inhibition maximale de 21 mm contre la souche E5, indiquant une forte efficacité antibactérienne (**YİĞİT et al., 2014 ; Živković et al., 2015**).



**Figure 13 :** Résultats obtenus par le test de diffusion sur disque des extraits de plante vis-à-vis d'*E.coli*

À l’opposé, les plus faibles zones d’inhibition (9 mm) ont été enregistrées avec l’extrait E contre la souche ECC4C. Par ailleurs, une absence de zone d’inhibition a été observée chez les souches E5 et E-01 face aux extraits E et EI. Contrairement aux résultats obtenus par la méthode des puits, où toutes les souches se sont révélées sensibles, ces cas de résistance apparente pourraient être liés à des limites méthodologiques, notamment au niveau de la diffusion des extraits. Selon **Bubonja-Šonje et al.(2020)**, bien que la méthode par disque soit simple et peu coûteuse, elle présente une reproductibilité limitée et peut ne pas permettre une bonne diffusion des composés non polaires. Ces observations confirment que la méthode utilisée pour évaluer l’activité antimicrobienne peut fortement influencer les résultats obtenus. Dans notre cas, les différences de sensibilité des souches entre la méthode des puits et celle des disques semblent davantage liées à des limites de diffusion des extraits dans le milieu gélosé qu’à une réelle absence d’activité antimicrobienne ou à une résistance des souches.

Les souches cliniques d'*E. coli* montrent une sensibilité modérée. Les diamètres des zones d’inhibition varient entre 16 et 20 mm. Ces valeurs restent stables, sans pics marqués. En moyenne, elles tournent autour de 17 mm. L’effet des extraits est présent, mais limité.

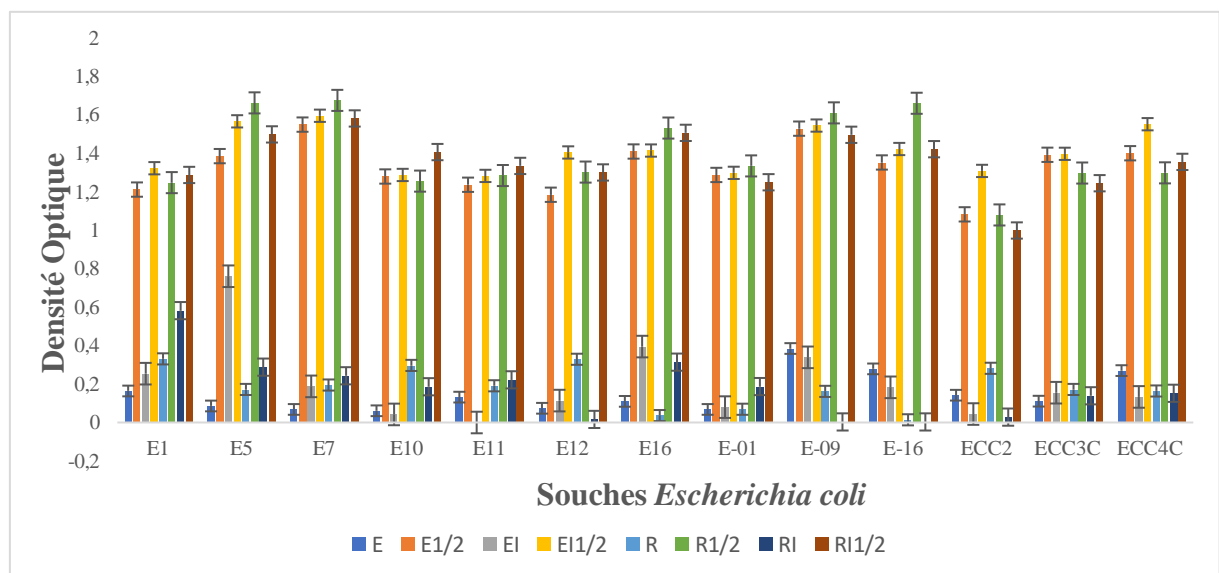
Pour les souches marines, c’est un peu différent. Plusieurs atteignent 20 mm. D’autres restent dans la moyenne haute. E5, E12 et E16 montrent une inhibition notable, presque constante. Cela suggère une sensibilité plus nette. La réponse est plus marquée. Ces résultats traduisent un effet plus prononcé des extraits sur les isolats marins.

Les souches alimentaires réagissent de façon plus modérée. Elles affichent des valeurs comparables aux souches cliniques. Entre 15 et 20 mm. Les diamètres d'inhibition restent dans un intervalle serré, peu de variations fortes et moins de réactivité que les marines.

Globalement, les extraits semblent plus efficaces contre les souches marines. L'origine des souches influence leur sensibilité.

### III.4.3. Activité antimicrobienne sur microplaque

Cette étape vise à évaluer, par méthode en microplaque, le potentiel antibactérien des extraits de plante, en mesurant leur impact sur la croissance bactérienne et en déterminant le niveau d'intensité de l'inhibition exercée. Les résultats sont présentés dans la figure 14.



**Figure 14 :** Résultats de l'effet des extraits de plantes vis-à-vis d'*E.coli* sur les microplaques.

Plusieurs souches de *E. coli* ont présenté une diminution marquée de la densité optique (**DO**) après exposition aux extraits végétaux, traduisant une inhibition notable de la croissance bactérienne. Les souches E10, E11, E12 et ECC4C ont montré une sensibilité accrue, avec des valeurs de DO largement inférieures à celles des témoins. Ces résultats mettent en évidence l'efficacité de certains extraits, en particulier l'extrait E, qui s'est imposé comme le plus actif, en induisant une baisse importante de la croissance sur un grand nombre de souches testées.

Les extraits R et RI ont également démontré une activité antibactérienne intéressante, avec des effets inhibiteurs clairs sur certaines souches comme E12 et ECC3C. Cependant, leur efficacité s'est révélée moins homogène, variant d'une souche à l'autre.

En revanche, des souches telles qu'E1, E5, E16 et ECC3C ont conservé des valeurs de DO relativement élevées malgré la présence des extraits. Cela suggère une résistance ou une faible sensibilité de ces souches aux substances testées, ce qui pourrait refléter des capacités d'adaptation spécifiques ou des mécanismes de tolérance.

Ces résultats confirment le potentiel antimicrobien de certains extraits végétaux, observé par une réduction marquée de la croissance bactérienne dans plusieurs conditions testées. Ce type d'approche, basé sur des tests en microplaque, a également été utilisé avec succès par d'autres auteurs tels que **Sultanbawa et al. (2009)**, qui ont évalué l'effet de différents extraits naturels (comme l'origan et la citronnelle) sur des souches pathogènes. Bien que les extraits diffèrent, la méthode reste comparable et valide l'intérêt de cette technique pour l'étude d'agents antimicrobiens d'origine végétale (**Sateriale et al., 2022**).

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de certaines substances bioactives de différente origine, bactérienne, notamment celles produites par des souches du genre *Lactobacillus*, végétale, extraits de la ronce (*Rubus fruticosus*) et de l'églantier (*Rosa canina*), à l'égard de 13 souches d'*E. coli* isolées de différentes niches écologiques.

La sensibilité des souches *E. coli* et celles de *Lactobacillus*, aux antibiotiques est évaluée par la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton en se basant sur les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en collaboration avec l'EUCAST (2024).

Les résultats de l'antibiogramme révèlent que la majorité des souches d'*E. coli* sont multirésistantes, avec un taux de résistance particulièrement élevé à l'ertapénème (ETP) atteignant 100 %, et à l'amoxicilline (AMC) avec 84,61 %.

Le test des spots, réalisé avec les souches de *Lactobacillus*, a révélé une activité antibactérienne particulièrement significative, avec des zones d'inhibition pouvant atteindre 34 mm. Cette méthode met en évidence un effet direct, intense mais ciblé, avec un spectre d'action plus restreint, affectant un nombre limité de souches d'*E. coli*.

En revanche, le test de diffusion sur disque, utilisant les surnageants de culture, a montré des zones d'inhibition plus modéré mais un spectre plus large, touchant un plus grand nombre de souches. Cela suggère l'implication de métabolites bioactifs diffusibles, actifs même en l'absence des cellules bactériennes vivantes.

Les analyses des résultats des microplaques ont confirmé ces observations de manière quantitative, une réduction significative de la croissance bactérienne a été observée pour plusieurs souches d'*E. coli*, notamment en présence de certaines souches de *Lactobacillus*. Cette méthode a permis de détecter des effets inhibiteurs plus subtils, parfois non visibles par les méthodes de diffusion, mettant en évidence la sensibilité accrue de cette approche pour évaluer l'efficacité antimicrobienne.

Concernant l'effet antibactérien des extraits de plantes, la méthode des puits s'est révélée la plus performante, puisqu'elle utilise un volume important, ce qui favorise la diffusion des composés actifs dans la gélose. Toutes les souches ont été inhibées notamment avec l'extrait RI contre la souche E-09.

La microplaque a permis d'apporter des résultats complémentaires à ceux obtenus sur gélose. Certains extraits qui montraient une activité modérée ou nulle dans les tests par puits ou sur disques ont révélé, en milieu liquide, une inhibition significative de la croissance bactérienne. C'est le cas de l'extrait E, dont l'efficacité sur gélose était limitée, mais qui a induit une réduction de croissance atteignant jusqu'à 80 % sur plusieurs souches, notamment E10, E11, E12 et ECC4C. Ces résultats mettent en évidence le fait que certains composés actifs peu diffusibles peuvent exercer un effet marqué lorsqu'ils sont en contact direct et homogène avec les bactéries, comme c'est le cas en milieu liquide.

D'après les résultats, les bactéries lactiques vivantes présentent l'effet antibactérien le plus intense, tandis que les surnageants offrent un spectre plus large et plus sécurisé. En parallèle, les extraits végétaux, notamment ceux obtenus sans infusion, démontrent une activité remarquable en milieu liquide, révélant leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens naturels. En combinant ces approches, il serait possible de développer des alternatives efficaces aux antibiotiques face aux souches multirésistantes d'*E. coli*.

En perspective pour compléter cette étude, il faut :

- Identifier et caractériser chimiquement les substances bioactives (ex. : chromatographie, spectrométrie).
- Déterminer le mode d'action à l'égard d'*E. coli* (bactéricide ou bactériostatique).
- Tester sur une large gamme de souches d'*E. coli*
- Réaliser des tests *in vivo* ou en conditions réelles (modèles animaux, matrices alimentaires).
- Optimiser les conditions de culture des *Lactobacillus* pour améliorer la production de métabolites actifs.
- Étudier la synergie entre bactéries lactiques, extraits végétaux et antibiotiques.
- Étendre l'évaluation à d'autres pathogènes d'intérêt médical ou alimentaire.

*Références  
bibliographiques*

- **Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V & Jafarian-Dehkordi A.** (2013). *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *RPS* 8(4): 261-268
- **Aditya A, Peng M, Young A & Biswas D.** (2020) Antagonistic Mechanism of Metabolites Produced by *Lactobacillus casei* on lysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 11:574422.
- **Aihiokhai MO, Chika OL & Imoni CA.** (2023) Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Food Samples in and around Michael and Cecilia Ibru University, Nigeria. *Univ J Pharm Res* 8(4):78-85
- **Al-Sarawi HA, Najem AB, Lyons BP, Uddin S & Al-Sarawi MA.** (2022) Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* isolated from Marine Sediment Samples from Kuwait Bay. *Sustainability*14(18):11325.
- **Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A & Lakhssassi N.** (2019) A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Métabolites* 9 (11) :258
- **Anisimova E, Gorokhova I, Karimullina G & Yarullina D.** (2022) Alarming Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements. *Antibiotics* 11(11):1557
- **Appau AAA & Ofori LA.** (2024). Antibiotic resistance profile of *E. coli* isolates from lettuce, poultry manure, irrigation water, and soil in Kumasi, Ghana. *Int J Microbiol* 2024: 6681311.
- **Ashraf MV, Pant S, Khan MAH, Shah AA, Siddiqui S, Jeridi M, Alhamdi H & Ahmad S.** (2023). Phytochemicals as Antimicrobials: Prospecting Himalayan Medicinal Plants as Source of Alternate Medicine to Combat Antimicrobial Resistance. *Pharmaceuticals* 16(6) :881.
- **Avril, J.-L.** (1992). *Escherichia coli*. In: Avril, J.-L, Dabernat, H, Denis, F & Monteil, H. (dir.) (1992), Bactériologie clinique. Paris : Édition Marketing, pp. 156–157.
- **Balouiri M, Sadiki M & Ibsouda SK.** (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2):71-9
- **Bakare, O. O., Gokul, A., Fadaka, A. O., Wu, R., Niekerk, L., Barker, A. M., Keyster, M., & Klein, A.** (2022). Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs) : Features, Applications, Production, Expression, and Challenges. *Molecules*, 27(12), 3703.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Bedrane R., Labaci A., Dellachi H. & Kehloul K.** (2020). Antibiorésistance des souches d'*Escherichia coli* chez les patients hospitalisés au niveau du service de réanimation polyvalente du CHU Nedir Mohamed Tizi-Ouzou – *Unité Balloua*. Université Mouloud Mammeri. 113 p.
- **Belmahdi M, Chenouf NS, Ait Belkacem A, Martinez-Alvarez S, Pino-Hurtado MS, Benkhechiba Z, Lahrech S, Hakem A & Torres C.** (2022). Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Poultry and Wild Birds (Sparrow) in Djelfa (Algeria), with Frequent Detection of CTX-M-14 in Sparrow. *Antibiotics* 11(12) :1814.
- **Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M & Rolain JM.** (2016). First Detected Human Case in Algeria of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(11) :6996-7.
- **Blount ZD.** (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Life.* 4: e05826.
- **Bubonja-Šonje M, Knežević S & Abram M.** (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology.* 71(4):300-11.
- **Charest AM, Reed E, Bozorgzadeh S, Hernandez L, Getsey NV, Smith L, Galperina A, Beauregard HE, Charest HA, Mitchell M & Riley MA.** (2024). Nisin inhibition of Gram-negative bacteria. *Microorganisms* 12: 1230.
- **Clermont O, Bonacorsi S & Bingen E.** (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 66(10):4555-8.
- **Correia J, Borges A, Simões M & Simões LC.** (2023). Beyond Penicillin: The Potential of Filamentous Fungi for Drug Discovery in the Age of Antibiotic Resistance. *Antibiotics* 12: 1250.
- **Cushnie, T. T., & Lamb, A. J.** (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- **Danquah, C.A., Minkah, P.A.B., Osei Duah Junior, I., Amankwah, K.B. & Somuah, S.O.** (2022). Antimicrobial Compounds from Microorganisms. *Antibiotics*, 11: 285.
- **Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S.** (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Diassana, A.** (2018). Identification des souches d'*Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition à Dioro. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.94 p.
- **Elmaidomy AH, Shady NH, Abdeljawad KM, Elzamkan MB, Helmy HH, Tarshan EA, Adly AN, Hussien YH, Sayed NG, Zayed A& Abdelmohsen UR.** (2022). Antimicrobialpotentials of natural products against multidrug resistance pathogens: a comprehensive review.  
*RSC Adv.*;12(45):29078-102.
- **Gradisteanu Pircalabioru G, Popa LI, Marutescu L, Gheorghe I, Popa M, Czobor Barbu I, Cristescu R & Chifiriuc MC.** (2021). Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics* 13 :196.
- **Grimont PAD.** (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 17:6-10.
- **Gueye O.** (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse de Doctorat en Pharmacie Université Cheikh Anta Diop de Dakar.120 p.
- **Guillon H, Tande D & Mammeri H.** (2011). Emergence of Ertapenem Resistance in an *Escherichia coli* Clinical Isolate Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase AmpC. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(9):4443-6.
- **Guiraud, J.-P.** (2012). *Microbiologie alimentaire* (2<sup>e</sup> éd.). Paris : Dunod. 608 p
- **Huijbers PMC, Bobis Camacho J, Hutinel M, Larsson DGJ & Flach CF.** (2023). Sampling Considerations for Wastewater Surveillance of Antibiotic Resistance in Fecal Bacteria. *IJERPH.* 20(5):4555.
- **Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, Esatbeyoglu T & Bakhshayesh RV.** (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12): 3131
- **Imade EE, Omonigho SE, Babalola OO& Enagbonma BJ.** (2021) Lactic acid bacterial bacteriocins and their bioactive properties against food-associated antibiotic-resistant bacteria. *Ann Microbiol.*71(1):44.
- **Joly Guillou ML.** (2016). *Escherichia coli* revisité, ami ou ennemi ? *Revue Francophone des Laboratoires.*2016(486):27-33.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Judge A, Hu L, Sankaran B, Van Riper J, Venkataram Prasad BV & Palzkill T.** Mapping the determinants of catalysis and substrate specificity of the antibiotic resistance enzyme CTX-M  $\beta$ -lactamase. *Commun Biol.*6(1):35.
- **Kanarek, P., Breza-Boruta, B., & Stocki, M.** (2025). Antimicrobial Activity and Phytochemical Profiling of Natural Plant Extracts for Biological Control of Wash Water in the Agri-Food Industry. *Applied Sciences*, 15(9), 5199.
- **Kaper JB, Nataro JP & Mobley HLT.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-40.
- **Kaye KS, Gold HS, Schwaber MJ, Venkataraman L, Qi Y, De Girolami PC, Samore MH, Anderson G, Rasheed JK, Tenover FC.** (2004). Variety of  $\beta$ -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the Northeastern United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5): 1520–1525.
- **Khameneh B, Eskin NAM, Iranshahy M & Fazly Bazzaz BS.** (2021). Phytochemicals: A Promising Weapon in the Arsenal against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics*.10(9):1044.
- **Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Fazly Bazzaz BS.** (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* (2019); **8:118**.
- **Khunajakr N, Wongwicharn A, Moonmangmee D & Tantipaiboonvut S.** (2008). Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts. 2008;8(1).
- **Kim, J., Park, S., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J., Hahm, K., & Park, Y.** (2009). Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *International Journal Of Molecular Sciences*, 10 (6), 2860-2872.
- **Kraupner N, Hutinel M, Schumacher K, Gray DA, Genheden M, Fick J, Flach CF & Larsson DGJ.** (2021). Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent. *Environment International*. 150 :106436.
- **Lee NY, Lee CC, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR & Ko WC.** (2012). Carbapenem Therapy for Bacteremia Due to Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*: Implications of Ertapenem Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.*56(6):2888-93.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Li Y, Zhang M, Luo J, Chen J, Wang Q, Lu S & Ji H.** (2020). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from retail foods in northern Xinjiang, China. *Food Science & Nutrition*.8(4):2035-51.
- **Michaut M.** (2018) Déterminisme environnemental de la contamination par *Escherichia coli* des eaux et des biofilms d'un hydrosystème karstique [thèse]. Rouen (FR) : Université de Rouen Normandie .237 p.
- **Mülner P, Schwarz E, Dietel K, Herfort S, Jähne J, Lasch P, Cernava T, Berg G & Vater J.** (2021). Fusaricidins, polymyxins and volatiles produced by *Paenibacillus polymyxa* strains DSM 32871 and M1. *Pathogens* 10: 1485
- **Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A& Cannatelli MA.**(2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol*.30(5):379-84.
- **Ochoa TJ et Gómez-Duarte OG.** Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. In: Torres AG, éditeur. *Escherichia coli* in the Americas Cham: Springer International; p. 301-22.
- **Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J& Oteo J.** (2016).Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother* 71(8):2131-8.
- **Pakbin B, Brück WM&Rossen JWA.**(2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *IJMS*. 14 sept 2021;22(18):9922.
- **Paul, K. (2023).** Medicinal Plants and their Bioactive Compounds: A Phytochemical Perspective. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy Phytochemistry*, 11(3), 004.
- **Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ& Pitout JDD.** (2014). Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131. *Emerg Infect Dis* 20(11):1928-31.
- **Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P&Schwarz S.** (2018) Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L, éditeurs. *Microbiol Spectr* 6(4):6.4.14.
- **Poppi LB, Rivaldi JD, Coutinho TS, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP& Mancilha IM.** (2015). Effect of *Lactobacillus sp.* isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesq Vet Bras* 35(4):353-9.

## *Références bibliographiques*

---

- **Rani A, Saini KC, Bast F, Varjani S, Mehariya S, Bhatia SK, Sharma N, et Funk C. (2021).** A Review on Microbial Products and Their Perspective Application as Antimicrobial Agents. *Biomolecules* 11(12):1860.  
  
*L.acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli*. *Braz J Microbiol.* 41(3):643-8.
- **Roberts KD, Azad MAK, Wang J, Horne AS, Thompson PE, Nation RL, Velkov T & Li J. (2015).** Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin B and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *ACS Infect Dis* 1: 568–575.
- **Rossi B, Soubirou JF, Chau F, Massias L, Dion S, Lepeule R, Fantin B & Lefort A. (2016).** Cefotaxime and Amoxicillin-Clavulanate Synergism against Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Murine Model of Urinary Tract Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 60(1):424-30.
- **Salamatullah, A. M. (2022).** Antioxidant and antimicrobial properties of polyphenolics from *Withania naja* (Coss.) Batt. against selected drug-resistant bacterial strains. *Open Chemistry*, 20(1), 474-483.
- **Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramírez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015).** Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Research International*, 2015, 1-11.
- **Sateriale D, Forgione G, De Cristofaro GA, Facchiano S, Boscaino F, Pagliuca C, Colicchio R, Salvatore P, Paolucci M & Pagliarulo C. (2022).** Towards Green Strategies of Food Security: Antibacterial Synergy of Essential Oils from *Thymus vulgaris* and *Syzygium aromaticum* to Inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Pathogenic Food Isolates. *Microorganisms* 10(12):2446.
- **Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A, Stefani S & Santagati M. (2021).** Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiology* 10(2):e1173.
- **Singh BR, Agri H, Karthikeyan R, Jayakumar V. (2023).** Comparative antimicrobial activity of amikacin and gentamicin on clinically important bacteria. *J Pharmacol Clin Toxicol.* 2023

## *Références bibliographiques*

---

- **Shahali, A., Soltani, R., & Akbari, V.** (2023). Probiotic *Lactobacillus* and the potential risk of spreading antibiotic resistance: a systematic review. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 468–477.
- **Sharma D, Goyal P, Sharma S & Srivastava S.** (2024). Classification and mechanism of bacteriocin induced cell death: A review. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 12(1): 1–7
- **Riaz S, Nawaz SK& Hasnain S.** (2010) Bacteriocins produced by *L. fermentum* and
- **Simons A, Alhanout K & Duval RE.** (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* 8(5): 639.
- **Sorathiya KB, Melo A, Hogg MC & Pintado M.** (2025). Organic acids in food preservation: Exploring synergies, molecular insights, and sustainable applications. *Sustainability* 17: 3434.
- **Sultanbawa Y, Cusack A, Currie M&Davis C.** (2009). An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. *Rapid Methods Automation Mic*17 (4):519-34.
- **Swamy, M. K., Akhtar, M. S., &Sinniah, U. R.** (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, 2016(1).
- **Taguri, T., Tanaka, T. &Kouno, I.** (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2226–2235.
- **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B& Denamur E.** (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8(3):207-17.
- **Tran C, Cock IE, Chen X & Feng Y.** (2022). Antimicrobial Bacillus: Metabolites and their mode of action. *Antibiotics* 11: 88.
- **Vallavan V, Krishnasamy G, Mohamad Zin N & Abdul Latif M.** (2020). A review on antistaphylococcal secondary metabolites from Basidiomycetes. *Molecules* 25: 5848.

## ***Références bibliographiques***

---

- **Wadhwa K, Kapoor N, Kaur H, Abu-Seer EA, Tariq M, Siddiqui S, Yadav VK, Niazi P, Kumar P & Alghamdi S.** (2024). A comprehensive review of the diversity of fungal secondary metabolites and their emerging applications in healthcare and environment. *Microbiology* 52: 335–387.
- **World Health Organization.** (30 juillet 2021). Call to Action on Antimicrobial Resistance 2021. Genève : Organisation mondiale de la Santé.
- **World Health Organization.** (7 février 2018). *E. coli*. Genève : Organisation mondiale de la Santé.
- **Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M.** (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10(3), 318.
- **YiĜiT D&YiĜiT N.** (2014). Antibacterial properties of blackberry (*Rubus Fruticosu*).
- **Zheng J, Gänzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M.** (2014). Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environmental Microbiology*;17(6):2133-43
- **Živković J, Stojković D, Petrović J, Zdunić G, Glamočlija J&Soković M.** (2015). *Rosa canina* L.new possibilities for an old medicinal herb. *Food Funct* 6(12):3687-92.

# *Annexes*

## Annexe n° 1 : Milieux de culture et composition

## ➤ Gélose nutritive

Ingrédient	Quantité (g/L)
Peptone	5
Extrait de viande de bœuf	3
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH final (25°C)	7,3 ± 0,2

## ➤ Bouillon nutritif

Ingrédient	Quantité (g/L)
Extrait de viande	2
Extrait de levure	5
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
pH final (25°C)	7,3 ± 0,2

## ➤ Gélose EMB (Éosine bleu de méthylène)

Ingrédient	Quantité (g/L)
Peptone	10
Dipotassiumhydrogen phosphate	2
Lactose	5
Saccharose	5
Éosine Y	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Agar	13,5
pH final (25°C)	7,2 ± 0,2

## ➤ Bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)

Ingrédient	Quantité (g/L)
Dextrose	20
Peptone bactériologique	10
Extrait de viande	8
Acétate de sodium	5
Extrait de levure	4
Phosphate dipotassique	2
Tween 80	1
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
pH final (25°C)	6,2 ± 0,2

➤ **Gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)**

<b>Ingrédient</b>	<b>Quantité (g/L)</b>
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Acétate de sodiumtrihydraté	5
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1
Hydrogèphosphate de potassium	2
Sulfate de magnésiumheptahydraté	0,2
Sulfate de manganèsetétrahydraté	0,05
agar	10
pH final (25°C)	6,2 ± 0,2

➤ **Bouillon Mueller-Hinton**

<b>Ingrédient</b>	<b>Quantité (g/L)</b>
Peptone	17,5
Amidon	1,5
Extrait de viande	2
pH final (25°C)	7,3 ± 0,1

**Annexe n° 2 : résultats**

**Tableau I** : Profil de sensibilité aux antibiotiques de souches d'*E. coli*: données interprétées selon EUCAST (diamètre mesuré en mm)

ATB \ S	AMC	CTX	FOX	CAZ	ETP	IMP	MRP	CT	CT-S	DA	TE	AK
E1	<b>R</b> (15)	S (31)	S (30)	<b>R</b> (18)	<b>R</b> (11)	S (31)	<b>I</b> (19)	R(10)	11	11	R(9)	S (25)
E5	<b>R</b> (19)	S (28)	S (23)	<b>I</b> (19)	<b>R</b> (9)	S (30)	<b>R</b> (15)	R(11)	11	9	R(12)	S (19)
E7	<b>R</b> (18)	S (28)	S(20)	<b>R</b> (16)	<b>R</b> (9)	S (34)	<b>R</b> (15)	R(10)	9	11	S(21)	S (21)
E10	<b>R</b> (8)	S (33)	S (24)	<b>R</b> (18)	<b>R</b> (9)	S (33)	<b>R</b> (13)	S(18)	11	10	R(9)	S (24)
E11	<b>R</b>	S (28)	S (23)	S(37)S YN	<b>R</b> (11)	S (33)	<b>R</b> (12)	R(10)	9	37 SYN	R(7)	S (23)
E12	<b>R</b>	S (26)	<b>R</b>	<b>I</b> (20)	<b>R</b> (8)	S (27)	<b>R</b>	R(10)	13	<b>R</b>	R(11)	<b>R</b> (18)
E16	S(46) Syn	S(46) syn	S (25)	<b>I</b> (19)		S (29)	<b>R</b> (14)	R(10)	9	9	S(21)	S (19)
E-01	<b>R</b> (14)	S (30)	S (23)	<b>R</b> (14)	<b>R</b> (8)	S (40)	<b>R</b> (10)	R(13)	9	<b>R</b>	S(22)	S (29)
E-09	S (26)	S (28)	S (21)	<b>R</b> (18)	<b>R</b> (9)	S (36)	<b>R</b> (11)	R(10)	11	<b>R</b>	S(23)	S (19)
E-16	<b>R</b> (18)	S (30)	S(23)	<b>R</b> (17)	<b>R</b> (9)	S (33)	<b>R</b> (11)	R(13)	11		S(23)	S (24)
ECC2	<b>R</b> (14)	S (23)	S(22)	<b>R</b> (14)		<b>R</b>	S(23)	R(12)	10	<b>R</b>	S(20)	S (19)
ECC3 C	<b>R</b> (16)	S (30)	<b>R</b> (15)	<b>R</b> (15)		<b>R</b>	S(25)	R(11)	10	<b>R</b>	R(10)	S (19)
ECC4 C	<b>R</b> (10)	S (23)	<b>R</b> (18)	<b>R</b> (15)		<b>R</b>	S(23)	R(10)	10	<b>R</b>	<b>R</b>	R(18)

**Tableau II** : Profil de sensibilité aux antibiotiques de souches de *Lactobacillus* : données interprétées selon EUCAST (diamètre mesuré en mm)

	AMC	CTX	FOX	CAZ	IMP	MRP	AK	CT	CT-S	TE	DA
S3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S 8	S	S	12	18	<b>R</b>	S	S	13	13	S	S
S9	S	S	S	S	S	S	S	15	S	S	S
S2	S	S	S	S	S	S	S	15	16	S	S
S6	S	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S	S
S4	S	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	S	S	S
S5	S	S	S	S	S	S	S	12	12	S	S
S7	S	S	S	S	S	S	S	12	<b>R</b>	S	S
S1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

**Tableau III** : résultats de test des disques contenant des surnageants des souches de *Lactobacillus* a l'égard de *E.coli* (diamètre mesuré en mm)

LB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
EC									
E1	12	13	13	13	14	10	11	13	14
E5	11	12	13	A	A	16	18	12	13
E7	A	A	10	A	A	10	A	11	A
E10									
E11	15	12	12	11	13	12	12	13	12
E12	A	10	14	13	11	A	10	A	A
E16	A	A	10	10	A	A	A	A	A
E-01	12	10	15	11	12	12	12	12	13
E-09							13	12	10

E-16	11	11	13	10	10	12	12	11	13
ECC2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ECC3C	11	12	13	10	12	11	10	12	11
ECC4C	12	13	13	14	14	11	11	12	11

**Tableau IV:** Résultats du test des puits sur *E. coli* vis-à-vis des extraits de plantes (diamètres des zones d'inhibition en mm)

EC EXT	E1	E5	E7	E10	E11	E12	E16	E-01	E-09	E-16	ECC2	ECC3C	ECC4C
E	18	19	18	20	18	19	19	16	17	16	17	20	16
EI	17	20	15	18	20	18	20	20	16	15	15	17	17
R	16	18	20	13	19	17	19	15	15	15	15	18	15
RI	18	17	13	17	20	18	19	14	25	13	18	15	17

**Tableau V :** Résultats du test des disques contenant des extraits de plantes vis-à-vis de *E. coli* (diamètres des zones d'inhibition mesurés en mm)

EC EXT	E1	E5	E7	E10	E11	E12	E16	E-01	E-09	E-16	ECC2	ECC3C	ECC4C
E	17	R	14	17	19	12	19	R	18	13	18	16	9
EI	15	R	15	15	18	14	19	R	10	12	17	17	13
R	17	21	19	16	19	11	16	16	17	17	18	17	18
RI	13	16	17	16	15	15	18	17	17	16	16	18	12

# *Résumé*

## Résumé

Les souches multirésistantes d'*Escherichia coli* constituent un enjeu majeur pour la santé publique et vétérinaire. Afin d'identifier des alternatives à l'antibiothérapie conventionnelle, cette étude a évalué l'activité antibactérienne de bactéries lactiques et d'extraits de plantes médicinales (ronce, églantier) sur treize isolats de souche prélevés en milieux marin, clinique et alimentaire.

Les isolats ont d'abord été soumis à un antibiogramme par diffusion sur gélose afin de déterminer leur sensibilité à douze antibiotiques appartenant à différentes familles. L'activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques a ensuite été évaluée à l'aide de trois approches complémentaires : le dépôt de suspension « spot-on-lawn », la diffusion sur disques imprégnés, les tests en puits, ainsi que des essais en microplaques. Parallèlement, l'activité antibactérienne des extraits de ronce et d'églantier a été étudiée par diffusion en puits, diffusion sur disques et tests en microplaques, permettant une quantification plus précise de leur effet inhibiteur.

Les profils antibiogrammes ont révélé qu'une grande partie des isolats présentait une résistance étendue, notamment aux  $\beta$ -lactamines. Les bactéries lactiques ont produit des zones d'inhibition comprises entre 2 et 34 mm selon la méthode utilisée, mettant en évidence un potentiel antagoniste notable. Les extraits de ronce et d'églantier ont également induit des zones d'inhibition allant de 9 à 25 mm. Par ailleurs, les essais en microplaques ont permis d'évaluer l'activité inhibitrice des surnageants bactériens et des extraits végétaux en condition liquide, confirmant leur capacité à freiner la croissance des souches pathogènes. Ces résultats soulignent l'intérêt de ces agents bioactifs en tant que compléments ou alternatives potentielles aux traitements antibiotiques classiques.

**Mots-clés :** *Escherichia coli* – multirésistance – antibiogramme – extraits de plantes médicinales – ronce – églantier – bactéries lactiques – activité antibactérienne – diffusion sur gélose – microplaques.

## Abstract

Multidrug-resistant *Escherichia coli* strains represent a significant challenge to both public and veterinary health. To identify alternatives to conventional antibiotic therapy, this study evaluated the antibacterial activity of lactic acid bacteria and medicinal plant extracts (blackberry and rosehip) against thirteen isolates obtained from marine, clinical, and food environments.

The isolates were first subjected to an agar diffusion antibiogram to determine their susceptibility to twelve antibiotics from different families. The inhibitory activity of the lactic acid bacteria strains was then assessed using three complementary approaches: spot-on-lawn assays, disk diffusion, well diffusion, and microplate assays. In parallel, the antibacterial activity of the blackberry and rosehip extracts was evaluated through well diffusion, disk diffusion, and microplate tests, allowing for a more precise quantification of their inhibitory effect.

The antibiogram profiles revealed that a large portion of the isolates exhibited extensive resistance, particularly to  $\beta$ -lactams. The lactic acid bacteria produced inhibition zones ranging from 2 to 34 mm depending on the method used, highlighting notable antagonistic potential. The blackberry and rosehip extract also produced inhibition zones ranging from 9 to 25 mm. Furthermore, microplate assays were used to evaluate the inhibitory activity of bacterial supernatants and plant extracts in liquid conditions, confirming their ability to suppress the growth of pathogenic strains. These findings underscore the relevance of these bioactive agents as potential complements or alternatives to conventional antibiotic treatments.

**Keywords:** *Escherichia coli* – multidrug resistance – antibiogram – medicinal plant extracts – blackberry – rosehip – lactic acid bacteria – antibacterial activity – agar diffusion – microplate assay.

