



# Mémoire de fin d'étude



*En Vue D'obtention Du Diplôme De Master*

*Domaine : Science de la nature et de la vie*

*Filière : Sciences alimentaires*

*Option : Agroalimentaire et Contrôle de qualité*

## Thème :

*Evaluation de l'activité antibactérienne de certains  
extraits végétaux et du miel sur E. coli et S. aureus*

Réalisé par :

Mr SMAILI Idir

&

M<sup>elle</sup> MIMOUN Lysa

Devant le jury composé de :

Président : Mr HOUALI K

Professeur à l'UMMTO

Promoteur : Mr MSELA A

Maitre de conférence B

Examineur : Mr SEBBANE H

Maitre de conférence B

*Année universitaire : 2021/2022*

# *Remerciements*

*Nous remercions Dieu le tout puissant, omnipotent  
Et miséricordieux, de nous avoir accordé des connaissances  
De la science et de nous avoir aidé à réaliser ce travail.  
Au terme de ce travail, Nous tenons à exprimer toutes nos  
reconnaissance et remerciement à*

*Mr. MSEL.A, qui a fait preuve d'une grande patience et a été  
D'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Ses conseils, ces  
Orientation ainsi que son soutien moral et scientifique nous ont  
permis de mener à terme se mémoire. Son encadrement était plus  
qu'exemplaire.*

*Nous tiendrons aussi à exprimer notre profonde gratitude et  
nos sincères Remerciements aux membres de jury :*

*Mr. HOUALI. K*

*Et*

*Mr. SEBBANE.H*

*D'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nos remerciements vont aussi à madame BEDOUHENE. S pour  
son aide et sa contribution pour la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement et respectivement tous ceux  
qui ont Contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste  
projet de fin D'étude.*

*Enfin, que nos familles trouvent ici l'expression de notre  
reconnaissance Pour nous avoir fait confiance et soutenu.*

# ★ DEDICACE ★

**Je dédie ce travail :**

*A la mémoire de mon père,*

*Qui m'a appris le sens de la persévérance et transmis les vraies valeurs, tu es toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui le fruit de tes sacrifices. Que Dieu, t'accueille dans son éternel paradis.*

*A ma mère,*

*Qui a œuvré ma réussite, par son amour et son soutien.*

*A mes chers frères :*

*Ali, Ahmed et Mokrane et mon adorable sœur : Fatma.*

*A mon cher binôme Idir :*

*Pour son entente et sa sympathie ainsi qu'à toute sa famille.*

*A mes chers ami(e)s : Sonia, Celia, Maylis, Lamia, Lylia, Sarah, Mouloud, Yacine, Idir et Menad.*

*Mon plus profond respect va tout droit à notre promoteur Mr MSELA Amine et sa famille.*

**MIMOUN Lysa**

# ★ DEDICACE ★

*Je dédie ce mémoire*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

**A** *mon père,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

**A** *ma mère,*

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.*

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous mes chers parents que je le dois, que Dieu vous garde.*

**A** *mon cher frère Amirouche & mes tendres et chères sœurs : Kahina, Saliha & Malika pour leur bonté, leur générosité de cœur et leur aide si précieuse, et à mes neveux et nièces que j'aime.*

**A** *ma très chère binôme, mes amis et collègues, chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin. Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, merci*

**A** *Toute la promotion "AACQ 2022"*

**Idir SMAILI.**

## Résumé :

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de six extraits bruts éthanoliques préparés à partir de la poudre de la partie aérienne des espèces d'agrumes : *Citrus limonum* (citron), *Citrus aurantium* (l'orange amère), *Citrus sinensis* (l'orange douce) et *Citrus maxima* (pamplemousse), l'espèce *Oléa europaea var. Europeaea* (l'olivier domestique) et du broyat d'*Allium sativum* (gousses et bulbes d'ail) ainsi que six échantillons de miel vis-à-vis des deux souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et cela par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme).

Les rendements d'extraction diffèrent d'une espèce végétale à une autre, le meilleur rendement est observé pour l'extrait éthanolique des feuilles d'olives avec un pourcentage de 5.35 et le plus faible est 1.55% pour les feuilles de citronnier.

Les résultats de l'aromatogramme montrent que tous les extraits et les échantillons de miel ont révélé une activité antibactérienne à l'encontre des deux souches testées et cela par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques et des puits réalisés, mis à part les extraits éthanolique des feuilles d'agrumes. L'ail (bulbe et gousses) et feuilles d'olives manifestent un bon effet inhibiteur et les plus fortes zones d'inhibition sont noté pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un diamètre de 36mm et 15mm respectivement.

L'inhibition des extraits éthanoliques dotés d'une activité antibactérienne a été confirmé en milieu liquide par l'évaluation de la CMB, et les valeurs obtenues sont : 0.401g/ml, 0.031g/ml, 0.043 g/ml pour les feuilles d'olive, de gousses et de bulbes d'ail respectivement.

La combinaison des extraits éthanoliques testés avec les antibiotiques de référence manifestent une bonne activité synergique pour les deux souches microbiennes.

**Mots clefs :** activité antibactérienne, extraits végétales, miel, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **Abstract :**

The objective of this work is to demonstrate the antibacterial activity of six ethanolic crude extracts prepared from the powder of the aerial part of citrus species: *Citrus limonum* (lemon), *Citrus aurantium* (bitter orange), *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus maxima* (grapefruit), the species *Oléa europaea* var. *Europaea* (domestic olive tree) and *Allium sativum* crushed material (garlic cloves and bulbs) as well as six honey samples against the two reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by the agar diffusion method (Aromatogram).

The extraction yields differ from one plant species to another, the best yield is observed for the ethanolic extract of olive leaves with a percentage of 5.35 and the lowest is 1.55% for lemon leaves.

The results of the aromatogram show that all the extracts and the honey samples revealed an antibacterial activity against the two tested strains and this by the appearance of the inhibition zones around the disks and the wells made, except for the ethanolic extracts of the log leaves. Garlic (bulb and cloves) and olive leaves showed a good inhibitory effect and the strongest inhibition zones were noted for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with a diameter of 36mm and 15mm respectively.

The inhibition of ethanolic extracts with antibacterial activity was confirmed in liquid medium by the evaluation of the BMC, and the values obtained are : 0.401g/ml, 0.031g/ml, 0.043 g/ml for olive leaves, cloves and garlic bulbs respectively.

The combination of the tested ethanolic extracts with the reference antibiotics shows a good synergic activity for both microbial strains.

**Key words:** antibacterial activity, vegetable extracts, honey, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

# **Sommaire :**

## **Synthese bibliographiques :**

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

### *Chapitre I : Généralités*

1	<b><i>E.coli</i></b> :.....	2
1.1	Historique :.....	2
1.2	Classification: .....	2
1.3	Identification d' <i>E.coli</i> sur les milieux nutritifs :.....	3
1.3.1	Caractères morphologiques et culturaux : .....	3
1.3.2	Caractères biochimiques :.....	3
1.4	Pouvoir pathogène : .....	4
1.5	Traitement :.....	6
2	<b><i>S.aureus</i></b> :.....	7
2.1	Historique :.....	7
2.2	Classification et habitat : .....	7
2.3	Identification de <i>S.aureus</i> sur les milieux nutritifs :.....	8
2.3.1	Caractères morphologiques et culturaux : .....	8
2.3.2	Caractères Biochimiques :.....	9
2.4	Pouvoir Pathogène : .....	10
2.5	Traitement :.....	10
3	La résistance des bactéries aux antibiotiques :.....	11
3.1	Définition : .....	11
3.2	Origine de la résistance bactérienne :.....	11
3.2.1	Résistance naturelle :.....	11
3.2.2	Résistance acquise :.....	11
3.3	Quelques Résistance des bactéries aux antibiotiques :.....	12
3.4	Causes de l'antibiorésistance et sa conséquence sur la santé publique :.....	12
3.5	Traitement alternative à l'antibiothérapie : .....	13

## *Chapitre II: Les plantes médicinales et leurs métabolites bioactifs*

1	Les métabolites bioactifs : .....	14
1.1	Les Composés phénoliques : .....	14
1.1.1	Définition : .....	14
1.1.2	Classification : .....	14
1.1.3	Activités biologiques des composés phénoliques : .....	16
1.2	Les alcaloïdes : .....	17
1.3	Les Terpenoïdes : .....	18
2	Les Plantes médicinales : .....	18
2.1	Les feuilles d'olivier : .....	18
2.1.1	Historique et origine : .....	18
2.1.2	Importance et intérêt : .....	18
2.1.3	Composition chimique des feuilles d'Olivier : .....	19
2.2	L'ail et le bulbe d'ail : .....	20
2.2.1	Classification : .....	20
2.2.2	Constituants de l'ail : .....	21
2.2.3	Principes actifs de l'ail : .....	21
2.2.4	Utilisations et propriétés : .....	22
2.3	Les agrumes et feuilles : (80) .....	22
2.3.1	L'oranger : Citrus sinensis (L.) Osbeck - Famille : Rutaceae .....	22
2.3.2	L'oranger amer : Citrus aurantium L. - Famille : Rutaceae .....	23
2.3.3	Le Citronnier : Citrus limon (L.) Burm.f. - Famille : Rutaceae .....	23
2.3.4	Le pamplemousse : Citrus maxima (Burm.) Merr. - Famille : Rutaceae .....	24
2.3.5	Utilisation et effets thérapeutiques des agrumes : .....	24
3	Le miel : .....	25
3.1	Définition : .....	25
3.2	Composition chimique du miel : (87) .....	25
3.3	Propriété biologique du miel : .....	26
4	Les méthodes d'extraction des métabolites bioactifs : .....	27
4.1	L'extraction par fluide supercritique (SFE, SupercriticalFluid Extraction) : .....	27

4.2	L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwaves-Assisted Extraction) : .....	28
4.3	L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction) : .....	29

## Partie Expérimentale

### Matériels et méthodes:

1	Matériel non biologique : <b>annexe 1</b> .....	33
2	Matériel végétal : .....	33
2.1	Préparation du matériel végétal : .....	33
2.1.1	Feuilles des plantes : .....	33
2.1.2	L'ail : .....	36
3	Le miel : .....	37
4	Préparation des extraits éthanoliques : .....	38
4.1	Extraction assistée par ultrasons : .....	38
5	Matériel bactérien : .....	42
5.1	Test de confirmation de la pureté des souches bactériennes .....	42
5.1.1	Préparation de pré-culture (réactivation des souches).....	42
5.1.2	Identification morphologique .....	42
5.1.3	Identification biochimique : .....	43
6	Evaluation de l'activité antibactérienne : .....	45
6.1	Préparation de la gamme de dilutions des extraits : .....	45
6.2	Préparation des disques : .....	46
6.3	Préparation des milieux de cultures en boîtes Pétri .....	46
6.4	Ré-isolément des souches bactériennes .....	47
6.5	Préparation de l'inoculum : .....	47
6.5.1	Standardisation : .....	48
6.6	Ensemencement : .....	48
6.7	L'Antibiogramme : .....	49
6.8	L'Aromatogramme : .....	50
6.9	Incubation : .....	51
6.10	Expression des résultats : .....	51

7	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	51
7.1	Préparation de la suspension bactérienne .....	52
7.2	préparation de la microplaque .....	52
7.3	Lecture .....	53

**Résultats et discussion :**

1	Résultats Rendement :	
1.1	Rendement d'extraction.....	54
2	Résultats de l'aromatogramme.....	55
2.1	Résultats Feuilles d'olives.....	55
2.2	Résultats Feuilles de citronnier.....	56
2.3	Résultats Feuilles d'oranger doux.....	57
2.4	Résultats Feuilles d'oranger amer.....	59
2.5	Résultats de Feuilles de pamplemoussier.....	60
2.6	Gousses d'ails .....	61
2.7	Bulbes d'ails.....	63
3	<b>Méthode des puits :</b> .....	64
3.1	Le miel pur : .....	66
4	Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :.....	66
4.1	<i>Escherichia Coli</i> : .....	67
4.2	<i>Staphylococcus Aureus</i> .....	67
	Discussion : .....	69
	Conclusion et perspectives : .....	73
	Références Bibliographiques : .....	75

## **Table des illustrations**

Figure 1: Morphologie et Structure de l' <i>E.coli</i> .....	2
Figure 2: <i>S.aureus</i> avec coloration de Gram au grossissement 10x100. ....	9
Figure 3: Les différentes classes des flavonoïdes .....	16
Figure 4: feuilles d'olivier .....	19
Figure 5: plante d'ail .....	20
Figure 6: feuilles et fleurs d'oranger. ....	22
Figure 7: feuille d'oranger amer (Bigarade). ....	23
Figure 8: Aspect morphologique des feuilles et du fruit de Citrus Limonum. ....	23
Figure 9: fruit et feuilles de pamplemousse. ....	24
Figure 10: Composition générale du miel. ....	25
Figure 11: paillasse de manipulation (photo prise au labo).....	32
Figure 12: Feuilles d' <i>Oléaeuropaea</i> .....	33
Figure 13: feuilles d'agrumes (photos prises au labo).....	34
Figure 14: séchage des feuilles (photos prises au labo). ....	34
Figure 15: étapes de broyage et tamisages (photos prises au labo).....	35
Figure 16: Epluchage et broyage d'ail (photos prise au labo) .....	37
Figure 17: Les échantillons de miel (photo prise au labo).....	37
Figure 18: Revivification des souches bactériennes. (photos prise au labo). ....	42
Figure 19: Aspect des colonies d' <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i> sur Gélose. (Photos prise au labo). ....	43
Figure 20: Aspect microscopique de bactéries après la coloration de Gram. ....	43
Figure 21: Ensemencement de la galerie biochimique (photo prise au labo) .....	44
Figure 22: Résultats de la galerie API 20e .....	44
Figure 23: Résultats du test Catalase (Photos prises au labo). ....	45
Figure 24: Résultats du test Dnase (Photos prises au Labo). ....	45
Figure 25: Préparation des doses (photos prises au labo) .....	46
Figure 26: Disques en papier wattman stériles .....	46
Figure 27: Préparation des milieux de culture (photo prise au labo) .....	47
Figure 28: Ré-isolément des souches bactériennes (photos prises au labo) .....	47
Figure 29: Méthode des stries (Google) .....	47
Figure 30: Suspension bactériennes des deux souches (photon prise au labo) .....	48

Figure 31: Ajustement de la charge bactérienne sur spectrophotomètre (photo prise au labo).....	48
Figure 32: Technique de culture en nappe par écouvillonnage (photo prise au labo) .....	49
Figure 33: Résultats de test de sensibilité des bactéries vis-à-vis des disques d'antibiotiques sélectionnés.....	49
Figure 34: Placement des disques et des extraies des plantes (photo prise au labo) .....	50
Figure 35: Aromatogramme par technique des puits (photo prise au labo) .....	50
Figure 36: Incubation des boîtes (photo prise au labo) .....	51
Figure 37: Inoculum bactérien utilisé pour la microplaque (photo prise au labo) .....	52
Figure 38: Méthode de micro-dilution en milieu liquide.CMI (photo prise au labo).....	53
Figure 39: Ajout de l'indicateur coloré pour la lecture (photo prise au labo).....	53

### **Partie Expérimentale**

<b>Figure 1.1</b> : taux de rendement des differents extraits de notre étude.....	54
<b>Figure 2.1</b> : Difference entre le diamètre de la synergie et l'antibiotiques témoin.....	55
<b>Photo 2.1</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'olivier et sa synergie sur les bactéries étudiées .....	55
<b>Figure 2.2</b> : Résultats de la synergie entre l'extrait pur des feuilles du citronnier avec la Colistine et avec la Bacitracine sur les bactéries étudiées .....	56
<b>Photo 2.2</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. de citronnier et sa synergie sur les bactéries étudiées .....	57
<b>Figure 2.3</b> : Résultat de la synergie entre la colistine et la Bacitracine avec l'extrait des f. d'oranger sur <i>E.coli</i> et <i>S.Aureus</i> .....	58
<b>Photo 2.3</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'oranger et sa synergie sur les bactéries étudiées.....	58
<b>Figure 2.4</b> : Résultat du test de la synergie entre la Colistine ( <i>E.coli</i> ), la Bacitracine( <i>S.aureus</i> ) et l'extrait pur des f. d'oranger amer.....	59
<b>Photo 2.4</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'oranger amer et sa synergie sur les bactéries étudiées.....	59
<b>Figure 2.5</b> : Résultat du test de la synergie entre les antibiotiques et l'extrait de feuilles de pamplemoussier.....	60
<b>Photo 2.5</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait f. de pamplemoussier et sa synergie sur les bactéries étudiées.....	61
<b>Figure 2.6</b> : Résultats du test de la synergie entre la Colistine et la Bacitracine avec l'extrait pur de gousses d'ail sur <i>L'E.coli</i> et <i>S.aureus</i> .....	62

<b>Photo 2.6</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de gousses d'ail et sa synergie sur les bactéries étudiées.....	62
<b>Figure 2.7</b> : Résultats Synergie entre l' <i>ERTAPENEM</i> et la <i>SPIRAMYCIN</i> avec l'extrait de Bulbe d'ail.....	63
<b>Photo 2.7</b> : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de Bulbe d'ail et sa synergie sur les bactéries étudiées.....	64
<b>Figure 3.1</b> : Résultats des diamètres (en mm) d'inhibition par méthode des puits du miel sur les bactéries étudiées.....	65
<b>Photo 3.1</b> : Diamètre d'inhibition du miel sur les bactéries étudiées par méthode des puits.....	66

### Liste des tableaux.

Tableau 1: Caractéristiques du genre <i>E.coli</i> .....	4
Tableau 2: Classification des composés phénoliques. ....	15
Tableau 3 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier selon plusieurs auteurs..	19
Tableau 2.1: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles d'olives sur les bactéries étudiées.....	55
Tableau 2.2: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles de Citronnier .....	56
Tableau 2.3: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles d'oranger doux.....	57
Tableau 2.4: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles d'oranger amer .....	59
Tableau 2.5: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles de pamplemousse.....	60
Tableau 2.6: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles de gousses d'ail.....	61
Tableau 2.7: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles de bulbes d'ail.....	63
Tableau 3.1 : Résultats des diamètres d'inhibition du miel sur les bactéries étudiées.....	65
Tableau 4.1: Tableau des résultats de la microplaque d' <i>Escherichia Coli</i> .....	67
Tableau 4.2: Tableau des résultats de la microplaque de <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	67

## Liste des abréviations

**ATB** : Antibiotique.

**BHIB** : Bouillon cœur-cervelle.

**C°** : Degré Celsius.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**DO** : Densité optique.

***E.coli*** : Escherichia coli.

**g** : Gramme.

**g/l** : Gramme par litre.

**min** : Minute.

**ml** : Millilitre.

**mm** : Millimètre.

**MH** : Mueller-Hinton.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

***S.aureus*** : Staphylococcus aureus.

**UFC** : Unité formant colonies.

# Introduction

## Introduction

La sécurité sanitaire des aliments d'origine animale (viande, lait, œufs...) est au cœur des efforts des organisations en charge de l'alimentation (1).

En filière agro-alimentaire, les antibiotiques restent parmi les molécules les plus utilisées en alimentation animale (2). Ces derniers peuvent en effet, si leurs délais d'attente n'ont pas été respectés, laisser dans les denrées alimentaires d'origine animale des résidus dangereux pour le consommateur tout en faisant la sélection des bactéries résistantes à des traitements ultérieurs (3).

Cette résistance augmente à un rythme alarmant et cause d'une part un problème assez préoccupant pour la santé mondiale et de l'autre un des grands défis auxquels la santé publique est confrontée aujourd'hui. Pour pallier à cela, les scientifiques ont menés des recherches de nouvelles molécules qui possèdent divers autres propriétés chimiques et utilisent de nouveaux mécanismes d'actions contre les microbes pathogènes (4).

Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle. Ces dernières possèdent des propriétés antimicrobiennes connues depuis l'antiquité (5). Ces plantes représentent un immense réservoir de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques (6).

L'évaluation des activités biologiques des plantes médicinales demeure une tâche très intéressante qui à fait l'objet de plusieurs études (7).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dont l'objectif principal est l'évaluation des activités antibactériennes des extraits d'origines végétales présente en Algérie à savoir le citron (*Citrus limonum*), l'orange amère (*Citrus aurantium*), *Citrus* l'orange douce (*sinensis*) et *Citrus maxima* (pamplemousse), l'espèce *Oléaeuropaea var. Europeaea* (l'olivier domestique) et *L'Allium sativum* (ail) ainsi qu'un aliment issue de l'association du monde végétal et animal (le miel) vis-à-vis de deux souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

# Chapitre I : Généralités

## I. Généralités

### 1 *E.coli*

#### 1.1 Historique :

*E.coli* est un procaryote, l'un des groupes d'organismes les plus petits et les plus courants qui existent. Theodore Escherich, un bactériologiste allemand, c'est-à-dire un scientifique qui étudie les bactéries, a identifié pour la première fois *E.coli* en 1885 dans des échantillons de selles prélevés sur des bébés atteints d'entérite. Cette découverte a permis d'identifier *E.coli* comme la cause d'une maladie spécifique. La bactérie a été initialement nommée *Bacterium coli*, mais il a ensuite été changé en *E.coli*, en l'honneur d'Escherich. Aujourd'hui, on en sait plus sur *E.coli* que sur tout autre organisme vivant, principalement parce qu'il a été le plus étudié. (8)

#### 1.2 Classification:

*E.coli* appartient au genre *Escherichia* et est un membre bien connu de la famille des bactéries *Enterobacteriaceae*. Les entérobactéries sont communément appelées bactéries entériques, c'est-à-dire des bactéries qui peuvent survivre dans le tube digestif, qui comprend les structures du système digestif (cavité buccale, œsophage, estomac, intestins, rectum et anus) (8). Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des protéobactéries. En plus de l'espèce *E.coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. (9)

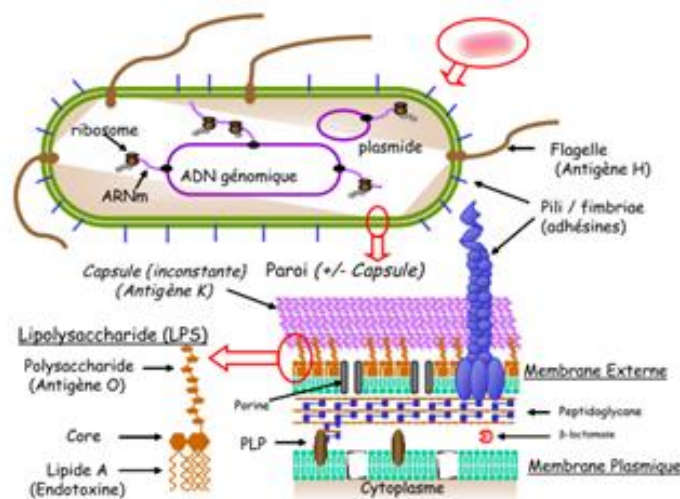


Figure 1: Morphologie et Structure de l'*E.coli* (10)

## 1.3 Identification d'*E.coli* sur les milieux nutritifs

### 1.3.1 Caractères morphologiques et culturaux :

Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E.coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). (9)

Elle se développe en 24 heures à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées Sur gélose au sang. Les colonies de *E.coli* sont lisses, gris terne, et de 2 à 3 mm de diamètre. Sur milieu Mac Conkey, Les colonies d'*E. coli* Lactose-positives, sont de couleur rose à rouge, plates, sèches et de 2 à 3 mm de diamètre, elles sont généralement entourées d'une zone rose plus foncée des sels biliaires précipités. Les colonies *E.coli* Lactose-négatives produisent des colonies incolores sur Mac qui sont de 2 à 3 mm de diamètre. (11).

Les colonies sur gélose Hecktoen entérique et le Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD) sont de couleur jaune (12)

### 1.3.2 Caractères biochimiques :

Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier.

*E.coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la glucuronidase (Glu). La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E.coli* en dehors du sérotype O157 :H7 qui ne fermentent pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre. (9)

**Tableau I: Caractéristiques du genre *E.coli* (13)**

Caractéristiques	<i>E.coli</i>
ONPG	+
Oxydase	-
Rouge de méthyle	+
Voges-Proskauer	-
Production d'indole	+(généralement présent)
Utilisation du citrate	-
Production de H <sub>2</sub> S	-
Uréase	-
β-galactosidase	+(généralement présent)
Gaz à partir de glucose	+
Acide à partir de lactose	+
Phénylalanine désaminase	-
Lysine décarboxylase	+(généralement présent)
Ornithine décarboxylase	+(généralement présent)
Mobilité	Péritriches si mobiles
Liquéfaction de la gélatine (22°C)	-

## 1.4 Pouvoir pathogène :

La "colibacillose" est un terme général désignant une maladie causée par la bactérie *E.coli*, qui réside naturellement dans les intestins inférieurs de la plupart des mammifères à sang chaud. *E.coli* est donc un micro-organisme polyvalent, avec un certain nombre de souches pathogènes susceptibles de provoquer des infections intestinales et extra-intestinales, tandis que la plupart des autres sont inoffensives pour leur hôte et relèvent du commensalisme. Les souches d'*E.Coli* pathogènes peuvent être classées en différents pathotypes, ou « pathovars », chaque pathotype provoquant une maladie différente. (14)

Les souches d'*E.coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages

cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches de *E.coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant : (15)

a) Les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques :

Il existe une classification basée sur le phénotype de virulence de chaque souche prenant en considération les facteurs de virulence, l'environnement colonisé, les caractéristiques d'invasion et les pathologies induites. (16) Cette classification permet de classer les *E.coli* intestinaux(InPEC) en plusieurs variants pathogènes appelés « pathovars » (17):

- *E.coli*entérotoxigènes (ETEC) :

Les organismes colonisent la surface de la muqueuse de l'intestin grêle et élaborent leurs entérotoxines, donnant lieu à un état de sécrétion nette. Les souches ETEC sont associées à deux grands syndromes cliniques : la diarrhée du sevrage chez les enfants du monde en développement, et la diarrhée du voyageur (18)

- ENTEROPATHOGENIC *E.COLI* (*EPEC*) :

L'EPEC est une catégorie importante d'*E.coli* diarrhéique qui a été liée à la diarrhée infantile dans les pays en développement. Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités et une adhérence intime entre la bactérie et la membrane de la cellule épithéliale. Des modifications marquées du cytosquelette. (18)

- les *E.coli*entéroinvasifs (EIEC) :

Les *E.coli*entéroinvasifs sont des bactéries apparentées à *Shigella*spp du point de vue génétique, biochimique et pathogénique. Les signes cliniques de la maladie induite par EIEC se caractérisent par une diarrhée aqueuse, des crampes abdominales, des selles sanglantes et une fièvre.

- les *E.coli*entéroagrégatifs (EAgg ou EAEC) :

Les *E.coli* entéro-agrégatifs sont à l'origine de manifestations voisines de celles observées lors d'infections à *E.coli* entéro-pathogènes, mais plus persistantes. une toxine a été impliquée : il s'agit de EAST (enteroaggregative *E.coli* heat stable enterotoxin). (19)

- les *E.coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Les principales caractéristiques de l'épidémiologie des EHEC sont les suivantes : un réservoir dans le tractus intestinal des bovins et d'autres animaux ; la transmission par une grande variété d'aliments, la viande bovine étant le principal vecteur d'infection ; et une dose infectieuse très faible, permettant des taux élevés d'attaque et de transmission de personne à personne. (18)

- b) Les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) (pour extra-intestinal pathogenic *E.coli*) : ils sont responsables d'infections extra-intestinales à partir soit de l'intestin ou des autres sites (plaies, appareil respiratoire). Ces bactéries ont développé des stratégies qui leur permettent de survivre et de se multiplier dans des milieux hostiles, pauvres en fer, et en présence des défenses immunitaires de l'hôte. Les ExPEC sont principalement responsables des infections urinaires, de bactériémies et de septicémies, ainsi que de méningites néonatales qui, souvent, laissent des séquelles chez le malade et peuvent même entraîner sa mort. *E.coli* est aussi responsable des infections intra-abdominales et des pneumonies nosocomiales. (20)

### 1.5 Traitement :

*E.coli* est, à l'état sauvage, sensible aux autres bêta-lactamines (penicillines du groupe A, carboxy-penicillines, ureido-penicillines, céphalosporines, monobactam, carbapénèmes), Cependant, la résistance acquise aux pénicillines, liée principalement à la production d'une pénicillinase plasmidique (TEM), est fréquente, retrouvée chez près de la moitié des souches. *E.coli* est naturellement sensible aux aminosides, aux quinolones et au cotrimoxazole mais les résistances acquises sont possibles et la sensibilité doit toujours être vérifiée sur un antibiogramme. Le traitement actuellement recommandé pour les cystites non compliquées de la femme jeune à *E.coli* est la fosfomycine par voie orale en prise unique « traitement minute ». (21)

## 2 *S.aureus*

### 2.1 Historique :

Les premières descriptions des Staphylocoques (bactérie en forme de coque) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871, mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, ROBERT KOCH en Allemagne et LOUIS PASTEUR en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine. (22)

Plus tard, en 1883 OGSTON crée le nom « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irrégulier à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). OGSTON différencie ainsi Staphylococcus de Streptococcus. (23)

En 1884, en Allemagne ROSENBACH donne la première description du germe Staphylococcus en obtenant des cultures pures de ces bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S.aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (blanches ou dorées). (24)

En 1885, ZOPF a placé les staphylocoques et les microcoques dans le genre Micrococcus séparé par la suite par FLUGGE et al., (1995) qui classent les cocci anaérobies facultatifs et aérobies dans le genre Staphylococcus et Micrococcus, respectivement. (25) Plus tard, vers les années 1970 il y a eu apparition de *S.aureus* résistant à la Méricilline (SARM) qui est la première cause d'infection nosocomiale. Actuellement, de nouveaux SARM sont responsables aux Etats Unis d'une épidémie d'infection bactérienne ont été apparus. (26)

### 2.2 Classification et habitat :

*S.aureus* appartient au :

- Règne : Bacteria,
- Phylum : Firmicutes
- Classe : Bacilli
- Ordre : Bacilliales
- Famille : Staphylococcaceae
- Genre : Staphylococcus. (27)

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont scindées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non la coagulase :

- ✓ Coagulase positive : dont *S.aureus* considéré comme l'espèce la plus pathogène.
- ✓ Coagulase négative : contient les espèces *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* (26)

*S.aureus* est une bactérie ubiquitaire, à l'inverse de certaines espèces de staphylocoques qui ont, eux un hôte préférentiel. *S.aureus* semble capable de coloniser tous les mammifères dont les marins même si différents biotypes de souches de *S.aureus* pourraient être raccordés à des hôtes spécifiques. (28)

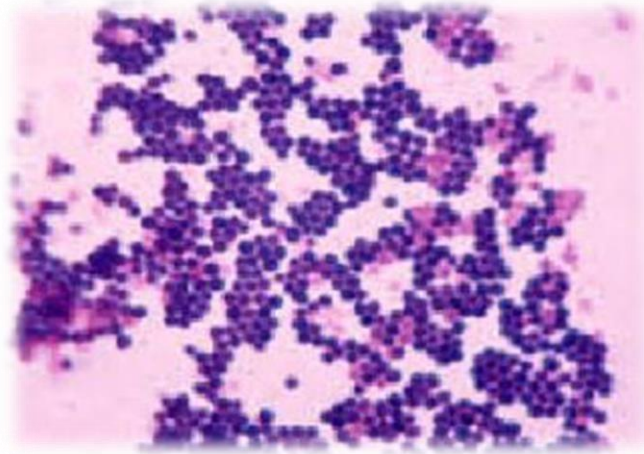
*S.aureus* est une bactérie robuste très répandue dans l'environnement. Elle est capable de survivre dans un large éventail de biotopes. Ces capacités expliquent en partie la difficulté à éradiquer cette bactérie (27)

La bactérie peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire. Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé (29)

### **2.3 Identification de *S.aureus* sur les milieux nutritifs :**

#### 2.3.1 Caractères morphologiques et culturaux :

A l'examen microscopique, *S.aureus* se présente sous l'aspect de coques immobiles. Il est regroupé en amas formant des grappes de raisin. C'est des cocci mesurant de 0.8 à 1 µm de 6 diamètres, non sporulés. *S.aureus* est isolé en diplocoque ou en très courte chaînette (3 à 5 éléments) (26).



**Figure 2: *S.aureus* avec coloration de Gram au grossissement 10x100. (30)**

Le *S.aureus* est une bactérie à croissance aéro-anaérobie facultative, et sa croissance sur milieu ordinaire est facile entre 10 et 45 °C. Sur une gélose profonde en tube, les bactéries cultivent tout au long du tube donc le caractère **aéro-anaérobie facultatif** est confirmé. Après 24h d'incubation, il peut *S.aureus* se développe sur géloses trypticase-soja supplémentées ou non en sang. Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles peuvent être pigmentées. Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d' « aureus » à *S.aureus* car la pigmentation est souvent de couleur or (jaune à jaune orangée). Il faut préciser que le *S.aureus* peut également croître en milieu hostile comme sur une gélose Chapman (milieu sélectif hyper salé), ce qui est un avantage pour isoler la souche. (28).

### 2.3.2 Caractères Biochimiques :

*S.aureus* a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Il est catalase positive à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobie. Il est toutefois capable de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques. Il est habituellement capable de fermenter le mannitol. Ce caractère est souvent, mais pas obligatoirement, associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu de CHAPMAN. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture. (31)

### 2.4 Pouvoir Pathogène :

*S.aureus* possède une structure de paroi cellulaire complexe composée d'une épaisse couche de peptidoglycane et d'une capsule de polysaccharides. De plus, *S.aureus* possède un arsenal élaboré de facteurs de virulence structurels et de sécrétion impliqués dans la production de toxines, l'adhérence et l'invasion des tissus de l'hôte, et l'évasion immunitaire. (32)

*S.aureus* est un pathogène pyogène connu pour sa capacité à abcéder les foyers d'infection locaux et métastatiques. Cette réponse pathologique classique à *S.aureus* définit le cadre dans lequel l'infection va évoluer. Les bactéries de ce type déclenchent une réaction inflammatoire. Si la réponse cellulaire de l'hôte n'arrête pas l'infection, celle-ci se propage aux tissus voisins ou à la circulation sanguine. L'acquisition peut généralement être exogène ou endogène. La transmission exogène peut avoir lieu par la contamination de tissus traumatisés (plaies ou brûlures), par l'introduction de matériel médical contaminé dans les tissus et par l'ingestion d'aliments ou de lait contaminés. L'infection endogène, quant à elle, est l'entrée de micro-organismes par la peau, à travers des fractures, des plaies ou des corps étrangers, à partir d'un site où le micro-organisme est commensal. L'infection est favorisée dans tous les cas si le patient est immunodéprimé, s'il est diabétique, mal-nourrie ou s'il est sous antibiothérapie à large spectre. (33)

*S.aureus*, parfois appelée staphylocoque doré, produit de nombreuses toxines dont les SE, produites par certains *S. aureus* (ceux portant les gènes de ces toxines) et qui sont responsables d'épidémies liées à cette bactérie. La maladie humaine d'origine alimentaire est une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE), protéines thermorésistantes préformées dans l'aliment, dans lequel *S. aureus* (ou tout autre staphylocoque) producteur de SE a pu se développer et produire sa (ou ses) toxine(s). (34).

### 2.5 Traitement :

Une affection contractée par les SARM est traitée par des antibiotiques efficaces. Ils comprennent: vancomycine, linézolide, tédizolide, quinupristine plus dalfopriline, céftaroline, télavancine ou daptomycine. Si les résultats des tests indiquent ultérieurement que la souche est sensible à la méticilline et si le patient n'est pas allergique à la pénicilline, on utilise alors un médicament apparenté à la méticilline, comme la nafcilline ou l'oxacilline. Suivant la

gravité de l'infection, les antibiotiques peuvent être prescrits pendant plusieurs semaines. Les souches de SARM communautaires sont généralement sensibles à d'autres antibiotiques, tels que le triméthoprim/sulfaméthoxazole, la clindamycine, la minocycline ou la doxycycline. Les infections cutanées légères dues aux SARM, comme la folliculite, sont généralement traitées par une pommade, comme celles à base de Bacitracine, néomycine et polymyxine B, ou à base de mupirocine. Si l'infection atteint les os ou des matériels étrangers (tels que pacemaker, valve cardiaque artificielle et prothèse articulaire), la rifampicine et éventuellement un autre antibiotique sont parfois ajoutés au traitement antibiotique. Généralement, l'os infecté et les matériels étrangers doivent être éliminés chirurgicalement pour guérir l'infection. (35)

### 3 La résistance des bactéries aux antibiotiques :

#### 3.1 Définition :

Selon la définition bactériologique du terme, une souche microbienne ou une bactérie sont dites résistantes quand elles supportent une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. La définition génétique correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie détectés par des techniques biophysiques et/ou génétiques. (36)

#### 3.2 Origine de la résistance bactérienne :

##### 3.2.1 Résistance naturelle :

Appelée aussi résistance primaire ou innée, est définie comme étant une insensibilité générale vis-à-vis d'une molécule ou une classe spécifique d'antibiotique. Cette résistance concerne toutes les souches appartenant à la même espèce ou au même genre bactérien (37)

##### 3.2.2 Résistance acquise :

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la

molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (38).

### 3.3 Quelques Résistance des bactéries aux antibiotiques :

La place des bactéries résistantes apparaît être réversible lorsque la pression de sélection diminue. Ainsi depuis 2016, alors que la consommation globale d'antibiotiques marque une diminution, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération chez *E.coli* amorce une diminution après 10 ans d'augmentation constante. (39)

Les b-lactamines (les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes) sont des ATBs bactéricides pour *S.aureus*, affectant les différentes réactions impliquées de la synthèse de la paroi bactérienne (système de peptidoglycane) à savoir : les réactions de transglycosylations et transpeptidations via l'acétylation des enzymes impliqués dans ces deux réactions qui sont nommées les protéines liants les pénicillines (PLP). Mais l'efficacité des b-lactamines diminue lorsqu'il apparaît des souches résistantes à la pénicilline en 1942 (40).

Cette résistance est médiée par des gènes nommés les gènes bla<sub>Z</sub> qui codent pour une enzyme extracellulaire appelée b-lactamase, synthétisée lorsque les staphylocoques sont exposés aux b-lactamines et qui hydrolyse le cycle b-lactame de la pénicilline et des autres b-lactamines (41).

La résistance d'*E.coli* aux b-lactamines est médiée aussi par les b-lactamases qui sont classées selon leurs propriétés fonctionnelles et structurelles en différents groupes et sous-groupes (42).

La méticilline est un antibiotique semi-synthétique dérivé de la pénicilline et résiste à l'action de la pénicillinase (b-lactamase) utilisé pour le traitement des infections dues à *S.aureus* (40). Mais après son utilisation, des souches résistantes à la Méticilline (SARM) apparaissent (43).

### 3.4 Causes de l'antibiorésistance et sa conséquence sur la santé publique :

L'administration répétée d'antibiotiques chez l'homme ou l'animal est responsable de l'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques : la présence d'antibiotique dans l'organisme favorise la sélection des bactéries qui sont résistantes, soit naturellement, soit par mutation ou soit par des échanges de matériel génétique (plasmide) avec d'autres bactéries. Les

antibiotiques absorbés vont éliminer les bactéries sensibles pour laisser place aux bactéries résistantes. Celles-ci peuvent se transmettre et diffuser entre les individus, particulièrement en milieu de soins. Elles rendent les traitements antibiotiques ultérieurs moins efficaces pour le patient et pour la collectivité. (39)

### 3.5 Traitement alternative à l'antibiothérapie :

La diminution drastique de l'usage des antibiotiques en élevage passe par la prévention des maladies et les mesures de biosécurité, l'usage raisonné des antibiotiques, mais également par le développement de méthodes alternatives ou complémentaires à l'antibiothérapie. Différentes approches sont étudiées dont certaines sont basées sur des découvertes biologiques anciennes, insuffisamment explorées et qui sont remises au goût du jour, comme par exemple **la phytothérapie** : elle désigne l'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques. Selon les cas, la plante entière ou certaines parties de celle-ci sont utilisées, incluant les parties souterraines, tiges, feuilles, fleurs, sommités fleuries, bourgeons, fruits, graines, qui sont utilisées sous forme fraîches ou séchées. Plusieurs types de transformation de ces plantes sont appliqués : infusion, décoction (dans l'eau maintenue bouillante), macération (dans l'eau froide), extraction hydroalcoolique, pour obtenir différentes préparations finales. L'aromathérapie, qui est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes (essences et huiles essentielles) est une des modalités de la phytothérapie. Les propriétés thérapeutiques des plantes sont associées à la présence en leur sein de molécules appartenant à une grande diversité de classes chimiques (par exemple : alcaloïdes, terpènes...).(44)

## Chapitre II : les plantes médicinales et leurs métabolites bioactifs.

## II. Les plantes médicinales et leurs métabolites bioactifs :

### 1 Les métabolites bioactifs :

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas encore parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général : ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même, rôle de défense ou de résistance. Ces métabolismes sont classés en trois grandes classes : (45)

- ✓ Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins) et les quinones.
- ✓ Les terpénoïdes et leurs dérivés.
- ✓ Les alcaloïdes.

#### 1.1 Les Composés phénoliques :

##### 1.1.1 Définition :

Les composés phénoliques, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. (46)

Dans la cellule, les composés phénoliques sont essentiellement localisés sous forme soluble dans les vacuoles. Ils peuvent également s'accumuler dans les parois végétales : c'est le cas de la lignine (hétéropolymère d'alcools coniférylique, p-coumarylique et sinapylique) ou de certains flavonoïdes (47)

##### 1.1.2 Classification :

Les composés phénoliques des plantes sont répartis en différentes classes selon la structure de leur squelette de base. (48) Ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule.

**Tableau II: Classification des composés phénoliques. (48)**

Structure	Classe
C6	Phénols simples
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénonnes et acides phenylacétiques
C6-C3	Acides cinnamiques, aldehydescinnamyl, alcools cinnamyl, coumarins, isocoumarins et chromones
C15	Chalcones, aurones, dihydrochalcones, flavans, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins
C30	Biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzophénones, xanthonnes, stilbenes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Betacyanins
Lignans, neolignans	Dimers ou oligomères
Lignins	Polymères
Tannins	Oligomères ou polymères
Phlobaphènes	Polymères

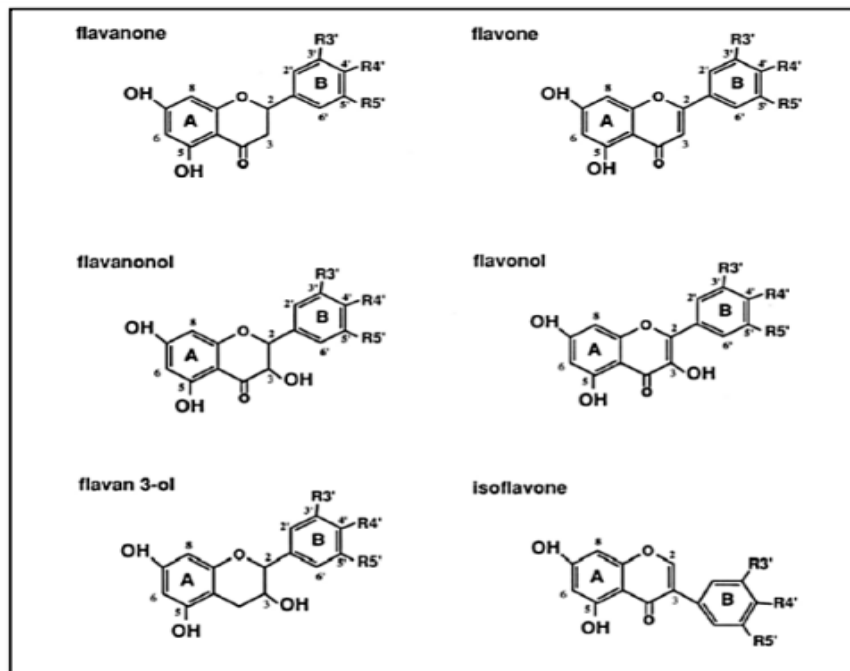
### 1.1.2.1 Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. (49).

En fonction de particularités structurales, les flavonoïdes sont répartis en six grandes classes : (50)

- **Anthocyanes** (baies, fruits rouges, vin) ;
- **Flavanols** (fruits, cacao, thé, vin) ;
- **Flavonols** (oignons, brocolis, tomates, thé) ;
- **Flavones** (tisanes, plantes aromatiques) ;

- **flavanones** (agrumes) ;
- **isoflavones** (soja, légumineuses).



**Figure 3: Les différentes classes des flavonoïdes (51)**

### 1.1.2.2 Les tanins :

Les tanins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir . Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène de la peau. Ce sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes distincts. Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (52).

### 1.1.3 Activités biologiques des composés phénoliques :

Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores et contre les infections et les agressions microbiennes multiples. (53) (54).

Les composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogénèse.

Les composés phénoliques sont aussi responsable des propriétés sensoriels des plantes tel que la couleur, le goût et parfois l'odeur. En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou partie aux composés phénoliques dans ces plantes. (55)

Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante, cette dernière est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers. (56)

Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phénoliques, protègent les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété «Vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiant, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques.

Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques. Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général (57)

### **1.2 Les alcaloïdes :**

Un alcaloïde est un composé d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte. L'appartenance aux alcaloïdes est confirmée par les réactions communes de précipitation avec les réactifs généraux des alcaloïdes. (45)

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Ainsi, la nicotine, produite dans les racines, migre vers les feuilles où elle est diméthylée. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (58)

les alcaloïdes sont utilisées dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine , acide aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine. D'autres effets

pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) (59)

### 1.3 Les Terpenoïdes :

Avec les polyphénols, les terpénoïdes sont classés aussi parmi les substances secondaires importantes du métabolisme chez les végétaux. Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel ils sont parfois désignés. Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : (45)

- Les monoterpènes (C10).
- Les sesquiterpènes (C15).
- Les diterpènes (C20).
- Les triterpènes (C30).
- Les tetraterpènes (C40).
- Les polyterpènes (C4000).

## 2 Les Plantes médicinales :

### 2.1 Les feuilles d'olivier :

#### 2.1.1 Historique et origine :

L'olivier est certainement l'un des plus anciens arbres cultivés, pour certains historiens il date depuis le néolithique : 2000 à 3000 ans avant J.-C. en Syrie, en Asie Mineure, au Proche-Orient (60). Dans le bassin méditerranéen, les premières traces découvertes de sa présence à l'état sauvage remontent au tertiaire, il y a plus de 3 millions d'années (61) et l'oléastre était considéré comme un taxon sans intérêt par les chercheurs et les oléiculteurs (62).

#### 2.1.2 Importance et intérêt :

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles, déchets agricoles et considéré comme un résidu sans intérêt industriel, font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques, tels que les composés phénoliques qui sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes. (63) (64).



**Figure 4: feuilles d'olivier (65)**

### 2.1.3 Composition chimique des feuilles d'Olivier :

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le Tableau ci-dessous montre sa composition chimique globale selon différents auteurs. La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations. (66). Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses).

**Tableau III : Composition chimique globale des feuilles d'olivier selon plusieurs auteurs.**

Composition en %	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)
EAU	46,2-49,7 a	49.8 a	41.4 a	Nd	44.0a
Protéines	5.0-7.6 a	5.4 a	7.0 b	Nd	Nd
Lipides	1.0-1.3 a	6.5 a	3.2 b	6.2 b	Nd
Minéraux	2.8-4.4 a	3.6 a	16.2 a	26.6 b	9.2 b
Carbohydrates	37.1-42.5 a	27.5 a	Nd	Nd	Nd
Fibres Brutes	Nd	7.0 a	Nd	Nd	18.0 b
Cellulose	Nd	Nd	Nd	19.3 b	11.4 b
Hémicellulose	Nd	Nd	Nd	25.4 b	13.3 b
Lignin	Nd	Nd	Nd	30.4 b	14.2 b
Polyphénols totaux	1.3-2.3 b	Nd	2.5 b	Nd	Nd
Tagnins solubles	Nd	Nd	Nd	Nd	0.3 b
Tagnins condensés	Nd	Nd	0.8 b	Nd	<b>2.0 b</b>

(a)Extrait frais ; (b) Extrait sec.

## 2.2 L'ail et le bulbe d'ail :

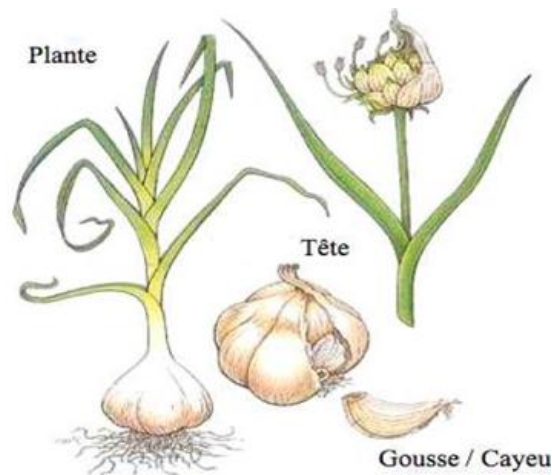


Figure 5: plante d'ail (72)

### 2.2.1 Classification :

La classification traditionnelle de l'ail, distingue les cultivars selon des critères morphophysiologiques en fonction de leur période de végétation et de la couleur de la tunique des bulbes et des bulbilles. (73)

- Règne : Plante
- Sous règne : Trachéophyte
- **Embranchement** : Spermatophytes ou Phanérogames
- Sous embranchement : Angiospermes
- **Classe** : Monocotyledonae
- Sous classe : Liliidae
- **Ordre** : Liliales
- **Famille** : Liliaceae ou Liliacées
- Genre : *Allium*
- **Espèce** : *Allium sativum*
- Nom commun : Ail.

### 2.2.2 Constituants de l'ail :

La valeur énergétique de l'ail est 138,7 kcal/100g. La gousse contient 65% d'eau, 28% de polysaccharides de stockage, 2% de protéines dont essentiellement des enzymes( alliinase et peroxydases...), 12% d'acides aminés libres (alanine, arginine, acide aspartique, asparagine, histidine, leucine, méthionine, proline, tryptophane, phénylalanine, sérine, thréonine et valine. L'ail est riche en calcium, en phosphore et en soufre. On y trouve aussi du potassium, du zinc, du cuivre, du magnésium et des oligo-éléments comme, le sélénium et germanium. Cette plante renferme aussi des vitamines A, B1, B2, PP, C, les acides gras essentiels (vitamine F). (74)

**Tableau 1 : Composition générale d'*Allium sativum*. (75)**

<b>Composants</b>	<b>Teneur (% poids frais)</b>
<b>Eau</b>	62 – 68
<b>Carbohydrates</b>	26 – 30
<b>Protéines</b>	1.5 - 2.1
<b>Acides aminés</b>	1 - 1.5
<b>Acides aminés : cystéine sulfoxides</b>	0.6 - 1.9
<b>γ- glutamylcystéinse</b>	0.5 - 1.6
<b>Lipides</b>	0.1 - 0.2
<b>Fibres</b>	1.5
<b>Composés soufrés totaux</b>	1.1 - 3.5
<b>Sulfures</b>	0.23 - 0.37
<b>Nitrogène</b>	0.6 - 1.3
<b>Minéraux</b>	0.7
<b>Vitamines</b>	0.015
<b>Totalité des composés solubles dans l'huile</b>	0.15 – 0.7
<b>Totalité des composés solubles dans l'eau</b>	97

### 2.2.3 Principes actifs de l'ail :

L'ail frais renferme des quantités importantes de γ-glutamylcystéines, composés de réserve, lesquels, par hydrolyse et oxydation peuvent former de l'alliine (la cystéinesulfoxyde), molécule majoritaire (76), qui représente 24% du poids total du bulbe. Cette molécule présente dans les bulbes intacts, peut s'accumuler naturellement durant la conservation de l'ail à température ambiante. Elle s'est avérée être le précurseur stable converti en allicine par l'action d'une enzyme nommée l'alliinase. Cette réaction ne peut avoir lieu que si les tissus sont écrasés

ou endommagés car les deux composés se trouvent dans des compartiments cellulaires différents. Les  $\gamma$ -glutamylcystéines donnent aussi des S-allyl-L-cystéine (77).

### 2.2.4 Utilisations et propriétés :

L'ail est non seulement utilisé en cuisine comme condiment pour ses vertus aromatiques, car il relève le goût des viandes et des sauces mais utilisé en phytothérapie vu ses effets anti-tumoraux, anti-cholestérol, antifongiques, antibactériens (Certaines bactéries gram négatif et positif y compris *E.coli*, se sont révélées sensibles aux extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux de l'ail. (78)), antiviraux, antiparasitaires, antioxydants, hypoglycémisants et son effet sur le système vasculaire. (79)

## 2.3 Les agrumes et feuilles : (80)

### 2.3.1 L'oranger : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck - Famille : Rutaceae

L'oranger est un arbre au port harmonieux et de croissance rapide. Son aspect est plutôt arrondi ou parfois en colonne. Les branches portent des feuilles vert sombre, ovales, coriaces et finement denticulées. Le pétiole est légèrement ailé. Les fleurs sont très odorantes, à 5 pétales blancs recourbés vers l'arrière. Le fruit est une baie généralement ronde. Sa coloration et sa grosseur varient sensiblement selon la variété. La pulpe se divise en quartiers composés de vésicules juteuses et de graines dures de couleur blanche. L'oranger est l'un des agrumes le plus répandu au monde et le plus connu.



Figure 6: feuilles et fleurs d'oranger. (81)

### 2.3.2 L'oranger amer : *Citrus aurantium* L. - Famille : Rutaceae



**Figure 7: feuille d'oranger amer (Bigarade).**

L'oranger amer est un bel arbrisseau épineux. Ses feuilles vert-brillant ont une odeur faible et une saveur amère. Elles sont ovales, subaiguës au sommet, à pétiole articulé et plus ou moins ailé. Elles mesurent environ 8 cm de longueur et 4 cm de largeur. Les fleurs pouvant atteindre 25 mm, sont blanches et très odorantes. Le fruit appelé Bigarade est une baie cortiquée vert-jaune ou rouge-orangé à maturité, avec des ponctuations bien distinctes. Le goût, acide et très amer, le rend impropre à la consommation. On produit aussi « l'essence de néroli » à partir de ses fleurs ainsi que « l'essence de petit-grain » à partir de ses jeunes pousses et de ses feuilles.

### 2.3.3 Le Citronnier : *Citrus limon* (L.) Burm.f. - Famille : Rutaceae



**Figure 8: Aspect morphologique des feuilles et du fruit de *Citrus Limonum*. (82)**

Le citronnier est un arbuste vigoureux aux branches robustes et épineuses. Les feuilles alternes et coriaces sont grandes et très parfumées. Les fleurs sont blanches et peu odorantes, regroupées à l'aisselle des feuilles. Les fruits sont des baies ovales, jaune vif, avec un mamelon au sommet. La peau est épaisse et contient de très nombreuses poches à huile essentielle. Enfin, la pulpe très acide et juteuse entoure quelques pépins. L'origine de cet arbre est inconnue, mais on pense qu'il provient d'Asie Mineure (ou d'Afrique du Nord). Très cultivé en Égypte et en Irak vers 700 après. J.-C., c'est Christophe Colomb qui l'introduisit en Amérique Centrale en 1493.

### 2.3.4 Le pamplemousse : *Citrus maxima* (Burm.). Merr. - Famille : Rutaceae



**Figure 9: fruit et feuilles de pamplemousse. (80)**

Le pamplemoussier est un arbuste (ou un petit arbre) en général épineux. Ses feuilles sont grandes, alternes pourvues d'un pétiole très ailé en forme de cœur. Les fleurs qui apparaissent au mois d'avril sont blanc-jaunâtre et odorantes. Le fruit, le pamplemousse, est une baie qui peut peser jusqu'à 8 kg (!) sous des climats chauds et humides. La peau très épaisse, lisse ou granuleuse, varie du jaune clair au vert clair. À l'intérieur du fruit se trouve la pulpe découpée en quartiers dont les vésicules sont juteuses, jaune clair, roses ou rouges. Au goût, le pamplemousse est aigre-doux. Le pamplemousse est le plus gros des agrumes. En Europe, on parle indifféremment de pamplemousse ou de pomelo (dénomination anglaise).

### 2.3.5 Utilisation et effets thérapeutiques des agrumes :

Les agrumes ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et dans la fabrication des produits comestibles, ils contiennent des quantités élevées de composés qui ont

des effets bénéfiques pour la santé, y compris les polyphénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols. Ils présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antioxydantes, antimicrobienne, antibiotique, antiseptique, antiviral, anti-inflammatoire et anticancéreuse. (83) (84) Par exemple : Le linalol et le citral extraits des écorces de pamplemousse et d'orange douce ont des effets antibactériens contre *Campylobacter* *Jejuni*, *E.coli*, *L.Monocytogenes* Et *Bacillus Cereus*. Le citral est un composé actif aussi contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus Niger* (85).

### 3 Le miel

#### 3.1 Définition

Le miel est la substance sucée produite par les abeilles « *ApisMillifera* » à partir du nectar, du miellat et autres matières sucrée qu'elles récoltent sur les végétaux, enrichissent des substances provenant de leur corps, transforment dans leur corps, entreposent dans les rayons et font mûrir. Le miel est une substance visqueuse d'une coloration très variable pouvant aller du jaune très clair au brun très foncé, de saveur très sucrée, acide et plus ou moins aromatique. (86)

#### 3.2 Composition chimique du miel : (87)

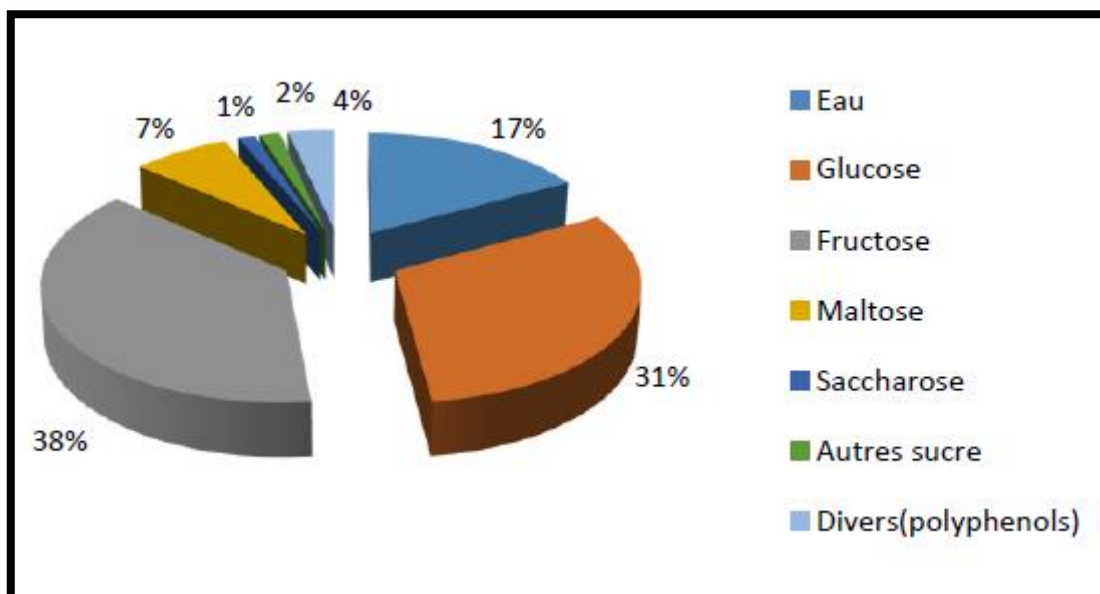


Figure 10: Composition générale du miel. (88)

- Eau : la teneur en eau est variable selon les miels, elle est en moyenne de 17%
- Glucides : (79.5%)

- Monosaccharides : glucose (dextrose): 31%, Fructose (lévulose 38%)
- Disaccharides : Maltose (2 molécules de glucose) : 7.5%, Saccharose (fructose et glucose) : 1.5%
- Divers sucres : (1.5%) Ces sucres sont différents selon l'origine florale.
- Acides aminés : Ils proviennent du nectar, des abeilles et du pollen.
- Acides organiques : acide gluconique, malique, oxalique...

L'acide gluconique est formé dans le miel à partir du glucose en présence de l'oxygène par action d'une enzyme salivaire de l'abeille, la glucose-oxydase.

- Les Enzymes : Elles proviennent, pour la plupart, des sécrétions salivaires de l'abeille :
  - Invertase (hydrolyse du saccharose en glucose et fructose.
  - Glucose-oxydase (formation d'acides gluconique)
  - Amylase.
  - Catalase.
  - Phosphatase.
- Sels minéraux.
- Vitamine.
- Pigments : Caroténoïdes et flavonoïdes.
- Arômes : Alcool, cétones, Aldéhyde...
- Éléments figurés : du pollen, de la cire, des levures, des spores de champignons.

### 3.3 Propriété biologique du miel :

Le miel possède en plus de ses activités énergétiques et nutritionnelles une action cicatrisante et désinfectante, il peut aider la plaie à se refermer (89). Il présente une action dynamisante, apéritive, antioxydante (par le bêta-carotène, les polyphénols...) (90). En concentration suffisamment importante, les flavonoïdes du miel réduiraient l'état inflammatoire et permettraient ainsi de soulager les patients souffrant de brûlures, plaies...etc (91). Des études ont montré des activités antifongiques contre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Trichosporon* sp (92), ainsi que des activités antivirales contre l'herpès simplex de type 1 et de

type 2 sur les lésions, notamment grâce aux flavonoïdes (93) et au monoxyde d'azote (94) contenus dans certains miels.

L'activité antibactérienne du miel a été signalée pour la première fois en 1892 sur certaines bactéries telles que *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi*, et *S.aureus* (95). Leurs effets antibactériens sont dus aux différentes substances qui varient, selon l'origine (96). Tous les miels n'ont pas la même activité antibactérienne, mais il présente de manière générale une activité envers des espèces bactériennes aérobies et les anaérobies, aussi bien Gram(+) que Gram(-) (97). Quatre facteurs sont largement mis en avant pour expliquer cette action antibactérienne à savoir : l'osmolarité, le pH acide, le peroxyde d'hydrogène, et le système non-peroxyde. Cependant, le principal agent responsable de cette activité est le peroxyde d'hydrogène, formé après l'oxydation du glucose par la glucoseoxydase, durant la maturation du miel (98).

L'acide gluconique accroît l'acidité du miel et le rend ainsi peu favorable au développement de colonies bactériennes. Lors de l'application de miel, la libération de peroxyde d'hydrogène s'opère de façon lente et prolongée, permettant ainsi une action locale efficace. L'action du peroxyde d'hydrogène contenu dans le miel sur des bactéries résistantes (*S.aureus* résistant à la *Méticilline* et quatre souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la *Vancomycine*) prélevées dans des plaies infectées a été récemment soulignée. (99)

#### 4 Les méthodes d'extraction des métabolites bioactifs :

La valorisation des composés bioactifs implique une étape clé, l'extraction, qui est réalisée par des méthodes telles que l'extraction par solvant, l'expulsion mécanique, l'extraction supercritique et l'extraction par micro-ondes. La récupération des composés par ces méthodes a des limites telles que l'utilisation d'un solvant supplémentaire dans l'extraction par solvant, un faible rendement dans l'expulsion mécanique, un capital important dans l'extraction par fluide supercritique et la nécessité d'une phase aqueuse dans l'extraction assistée par micro-ondes. (100)

##### 4.1 L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction) :

Les extraits obtenus par extraction par fluide supercritique (SFE) sont aussi compris dans l'appellation « huile concrète ». Un fluide supercritique est un fluide chauffé au-delà de sa

température critique et comprimé au-dessus de sa pression critique. Ce fluide peut alors avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz, ce qui se traduit par une bonne diffusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvateur. Sous haute pression, le CO<sub>2</sub> se transforme en liquide qui est utilisé comme solvant pour extraire les molécules d'intérêt de la matière première. Après l'extraction, aucun résidu de solvant ne reste dans le produit final puisque le CO<sub>2</sub> liquide redevient un gaz et s'évapore sous pression atmosphérique et température ambiante, l'huile concrète est alors obtenue. (101)

L'utilisation de cette technique permet d'éviter la dégradation thermique et la décomposition des composés labiles du fait que l'opération est effectuée à une basse température, tandis que l'absence de la lumière et de l'oxygène empêche les réactions d'oxydation. En conséquence, son efficacité est associée à plusieurs paramètres, notamment la température, la pression, le flux de CO<sub>2</sub> supercritique, la présence de co-solvant et le temps d'extraction. (102)

#### **4.2 L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwaves-Assisted Extraction) :**

Cette technique, qui consiste à extraire avec des solvants à une pression et une température élevées sans que leur point critique ne soit atteint, a reçu différents noms, tels que extraction accélérée par solvant (ASE), extraction par fluide sous pression (PFE), extraction par liquide sous pression (PLE), extraction par solvant chaud sous pression (PHSE), extraction par solvant à haute pression (HPSE), extraction par solvant à haute pression et à haute température (HPHTSE) et extraction par solvant sous-critique (SSE). La mise en place de l'extraction assistée par microondes (MAE) est similaire à l'UAE, elles ne diffèrent seulement par la nature des ondes envoyées sur l'échantillon. En effet, les microondes de la MAE ont une fréquence entre 300 MHz et 300 GHz. (103)

Le phénomène physique de l'extraction n'est alors pas le même. L'énergie diffusée par les microondes va permettre de chauffer le solvant d'extraction au contact de la matière végétale, solubilisant ainsi les composés d'intérêt dans le solvant. (104) Les micro-ondes agissent de manière sélective sur les cellules végétales, vaporisant la matrice d'eau, provoquant la rupture des cellules et libérant directement l'arôme dans la cavité micro-ondes. L'huile est transparente pour les micro-ondes et ne subit pas de chauffage thermique par le processus d'infusion, cela permet d'obtenir un taux d'extraction élevé tout en préservant totalement les

propriétés organoleptiques et physico-chimiques du produit extrait, sans altération thermique. Cette technique offre plusieurs avantages par rapport aux techniques plus traditionnelles, tels qu'un temps d'extraction plus court, une utilisation moindre de solvants, des taux d'extraction de composés plus élevés et un coût de traitement globalement inférieur. (105)

### **4.3 L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction) :**

Les ultrasons sont employés avec succès pour l'extraction des polyphénols, des caroténoïdes, des arômes, des polysaccharides des matrices végétales (plante entière et sous-produits). Les variables associées aux EAU, telles que la fréquence, la puissance, le cycle de travail, la température, le temps, le type de solvant, le rapport liquide-solide, nécessitent un contrôle précis pour une extraction optimale. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) utilise l'énergie des ultrasons et des solvants pour extraire des composés cibles de diverses matrices végétales. Les ultrasons sont des ondes mécaniques dont la fréquence (> 20 kHz) est supérieure à la gamme de fréquences audibles de l'audition humaine (20 Hz à 20 kHz). Ces ondes consistent en une série de cycles de compression et de raréfaction qui peuvent se propager à travers un milieu solide, liquide ou gazeux, induisant le déplacement et le délogement des molécules de leur position initiale. Lorsque l'onde sonore est de forte intensité, la pression négative pendant la raréfaction dépasse la force d'attraction qui unit les molécules, les séparant et créant une cavité. Ces bulles croissent par coalescence et s'effondrent ensuite pendant la phase de compression, créant un point chaud et des conditions locales extrêmes. La température peut atteindre jusqu'à 5000 K et la pression peut augmenter jusqu'à 1000 atm. Ces points chauds accélèrent les réactions biochimiques dans leur voisinage. La cavitation acoustique est le principal mécanisme impliqué dans l'extraction assistée par ultrasons. L'effondrement des bulles de cavitation et les ondes sonores peuvent induire un ou plusieurs phénomènes tels que la fragmentation, l'érosion localisée, la formation de pores, la force de cisaillement, l'augmentation de l'absorption et l'indice de gonflement dans la matrice cellulaire de la plante. L'effondrement des bulles de cavitation génère des ondes de choc et la collision accélérée entre les particules provoque la fragmentation de la structure cellulaire. La fragmentation rapide conduit à la solubilisation du composant bioactif dans le solvant en raison de la diminution de la taille des particules, de l'augmentation de la surface et des taux élevés de transfert de masse dans la couche limite de la

matrice solide. Les ultrasons entraînent des dommages localisés aux tissus végétaux, appelés érosion. Cette érosion peut également être attribuée à l'implosion des bulles de cavitation à la surface des tissus végétaux. La partie érodée facilite le contact du solvant, ce qui augmente le rendement de l'extraction. La formation de pores pendant la cavitation, un phénomène connu sous le nom de "sonoporation", dans les membranes cellulaires entraîne la libération des composés bioactifs présents dans la cellule. En outre, la génération et l'effondrement des bulles de cavitation induisent une force de cisaillement et une turbulence dans le fluide, ce qui entraîne la rupture des parois cellulaires et contribue à la libération des composés bioactifs. Les ultrasons augmentent l'absorption d'eau du grignon, améliorant ainsi l'accessibilité de l'eau en tant que solvant pour les composés bioactifs à extraire, tout en augmentant la diffusivité des composés bioactifs eux-mêmes. (100)

## Partie Expérimentale

### Matériels et méthodes :

- Problématique:

L'usage anarchique et abusif des antibiotiques conventionnels, combiné aux nombreuses mutations génétiques qui surviennent dans le monde bactérien à induit à l'émergence des souches bactériennes résistantes. A cet égard, et afin de lutter contre ce phénomène de résistance antibactérienne, l'investigation de plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles sources d'agents antimicrobiens. Dans ce cadre, nous avons tenté de contribuer, par la présente étude, à l'évaluation de l'effet antibactérien de sept extraits végétaux obtenues à partir des feuilles d'agrumes (citronnier, oranger, oranger amer, pamplemoussier), de l'olivier domestique, des gousses et des bulbes d'ail ainsi que de six échantillons de miel.

- Objectifs d'étude :

- ✓ Préparation des extraits éthanoliques bruts par ultrasonication à partir des différentes ressources végétales étudiées.
- ✓ Détermination du rendement de l'extraction.
- ✓ Evaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits et du miel par diffusion sur milieu solide (**Aromatogramme**).
- ✓ Evaluation de l'effet synergique résultant de l'association extrait pur-antibiotique.
- ✓ Détermination de la concentration minimale bactéricide des extraits actifs.

- Lieu et période d'étude :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pendant la période allant du mois de mars au mois



de juin 2022.

**Figure 11:paillasse de manipulation (photo prise au labo)**

### 1 Matériel non biologique

Tous les appareillages, verreries, consommables, instruments utilisés lors de notre étude sont résumés dans l'**annexe 1**.

### 2 Matériel végétal :

#### 2.1 Préparation du matériel végétal :

##### 2.1.1 Feuilles des plantes :

- Collecte :

- Feuilles d'olivier :

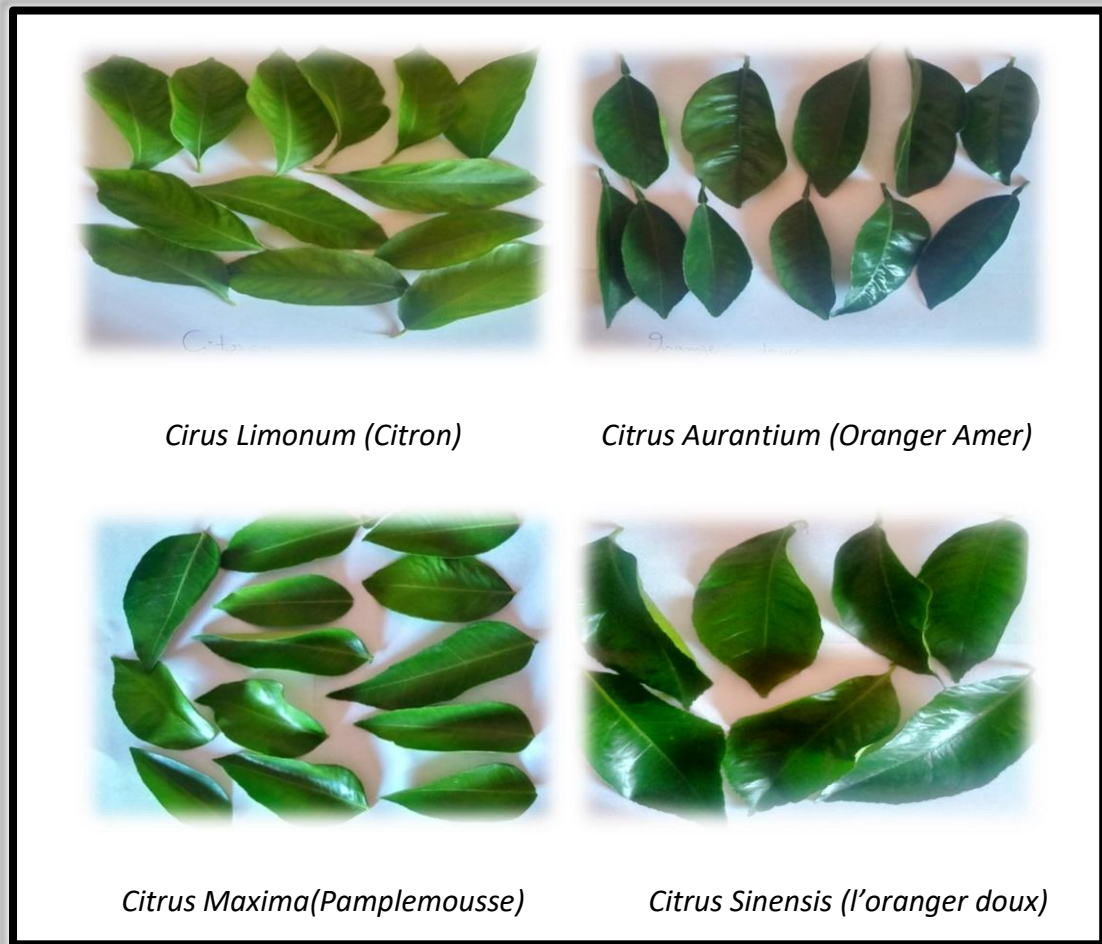
Les feuilles d'*Oléa europaea var. Europeaea* (l'olivier domestique) ont été prélevées au village tamarighet, région de béni-douala, wilaya de Tizi-Ouzou en automne 2015.



**Figure 12: Feuilles d'*Oléa europaea***

- Feuilles d'agrumes :

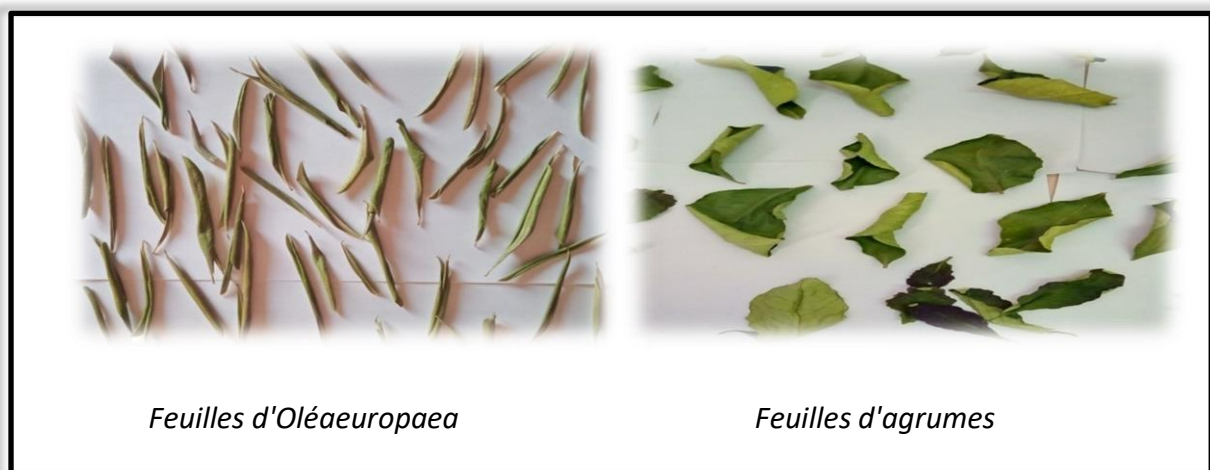
Les feuilles d'agrumes des espèces : *Citrus limonum* (citron), *Citrus aurantium* (l'orange amère), *Citrus sinensis* (l'orange douce) et *Citrus maxima* (pamplemousse) proviennent de la région d Sidi Nâamane, village Draa khelifa de la wilaya de Tizi-Ouzou.



**Figure 13: feuilles d'agrumes (photos prises au labo).**

- Séchage :

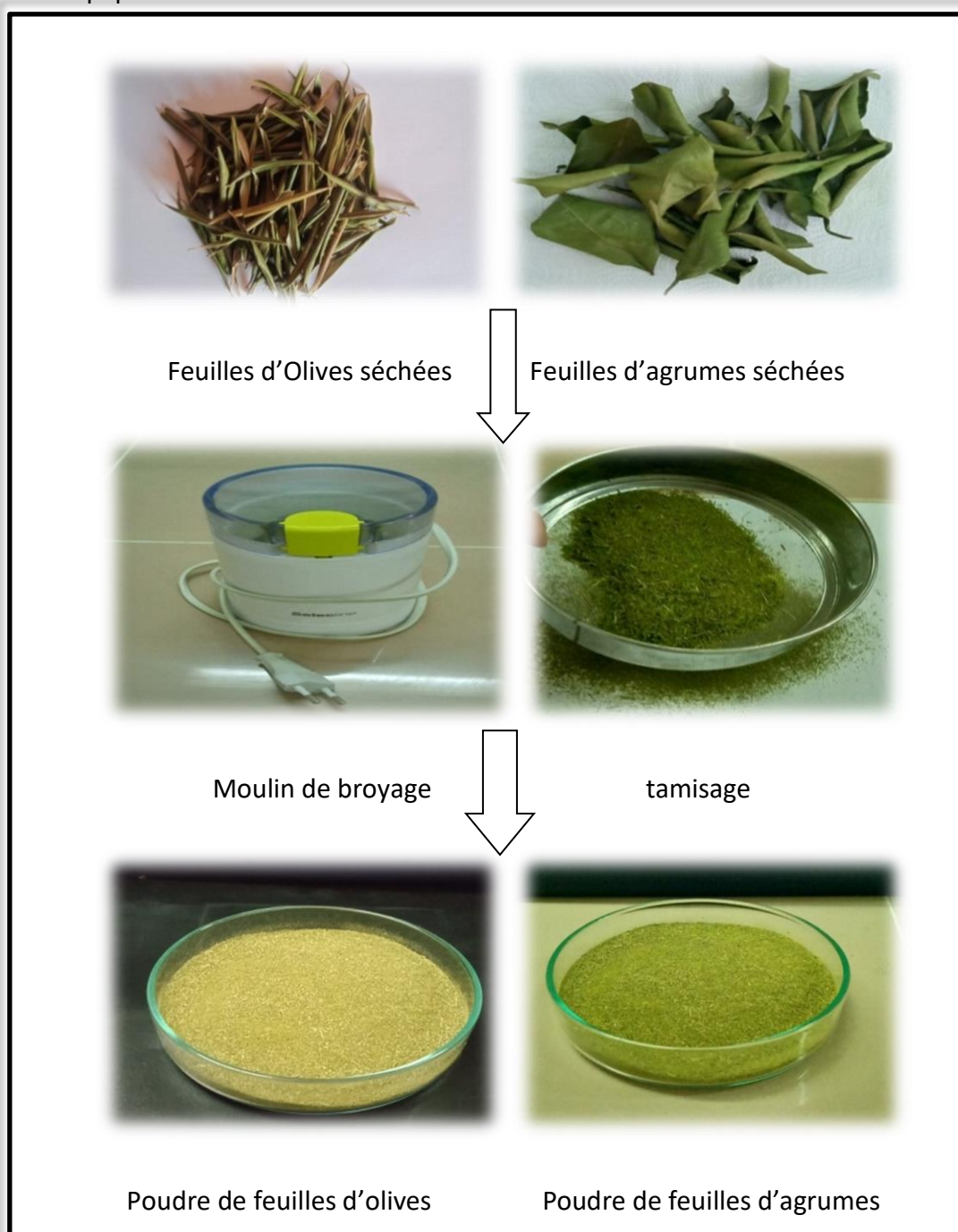
Les feuilles des plantes récoltées, préalablement débarrassées de toutes poussières et de toutes impuretés puis lavées avec de l'eau distillée ont été étalées sur un papier sec et propre renouvelé périodiquement et laissées séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un endroit aéré durant une période de 15 jours (deux semaines).



**Figure 14: séchage des feuilles (photos prises au labo).**

### - Broyage et tamisage :

Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un moulin à café, le résultat est passé dans un tamis afin d'obtenir une poudre très fine, cette dernière est conservée dans un bocal en verre couvert avec du papier aluminium à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 15: étapes de broyage et tamisages (photos prises au labo)**

### 2.1.2 L'ail :

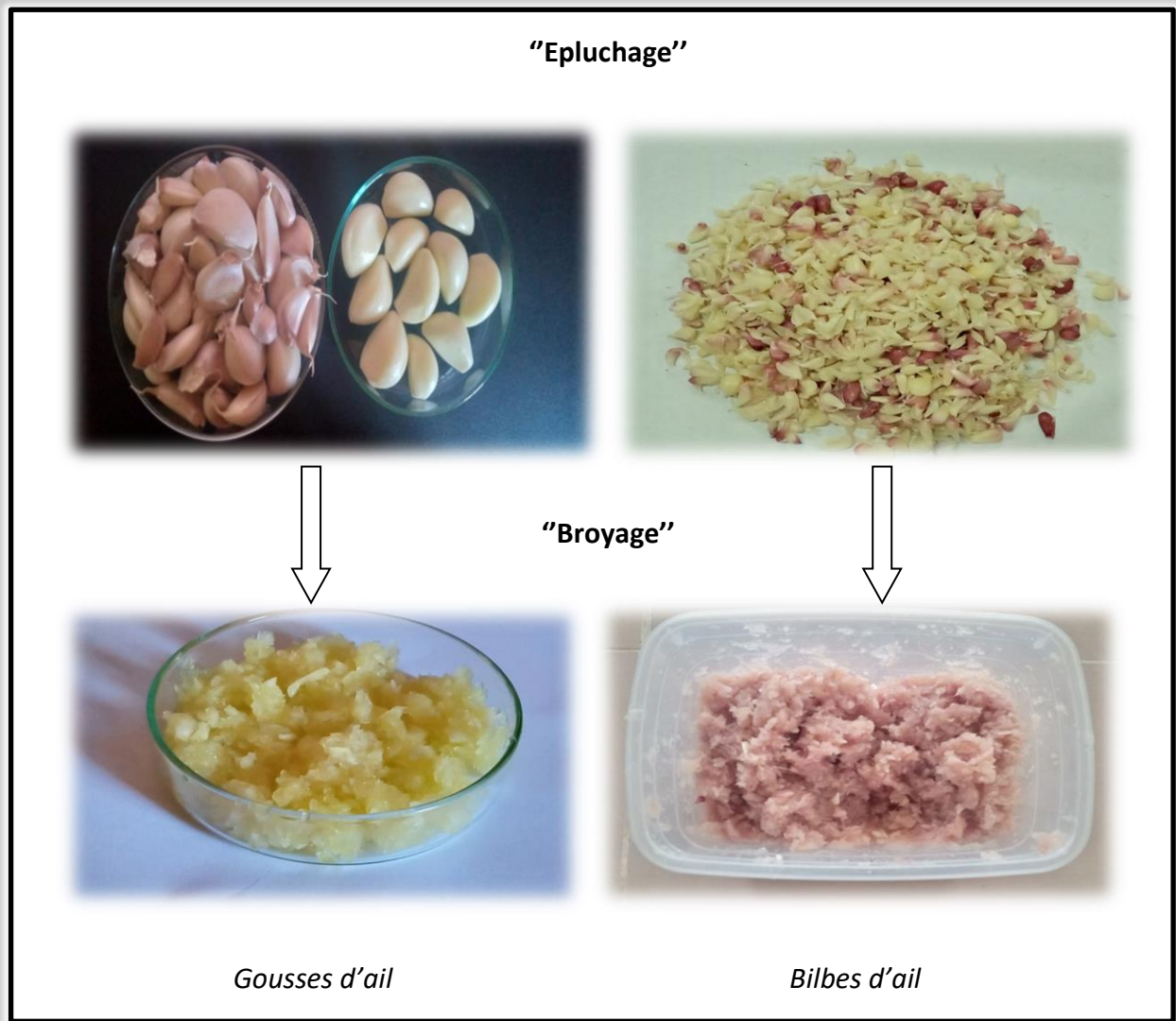
L'*Allium sativum* (ail) utilisé dans cette étude est présenté sous deux formes : les gousses ont été achetées fraîches au marché REHMA, Nouvelle Ville, Tizi-Ouzou ; et les bulbes ont été donnés par un agriculteur à DRAA BEN KHEDDA.



**Photo 1: Gousses et bulbes d'ail (photo prise au labo).**

#### - Nettoyage et broyage :

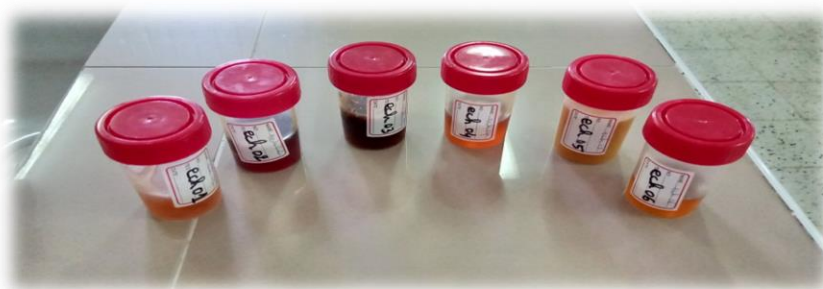
Les gousses et les bulbes d'ails ont été nettoyés et débarrassés de toutes leur enveloppes, découpés en morceaux, puis broyés à l'aide d'un mortier et utilisés directement pour éviter l'oxydation des bulbes et la dégradation des principes actifs.



**Figure 16: Epluchage et broyage d'ail (photos prises au labo)**

### 3 Le miel :

Six (06) échantillons de miel ont été prélevés en 2021 et 2022, chez des apiculteurs dans différentes régions à la wilaya de Tizi-Ouzou (**Annexe 2**) et étaient conservés à température ambiante et à l'obscurité jusqu'à l'utilisation.



**Figure 17: Les échantillons de miel (photo prise au labo)**

### 4 Préparation des extraits éthanoliques :

#### 4.1 Extraction assistée par ultrasons :

➤ Principe :

Les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans une matière ou elles impliquent des cycles d'expansion et de compression induisant à la formation des bulles de cavitation qui s'effondrent dans cette dernière et produit un jet de liquide qui à un fort impact à proximité d'une surface solide (106). Dans le cas d'une matrice végétale, les ultrasons brisent ainsi la structure de la paroi cellulaire ce qui induit à la lyse des cellules et accélèrent la diffusion des molécules à travers les membranes ( **Fylaktakidou *et al.* 2004**)

➤ Processus d'extraction :

L'extraction assistée par ultrasons est réalisée dans un bain ultrasonique dans les conditions optimales suivantes :

- ✓ Temps d'extraction (min) : 30min
- ✓ Température d'extraction (°C) : température ambiante
- ✓ Concentration de l'éthanol : 96%
- Etapes :

Dissoudre dans un bocal en verre une masse de 15g de poudre obtenue après séchage et broyage, pour l'ail 15g était lavé et écrasé dans 100 ml d'éthanol (96%).



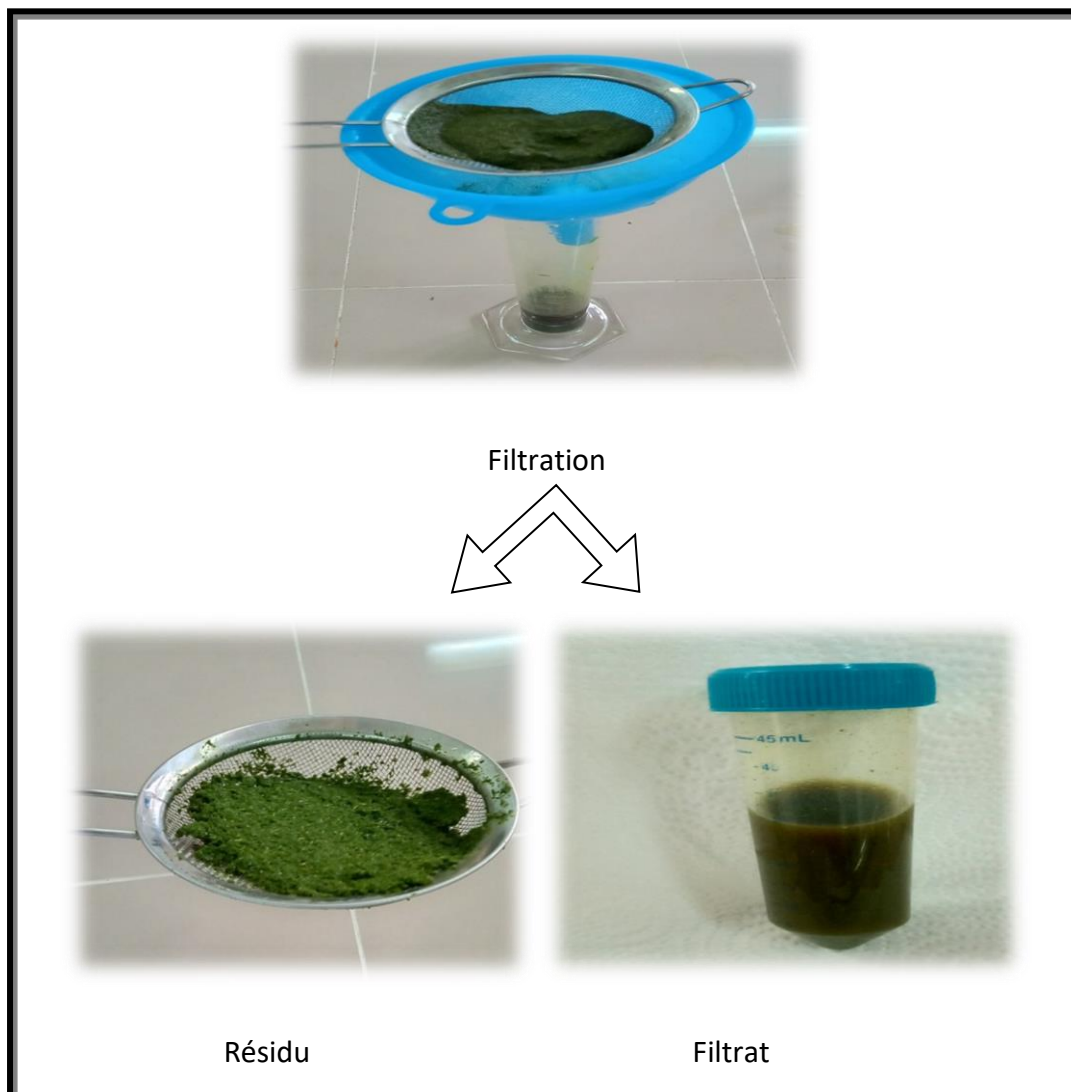
**Photo 2: pesage de la poudre et le mélange poudre/Solvant (photos prises au labo).**

Placer les bocaux contenant la solution obtenue au centre du bain à ultrasons à une profondeur de 15 cm afin d'assurer une sonication égale de tous les échantillons pendant 30 min à une température ambiante.



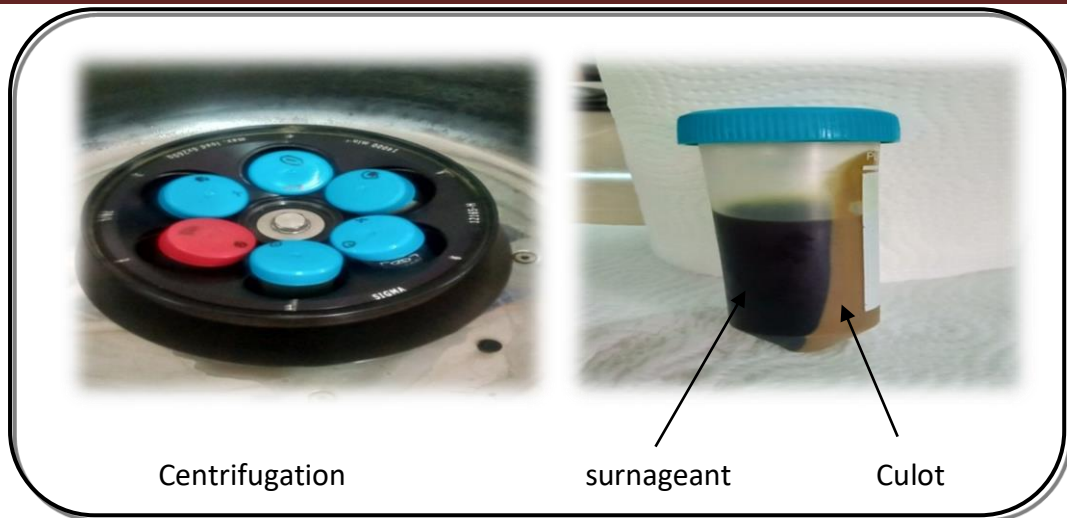
**Photo 3: Etape de sonication (photo prise au labo).**

Les extraits obtenues ont été filtrés à l'aide d'un entonnoir en plastique :



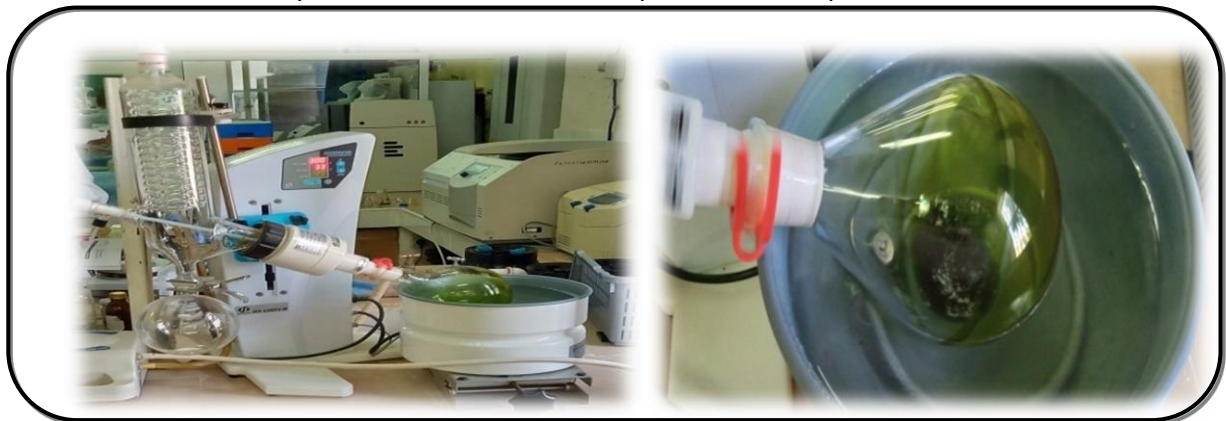
**Photo 4: Etape de filtration.**

Les filtrats obtenues ont été centrifugées à 6000 tours/minute à 4°C pour éliminer les culots contenant les matières insolubles dans l'éthanol et récupérer les surnageants.



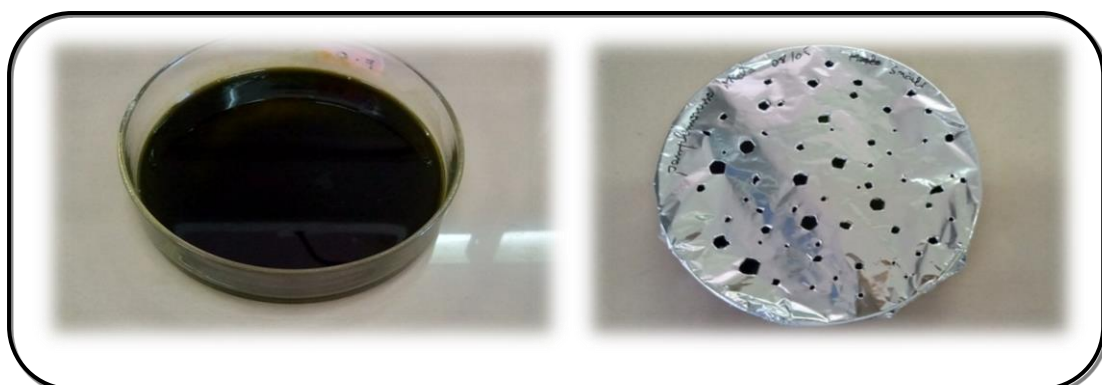
**Photo 5: Etape de centrifugation (photos prise au labo).**

Les surnageants ont été concentrés par évaporation du solvant (éthanol) dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température 60°C pendant 25 à 30 min.



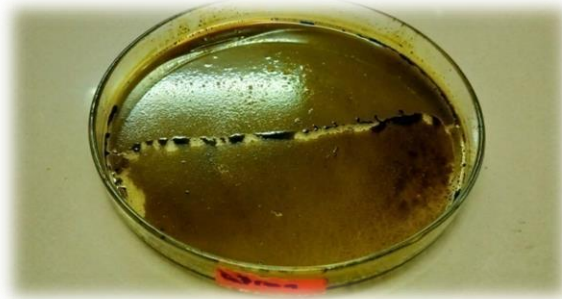
**Photo 6: Etape de l'évaporation.(Photos prise au labo).**

Disperser l'extrait évaporé dans des cristallisoirs et couvrir avec du papier aluminium troué et laisser à température ambiante pendant 3 à 4 jours afin d'assurer l'évaporation totale de l'éthanol.



**Photo 7: Etape de Concentration de l'extrait**

Récupérer l'extrait éthanolique en ajoutant 1 ml de DMSO afin de faciliter le grattement de la surface des cristallisoirs.



**Photo 8: Extrait brut éthanolique**

La dernière étape consiste à conserver les extraits dans des eppendorf stériles, ces derniers ont été placés dans des portoirs en polystyrène à -40°C jusqu'à utilisation.



**Photo 9: Conservation des extraits**

### I. Rendement d'extraction :

Les rendements d'extraction ont été déterminés par rapport à la quantité de matière végétale utilisé selon la formule (108) :

Ou :

$$R(\%) = \frac{M_s}{M_v} * 100$$

**R (%)** : Rendement exprimé en %.

**Ms** : Masse de l'extrait sec résultant en gramme.

**Mv** : Masse du matériel végétal à traiter en gramme.

### 5 Matériel bactérien

Les souches bactériennes testées dans cette recherche pour l'activité antibactérienne sont des souches de référence l'American type culture collection (ATCC), une Grampositive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une souche Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922).

#### 5.1 Test de confirmation de la pureté des souches bactériennes

##### 5.1.1 Préparation de pré-culture (réactivation des souches)

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18h à 24 heures en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par l'ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide BHIB. Après incubation de 18h à 24h à 37C, on prélève la souche du milieu liquide pour l'ensemencer en stries sur milieu sélectif gélosé.

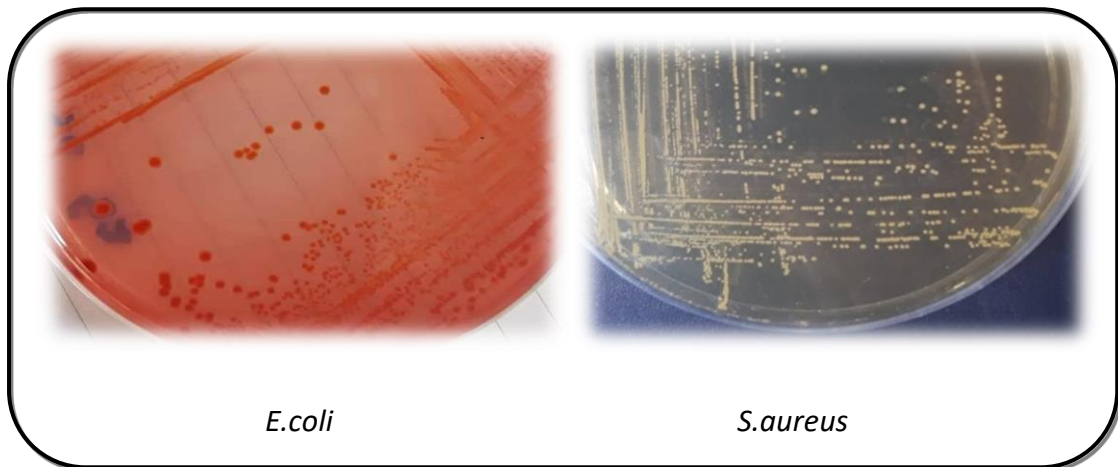


**Figure 18: Revivification des souches bactériennes. (Photos prises au labo).**

##### 5.1.2 Identification morphologique

- Aspect macroscopique

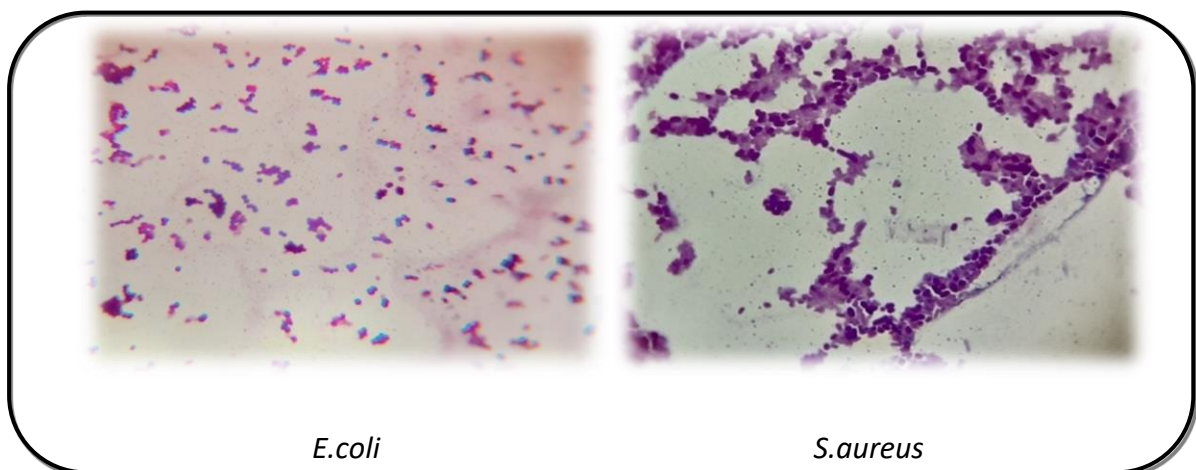
C'est un examen à l'œil nu pour mettre en évidence la description des colonies sur milieu solide : la forme, le contour, la taille et la couleur.



**Figure 19: Aspect des colonies d'*E.coli* et *S.aureus* sur Gélose. (Photos prises au labo).**

- Aspect microscopique (coloration de Gram)

L'aspect microscopique des bactéries a été révélé par le biais de la technique de coloration de Gram (**Annexe N°3**), cette dernière permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactériens en Gram<sup>+</sup> (colorés en violet) et Gram<sup>-</sup> (colorés en rose).



**Figure 20: Aspect microscopique de bactéries après la coloration de Gram.**

### 5.1.3 Identification biochimique :

01 Escherichia Coli :

- Galerie API 20<sup>E</sup>
  - principe :

La galerie API 20<sup>E</sup> est une version miniaturisé et standardisé des techniques biochimiques classiques destinée à l'identification des Entérobactéries, comprenant 20 cupules en plastiques avec différents réactifs.

- Technique : Toutes les étapes sont décrites en **Annexe 3**



**Figure 21: Ensemencement de la galerie biochimique (photo prise au labo)**

- Lecture

Après incubation à 37°C, les résultats de toutes les réactions spontanées sont notés ainsi que les tests nécessitant l'addition des réactifs (TDA, VP et Kovacs) en se servant des tableaux de lecture et d'interprétation (**Annexe 5**). L'identification est ensuite obtenue à l'aide d'un logiciel à partir du profil numérique correspondant à la souche du code.



OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

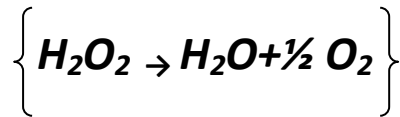
\* (+) Résultat positif ; (-) Résultat négatif

**Figure 22: Résultats de la galerie API 20<sup>e</sup>**

## 02 Staphylococcus aureus

### ➤ Test catalase (**Annexe 3**)

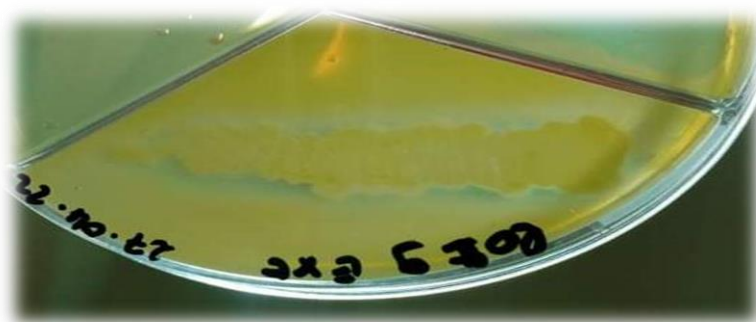
La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée en eau et en oxygène qui se dégage (109).



**Figure 23: Résultats du test Catalase (Photo prise au labo).**

### ➤ Test Dnase (désoxyribonucléase)

Ce test (**Annexe 3**) est utilisé pour identifier les staphylocoques pathogènes qui produisent de grandes quantités de DNase extracellulaire qui est une enzyme qui permet la dégradation de l'ADN (110).



**Figure 24: Résultats du test Dnase (Photo prise au Labo).**

## 6 Evaluation de l'activité antibactérienne :

### 6.1 Préparation de la gamme de dilutions des extraits :

Trois doses dont la concentration varie en fonction de la dilution de l'extrait pur dans l'eau distillée stérile ont été préparées:

- **Dose 1:** 100% de l'extrait pur.
- **Dose2 (1/2):** Correspond à 50% de l'extrait pur et 50% de l'eau distillée stérile
- **Dose3 ( $10^{-1}$ ):** correspond à 10 $\mu$ l de l'extrait pur et 90 $\mu$ l d'eau distillée stérile.
- **Dose4 ( $10^{-2}$ ):** correspond à 10 $\mu$ l de la dose  $10^{-1}$  et 90 $\mu$ l d'eau distillée stérile.

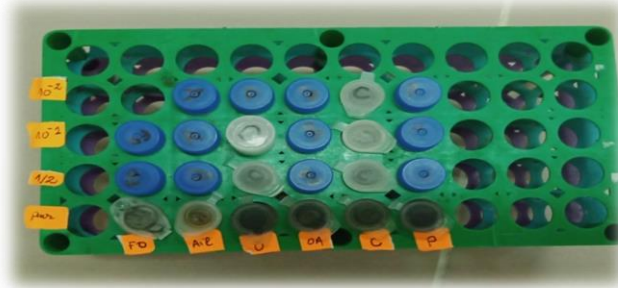


Figure 25: Préparation des doses (photos prises au labo)

### 6.2 Préparation des disques :

Des disques de 6mm de diamètre sont découpés à partir du papier Wattman et sont stérilisés dans des tubes à vice dans l'autoclave.



Figure 26: Disques en papier wattman stériles

### 6.3 Préparation des milieux de cultures en boîtes Pétri

Cette étape consiste à liquéfier le milieu de culture Mueller-Hinton dans un bain marie, puis collé aseptiquement dans des boites pétri et laissé refroidir sur la paillasse. Etapes détaillé voir **Annexe N°4**.

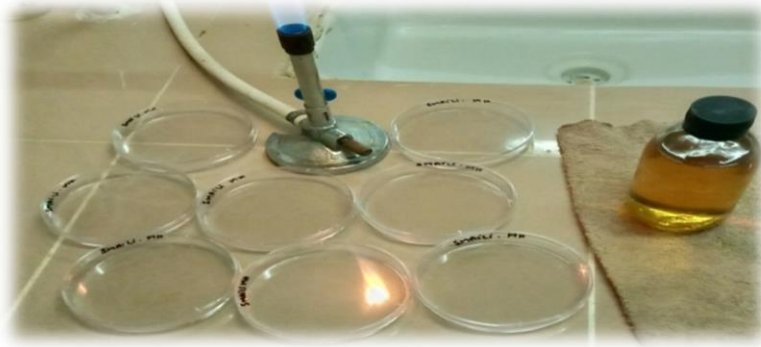


Figure 27: Préparation des milieux de culture (photo prise au labo)

### 6.4 Ré-isolement des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur milieu sélectif gélosé puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h :

- *Escherichia Coli* ATCC25922 est ensemencé sur milieu Hektoen.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est ensemencé sur milieu Chapman.

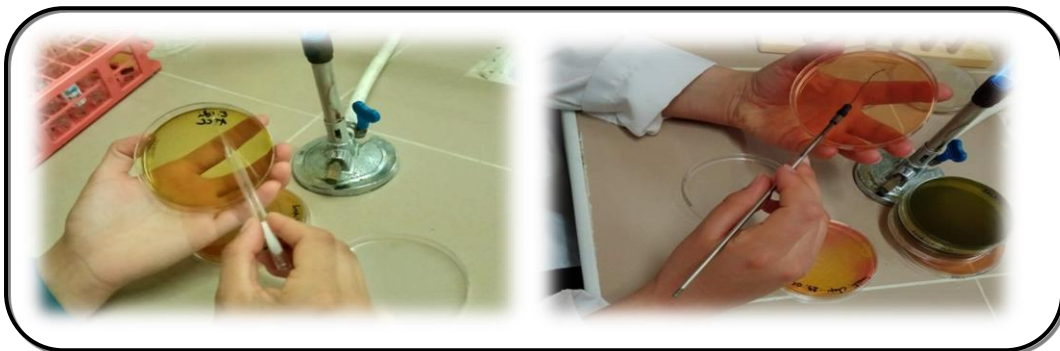


Figure 28: Ré-isolement des souches bactériennes (photos prises au labo)

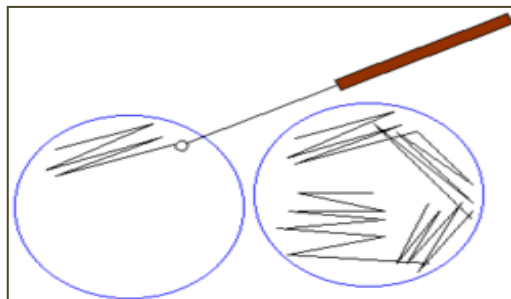
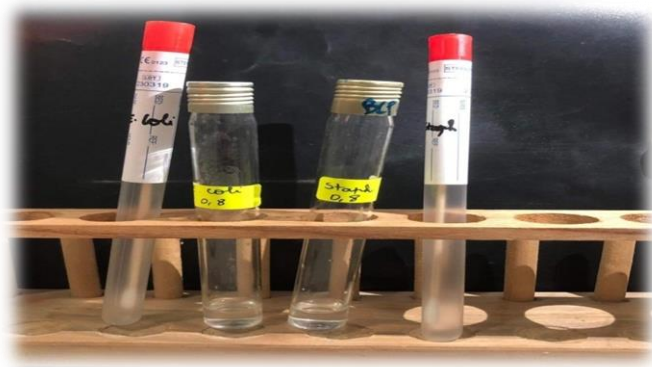


Figure 29: Méthode des stries (Google)

### 6.5 Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture jeune (18à24h), prélever deux à trois colonies bien isolées et identiques de chaque bactérie à l'aide d'une anse de platine.

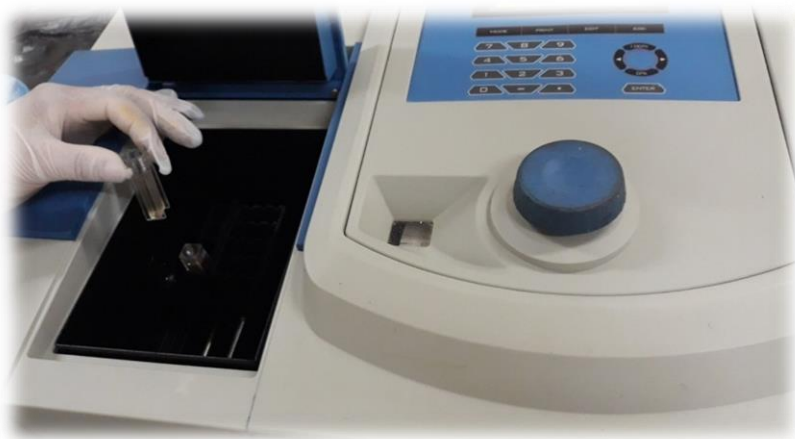
- Décharger l'anse dans 3ml d'eau physiologique stérile.
- Homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.



**Figure 30: Suspension bactériennes des deux souches (photo prise au labo)**

### 6.5.1 Standardisation :

Ajuster la charge bactérienne de l'inoculum dans le spectrophotomètre à une turbidité standard de 0.5McFarland, ce qui correspond à une densité optique de l'intervalle compris entre 0.08 à 0.1 à une longueur d'onde de 625nm.



**Figure 31: Ajustement de la charge bactérienne sur spectrophotomètre.**

### 6.6 Ensemencement :

L'ensemencement doit se faire juste après quelques minutes après la préparation de l'inoculum, et se fait selon les étapes suivantes :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- L'essorer en le pressant fermement et en tournant sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose MH de haut en bas ;
- Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.



Figure 32: Technique de culture en nappe par écouvillonnage (photos prises au labo)

### 6.7 L'Antibiogramme :

Il a été réalisé afin de tester la sensibilité des souches étudiées vis-à-vis des antibiotiques standards.

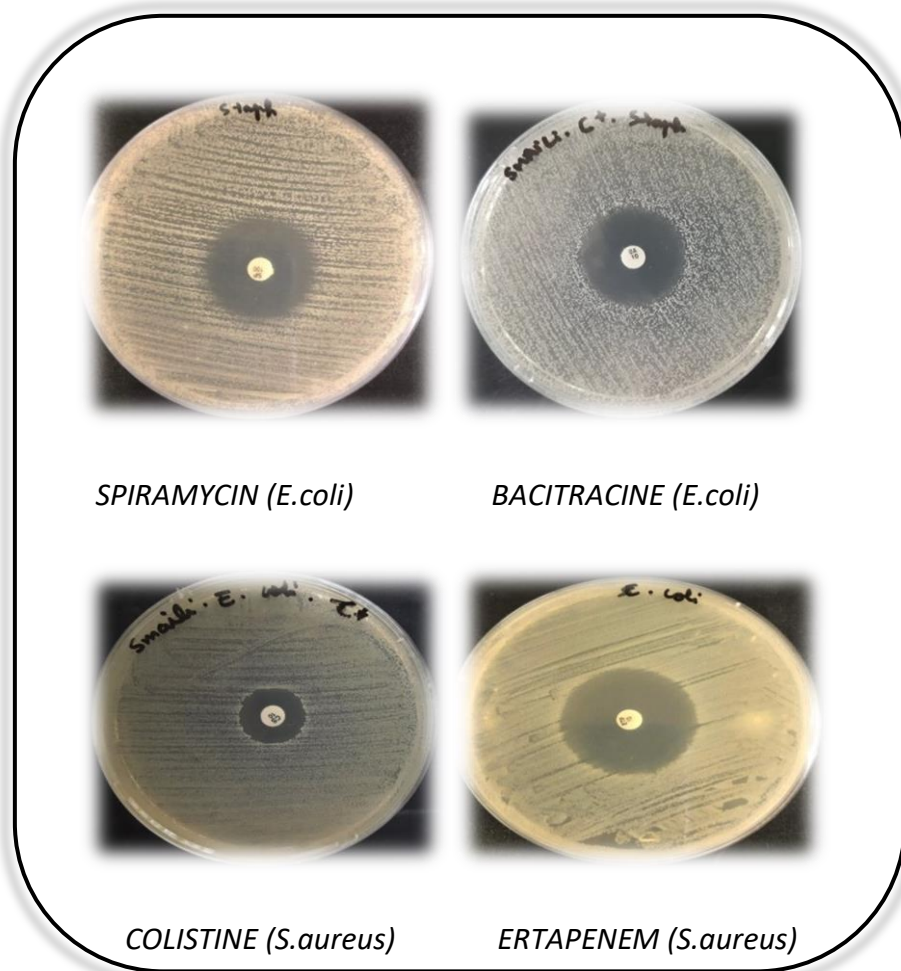


Figure 33: Contrôle du test de sensibilité des bactéries vis-à-vis des disques d'antibiotiques sélectionnés.

### 6.8 L'Aromatogramme :

La sensibilité des germes pathogènes vis-à-vis des extraits ethanologiques préparés et du miel a été déterminée par la technique de l'aromatogramme (méthode de diffusion).

#### a- La diffusion sur milieu gélosé (disques)

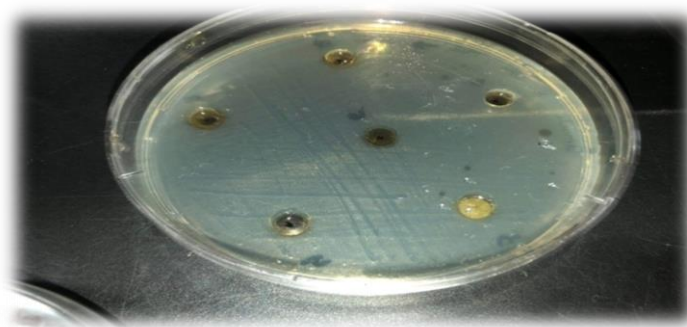
- Déposer un disque à la surface des boîtesensemencées et les coder selon les différentes dilutions.
- Les imbiber à l'aide d'une micropipette avec une quantité de 20 $\mu$ l de l'extrait à tester.
- Laisser les boîtes au réfrigérateur pendant une période de pré-diffusion de deux heures avant incubation.



**Figure 34: Placement des disques et des extraies des plantes (photo prise au labo)**

#### b- La diffusion en milieu gélosé (puits)

- Creuser stérilement des puits de 6mm de diamètre en masse gélosé à l'aide d'une pipette pasteur stérile et les coder selon les échantillons du miel.
- Avec des embouts stériles, remplir les fonds des puits avec une quantité du miel.
- Laisser diffuser au réfrigérateur pendant deux heures.



**Figure 35: Aromatogramme par technique des puits (photo prise au labo)**

### 6.9 Incubation :

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.



**Figure 36: Incubation des boîtes (photo prise au labo)**

### 6.10 Expression des résultats :

La lecture se fait après l'achèvement de la période d'incubation, l'activité antibactérienne se manifeste par la formation d'un halo d'inhibition autour du disque / puits ou la culture est absente.

Les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres et comparé avec des diamètres de référence relatifs aux antibiotiques utilisées et les résultats sont exprimés comme suit (111) :

- Non sensible (-) : ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

## 7 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

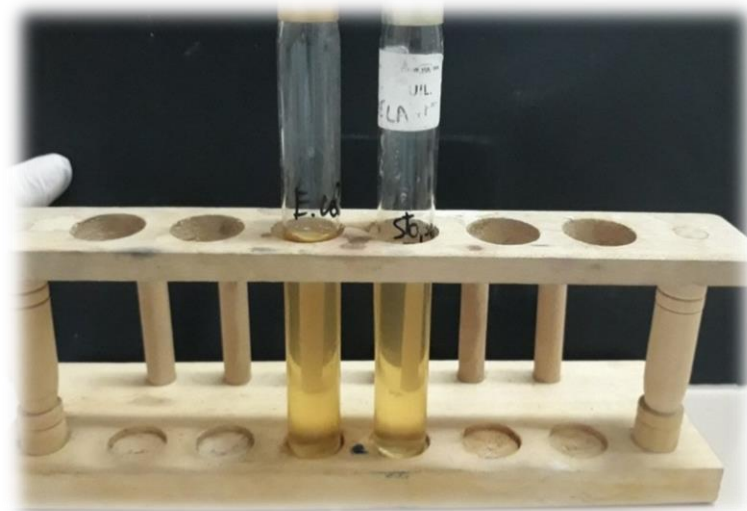
La CMI est définie comme étant la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après incubation de 18 à 24h, elle est déterminée par l'observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube.

La CMI concerne seulement les extraits végétaux qui se sont avérés les plus actifs sur les souches bactériennes testées.

La méthode de micro-dilution sur plaque ELISA stérile de 96 puits en polystyrène pur de haute qualité hautement transparente est utilisée dans notre étude pour l'évaluation de la CMI.

### 7.1 Préparation de la suspension bactérienne

- Prélever à partir d'une culture jeune (18 à 24h) une colonie et l'ensemencer dans 10ml de BHIB puis l'incuber à 37°C pendant 24h.
- Après incubation, la suspension a été centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm ;
- Récupérer le culot bactérien et jeter le surnagent contenant les déchets.
- Suspendre le culot bactérien dans bouillon BHIB et l'ajuster à une unité de densité optique à 620nm pour obtenir une concentration de  $10^8$  UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre.



**Figure 37: Inoculum bactérien utilisé pour la microplaque (photo prise au labo)**

### 7.2 Préparation de la microplaque

- Remplir les trois premiers puits de la première colonne (A) avec 50 $\mu$ l de bouillon BHIB (témoin négatif).
- Remplir les trois premiers puits de la deuxième colonne (B) avec 50 $\mu$ l de bouillon BHIB + 50 $\mu$ l de l'inoculum bactérien (témoin positif).
- Introduire à partir de la troisième colonne les dilutions successives : 50 $\mu$ l extrait pur (colonne C), 50 $\mu$ l dilution au demi  $\frac{1}{2}$  (colonne D), 50 $\mu$ l dilution décimale  $10^{-1}$  (colonne E), 50 $\mu$ l dilution décimale  $10^{-2}$  (colonne F) dont chaque rongé constitue un test de raison de trois test.
- Ensemencer les puits contenant les différentes dilutions avec 50 $\mu$ l de la suspension bactérienne.
- Recouvrir la microplaque et incuber à 37°C pendant 24h.
- Répéter toutes les étapes pour chaque extrait testé.

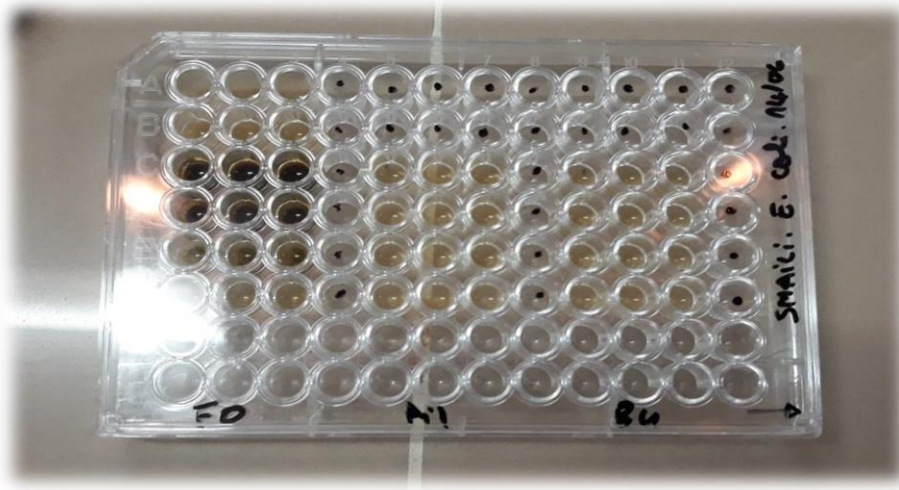


Figure 38: Méthode de micro-dilution en milieu liquide. CMI (photo prise au labo)

### 7.3 Lecture

Après incubation, 30 $\mu$ l de réasurine à 0.015% préparé dans l'eau distillé stérile est ajouté comme indicateur coloré dans tous les puits et la lecture se fait comme suit :

- ✓ Coloration bleu violette indique l'absence de croissance des bactéries.
- ✓ Coloration rose est un signe de croissance.

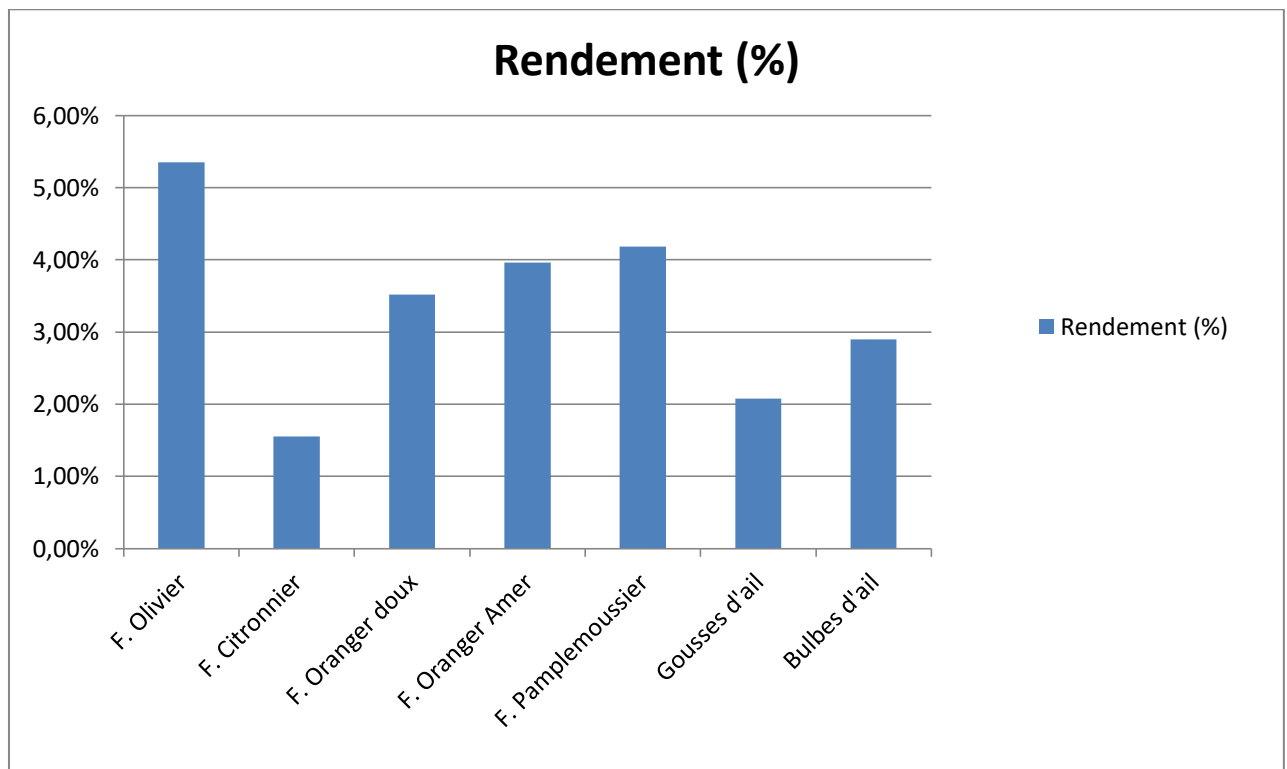


Figure 39: Ajout de l'indicateur coloré pour la lecture (photo prise au labo)

## Résultats et discussion

### 1.1 Rendement d'extraction :

La méthode d'extraction à permet l'obtention des taux d'extraction suivants (figure ci-dessous) :



**Figure 1.1: taux de rendement des différents extraits de notre étude.**

#### ❖ Interprétation :

Les résultats montrent que le meilleur rendement, est l'extrait des feuilles d'olivier (5.35%), puis les feuilles de pamplemoussier (4.18%) suivi par les feuilles d'oranger amer (3.96%) et d'oranger doux (3.52%) puis les bulbes d'ail (2.90%), les gousses d'ail (2.08%) et enfin l'extrait des feuilles de citronnier avec le pire pourcentage de rendement. (1.55%).

2 Résultats de l'aromatogramme :

2.1 Résultat Feuilles d'olives :

Tableau 2.1: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles d'olives sur les bactéries étudiées.

Concentrations Souches	1 <sup>er</sup> essaie				2 <sup>ème</sup> essaie				3 <sup>ème</sup> essaie			
	<sup>a</sup> pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>S. aureus</i>	15	12	6	6	15	11	6	6	13	12	6	6

a = Extrait pur : 0.83g/ml ; b= Concentration (1/2) : 0.402g/ml ; c= Concentration (10<sup>-1</sup>) : 0.08g/ml ; d= Concentration (10<sup>-2</sup>) : 0.008g/ml.

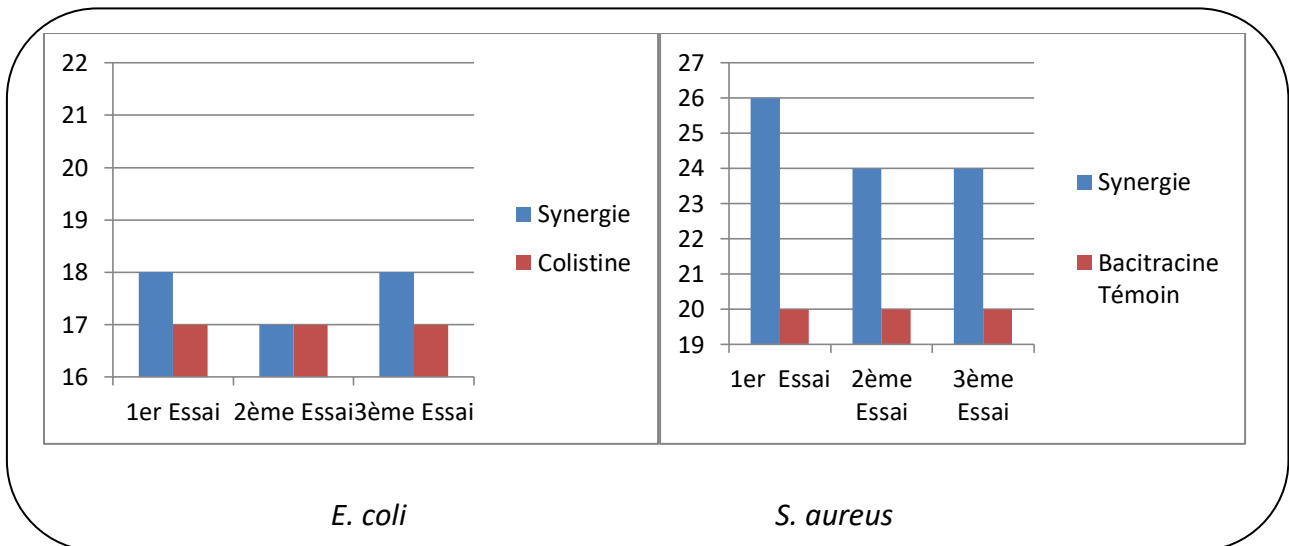


Figure 2.1 : Différence entre le diamètre de la synergie et l'antibiotiques témoin.

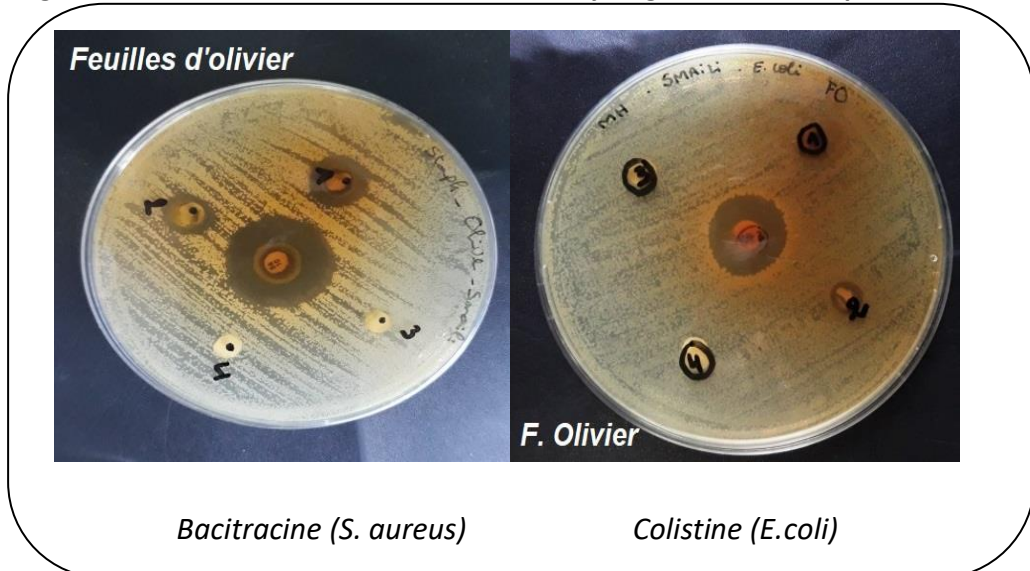


Photo 1.1 : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'olivier et sa synergie sur les bactéries étudiées.

❖ Interprétation :

Les résultats obtenus démontrent que les zones d'inhibition les plus importantes sont observées pour *S. aureus* avec des diamètres de 15, 12mm pour les concentrations "pur", "au demi" respectivement, toutefois aucun diamètre d'inhibition n'est obtenu pour *E. coli*.

Par conséquent, *S. aureus* présente une sensibilité vis-à-vis de l'extrait de feuilles d'olives contrairement à *E. coli* qui est noté résistante vis-à-vis de l'extrait pur de feuilles d'olives et la série des trois dilutions.

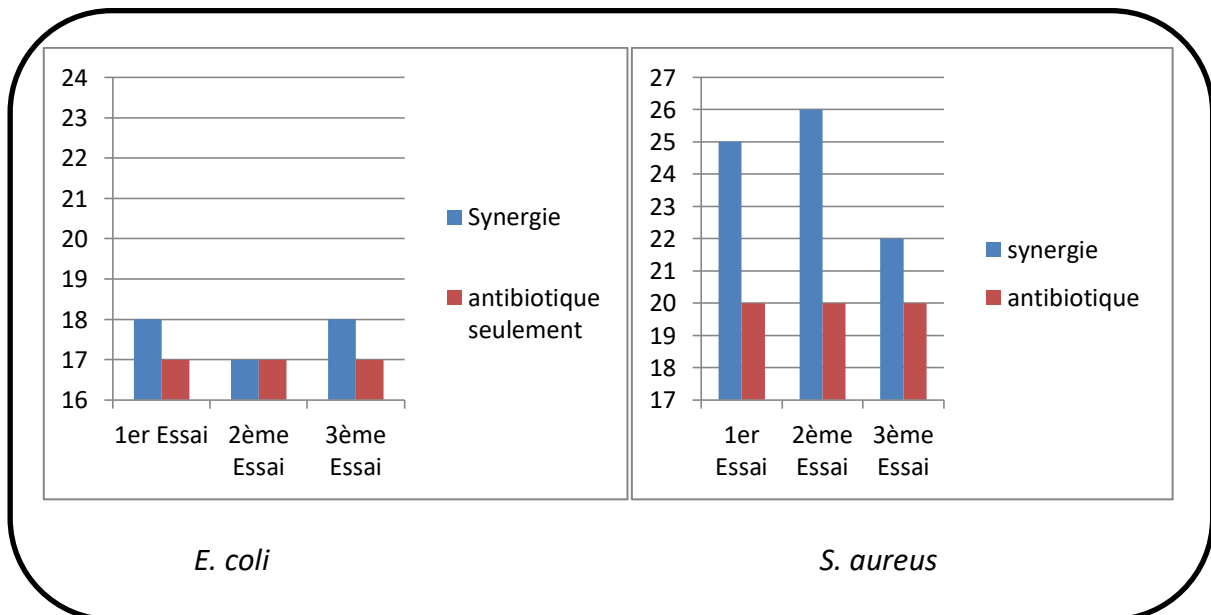
L'association extrait éthanolique pur de feuilles d'olives et la *BACITRACINE* s'est révélé synergique vis-à-vis de *S. aureus* avec un diamètre de 26 mm. Par contre pour *E. coli*, l'interaction n'a aucun effet (indifférence) avec l'antibiotique.

## 2.2 Résultats Feuilles de citronnier :

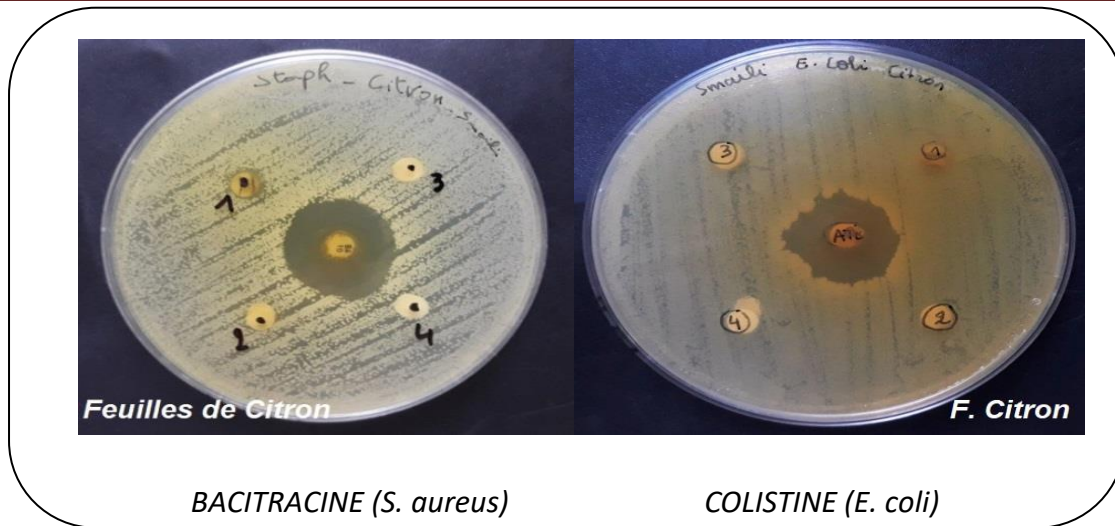
**Tableau 2.2: Diamètre d'inhibition de l'extrait des feuilles de Citronnier.**

Concentrations Souches	1 <sup>er</sup> essai				2 <sup>ème</sup> essai				3 <sup>ème</sup> essai			
	<sup>a</sup> Pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>S. aureus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a=Extrait Pur : 0.233g/ml ; b= Concentration (1/2): 0.117g/ml ; c= Concentration (10<sup>-1</sup>) : 0.023g/ml ; d=Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.002g/ml.



**Figure 2.2: Résultats de la synergie entre l'extrait pur des feuilles du citronnier avec la Colistine et avec la Bacitracine sur les bactéries étudiées.**



**Photo 2.2 : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. de citronnier et sa synergie sur les bactéries étudiées.**

❖ Interprétations :

Les résultats ont montrés que les deux souches bactériennes testées sont extrêmement résistantes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de citronnier avec un diamètre d'inhibition faible de 6mm.

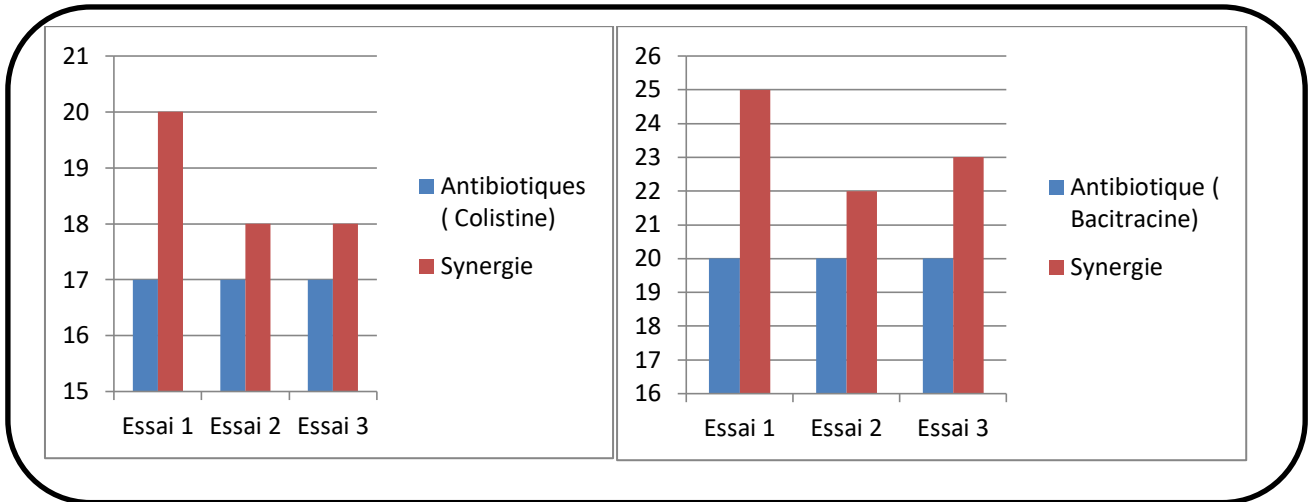
De son côté, la combinaison entre l'extrait pur et l'antibiotique n'a donné aucun effet synergique avec la COLISTINE. Cependant le pouvoir inhibiteur est plus au moins important sur l'interaction avec la BACITRACINE que l'extrait seul avec un diamètre d'inhibition de 26mm.

**2.3 Résultats Feuilles d'oranger doux :**

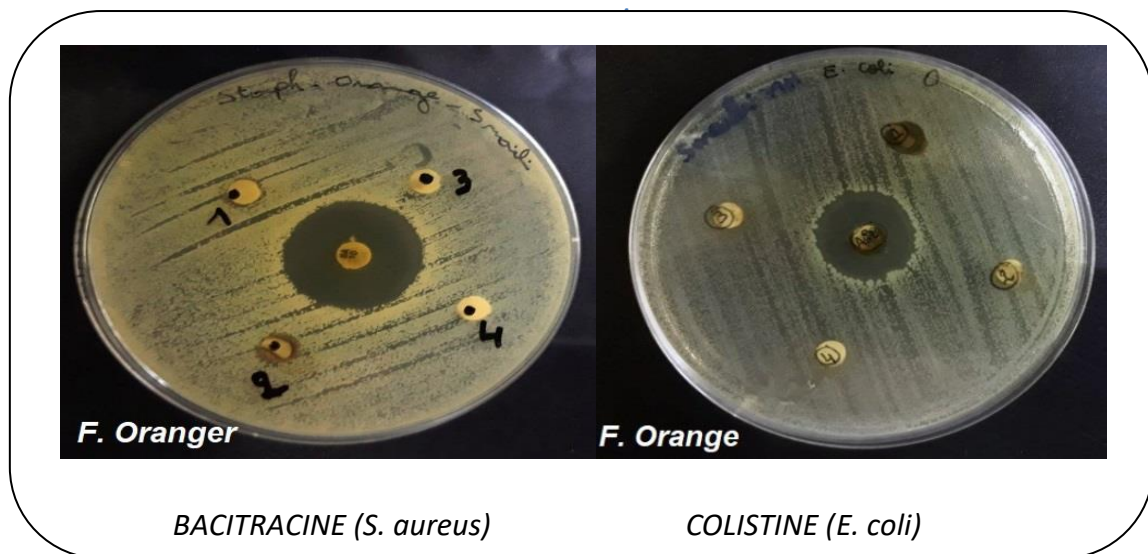
**Tableau 2.3: Diamètre d'inhibition de l'extrait de feuilles de l'oranger doux.**

concentration \ Souches	1 <sup>er</sup> essai				2 <sup>ème</sup> essai				3 <sup>ème</sup> essai			
	Pur <sub>a</sub>	1/2 <sub>b</sub>	10 <sup>-1</sup> <sub>c</sub>	10 <sup>-2</sup> <sub>d</sub>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>S. aureus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a= Extrait Pur : 0.529g/ml ; b= Concentration au demi (1/2): 0.264g/ml ; c= Concentration (10<sup>-1</sup>): 0.052g/ml ; d= Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.005g/ml



**Figure 2.3: Résultat de la synergie entre la colistine et la *Bacitracine* avec l'extrait des f. d'oranger sur *E. coli* et *S. aureus*.**



**Photo 2.3: Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'oranger et sa synergie sur les bactéries étudiées.**

❖ **Interprétations :**

Les deux souches bactériennes testées n'ont montré aucun signe de sensibilité vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de citronnier avec un diamètre d'inhibition faible de 6mm.

En comparant l'activité antibactérienne des antibiotiques seule et l'effet synergique en l'associant avec l'extrait pur des feuilles d'oranger, on constate que la combinaison manifeste une bonne activité synergique sur *S. aureus* avec un diamètre de 25mm. Toutefois l'effet sur *E. coli* dépasse légèrement la valeur de la *COLISTINE* (20mm).

2.4 Résultats Feuilles d'oranger amer :

Tableau 2.4 : Diamètre d'inhibition de l'extrait de F. d'oranger amer.

Concentrations	1 <sup>er</sup> essaie				2 <sup>ème</sup> essaie				3 <sup>ème</sup> essaie			
	<sup>a</sup> Pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>S. aureus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a= Extrait Pur : 0.595g/ml; b= Concentration au demi (1/2): 0.297g/ml; c= Concentration (10<sup>-1</sup>): 0.059g/ml; d= Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.005g/ml

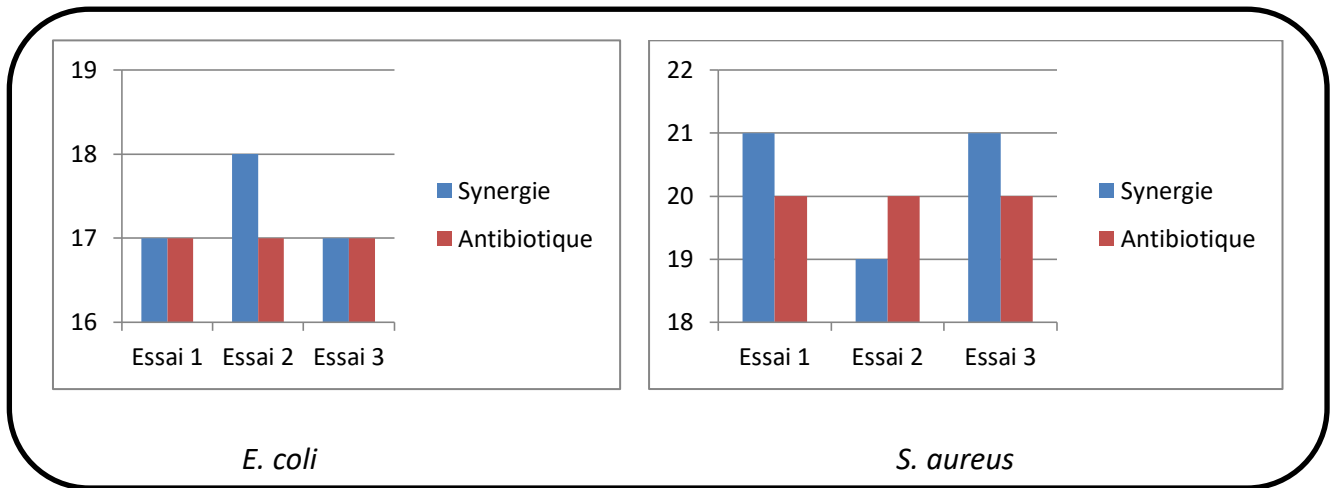


Figure 2.4: Résultat du test de la synergie entre la Colistine (*E. coli*), la Bacitracine (*S. aureus*) et l'extrait pur des f. d'oranger amer.

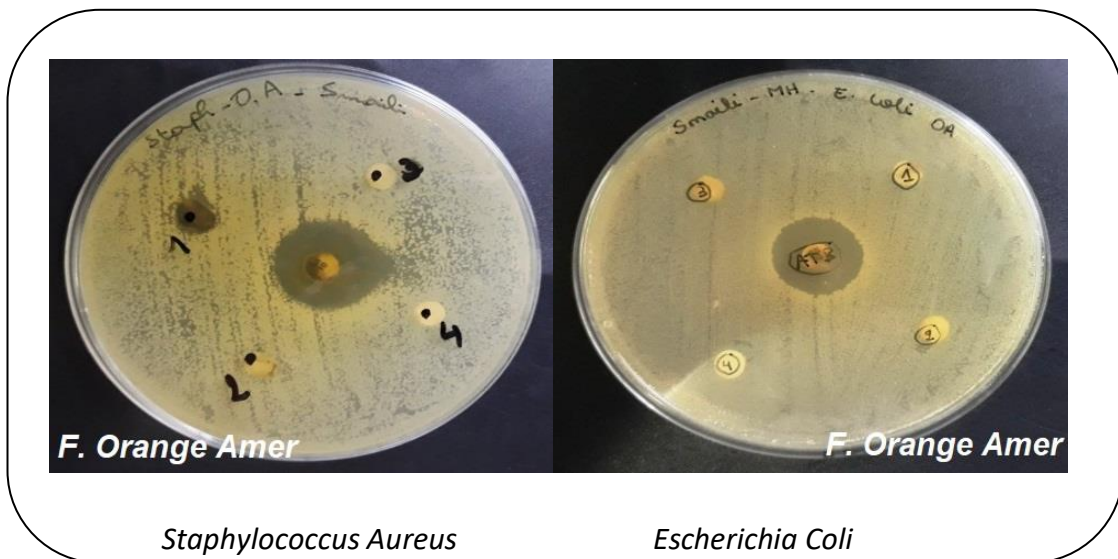


Photo 2.4: Résultats de la Sensibilité de l'extrait de F. d'oranger amer et sa synergie sur les bactéries étudiées.

❖ Interprétations :

Aucune zone d'inhibition n'a été observée (6mm), les souches bactériennes sont donc en aucun cas inhibé par l'extrait éthanolique des feuilles d'oranger amer.

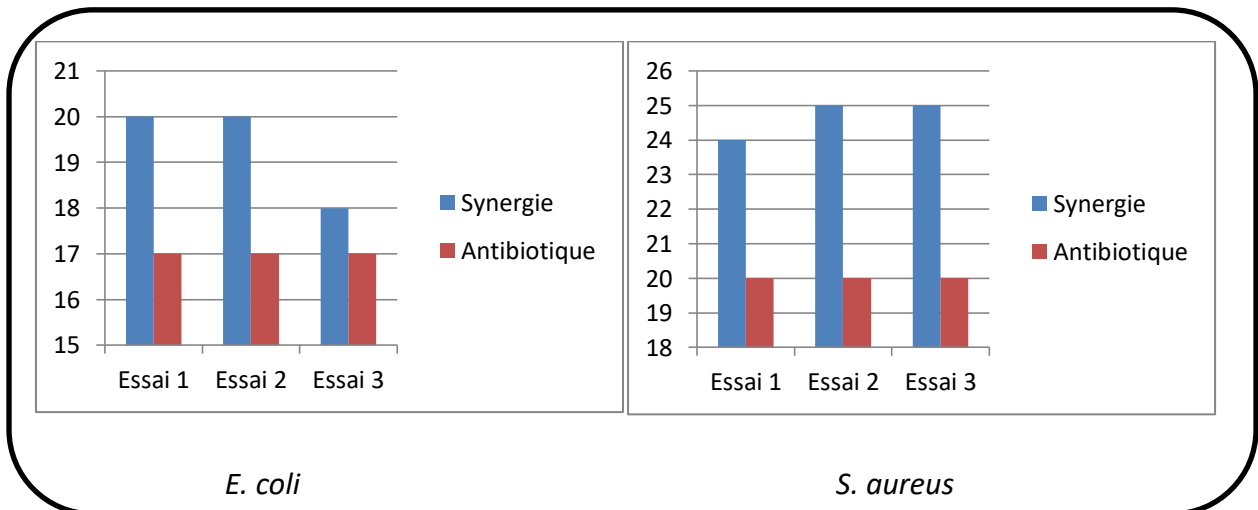
Après la comparaison des résultats de l'antibiogramme avec ceux de l'association extrait pur-antibiotique, il a été rapporté que les diamètres d'inhibition sont fortement proches donc l'activité synergique est absente pour l'extrait éthanolique des feuilles d'oranger amer.

## 2.5 Résultats de Feuilles de pamplemoussier :

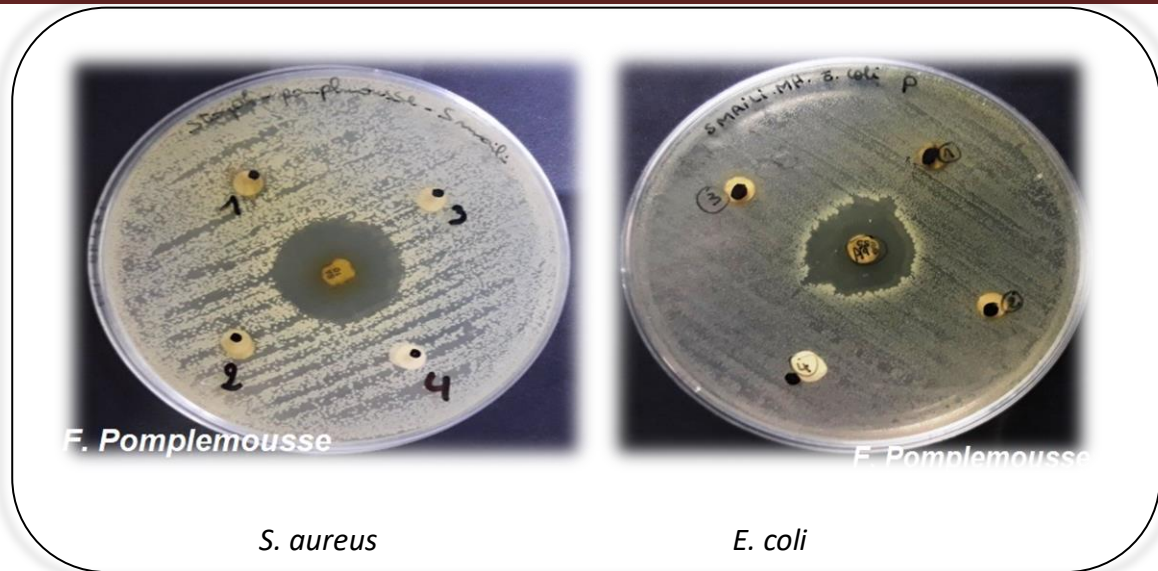
**Tableau 2.5: Diamètre d'inhibition de l'extrait de F. de pamplemoussier sur les bacteries étudiées.**

Concentration \ Souches	1 <sup>er</sup> essaie				2 <sup>ème</sup> essaie				3 <sup>ème</sup> essaie			
	<sup>a</sup> Pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i> (en mm)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>S. aureus</i> (en mm)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a= Extrait Pur : 0.627g/ml ; b= Concentration au demi (1/2): 0.313g/ml ; c= Concentration (10<sup>-1</sup>): 0.062g/ml ; d= Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.006g/ml.



**Figure 2.5: Résultat du test de la synergie entre les antibiotiques et l'extrait de feuilles de pamplemoussier.**



**Photo 2.5 : Résultats de la Sensibilité de l'extrait f. de pamplemoussier et sa synergie sur les bactéries étudiées.**

❖ Interprétations :

Les résultats obtenus pour l'extrait éthanoliques des feuilles de pamplemoussier n'ont démontré aucune zone d'inhibition (6mm).

En comparant l'activité antibactérienne des antibiotiques et l'effet synergique de ces derniers avec l'extrait éthanolique des feuilles de pamplemousse, on constate que la combinaison manifeste une bonne activité synergique sur *S. aureus* avec un diamètre de (25mm). Toutefois l'effet sur *E. coli* dépasse légèrement la valeur de la COLISTINE (20mm).

**2.6 Gousses d'ails :**

**Tableau 2.6 : Diamètre d'inhibition (en mm) de l'extrait de gousses d'ail.**

Concentration \ Souches	1 <sup>er</sup> essai				2 <sup>ème</sup> essai				3 <sup>ème</sup> essai			
	<sup>a</sup> Pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	23	22	6	6	20	15	6	6	20	13	6	6
<i>S. aureus</i>	30	20	12	6	32	22	10	6	30	22	12	6

<sup>a</sup>= Extrait Pur : 0.312g/ml ; <sup>b</sup>= Concentration au demi (1/2):0.156g/ml ; <sup>c</sup>= Concentration (10<sup>-1</sup>): 0.031g/ml ; <sup>d</sup>= Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.003g/ml.

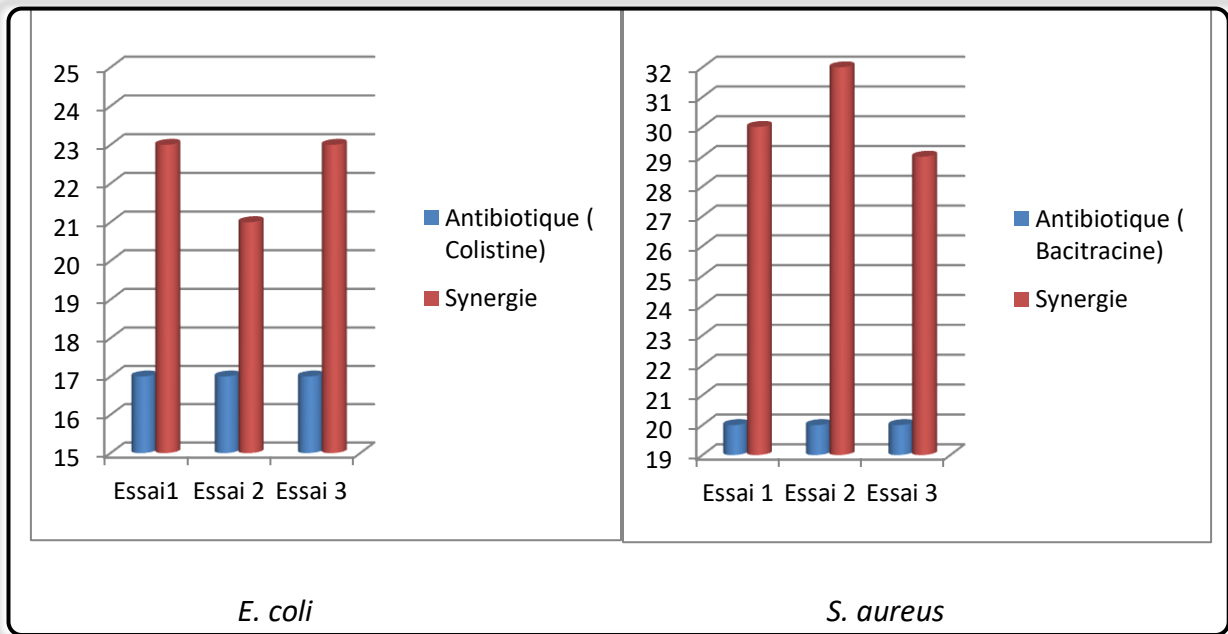


Figure 2.6 : Résultats du test de la synergie entre la *Colistine* et la *Bacitracine* avec l'extrait pur de gousses d'ail sur *L'E. coli* et *S. aureus*.

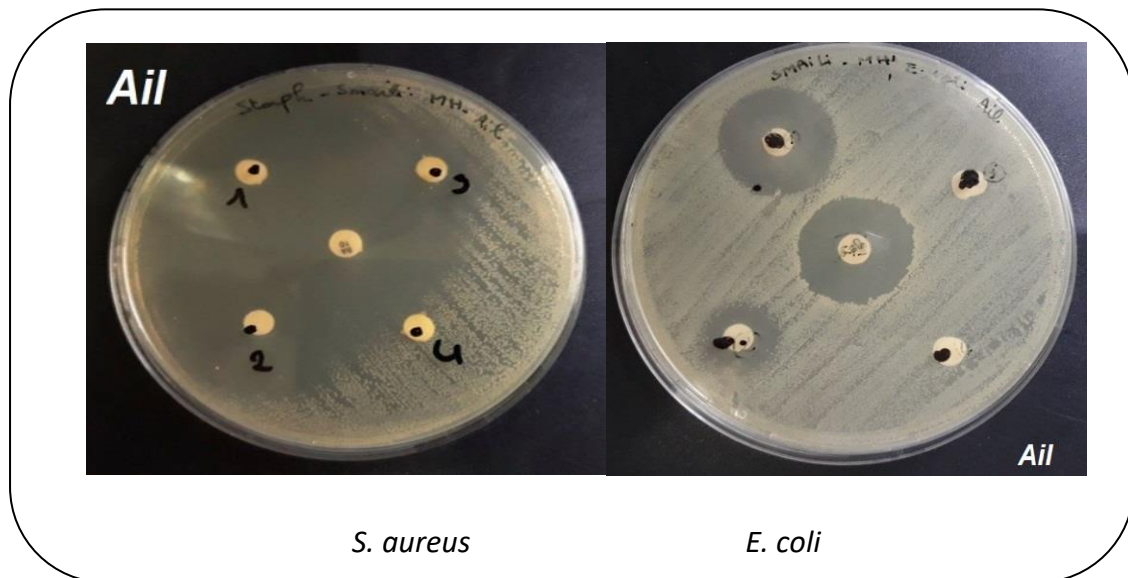


Photo 2.6 : Résultats de la Sensibilité de l'extrait de gousses d'ail et sa synergie sur les bactéries étudiées

❖ Interprétations :

Les résultats indiquent que les deux souches bactériennes étudiées montrent une extrême sensibilité vis-à-vis de l'extrait de gousses d'ail avec des diamètres qui varient selon les différentes concentrations. Le diamètre le plus important est noté pour l'extrait pur pour *S. aureus* (32mm) et (23mm) pour *E. coli*. Ces résultats, en comparaison avec les résultats de

l'antibiogramme, montrent que l'extrait présente des zones d'inhibition plus importantes que celle des antibiotiques utilisés comme témoins positifs avec des auréoles d'inhibition de 17mm pour la COLISTINE (*E. coli*) et 20 mm pour BACITRACINE (*S. aureus*).

Des zones d'inhibitions moins importantes pour la dilution (1/2) arrivant à 22mm pour *S. aureus* et 15 mm pour *E.Coli*. Toutefois pour les dilutions au "dixième", un diamètre de 12mm est observé pour la concentration  $10^{-1}$  pour *S. aureus* et l'absence d'activité antibactérienne pour *E. coli*.

La synergie a donné une zone d'inhibition beaucoup plus forte que l'antibiotique seul avec un diamètre (32mm) pour *S. aureus* et plus au moins importante avec *E. coli* (23mm).

### 2.7 Bulbes d'ails :

Tableau 2.7: Diamètre d'inhibition de l'extrait de Bulbe d'ail.

concentrations souches	1 <sup>er</sup> essai				2 <sup>ème</sup> essai				3 <sup>ème</sup> essai			
	<sup>a</sup> Pur	<sup>b</sup> 1/2	<sup>c</sup> 10 <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> 10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Pur	1/2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i>	25	22	6	6	24	19	6	6				
<i>S. aureus</i>	34	20	6	6	32	22	6	6				

a= Extrait Pur : 0.436g/ml ; b=Concentration au demi (1/2): 0.218g/ml ; c= Concentration (10<sup>-1</sup>): 0.043g/ml ; d= Concentration (10<sup>-2</sup>): 0.004g/ml.

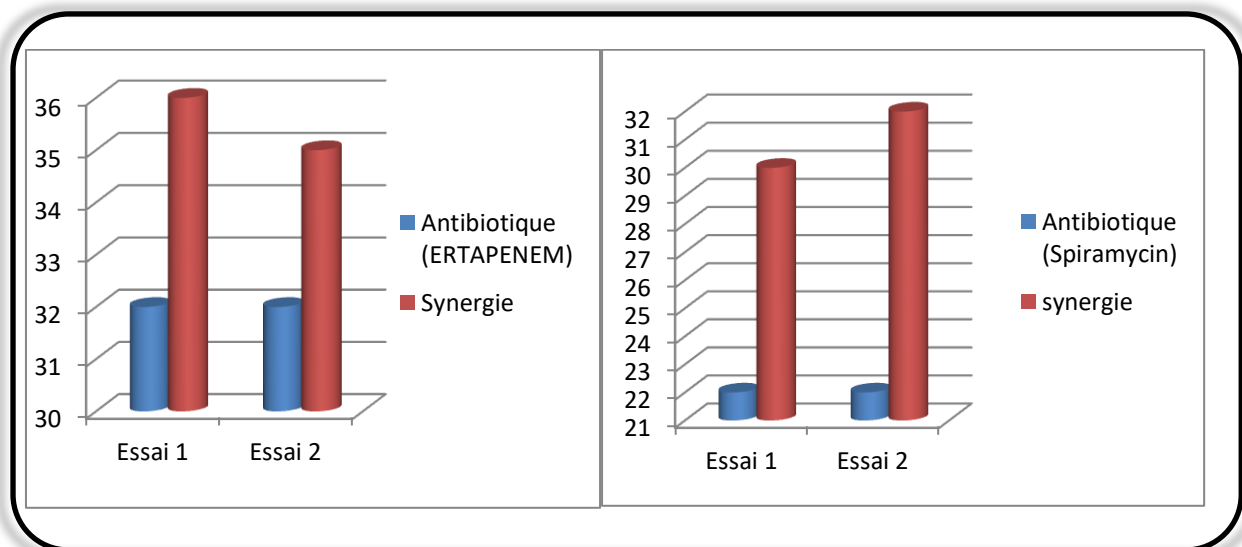
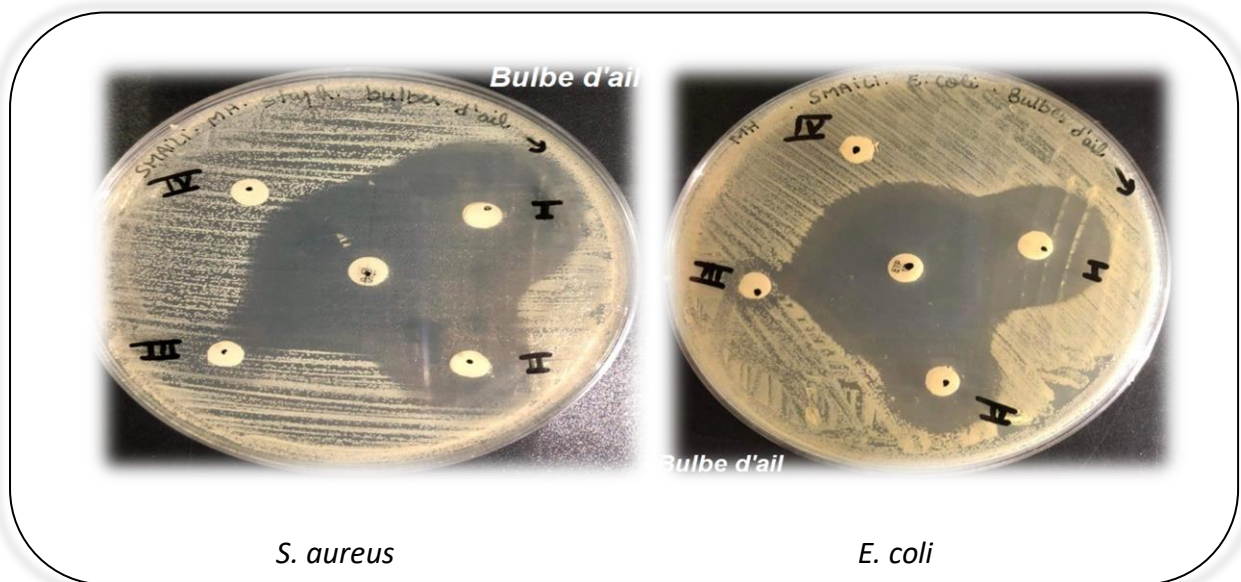


Figure 2.7: Résultats Synergie entre l'ERTAPENEM et la SPIRAMYCIN avec l'extrait de Bulbe d'ail.



**Photo 2.7: Résultats de la Sensibilité de l'extrait de Bulbe d'ail et sa synergie sur les bactéries étudiées.**

❖ Interprétations :

Les résultats montrent clairement que la bactérie *S. aureus* s'est avérée extrêmement sensible vis-à-vis l'extrait éthanolique pur des bulbes d'ails qui a donné une auréole d'inhibition de 34mm, il en est de même pour *E. coli* qui a donné un diamètre assez important de 25mm.

Des zones d'inhibitions moins importantes pour la dilution au (1/2) arrivant à 22 mm pour *S. aureus* et de même pour *E. coli*. Toutefois pour les dilutions au dixième, l'absence d'activité antibactérienne est notée pour *E.Coli*.et *S. aureus*.

De son côté, la combinaison entre l'extrait pur et l'antibiotique a donné un effet synergique très important avec l'*ERTAPENEM* (36mm) et un pouvoir inhibiteur plus au moins important dans l'interaction avec la *SPIRAMYCIN* que l'extrait seul avec un diamètre d'inhibition de 32mm.

### 3 Méthode des puits :

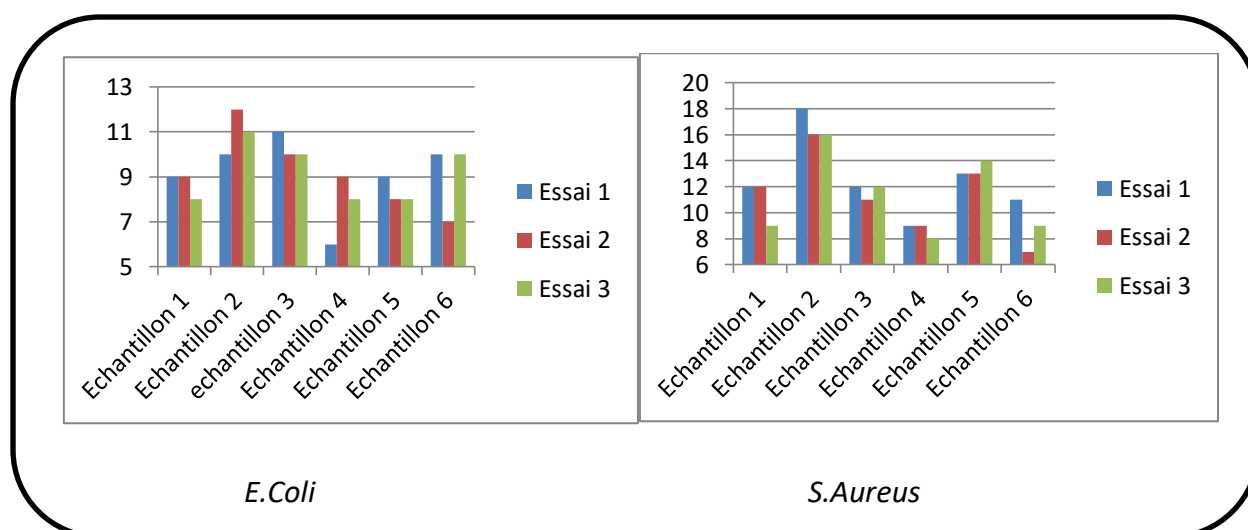
#### 3.1 Le miel pur :

L'effet antibactérien des 6 échantillons de miel sur les bactéries étudiées est représenté dans le tableau, figures et les photos ci-dessous :

**Tableau 3.1 : Résultats des diamètres d'inhibition du miel sur les bactéries étudiées.**

Echantillons	E-coli				S. aureus			
	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne
E1	9 (S)	9 (S)	8 (R)	<b>8,6</b>	12 (S)	12 (S)	9 (S)	<b>11</b>
E2	10 (S)	12 (S)	11 (S)	<b>11</b>	18 (TS)	16 (TS)	16 (TS)	<b>16,6</b>
E3	11 (S)	10 (S)	10 (S)	<b>10,3</b>	12 (S)	11 (S)	12 (S)	<b>11,6</b>
E4	6 (R)	9 (S)	8 (R)	<b>7,6</b>	9 (S)	9 (S)	8 (R)	<b>8,6</b>
E5	9 (S)	8 (R)	8 (R)	<b>8,3</b>	13 (S)	13 (S)	14 (S)	<b>13,3</b>
E6	10 (S)	7 (R)	10 (S)	<b>9</b>	11 (S)	7 (R)	9 (S)	<b>9</b>

R= Résistant ; S= Sensible ; TS= Très Sensible.



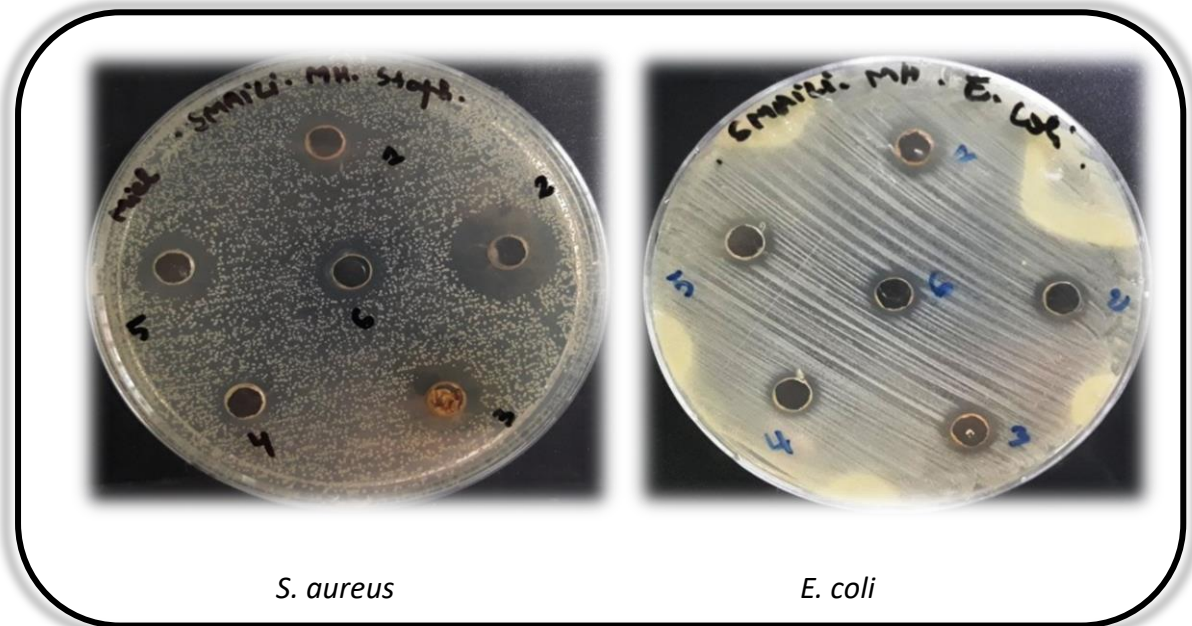
**Figure 3.1 : Résultats des diamètres (en mm) d'inhibition par méthode des puits du miel sur les bactéries étudiées.**

❖ **Interprétation :**

L'évaluation de l'effet inhibiteur des différents échantillons de miel testés sur les deux souches bactériennes est exprimée par le diamètre de l'auréole d'inhibition (en millimètres) :

Sur tous les échantillons de miel testé, **l'échantillon 2** était le plus inhibiteur avec des diamètres allant de 10 à 12 mm et de 16 à 18 mm pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus Aureus* respectivement.

Tandis que, l'échantillon 4 (Oued Aissi) était le moins inhibiteur avec une absence de zone d'inhibition lors du 1<sup>er</sup> Essai et un diamètre de 9 et 8 mm sur le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> essai respectivement sur *Escherichia Coli*, aussi avec un diamètre allant de 8 à 9 mm sur les trois essais sur *Staphylococcus Aureus*.



**Photo 3.1: Diamètre d'inhibition du miel sur les bactéries étudiées par méthode des puits.**

A noter aussi que *Staphylococcus Aureus* s'est montré plus sensible qu'*Escherichia coli* sur les six échantillons avec une zone d'inhibition plus importante.

#### 4 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Les résultats de la microplaque sont illustrés dans les tableaux suivants dont :

- Témoin positif : 50µl BHIB+50µl suspension bactérienne
- Témoin négatif : 50µl BHIB
  - (R) : Rose.
  - (B) : Bleu.

## 4.1 *Escherichia coli* :

**Tableau 2: Tableau des résultats de la microplaque d' *Escherichia Coli*.**

	Extrait pur			Dilution au demi			Dilution ( $10^{-1}$ )			Dilution ( $10^{-2}$ )		
	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai
Feuilles d'olives												
Gousses d'ail												
Bulbes d'ails												
Témoin positif				/	/	/	/	/	/	/	/	/
Témoin négatif				/	/	/	/	/	/	/	/	/

## 4.2 *Staphylococcus aureus*

**Tableau 3: Tableau des résultats de la microplaque de *Staphylococcus Aureus*.**

	Extrait pur			Dilution au demi			Dilution ( $10^{-1}$ )			Dilution ( $10^{-2}$ )		
	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai
Feuilles d'olivier												
Gousses d'ail												
Bulbes d'ails												
Témoin positif				/	/	/	/	/	/	/	/	/
Témoin négatif				/	/	/	/	/	/	/	/	/

❖ Interprétation :

Après incubation à 37°C, on observe une diminution progressive de l'intensité du trouble induit par la croissance des bactéries au fur à mesure que la concentration de l'extrait végétal augmentait dans les puits de la microplaque.

Après ajout du réactif Resazurine, on note que les différents extraits éthanoliques (feuilles d'olives, gousses et bulbes d'ails) ont tous montrés une action bactéricide contre *E. coli* et *S.Aureus* avec toutes les dilutions sauf à la dilution ( $10^{-2}$ ) et à ( $10^{-1}$ ) pour l'extrait de feuilles d'olives où on constate le virement de couleur en rose.

### Discussion :

#### 1.1 Rendement de l'extraction :

Un meilleur rendement était enregistré pour l'extrait de feuilles d'olivier (5.35%), suivi par les feuilles de pamplemoussier (4.18%), les feuilles d'oranger amer (3.96%), les feuilles d'oranger doux (3.52%) puis les bulbes d'ail (2.90%), les gousses d'ail (2.08%) et enfin l'extrait des feuilles de citronnier avec le plus bas pourcentage de rendement (1.55%).

Nos résultats restent inférieurs à ceux rapportés par (MORZOUGLAL & RABOUH, 2019) pour l'extrait des feuilles d'olivier qui ont obtenus un meilleur rendement (21.34%), et aussi inférieurs pour l'extrait de feuilles du citronnier (10.93%) dans le travail de (Ewansiha, et al., 2016)

Cette disparité au niveau des résultats pourrait être due à plusieurs paramètres: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon. De plus, la période et le lieu de récolte influencent le rendement d'extraction. (ADDAB, FETNI, HAMLAOUI, ZERGUINE, & MAHLOUL, 2020).

#### 1.2 Activité antibactérienne des extraits éthanolique :

Durant notre étude, on a pu tester la sensibilité de deux espèces bactérienne : *E. coli* et *S. Aureus* avec sept échantillons d'extraits éthanolique de plantes qui ont été obtenus à partir des feuilles d'olive, de citronnier, d'oranger, d'oranger amer, de pamplemoussier, des gousses et du bulbe d'ail :

*E. Coli* s'est révélée sensible aux concentrations élevées des extraits éthanolique d'ail (gousses et bulbes) à savoir le pur : 0.312 g/ml pour l'extrait de gousses d'ail et 0.436 g/ml pour l'extrait de bulbes d'ail, ainsi que le demi : 0.156 g/ml et 0.218 g/ml pour l'extrait de gousses et bulbes d'ail respectivement Cependant, tous les autres extraits n'ont démontré aucune activité antibactérienne vis-à-vis de cette bactérie.

*S. Aureus* quant à elle, en plus d'être sensible aux deux extraits d'ail (gousses & bulbes), elle s'est révélée sensible à l'extrait de feuilles d'olivier contrairement à *E. Coli* avec

les concentrations “extrait pur” et “au demi” avec les trois extraits (gousses et bulbes d’ail, feuilles d’olivier).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Ekwenye & Elegalam, 2005) où ils ont réussi à obtenir une zone d’inhibition d’une valeur de “9mm” avec une concentration de 1000mg/ml d’extrait éthanolique de l’ail sur *E. Coli*. Cependant, ils ne concordent pas avec ceux obtenus par (OKOMBE EMBEYA & NZUZI MAVUNGU , 2019) où *E. Coli* s’est montrée résistante aux extraits méthanolique et aqueux de l’ail.

D’après (OKOMBE EMBEYA & NZUZI MAVUNGU , 2019), cela peut être due aux conditions de conservations, vu que les gousses d’ail exposés au soleil, a pu provoquer l’altération des certains composés bioactifs de l’ail.

De plus, les résultats de (Hindi & Chabuck, 2013) ont montré une résistance d’*E. Coli* vis-à-vis des extraits aqueux du citron et une sensibilité de *S. Aureus* vis-à-vis des extraits aqueux à partir du citron frais mais une résistance à l’extrait aqueux obtenu à partir citron séché.

Ces divergence dans les résultats est généralement dépendante de plusieurs facteurs qui sont la méthode de l’extraction, sa durée, la nature du solvant utilisé, la concentration de l’extrait et l’espèce bactérienne étudiée. (BURNICHON & TEXIER, 2003) (Totty, Guessennd, Bahi, Kra, OTOKORE, & Dosso, 2013).

Par ailleurs, les résultats de l’étude de (MIRAD & BADIS, 2019) concordent avec les nôtres sur *S. Aureus* mais sont en contradiction avec ceux obtenus pour *E. Coli* où ils ont pu obtenir une inhibition de croissance d’*E. Coli* avec les extraits éthanoliques (70% et 50%) des feuilles d’olivier.

Ceci peut s’expliquer par une différence de composition ou de concentration en substances actives dans la plante, pouvant être liée à des différences de moment de récolte où de lieu de collecte. (GANFON, HOUVOHESSOU, ASSANHOUE, BANKOLE, & GBENOU, 2019)

De plus, *S. Aureus* s’est montré beaucoup plus sensible qu’*E. Coli* sur l’ensemble des résultats. La raison de la différence de sensibilité des bactéries à Gram négatif par rapport à

celle des bactéries à Gram positif pourrait être due à des différences dans la composition de leur paroi cellulaire. (Hindi & Chabuck, 2013).

Concernant la synergie entre chaque extrait avec les antibiotiques utilisés : On a constaté une importante activité synergique de l'extrait de gousses d'ail avec la *COLISTINE* et l'extrait de bulbes d'ail avec l'*ERTAPENEM* sur *E. COLI* avec une amélioration de l'activité antibactérienne de "6mm" et "4mm" respectivement. Et malgré qu'*E. COLI* soit résistante aux autres extraits, la synergie de ces derniers avec les antibiotiques ont démontré une légère amélioration de l'efficacité de l'antibiotique qui s'est traduit par un léger gain de "1 à 3mm" pour les extraits de feuilles d'oranger et de pamplemoussiers et un gain de "1 mm" pour les extraits des feuilles d'olivier, de citronnier et d'oranger amer.

Relativement à *S. Aureus*, l'activité synergique des extraits avec les antibiotiques s'est montrée beaucoup plus importante par rapport à celle sur *E. Coli* avec des importants gains de diamètre d'inhibition de "12mm" et de "10mm" pour l'extrait des gousses d'ail avec la *BACITRACINE* et l'extrait de bulbes d'ail avec la *SPIRAMYCIN* respectivement.

Egalement, l'effet synergique des autres extraits sur *S. Aureus* s'est révélé plus important que sur *E. Coli* avec des gains de diamètre d'une valeur de "6 mm" pour les extraits des feuilles d'olivier, de citronnier et de "5 mm" pour les feuilles d'oranger, de pamplemoussier et enfin de "1 mm" pour l'extrait des feuilles d'oranger amer.

De façon générale, nos résultats ont permis de mettre en évidence Un effet potentialisateur (synergique) entre plusieurs extraits et les antibiotiques testés. Ces résultats représentent donc un intérêt qui pourrait conduire au développement d'un traitement basé sur la combinaison d'un antibiotique et d'extraits de plantes.

### 1.3 Test de détermination de la concentration minimale bactéricide :

On a procédé au test de la concentration minimale bactéricide à l'aide des microplaques "96 puits" avec trois de nos extraits qui ont donné les meilleurs résultats sur *E. Coli* et *S. Aureus* qui sont les extraits de gousses, bulbes d'ail et celui des feuilles d'olivier :

L'extrait éthanolique de feuilles d'olives, pour les concentrations "extrait pur" (0.803g/ml), "dilution au demi" (0.401g/ml), on a constaté une absence de croissance des germes étudiés, par contre pour les deux dilutions au dixième : "dilution au  $10^{-1}$ " (0.08g/ml) et " $10^{-2}$ " (0.008g/ml), on a pu relever une croissance bactérienne d'*E. Coli* et *S. Aureus*. En conséquence, la CMB des extraits de feuilles d'olivier est enregistrée aux concentrations "au demi" 0.401 g/ml pour les deux souches testées.

Pour les extraits éthanoliques des gousses et bulbes d'ail, on a pu observer une absence de croissance des deux espèces germes avec toutes concentration sauf avec la concentration " $10^{-2}$ ". Ainsi, la CMB des extraits d'ail est enregistrée aux concentrations 0.031 g/ml pour l'extrait de gousses d'ail et 0.043 g/ml pour l'extrait de bulbes d'ail.

Déjà très attendus, les résultats de la CMB viennent confirmer nos résultats précédents sur l'aromatogramme.

### 1.4 Le miel :

Par méthode de puits, on a procédé au test de l'effet antibactérien de six échantillons de miel récupéré de différents endroits.

Sur tous les échantillons de miel testé, **l'échantillon 2** avait le meilleur pouvoir inhibiteur sur les deux souches bactérienne testées avec une moyenne de diamètre de zone d'inhibition de "11mm" sur *E. Coli* et de "16,6mm" sur *S. Aureus*, tandis que l'échantillon 4 était le moins efficace avec une moyenne de "7,6 mm" sur *E. Coli* et "8,6 mm" sur *S. Aureus*.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par (BOURBIA , HAMITOUCHE, & LITAMINE, 2020) vu qu'ils ont obtenu, par méthode des puits, une inhibition de croissance en utilisant trois échantillons de miels différents sur *S. Aureus* ("28mm", "32mm" et "30 mm") et *E. Coli* ("12 mm", "18 mm" et " 17mm").

Plusieurs facteurs rendent difficile de prédire si oui ou non un échantillon de miel donné est susceptible d'avoir ou pas une activité antimicrobienne, on cite : L'interaction complexe d'espèces végétales, la physiologie végétale, la nature des fleurs de nutrition de l'abeille et son origine, les conditions de croissance, les variations saisonnières, l'âge de

l'abeille (le miel de l'abeille jeune est particulièrement clair et moins concentré par rapport à celui de l'abeille la plus âgée) et les conditions de conservation du miel et sa durée. (MERAH, BENSACI BACHAGHA, & BOUDERHEM, 2010)

Dans tous les cas, *S. Aureus* s'est révélé plus sensible aux différents miels qu'*E. Coli* et le travail de (Feddaoui & Kerdouci, 2013) vient confirmer notre déduction avec des résultats comparables aux nôtres.

## Conclusion et perspectives

### ➤ Conclusion :

Notre étude avait comme objectif principal l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'origines végétales et du miel vis-à-vis de deux souches bactériennes à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et à la lumière des résultats obtenues, il a été conclu que :

- ✓ Les rendements d'extraction obtenus varient d'une plante à une autre, le meilleur rendement (5.35%) est noté pour les feuilles d'olives.
- ✓ Un meilleur effet antibactérien était enregistré chez les bactéries Gram<sup>+</sup> par rapport aux bactéries Gram<sup>-</sup>.
- ✓ Une bonne activité antibactérienne (34mm et 32mm) était enregistrée par l'extrait d'ail (bulbes et gousses respectivement) à l'encontre des deux souches testées.
- ✓ Une activité moyenne (15mm) était notée par l'extrait de feuilles d'olivier, cependant cette activité concerne seulement *S. Aureus*.
- ✓ Les extraits de feuilles de citronnier, oranger, oranger amer et pamplemoussier n'ont révélé aucun effet antibactérien.
- ✓ Tous les miels se sont manifestés actifs vis-à-vis des deux souches testées, et le meilleur diamètre était de l'ordre de 16,6mm.
- ✓ Les CMI obtenues sont de l'ordre de 0.401 g/ml, 0.031 g/ml, 0.043g/ml pour les feuilles d'olives, des gousses et des bulbes d'ail respectivement.

### ➤ Perspectives

Ces travaux préliminaires réalisés peuvent être poursuivis afin d'apporter des informations supplémentaires sur l'importance biologique des molécules bioactives des plantes. Des essais complémentaires sont nécessaires pour cerner ce travail, il est donc souhaitable de le compléter par :

- L'optimisation de la diversification des extraits à base de différents solvants afin de sélectionner les meilleurs rendements et les meilleurs effets biologiques.
- Elargir l'éventail des espèces microbiennes testées (bactéries, levures et moisissures, hospitalières et de référence).
- Déterminer les principes actifs présents dans ces extraits qui sont responsables de cette activité antibactérienne et les utiliser comme médicaments.
- Effectuer l'étude de l'effet de l'association de ces extraits de plantes entre eux.

### Bibliographie

1. **Manning, Shannon D.** *ESCHERICHIA COLI INFECTIONS*. Philadelphia : Chelsea House Publishers, 2005.
2. **King, L A, et al.** *Foodborne transmission of sorbitol-fermenting Escherichia coli O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011*. 2014, *Clinical Microbiology & Infection*, pp. 01136-01144.
3. **Bidet, Philippe et Bonacorsi, Stéphane.** *Escherichia coli/ Shigelle*. s.l. : Société Française de microbiologie.
4. **Berche, Patrick, Gaillard, Jean-Louis et Simonet, Michel.** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Paris : Lavoisier, 2007.
5. **ENGELKIRK , P G et DUBEN-ENGELKIRK , J L.** *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. . Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins., 2008.
6. **Harley, John P, et al., et al.** *Microbiologie. 3ème Edition*. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 2010.
7. **POIREL, Laurent, et al.** *Antimicrobial Resistance in Escherichia coli*. . 4, 2018, *Microbiology Spectrum*, Vol. 6, p. 27.
8. **Dobrindt, U, et al.** *Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal Escherichia coli isolates by use of DNA arrays*. 6, 2003, *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, pp. 1831- 1840.
9. **Müller, D, et al.** *Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR*. 10, 2007, *Applied and Environmental Microbiology*., Vol. 73, pp. 3380-3390.
10. **Croxen, M A, et al.** *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. 4, 2013, *Microbiology Reviews*, Vol. 26, pp. 822-880.
11. **NATARO, James P et KAPER, James B.** *Diarrheagenic Escherichia Coli*. 1998, *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, pp. 142-201.

12. **Brenner, D J, et al., et al.** *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2.* NewYork : Springer, 2005.
13. **Johnson, J R et Russo, T A.** *Uropathogenic Escherichia coli as Agents of Diverse Non-Urinary Tract Extraintestinal Infections.* 2002, The Journal of Infectious Diseases.
14. **Bidet, Phillipe et Bonacorsi, Stéphane.** Escherichiacoli/Shigelle. *Société Française de Microbiologie.* [En ligne] [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE\\_EscherichiaColiShighella.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_EscherichiaColiShighella.pdf).
15. **FASQUELLE, R.** *Eléments de bactériologie médicale. 9ème édition.* Paris : Flammarion, 1974.
16. **Spicer, W J.** *Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie.* Paris : Edition Flammarion Medecine Sciences, 2003.
17. **AVRIL, J L, et al., et al.** *Les cocci à gram positif, Bactériologie Clinique.* Paris : Ellipses, 2000.
18. **GILLESPIE , Stephen H et HAWKEY, Peter M.** *Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2ème Edition.* Chichester, West Sussex, England : Wiley Office England, 2006.
19. **LE LOIR, Y et GAUTIER, M.** *Monographie de la microbiologie : Staphylococcus aureus.* Paris : Lavoisier, 2010.
20. **Dworkin, M, et al., et al.** *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. Vol 4.* NewYork : Springer, 2006.
21. **Hennekine, JA, et al., et al.** *Discrimination of Staphylococcus aureus biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments.* 2003, Journal of Applied Microbiology, pp. 321-329.
22. **Callon, C, et al.** *Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of S.aureus contamination from milk to cheese in goat cheese farms.* 2007, Food Control, pp. 143-150.

23. **FARNANDEZ , L G et TURNER, M C.** *The chronicles of incision management: clinical insights, perspectives, and treatment approaches.* Texas, USA : Duke of University Medical Center and University of Texas Medical Center., 2017. Vol. 1.
24. **Université Pierre et Marie Curie. Service Bactériologie.** Cours de Bactériologie. niveau DCEM 1. *Université Pierre et Marie Curie.* . [En ligne] 2003. <https://docplayer.fr/4177697-Universite-pierre-et-marie-curie-bacteriologie-niveau-dcem1-2002-2003-service-de-bacteriologie.html>.
25. *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: An Enemy amidst Us.* **Kong, Eric F, Johnson, Jennifer K et Jabra-Rizk, Mary Ann.** 10, 2016, PLOS Pathogens, Vol. 12, pp. 1-7.
26. **Silva, Professeur Marco.** Staphylococcus Aureus. *Université Andres Bello.* [En ligne] 14 Novembre 2007. <http://7staphylococcus-aureus.blogspot.com/>.
27. **Anses, Agence nationale de Sécurité sanitaire, Alimentation, Environnement & Travail.** Staphylococcus Aureus et les toxines Staphylococciques. *Anses.* [En ligne] <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0117Fi.pdf>.
28. **Bush, Larry M.** Infections à Staphylococcus aureus. *Le Manuel MSD.* [En ligne] Mars 2021. <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-positives/infections-%C3%A0-staphylococcus-aureus>.
29. **Guilot, J F.** *Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques.* . 1, s.l. : INRA Editions., 1989, Annales de Recherches vétérinaires. , Vol. 20, pp. 3-13.
30. **AMAIRI, Toufik.** *Résistance aux antibiotiques des Escherichia coli isolés des abbatoiores et élevages de poulet de chair au Nord-Est d'Algérie.* . 2020, Thèse de doctorat.
31. **ABDANI, Saïd EL.** *EVOLUTION DE LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES ET CONSEILS EN ANTIBIOTHÉRAPIE.* 2016, thèse de doctorat.
32. **Santé Publique France.** La Résistance aux antibiotiques. *Santé publique France.* [En ligne] 29 mars 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux->

antibiotiques#:~:text=La%20r%C3%A9sistance%20aux%20antibiotiques%20rend,impossibilit%C3%A9%20de%20traiter%20certaines.

33. **Riffaud, Camille.** *Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxine-antitoxine de type I exprimés par Staphylococcus aureus.* 2019, Thèse de doctorat en Biochimie, biologie moléculaire et cellulaire.
34. **Fetsch, Alexandra.** *Staphylococcus Aureus.* s.l. : Elsevier science., 2018.
35. **Van Baum, Heike et Marre, Reinhard.** *Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications.* 2005, International Journal of Medical Microbiology., pp. 503-511.
36. **Marena, Alessandra.** *Staphylococcus aureus protein S1, an RNA chaperone involved in translation initiation and sRNA regulation.* 2017, Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.
37. **Ducrot, Christian, et al.** *Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage.* 1, 2017, INRAE Productions Animales, Vol. 30, pp. 77-88.
38. **Merghem, R.** *Elément de biochimie végétale.* Constantine; Algerie : Bahaeddine, 2009.
39. **Beta, T, et al.** *Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions.* 4, 2005, Cereal Chem, Vol. 82, pp. 390-393.
40. **Sarni-Manchado, Pascale et Cheynier, Véronique .** *les polyphénols en agroalimentaire.* paris : Lavoisier, 2006.
41. **Harborne, J B et Simmonds, N W.** *Biochemistry of Phenolic Compounds.* London : Academic Press, 1964.
42. **Yezza, Samiha et Bouchama, Sara.** *Index des métabolites secondaires végétaux. Thèses.* Ouargla; Algérie : Université Kasdi Merbah, 2014.
43. *Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique.* **Morand, Christine.** 5, 2014, Médecine des Maladies Métaboliques., Vol. 8, pp. 477-482.

44. **Gamet-Payrastre, L, et al.** *Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3-kinase.*, et al. 1999, *General Pharmacology.*, Vol. 32, pp. 279-286.
45. **Bruneton, J.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème édition.* Paris : médicales internationales & Lavoisier., 1999.
46. **Uccella, Nicola.** *Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes.* 2001, *Trends Food Science and Technology.*, pp. 215-327.
47. **Lo Scalzo, R, et al.** *Olea europaea chemical repellent to Dacis oleae females.* 1994, *Journal of Chemical Ecology*, pp. 1813-1923.
48. **Leong, L P et Shui, G.** *An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets.* 2002, *Food Chem*, Vol. 76, pp. 69-75.
49. **Karakaya, S.** *Bioavailability of phenolic compounds.* 6, 2004, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 44, pp. 453-464.
50. **Bruneton, J.** *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales.* Paris : Technique et documentation-Lavoisier, 1993. p. 278.
51. **Krief, Sabrina.** *Métabolites secondaires des plantes et comportement ET COMPORTEMENT ANIMAL.* 2003, *THESES DE DOCTORAT DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE.*, p. 32.
52. **Badiaga, M.** *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea Latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali.* 2011, thèse de doctorat, université de Bamako., p. 10.
53. **Gaussourgues, R .** *L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique.* .s.l. : ELSEVIER, 2009, *Revue Française d'Allergologie*, Vol. 49, pp. 52-56.
54. **LANGER, Patrick.** *L'Olivier.* Aix-en-Provence, France : édisud, 2008.
55. **Bervillé, André et Breton, Catherine.** *Histoire de l'olivier.* Versailles : Editions Quae, 2012.

56. **DJENANE, Djamal , et al.** *Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de Dinde.* 2012, Nature & Technologie , pp. 53-61.
57. **Irakli, M, Chatzopoulou, P et Ekateriniadou , L.** *Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities.* 2018, Food Science & Technology, pp. 382-388.
58. **Botanica Health.** Feuilles d'olivier. *Botanica* . [En ligne] 2022.  
<https://botanicahealth.com/fr/our-ingredients/feuille-dolivier/>.
59. **NEFZAOUI, A.** *Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources.* s.l. : Advanced Courses, 1995.
60. **Boudhrioua, Nourhène, et al.** *Comparison on the Total Phenol Contents and the Color of Fresh and Infrared Dried Olive Leaves.* 2009, Industrial Crops and Products., Vol. 29, pp. 412-419.
61. **Erbay, Z et Icier, F .** *A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling and Experimental Results.* 2009, Critical Reviews in Food Science and Nutrition., Vol. 50, pp. 441-464.
62. **Martin-Garcia, A I, et al.** *Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (Olea europaea var. europaea) leaf fermentation in continuous fermentors.* 2006, Small Ruminant Research., Vol. 61, pp. 53-61.
63. **Garcia-Gomez, A, Roig, A et Bernal, M P.** *Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity.* 2003, Bioresource Technology, Vol. 86, pp. 59-64.
64. **Fegeros, K, et al.** *Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep.* 1995, Small Ruminant Research., Vol. 17, pp. 9-15.
65. **DETHIER, BERENICE.** *CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYNTHÈSE DE L'ALLIINE DE L'AIL.* 2010, Mémoire de Master. Université de Liège.

66. **TOUIL , A, LITAIEM , J et ZAGROUBA , F.** *Isothermes de sorption et propriétés thermodynamique de l'Allium sativum.*. 2015, Journal of the Tunisian Chemical Society., Vol. 17, pp. 105-114.
67. **SALEH , N E, MICHAEL , F R et TOUTOU , M M.** *Evaluation of garlic and onion powder as phyto-additives in the diet of sea bass (Dicentrarcus labrax).* 2015, Egyptian Journal of Aquatic Research, pp. 211-217.
68. **MEDDEB, V.** *Etude des effets des rayonnements ionisants sur les propriétés biochimiques et biologiques de l'ail (Allium sativum).* 2008, Mémoire de Master, université 7 novembre. Carthage.
69. **AGARWAL , K C.** *Therapeutic action of garlic constituents.* 1, 1996, Medicinal Research Reviews, Vol. 16, pp. 111-124.
70. **XU , X, et al.** *Effective production of S-allyl-L-cysteine through a homogeneous reaction with activated endogenous  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in garlic (Allium Sativum).* 2015, Journal of Food Science and Technology, pp. 1724-1729.
71. **OKOMBE , Embeya Victor et NZUZI , Mavungu Gaël.** *Etude de l'activité antibactérienne (in vitro) des extraits aqueux et méthanoliques de l'ail (Allium sativum L.).* 2019, Journal of Applied Biosciences, Vol. 141, pp. 14419-14425.
72. **TAHRI , N, ORCH , H et ZIDANE , L.** *Ail et Microbes : Examen critique de la littérature, revue antibiotherapeutique.* 2007, Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie » Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles. Université Ibn Tofail, Kenitra.
73. **Institut Klorane.** *Guide des agrumes.* 81500 Lavour : Art & Caractère (SIA), 2008.
74. **PAGES.** *L'oranger. Pagès.* [En ligne] 2022. <https://www.pages.fr/oranger.html>.
75. **Loussert, R.** *Les Agrumes ( Arboriculture).* Paris; France : Ed Technique et documentation Lavoisier, 1989.

76. **Ercan, Bursal et Gülçin, İlhami.** *Polyphénol contents and in vitro antioxydant activites of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (Actinidia deliciosa).* 5, s.l. : Elsevier, juin 2011, Food Research International., Vol. 44, pp. 1482-1489.
77. **Choi, Soo-Youn , et al.** *Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits.* 4, avril 2007, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 30, pp. 772-778.
78. **Tian, Q, et al.** *Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids.* 2, 2001, Nutrition and Cancer, Vol. 40, pp. 180-184.
79. **CHAUVIN, R.** *La Ruche et l'homme.* Poitiers : Almann-Lévy, 1987.
80. **ORENGO, C.** *Le miel utilisé dans les préparations pharmaceutiques.* Montpellier : Th. Univ. Pharm, 1985.
81. **Bruneau, E.** *Le miel.* s.l. : Edition Rustica, 2002, Le Traité Rustica de l'Apiculture, pp. 354-364.
82. **Dumbrava, D G, et al.** *ANTIOXIDANT PROPERTIES AND OTHER PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SOME HONEY VARIETIES FROM WEST ROMANIAN AREA.* 2013, International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM: Surveying Geology & Mining Ecology Management., p. 101.
83. *Functional properties of honey, propolis, and royal jelly.* **Viuda-Martos, M, Ruiz-navajas, Y et Fernández-lópez, J.** 9, 2008, Journal of food science, Vol. 73.
84. **Erejuwa, O O, Sulaiman, S A et Ab Wahab, M S.** *Honey: a novel antioxidant.* 2012, Molecules, Vol. 17, pp. 4400-4423.
85. **Shenoy, et al.** *Honey as an antimicrobial agent against Pseudomonas aeruginosa isolated from infected wounds.* 2, 2012, Journal of global infectious diseases, Vol. 4, p. 102.
86. **Amoros, M, et al.** *Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis.* 1992, Journal of Natural Products., Vol. 55, pp. 1732-1740.

87. **Cavia, M M, et al.** *Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation.* 2007, Food Chemistry., Vol. 100, pp. 1728-1733.
88. **Cortopassi-Laurino, M et Gelli, D S.** *Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées Apis mellifera et de Méliponinés du Brésil.* 1991, Apidologie., Vol. 22, pp. 61-73.
89. **Cooper, R A, Molan, P C et Harding, K G.** *Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds.* 1999, Journal of the Royal Society of Medicine., Vol. 92, pp. 283-285.
90. **Ahmadi–Motamayel, et al.** *antibacterial activity of honey on cariogenic bacteria., et al.* 1, 2013, journal of dentistry (tehran, iran)., Vol. 10, p. 10.
91. **Avisse, I.** *Grand traité des miels.* s.l. : Editions Le Sureau, 2014.
92. **Couquet, Y, Desmoulière, A et Rigal, M L.** *les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel.* 531, 2013, Actualités pharmaceutiques, Vol. 52, pp. 22-25.
93. **Kumar, Kshitiz, Srivastav, Shivmurti et Sharanagat, Vijay Singh.** *Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review.* 2021, Ultrasonics - Sonochemistry, Vol. 70.
94. **Rabia, Waseem et Low, Kah Hin.** *Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry.* 3, 2015, Journal of Separation Science., Vol. 38, pp. 483-501.
95. **Díaz-Reinoso, Beatriz, et al.** *Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity.* 7, 5 Avril 2006, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, pp. 2441-2469.
96. **Carabias-Martinez, R, et al.** *Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples.* 2005, Journal of Chromatography A, pp. 1-17.
97. **Yang, Cui, Wang, Juan et Li, Donghao.** *Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review.* 2013, Analytica Chimica Acta., Vol. 779, pp. 8-22.

98. **SAVARY, Etienne.** Extraction de composés assistée par micro-ondes. *SAIREM micro-ondes et hautes fréquences*. [En ligne] SAIREM, 2020. <https://www.sairem.com/fr/solutions-for-food-and-industry/microwave-assisted-compound-extraction/#:~:text=Les%20micro%2Dondes%20agissent%20de,par%20le%20processus%20d'infusion..>
99. **BEN AMOR, Bouthaina.** MAITRISE DE L'APTITUDE TECHNOLOGIQUE DE LA MATIERE VEGETALE DANS LES OPERATIONS D'EXTRACTION DE PRINCIPES ACTIFS ; TEXTURATION PAR DETENTE INSTANTANEE CONTROLEE DIC. 2008.
100. **BOURGOU, S., et al.,** *Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia.* . 2016, JOURNAL OF NEX SCIENSES, pp. 1649-1655.
101. **ADJOU, S. et SOUMANOU, Mohamed M.** *Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin.* 2013, Journal of Applied Biosciences, pp. 5555– 5566.
102. **Delarras, Camille.** *PRATIQUE EN MICROBIOLOGIE DE LABORATOIRE.* Lavoisier, Paris : s.n., 2014.
103. **Török, Estée, Moran, Ed et Cooke, Fiona.** *INFECTIOUS DISEASES AND MICROBIOLOGY.* OXFORD : s.n., 2017.
104. **BENYAGOUB, Elhassan, et al.** *Etude phytochimique et évaluation du pouvoir antibactérien de quelques extraits de Lavandula angustifolia Mill., in vitro sur des espèces bactériennes isolées responsables d'infection urogénitale chez la femme.* 2015, Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products, pp. 93-49.
105. **Bousseboua, Hacène.** *Elément de microbiologie. 2ème édition.* Constantine (Algérie) : Edition Campus-Club, 2005.
106. **Martin, S et Andriantsitohaina, R.** *Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium.* 2002, Annales de cardiologie et d'angéiologie, Vol. 51, pp. 304-315.

107. **Fylaktakidou, K C, et al.** *Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities.* 30, 2004, *Current Pharmaceutical Design.*, Vol. 10, pp. 3813-3833.

108. **Habtemariam, S.** *Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from Commiphora erlangeriana.* 6, 2003, *Toxicon*, Vol. 41, pp. 723-727.

109. **Bacar, Elia et Meskine , Hanane.** *Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de l'ail. (Allium sativum L).* 2014, thèse de master. UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA.

110. ADDAB, N., FETNI, S., HAMLAOUI, F., ZERGUINE, A., & MAHLOUL, K. (2020). Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'Olea europaea L. de l'Est Algérien. *Journal de la faculté de médecine d'Oran*, 4(2), 579-586.

111. BOURBIA , M., HAMITOCHE, L., & LITAMINE, L. (2020). ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DU MIEL. *Thèse En vue de l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Tizi-Ouzou.*

112. BURNICHON, N., & TEXIER, A. (2003). L' ANTIBIOGRAMME : LA DETERMINATION DES SENSIBILITES AUX ANTIBIOTIQUES. *DES bactériologie*, 1-29.

Ekwenye, U. N., & Elegalam, N. N. (2005). Antibacterial activity of Ginger (Zingiber officinale Roscoe and Garlic (Allium sativum L.) extract on Escherichia coli and Salmonella typhi. *International Journal of Molecular Medicine and Advanced Science.*, 1(4), 411-416.

Ewansiha, J. U., Garba, S. A., Musa, G., Daniyan, S. Y., Busari, M. B., Innalegwu, D. A., et al. (2016). Preliminary Phytochemical and Antimicrobial Activity of Citrus x limon (L) Burm. f. (lemon) Leaf Extract against Some Pathogenic Microorganisms. *Journal of Applied Life Sciences International.*, 6(4), 1-10.

Feddaoui, C., & Kerdouci, S. (2013). Effet antibactérien du miel. *Thèse Master en microbiologie de l'environnement. Université de Sétif.*

- GANFON, H., HOUVOHESSOU, J.-P., ASSANHOU, A., BANKOLE, H., & GBENOU, J. (2019). Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC) Guill. Et Perr. (Combretaceae). *International Journal Of Biological And Chemical Sciences.*, 13(2), 643-651.
- Hindi, N. K., & Chabuck, Z. A. (2013). Antimicrobial Activity of Different Aqueous Lemon Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 74-78.
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Food Science & Technology*, 382-388.
- MERAH, M., BENSACI BACHAGHA, M., & BOUDERHEM, A. (2010). ETUDE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DE TROIS ECHANTILLONS DU MIEL NATUREL RECOLTES DU TERRITOIRE ALGERIEN. *Annals of Science and Technology.*, 115-125.
- MIRAD, B., & BADIS, A. (2019). Activité antioxydant et antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier sauvages et cultivés. *Thèse master en microbiologie appliquée. Université de Bouira*, 1-47.
- MORZOUGLAL, D., & RABOUH, K. (2019). Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante des extraits de feuilles d'olivier. *Thèse Master Agronomie. Université Ziane Achour -Djelfa*.
- OKOMBE EMBEYA, V., & NZUZI MAVUNGU, G. (2019). Etude de l'activité antibactérienne (in vitro) des extraits aqueux et méthanoliques de l'ail (*Allium sativum* L.). *Journal of Applied Biosciences.*, 141, 14419-14425.
- Totty, A. A., Guessenn, N., Bahi, C., Kra, A. N., OTOKORE, D. A., & Dosso, M. (2013). Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.*, 82, 12-21.



# Annexes

## Annexe 1 : matériel non biologique

Matériel du laboratoire	Appareils et instruments	Solvants	réactifs chimiques	Milieux de culture utilisés	Antibiotiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pipettes pasteurs</li> <li>✓ Microplaques de 96 puits</li> <li>✓ Ecouvillons stériles.</li> <li>✓ Tubes à essais à vis</li> <li>✓ Embouts</li> <li>✓ Flacons en verre</li> <li>✓ Lames</li> <li>✓ Porte objets.</li> <li>✓ Boîtes de pétri en plastiques</li> <li>✓ Entonnoir</li> <li>✓ Spatules</li> <li>✓ Portoirs</li> <li>✓ Cristallisoir</li> <li>✓ Bec bunsen</li> <li>✓ Micropipettes 10, 100 et 1000µl</li> <li>✓ Anse de platine</li> <li>✓ Mortier</li> <li>✓ Pince stérilisée</li> <li>✓ Fioles jaugées</li> <li>✓ Disques en papier wattman stériles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Rota vapeur</li> <li>✓ Autoclave</li> <li>✓ Bain-marie</li> <li>✓ Balance de précision</li> <li>✓ Centrifugeuse</li> <li>✓ Microscope</li> <li>✓ Spectrophotomètre visible</li> <li>✓ Bain ultrasonique</li> <li>✓ Réfrigérateur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ethanol 96%</li> <li>✓ DMSO</li> <li>✓ Eau distillée</li> <li>✓ Alcool stérile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ VPI</li> <li>✓ VPII</li> <li>✓ KOVACS</li> <li>✓ TDA</li> <li>✓ Lugol</li> <li>✓ Fuschine</li> <li>✓ Lugol</li> <li>✓ Violet de Gentiane</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bouillon BHIB</li> <li>✓ Milieu Chapman</li> <li>✓ Milieu Hektoen</li> <li>✓ Gélose Muller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ COLISTINE (CS 10µg), ERTAPENEM pour <i>Escherichia coli</i> ATCC25922</li> <li>✓ BACITRACINE (BA 10µg), SPIRAMYCIN pour <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</li> </ul>



Microscope optique



Étuve



Centrifugeuse



Rota-vapour



Autoclave



Réfrigérateur



Spectrophotomètre visible



Bain marie



Balance



Vortex



Micropipette



Broyeur électrique



NaCl



Ethanol



Cristal violet



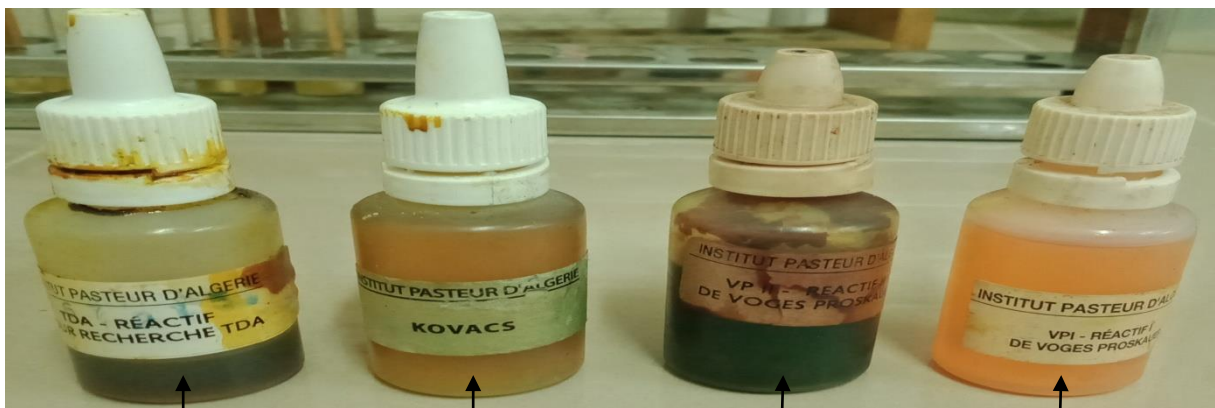
Fuschine



Lugol



Alcool



TDA

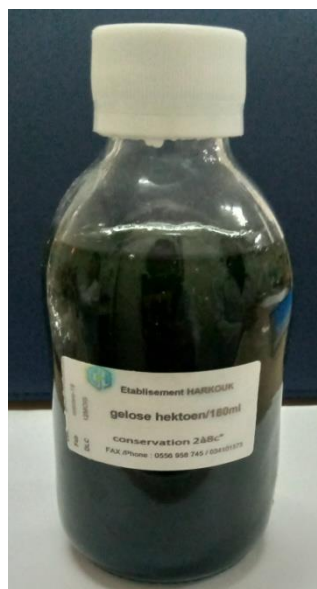
KOVACS

VP II

VPI



Gélose CHAPMAN



Gélose Hektoen



Gélose Muller Hinton

## Annexe 2 : Origine géographique des six échantillons de miel

N° Echantillon	Date de récolte	Origine géographique	Origine florale
E1	2022	FREHA (Tizi-Ouzou)	Miel de toutes fleurs
E2	2021	Larvaa Nath Irathen Ichariden (Tizi-Ouzou)	Miel de toutes fleurs
E3	2022	Ath-Douala, Ath- Zmenzer, (Tizi-Ouzou)	Miel de toutes fleurs
E4	2021	Oued Aissi, (Tizi- Ouzou)	Miel de toutes fleurs
E5	2021	FREHA, (Tizi-Ouzou)	Miel de toutes fleurs
E6	2021	Djurdjura, (Tizi-Ouzou)	Miel de toutes fleurs

## Annexe 3 :

➤ **Technique coloration de Gram** (Smith & Hussey, 2005)✚ **Préparation du frotti bactérien :**

- Déposer aseptiquement sur une lame porte objet stérile une goutte d'eau distillée.
- Prélever une colonie à partir du milieu gélosé à l'aide d'une anse de platine et la dissocier dans la goutte d'eau.
- Etaler la suspension bactérienne en un film mince et régulier sur la lame par un mouvement circulaire pour construire un frotti.
- Laisser évaporer en tenant la lame bien au-dessus de la flamme, le frotti doit devenir terne et ne doit ni brunir, ni brûler.

✚ **Coloration simple** : recouvrir le frotti par le violet de gentiane et laisser agir pendant une minute.

✚ **Premier rinçage** : rincer délicatement à l'eau du robinet puis égoutter pour enlever l'excès d'eau.

✚ **Fixation et mordantage** : verser le Lugol et le laisser agir pendant une minute.

✚ **Deuxième rinçage** : rincer à l'eau du robinet puis égoutter.

✚ **Décoloration** : différencier à l'alcool pendant 30 secondes pour éliminer le violet de gentiane.

✚ **Troisième rinçage** : rincer avec l'eau de robinet puis égoutter.

✚ **Recoloration** : colorer avec la Fuchsine pendant une minute.

✚ **Dernier rinçage** : rincer avec l'eau de robinet et laisser la lame sécher.

✚ **Observation** : observer au microscope optique en ajoutant une goutte de l'huile à immersion (objectif×100).

### ➤ **Technique galerie API20E**

#### ❖ **Préparation de la suspension bactérienne :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h, prélever à l'aide d'une pipette pasteur une colonie bien isolée sur milieu gélosé et l'introduire dans un tube à essai contenant 5 à 6 ml d'eau physiologique stérile. La suspension obtenue est bien agitée en se servant d'un vortex.

#### ❖ **Inoculation de la galerie**

- Créer une atmosphère humide en mettant de l'eau physiologique au fond de la boîte.
- A l'aide d'une seringue, inoculer le microtube de la galerie avec la suspension bactérienne.
- Remplir jusqu'au bout les cupules dont les noms sont encadrés.
- Ajouter l'huile de vaseline dans les cupules ou les noms des tests sont soulignés : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S pour créer les conditions d'anaérobiose.
- Renfermer la boîte.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

### ➤ **Test catalase**

- Déposer sur une lame porte-objet stérile une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- Emulsionner sur la goutte avec une colonie de la culture obtenue sur gélose.

**Lecture :** Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase+.

### ➤ **Tes Test Dnase (désoxyribonucléase)**

#### ✚ **Principe**

Ce test est utilisé pour identifier les staphylocoques pathogènes qui produisent de grandes quantités de DNase extracellulaire qui est une enzyme qui permet la dégradation de l'ADN (Török, Moran, & Cooke, 2017).

#### ✚ **Technique** (Kumar, 2012)

- A l'aide d'une anse de platine prélever une colonie d'une culture jeune de staphylococcus aureus ;
- L'étaler sous formes de stries sur une boîte pétri contenant le milieu gélosé DNase.
- Incuber la boîte à 37°C pendant 24h.

#### ✚ **Lecture**

Après incubation, inonder les stries avec quelques gouttes de HCL ; l'apparition des zones claires autour indique la dégradation de l'ADN du milieu :DNase positif.

**Annexe 4 : préparation des milieux de culture en boite pétris :**

- Desserrer légèrement le bouchon des flacons contenant la gélose MH.
  - Faire fondre le milieu en le plaçant dans un bain marie réglé à 100°C.
  - Une fois fondu, laisser le milieu refroidir sur une surface thermorésistante à température ambiante jusqu'à obtention d'un milieu en surfusion d'une température comprise entre 45°C et 50°C.
  - Couler les milieux dans des boîtes de pétri de façon à obtenir une épaisseur de 3 à 4 mm.
  - Déposer les boites avec leurs couvercles sur une surface fraîche et horizontale pour refroidir et se solidifier avant de les conserver au réfrigérateur à 2-8°C.
- ✚ Pour un ensemencement en surface d'un milieu de culture solide, les boites de pétri sont préalablement séchés dans une étuve, sans leurs couvercles et la surface de la gélose tournée vers le bas jusqu'à la disparition des gouttelettes d'eau.

**Annexe 5 : Tableau d'identification (galerie API 20<sup>E</sup>)**

API 20 E	V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	OF10	OF11
<i>Butiiaurella agrestis</i>	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Cedrelea davisiae</i>	99	99	0	99	75	0	0	0	0	99	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	99	0	87	100	100	100	
<i>Cedrelea lapagei</i>	99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	99	0	87	100	100	100	
<i>Citrobacter brasili</i>	50	45	0	99	75	94	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter freundii</i>	90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	96	25	99	99	99	92	99	99	0	98	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter koseri/amalonaticus</i>	99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	100	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter youngae</i>	100	60	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0	85	0	95	100	100	100	
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	100	0	100	100	100	100	
<i>Edwardsiella ictalidis</i>	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	100	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 1	99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 2	99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	100	100	100	100	
<i>Enterobacter asburiae</i>	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	100	0	95	100	100	100	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	100	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	95	100	100	100	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	99	0	32	100	75	0	99	0	0	80	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	100	
<i>Enterobacter inermis</i>	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	98	40	100	99	99	0	100	0	92	100	100	100	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	96	0	94	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 1	90	1	74	70	0	1	3	0	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 2	26	1	45	20	0	1	1	0	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	100	
<i>Escherichia fergusonii</i>	96	1	99	100	1	0	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	98	99	0	100	0	93	100	100	
<i>Escherichia hermannii</i>	100	0	1	100	1	0	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Escherichia vulneris</i>	100	99	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	85	95	99	0	100	0	100	100	100	
<i>Evangelilla americana</i>	98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	0	1	0	1	50	1	0	100	0	90	100	100	
<i>Hafnia alvei</i> 1	75	0	99	98	50	0	10	0	0	60	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	85	100	100	100	
<i>Hafnia alvei</i> 2	50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	0	1	0	100	0	100	100	100	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	66	55	20	60	97	85	0	92	0	0	100	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	0	73	0	86	0	75	0	0	80	0	100	99	99	99	89	99	99	99	99	0	100	0	100	100	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>	1	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	13	0	100	0	100	100	100	
<i>Kluyvera ssp</i>	95	0	25	99	60	0	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	95	0	94	100	100	
<i>Lectera adacarbovifata</i>	99	0	0	0	0	0	1	0	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Moraxella wisconsinensis</i>	97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	0	90	0	0	100	100	
<i>Morganella morganii</i>	1	0	10	96	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	88	0	95	100	100	
<i>Paritoea ssp 1</i>	85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	89	61	0	85	0	85	100	100	100	

Tableau de lecture (galerie Api 20<sup>E</sup>)

TESTS / TEST / TESTES / ΕΒΕΤΑ ΞΕΙΣ / TESTER	COMPOSANTS ACTIFS / ACTIVE INGREDIENTS / AKTIVE BESTANDTEILE / COMPONENTES ACTIVOS / ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ / AKTIVA INGREDIENTS / AKTYWNE INDHOLDSTOFFER / AKTYWNE SKŁADNIKI	QTE / QTY / MENGE / CANTIDAD / Q.TA / QTD / ΠΟΣ. / MANGD / MĀENGDIE / STEŽENIE / (mg/cup. / mg/Vert. / mg/cup. / mg/kvtt. / mg/cup. / mg/brand / mg/probówka)	REACTIONS-ENZYMES / REAKTIONE-ENZYM / REACCIONES-ENZIMAS / REAZIONI-ENZIMI / REACȚIÕES-ENZIMAS / ANTIΔΡΑΣΕΙΣ-ΕΝΖΥΜΑ / REAKTIONER-ENZYMER / REAKTIONER/ENZYMER / REAKCJE/ENZYMY	RESULTATS / RESULTS / ERGEBNISSE / RESULTADOS / RISULTATI / RESULTADOS / ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ / RESULTAT / RESULTATER / WYNIKI	
				NEGATIF / NEGATIVE / NEGATIV / NEGATIVO / ΑΡΗΘΗΚΟ / NEGATIVT / NEGATYWNY	POSITIF / POSITIVE / POSITIV / POSITIVO / ΘΕΤΙΚΟ / POSITIVT / POZYTYWNY
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside / 2-nitrophenyl-βD-galactopyranosid / 2-Nitrophenyl-βD-Galaktopyranosid / 2-nitro-fenil-βD-galaktopiranosida / 2-nitrofenil-βD-galaktopiranoside / 2-nitrofenil-βD-galaktopiranosida / 2-νιτροφενυλ-βD-γαλακτοπιρανοσιδ / 2-nitrofenil-βD-galaktopyranosid / 2-nitrofenilo-βD-galaktopiranozyd	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase) / β-Galaktosidase (Ortho-Nitrophenyl-βD-Galaktopyranosidase) / β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa) / β-galattosidasi (Orto-NitroFenil-βD-Galaktopiranoside) / β-galactosidase (Orto Nitrofenil-βD-Galactopiranosidase) / β-γαλακτοσιδάση (Ορθο Νιτροφενυλ-βD-Γαλακτοπιρανοσιδ) / β-galaktosidas (orto-nitrofenil-βD-galaktopyranosidas) / β-galaktosidase (Ortho-NitroFenyl-βD-Galaktopyranosidase) / β-galaktosydaza (orto nitrofenilo-βD-galaktopiranozyd)	Incolore / colorless / farblos / incoloro / incolore / άχρωμο / färglös / farvelos / bezbarwny	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty (1)
ADH	L-arginine / L-Arginin / L-arginina / L-αργινίνη	1,9	Arginine DiHydrolase / Arginin DiHydrolase / Arginina-dihidrolasa / Arginina Deidrolasi / Arginina DiHidrolase / Διυδρολάση της Αργινίνης / Arginin dihydrolas / Arginin DiHydrolase / dihydrolaza argininy	Jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty	rouge - orangé / red - orange / rot - orange / rojo - anaranjado / rosso - arancio / vermelho - alaranjado / ερυθρό - πορτοκαλί / rød - orange / rød - orange / czerwony - pomarańczowy (2)
URE	Urée / urea / Harnstoff / Ureia / ουρία / urinämne / mocznik	0,76	UREase / UREasa / UREasi / ουρεάση / UREas / ureaza	Jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty	rouge - orangé / red-orange / rot - orange / rojo - anaranjado / rosso - arancio / vermelho - alaranjado / ερυθρό - πορτοκαλί / rød - orange / rød - orange / czerwony - pomarańczowy (2)
TDA	L-tryptophane / L-Tryptophan / L-τριπτοφάνο / L-tryptofano / L-τριπτοφάνη / L-tryptofan	0,38	Tryptophane DesAminase / Tryptophane DeAminase / Tryptophan DesAminase / Triptofano DesAminasa / Triptofano DeAminasi / Triptofano DesAminase / Δεαμινάση της Τρυπτοφάνης / Tryptofan-deaminas / Tryptofan DeAminase / dezaminaza tryptofanu	Jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty	marron-rougeâtre / reddish brown / rotbraun / marrón-rojizo / marrone-rossastro / castanho - avermelhado / κοκκινωπό καφέ / rødbrun / rødbrun / czerwono-brązowy
IND	L-tryptophane / L-Tryptophan / L-τριπτοφάνο / L-tryptofano / L-τριπτοφάνη / L-tryptofan	0,19	production d'INDole / INDole production / INDol-Bildung / producción de INDole / produzione di acetoina / Produção de acetoina / παραγωγή ινδόλης / INDol-bildning / INDol produktion / wytwarzanie indolu	Incolore-vert pâle-jaune / colorless - pale green-yellow / farblos - hellgrün-gelb / incoloro - verde pálido-amarillo / incoloro - verde chiaro-giallo / incolor - verde pálido-amarelo / άχρωμο - ανοιχτό πράσινο-κίτρινο / färglös - ljusgrön-gul / farvelos - lysegrøn-gul / bezbarwny - jasno zielony-żółty	rose / pink / rosa / różowo / lyserad / różowy
VP	sodium pyruvate / Natriumpyruvat / piruvato sódico / piruvato di sodio / Piruvato de sódio / πηρουβικό νάτριο / natriumpyruvat / pirogronian sodu	1,9	production d'acétoine / acetoin production / Acetoinbildung / producción de acetoina / produzione di acetoina / Produção de acetoina / παραγωγή ακετοίνης / acetoinbildung / acetoindannelse / wytwarzanie acetoiny (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min / VP 1 + VP 2 / 10 λεπτά incolore - rose pâle / colorless - pale pink / farblos - blassrosa / Incoloro / rosa pálido / incolore - rosa chiaro / Incolor / rosa - pálido / Άχρωμο / ανοιχτό ρόδινο / färglös - ljusrosa / farvelos - bleg lyserad / Bezbarwny - blad róžowy	rose - rouge / pink - red / rosa - rot / rosa - rojo / rosa - rosso / rosa - vermelho / ρόδινο - ερυθρό / rosa - rød / lyserad - rød / różowy - czerwony (5)
GEL	Gélatine (origine bovine) / Gelatin (bovine origin) / Gelatine (bovinen Ursprungs) / Gelatina (origen bovino) / gelatina (origine bovina) / Gelatina (origem bovina) / Ζελατίνη (βοείου προέλευσης) / Gelatin (av nöt) / Gelatine (okse-oprindelse) / żelatyna (wołowa)	0,6	Gélatinase (GELatine) / GELatinase / Gelatinase (GELatine) / Gelatinasa (GELatina) / GELatinasi / Ζελατινάση / GELatinas / GELatinase / żelatynaza	non diffusion / no diffusion / keine diffusion / no difusión / nessuna diffusione / não difusão / μη διάχυση / ingen spridning / ingen diffusion / brak dyfuzji	diffusion du pigment noir / diffusion of black pigment / Diffusion der schwarzen Tusche / difusión pigmento negro / diffusione del pigmento nero / difusão do pigmento negro / διάχυση μελανής χρωστικής / spridning av svart pigment / diffusion af sort pigment / dyfuzja czarnego pigmentu
GLU	D-glucose / D-Glukose / D-glucosa / D-glucosio / D-γλυκόζη / D-glukos / D-glukoza	1,9	fermentation - oxydation (GLUcose) / fermentation - oxidation (GLUcose) / Fermentación - Oxidation (GLUkose) / fermentación-oxidación (GLUcosa) / fermentazione - ossidazione (GLUcosio) / fermentação - oxidação (GLUcose) / ζύμωση - οξειδωση (μανιτόλης) / jäsnings - oxidation (GLUkos) / fermentacja - utlenianie (glukoza) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul - azul-esverdeado / κυανό - κυανοπράσινο / blå - blågrön / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune - jaune gris / yellow - greyish yellow / gelb - gelb grau / amarillo/amarillo grisáceo / giallo - giallo grigio / amarelo - amarelo acinzentado / κίτρινο - γκριζωπό κίτρινο / gul - grågul / gul - grågul / żółty - szaro-żółty

LDC	L-lysine / L-Lysin / L-lisina / L-λυσίνη / L-lizyna	1,9	Lysine DeCarboxylase / Lysine Decarboxylase / Lysin DeCarboxylase / Lisina Decarboxilasa / Lisina DeCarboxilasa / Lisina DesCarboxilase / Δεκαρβοξυλάση της Λυσίνης / Lysin-dekarboxylas / dekarboxylaza lizyny	Jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty	rouge - orangé / red - orange / rot - orange / rojo - anaranjado / rosso - arancio / vermelho - alaranjado / ερυθρό - πορτοκαλί / rød - orange / rød - orange / czerwony - pomarańczowy (2)
ODC	L-ornithine / L-Ornithin / L-ornitina / L-ορνιθίνη / L-ornitin / L-ornityna	1,9	Ornithine DeCarboxylase / Ornithine Decarboxylase / Ornithin DeCarboxylase / Ornithina Decarboxilasa / Ornithina DeCarboxilasi / Ornithina DesCarboxilase / Δεκαρβοξυλάση της Ορνιθίνης / Ornithin-dekarboxylas / Ornithin DeCarboxylase / dekarboxylaza ornityny	Jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / amarelo / κίτρινο / gul / żółty	rouge - orangé / red - orange / rot - orange / rojo - anaranjado / rosso - arancio / vermelho - alaranjado / ερυθρό - πορτοκαλί / rød - orange / rød - orange / czerwony - pomarańczowy (2)
CIT	trisodium citrate / Trinatricumcitrat / citrato trisódico / citrato trisódico / Citrato de sódio / κίτρινο τρινάτριο / trinatricumcitrat / cytrynian trisodowy	0,756	utilisation du CITrate / CITrate utilization / CITratverwertung / utilización del CITrato / utilizzazione del CITrato / Utilização do CITrato / Χρήση κίτρινο / CITratanvändning / CITratudnyttelse / wykorzystanie cytrynianu	vert pâle - jaune / pale green - yellow / hellgrün - gelb / verde pálido-amarillo / verde chiaro - giallo / verde pálido - amarelo / ανοιχτό πράσινο - κίτρινο / ljusgrön - gul / lysegrøn - gul / jasno szary - żółty	bleu-vert - bleu / blue-green - blue / blau-grün - blau / azul-verde - azul / blu-verde - blu / azul-esverdeado - azul / κίτρινο-πράσινο - κίτρινο / błękitno-zielony - niebieski / niebieski (3)
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate / Natriumthiosulfat / tiosulfato sódico / tiosulfato di sodio / Tiosulfato de sódio / θειοθειικό νάτριο / natriumthiosulfat / tiosiarzan sodowy	0,075	production d'H <sub>2</sub> S / H <sub>2</sub> S production / H <sub>2</sub> S-Bildung / producción de H <sub>2</sub> S / produção de H <sub>2</sub> S / Προγωγή H <sub>2</sub> S / H <sub>2</sub> S-bildning / H <sub>2</sub> S produktion / wytwarzanie H <sub>2</sub> S	incolore - grisâtre / colorless - greyish / farblos - gräulich / incolore - grisáceo / incolore - grigiastro / incolore - acinzentato / άχρωμο - γκριζωπό / färglös - gråkigt / farveløs - grålig / bezbarwny - szarawy	dépot noir - fin liseré / black deposit - thin line / schwarzer Niederschlag / depósito negro - fin liserado / deposito nero - orlo sottile / depósito negro - orlo fino / μαύρο υπόλειμμα - λεπτή γραμμή / svart avlagring - tunn linje / Activer sort aflejring - tynd stribe / Activer czarny osad - rozplynięta linia
MEL	D-melibiose / D-Melibiose / D-melibiosa / D-melibioso / D-μελιβιόζη / D-melibios / D-melibioza	1,9	fermentation - oxydation (MELibiose) / fermentation - oxidation (MELibiose) / fermentación-oxidación (MELibiosa) / fermentazione - ossidazione (MELibiosio) / fermentação - oxidação (MELibiose) / ζύμωση - οξειδωση (μελιβιόζη) / jäsnung - oxidation (MELibios) / fermentacja - utlenianie (melibioza) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul-esverdeado / κίτρινο - κίτρινοπράσινο / blå - blågrøn / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / κίτρινο / gul / żółty
SAC	D-saccharose / D-sucrose / D-sacarosa / D-saccarosio / D-sacarose / D-σουλκρόζη / D-sukros / D-sucrose / D-sacharosa	1,9	fermentation - oxydation (SACcharose) / fermentation - oxidation (SACharose) / fermentación-oxidación (SACarosa) / fermentazione - ossidazione (SACcarosio) / fermentação - oxidação (SACarose) / ζύμωση - οξειδωση (σουλκρόζη) / jäsnung - oxidation (SACKaros) / fermentacja - utlenianie (sacharosa) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul-esverdeado / κίτρινο - κίτρινοπράσινο / blå - blågrøn / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / κίτρινο / gul / żółty
MEL	D-melibiose / D-melibiosa / D-melibioso / D-μελιβιόζη / D-melibios / D-melibioza	1,9	fermentation - oxydation (MELibiose) / fermentation - oxidation (MELibiose) / fermentación-oxidación (MELibiosa) / fermentazione - ossidazione (MELibiosio) / fermentação - oxidação (MELibiose) / ζύμωση - οξειδωση (μελιβιόζη) / jäsnung - oxidation (MELibios) / fermentacja - utlenianie (melibioza) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul-esverdeado / κίτρινο - κίτρινοπράσινο / blå - blågrøn / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / κίτρινο / gul / żółty
AMY	Amygdaline / Amygdalin / amigdalina / αμυγδαλίνη / amygdalin /	0,57	fermentation - oxydation (AMYgdaline) / Fermentation - Oxidation (AMYgdalin) / fermentación-oxidación (AMYgdalina) / fermentazione - ossidazione (AMIGdalina) / Fermentação - oxidação (AMIGdalina) / ζύμωση - οξειδωση (αμυγδαλίνη) / jäsnung / oxidation (AMYgdalin) / fermentacja / utlenianie (amigdalina) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul-esverdeado / κίτρινο - κίτρινοπράσινο / blå - blågrøn / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / κίτρινο / gul / żółty
ARA	L-arabinose / L-arabinosa / L-arabinosio / L-αραβινόζη / L-arabinos / L-arabinoza	1,9	fermentation - oxydation (ARAbinose) / fermentaion - oxidation (ARAbinose) / fermentación-oxidación (ARAbinosa) / fermentazione - ossidazione (ARAbinosio) / fermentação - oxidação (ARAbinose) / ζύμωση οξειδωση (αραβινόζη) / jäsnung - oxidation (ARAbinos) / fermentacja - utlenianie (arabinoza) (4)	bleu - bleu-vert / blue - blue green / blau - blau-grün / azul - azul verdoso / blu - blu-verde / azul-esverdeado / κίτρινο - κίτρινοπράσινο / blå - blågrøn / blå - blågrøn / niebieski - niebiesko-zielony	jaune / yellow / gelb / amarillo / giallo / κίτρινο / gul / żółty
OX	(voir notice du test oxydase) / (see oxidase test package insert) / (siehe Arbeitsanleitung des Oxidase-Tests) / (ver ficha técnica del test de oxidasa) / (vedere scheda tecnica del test ossidasi) / (consultar o folheto informativo do teste oxidase) / (δείτε εσωκλειστο οδηγίων της εξέτασης οξειδάσης) / (se bupacksedel for oxidastest) / (se indlægseddell for oxidase-test) / (przeczytać instrukcję do testu oksydazy)		cytochrome-Oxydase / Cytochrom OXidase / citocromo-OXidasa / citocromo-Ossidasi / Citocromo-Oxidase / οξειδάση του κυτοχρώματος / cytochrom-Oxidase / cytochrom-Oxidase / oksydaza cytochromowa	(voir notice du test oxydase) / (see oxidase test package insert) / (siehe Arbeitsanleitung des Oxidase-Tests) / (ver ficha técnica del test de oxidasa) / (vedere scheda tecnica del test ossidasi) / (consultar o folheto informativo do teste oxidase) / (δείτε εσωκλειστο οδηγίων της εξέτασης οξειδάσης) / (se bupacksedel for oxidastest) / (se indlægseddell for oxidase-test) / (przeczytać instrukcję do testu oksydazy)	