

Université MUSTAPHA Stambouli  
Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي  
معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

*Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire*

## Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Microbiologie

Intitulée

### Appréciation quantitative du risque sanitaire lié au Vibrio cholérique.

*Présentée par : M<sup>me</sup> HAMDI Amina*

**Le 11/03/2023**

Devant le jury :

Président	M <sup>r</sup> MEDDAH Boumediene	Professeur	Université de M.S. de Mascara
Directrice de thèse	Mme TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université M.S. de Mascara
Examineur	M <sup>r</sup> MARROKI Ahmed	Professeur	Université de de Sidi Bel Abbès
Examinatrice	Mme Benfreha Hamida	MCA	Université M.S. de Mascara
Examinatrice	Mme CHELLI Nadia	MCA	Université M.S. de Mascara
Examinatrice	Mme DEBIB Aicha	MCA	Université de Tipaza

Année Universitaire : 2022-2023

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

## Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Microbiologie

Intitulée

**Appréciation quantitative du risque sanitaire lié au  
vibrio cholérique.**

*Présentée par : M<sup>me</sup> HAMDI Amina*

**Le 11/03/2023**

Devant le jury :

Président	M <sup>r</sup> MEDDAH Boumediene	Professeur	Université de M.S. de Mascara
Directrice de thèse	Mme TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université M.S. de Mascara
Examineur	M <sup>r</sup> MARROKI Ahmed	Professeur	Université de de Sidi Bel Abbès
Examinatrice	Mme Benfreha Hamida	MCA	Université M.S. de Mascara
Examinatrice	Mme CHELLI Nadia	MCA	Université M.S. de Mascara
Examinatrice	Mme DEBIB Aicha	MCA	Université de Tipaza

**Année Universitaire : 2022-2023**

## **REMERCIEMENTS**

Avant tout je remercie mon DIEU tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage, la patience, l'esprit, et le savoir, et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans le Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS), sous la direction du Professeur **Mme TIR TOUIL Aicha**.

Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse, **Mme TIR TOUIL Aicha**, Professeur, à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité et pour son écoute attentive, sa compréhension, et la confiance qu'elle m'a toujours accordée.

Le grand merci à **Mr MEDDAH Boumediene**, Professeur à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, pour avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Mr MARROKI Ahmed**, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbes, **Mme Benfreha Hamida** Maitre de conférences, à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, **Mme CHELLI Nadia**, Maitre de conférences à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara et **Mme DEBIB Aicha**, Maitre de conférences à l'Université de Tipaza, pour m'avoir honoré par leur présence en acceptant d'être les examinateurs de ce travail.

J'adresse mes remerciements à **Mme MOKHTAR Meriem**, Docteur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem-Algérie pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire, pour ses conseils pertinents durant mon travail de thèse et afin de réaliser et d'interpréter les analyses chromatographiques HPLC-DAD-ESI-MS.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de la Faculté SNV, Université de Mascara, pour leurs aides, leurs gentillesse et leurs disponibilités.

## **DEDICACES**

*C'est avec mon énorme plaisir, un cœur ouvert et une joie immense, que je dédie ce modeste travail tout d'abord à ma chère maman pour son amour, les sacrifices et les encouragements qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*À la mémoire de mon père Mohamed EL Habib.*

*A mon mari, qui par sa compréhension, son aide et ses encouragements, a soutenu sans cesse mes efforts durant la réalisation de ce travail.*

*A mes chers enfants : Sanna, Sara et Mohamed.*

*A mon cher frère : Mahdi*

*A mes chères sœurs : Kheira et Souad.*

*A mon neveu : Youcef.*

*A mes nièces : Nihed, Nesrine, Sabrine, Souha.*

*A mes beaux-parents, beaux-frères et belles sœurs, merci pour vos encouragements.*

*A tous mes collègues de la promotion avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés durant ces années, surtout mon collègue CHABANE Mahmoud Adel.*

Remerciements

Dedicaces

Table Des Matieres

Listes Des Tableaux

Listes Des Figures

Listes Des Photos

Listes Des Abreviations

**Introduction**..... 1

**Synthèse bibliographique**

**Chapitre I : Risques sanitaires liés aux *Vibrio cholerae***

I. Définition d'un risque sanitaire ..... 3

I. 1 Risques biologiques ..... 3

I. 2 Risques chimiques ..... 3

I. 3 Gestion des risques ..... 3

I. 3 .1 Différents types d'actions pour diminuer le risque..... 4

I. 4 Risques biologiques liés à l'environnement aquatique..... 4

I.5. Caractérisation et description des *Vibrios* ..... 4

I.5. 1 Morphologie et structure des *Vibrios* ..... 5

I.5.2 Caractères biochimiques ..... 5

I.5.3 Taxonomie moléculaire ..... 6

I.6 *Vibrio cholerae* ..... 6

I.6.1. Classification et Sérogroupes de *V. cholerae* ..... 7

I.6.2. Structure du génome ..... 7

I.6 .3 Ecologie de *V. cholerae*, une bactérie environnementale ..... 8

I.6.4 Pouvoir pathogène et toxigène des *V. cholerae* ..... 9

I.6.4 .1 Facteurs de virulence « majeurs » chez *V. cholerae* ..... 9

I.6.4 .2 Facteurs de virulence « accessoires » chez *V. cholerae*..... 11

I.6.5. Dose infectante et concentration..... 12

I. 6. 6 Choléra..... 13

I.6.6.1. Définition..... 13

I.6.6.2. Transmission..... 13

I.6.6.3. Facteurs de risque ..... 14

I.6.6.4 Manifestations cliniques ..... 14

I.6.6.5 Choix des antibiotiques de lutte..... 15

---

I.6.7 Résistance de <i>V.cholerae</i> .....	15
I.6.8 Réservoir et sensibilité.....	16
I. 7 <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 et non-O139.....	16
I.7.1 Maladies et infections .....	16
I.7.2 Facteurs de pathogénicité des <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 et non-O139.....	16
I.7.3 Voies d'exposition et dose infectante .....	17
I.8 Autres espèces de <i>Vibrio</i> .....	17

**Chapitre II : *Atriplex halimus* source de polyphénols**

II.1 Définition .....	19
II.2 Origine et diffusion .....	19
II.2.1 <i>Atriplex</i> en Algérie.....	19
II.3 Caractéristiques .....	19
II.4 Description botanique de l' <i>A. halimus</i> .....	20
II.5 Position systématique.....	20
II.6 Composition chimique .....	21
II.7. Applications des <i>Atriplex halimus</i> .....	22
II.7.1. En thérapie.....	22
II.7.2. Activité biologique.....	23
II.7.3. Intérêt fourrager.....	23
II.7.4. Phytoremédiation .....	23
II.7.5. Intérêts écologiques.....	24
II.8. Richesse des halophytes en composés phénoliques .....	24
II.8.2 Classification.....	25
II.8.2.1 Acides-phénoliques .....	26
II.8.2.2 Flavonoïdes .....	27
II.8.2 .3 Coumarines.....	27
II.8.2.4 Stilbènes .....	28
II.8.2.5 Tanins .....	28
II.8.2.6 Lignanes et les lignines .....	28
II.8.3 Facteurs modifiants la teneur en polyphénols .....	28
II.8.4 Solubilité des composés phénoliques .....	28
II.8.5 Activités biologiques des polyphénols .....	29
II.8.6 Polyphénols et autres pathologies .....	29
II.8. 7 Pouvoir antimicrobien des polyphénols contre une large gamme de pathogènes humains.....	29

---

**Chapitre III : Lactobacilles autant que probiotiques**

III .1 Définition des probiotiques.....	31
III .2 Modes d'action des probiotiques .....	31
III .3 Évaluation des micro-organismes probiotiques .....	32
III .4 Conditions de l'appellation d'une souche un probiotique.....	32
III .5 Effets santé attribués aux probiotiques .....	33
III .5.1 Effets immunologiques des probiotiques .....	33
III .5.2 Effets non immunologiques des probiotiques.....	33
III .5.3 Effets santé des probiotiques sur le stress oxydant .....	33
III .5.4 Propriétés antivirales.....	34
III .5.5 Propriétés antibactériennes .....	34
III .6 Types de microorganismes probiotiques.....	35
III .7 Criblage des probiotiques potentiels par des tests <i>in vitro</i> .....	36
III .8 Les bactéries lactiques .....	36
III .8.1 Connaissances générales .....	36
III .8.2 Niche écologique .....	37
III .8.3 Classification.....	38
III .8.4 Domaine d'utilisation.....	38
III .8.5 Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques .....	39
III .8.5 .1 Acides organiques .....	39
III .8.5.2 Reutéline .....	39
III .8.5.3 Bactériocine .....	40
III .8.5.4 Peroxyde d'hydrogène .....	40
III .8.5.5 Dioxyde de carbone .....	40
III .9 Les lactobacilles.....	40
III .9. 1 Généralité.....	40
III .9.2 Habitat.....	41
III .9.3 Description des Lactobacilles .....	41
III .9.4 Classification des lactobacilles .....	41
III. 10 Distinction entre prébiotiques et probiotiques .....	41
III. 11 Mécanismes d'action des prébiotiques .....	42

**Partie expérimentale**

**Chapitre I : Matériel et méthodes**

I. Objectif du travail.....	43
II. Matériel .....	44

---

II .1 Plante médicinale : <i>Atriplex halimus</i> .....	44
Collecte de la plante <i>A. halimus</i> .....	44
II. 2 Probiotique : <i>Lactobacillus sp</i> .....	45
Origine et collection des échantillons .....	45
III .Méthodes.....	45
III. 1 Recherche et caractérisation de <i>Vibrio cholerae</i> dans l'eau .....	45
III. 1 .1 Condition de prélèvement .....	45
III. 1 .2 Site de prélèvement.....	46
III. 1 .3 Méthode de prélèvement.....	46
III. 1 .4 Analyse physicochimique .....	46
III. 1 .4.1 Mesure de la température.....	46
III. 1 .4 .2 Potentiel d'hydrogène (pH).....	47
III. 1 .5 Etude bactériologique quantitative.....	47
III. 1 .5.1 Numération des <i>Vibrios</i> .....	47
III. 1 .6 Etude bactériologique qualitative.....	47
III. 1 .6 .1 Isolement du <i>Vibrion cholerae</i> .....	47
III. 1 .6.1 Enrichissement dans l'eau peptonée alcaline.....	47
III. 1 .7 Identification des <i>Vibrio cholerae</i> .....	49
III. 1 .7 .1 Identification morphologique de <i>V. cholerae</i> .....	49
III. 1 .7 .2 Identification biochimique de <i>V. cholerae</i> .....	49
III. 1 .7. 3 Identification des souches de <i>Vibrio</i> par galeries API 20 E.....	51
III. 1 .7 . 4 Sérotypage des souches de <i>Vibrion cholerae</i> .....	51
III. 1.8 Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques .....	52
III. 1.8.1 Sélection des souches productrices des bêta-lactamases .....	52
III. 1.9 Croissance de <i>Vibrio cholerae</i> en présence du Sel (NaCl) .....	54
III. 1. 10 Purification et conservation .....	55
III. 2 Etude phytochimique de la plante <i>A. halimus</i> .....	55
III. 2 .1 Extraction des polyphénols .....	55
III. 2 .1.1 Extrait méthanolique .....	55
III. 2 .1.2 Extrait aqueux .....	56
III. 2. 2 Stérilisation es extraits .....	57
III. 2. 3 Détermination des rendements d'extraction.....	57
III. 2. 4 Détermination du pH pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux .....	57
III. 2. 5 Analyses phytochimiques qualitatives .....	57
III. 2. 5. 1 Détection des flavonoïdes .....	57

---

III. 2. 5. 2 Test des saponosides .....	58
III. 2. 5. 3 Test des tannins.....	58
III. 2. 5. 4 Test des polyphénols.....	58
III. 2. 5. 5 Test des alcaloïdes .....	58
III. 2. 5. 6 Test des composés Anthracéniques.....	58
III. 2. 5. 7 Test des stérois/ terpénoïdes .....	58
III. 2. 5. 8 Test des sucres réducteurs.....	58
III. 2. 6 Analyses phytochimiques quantitatives .....	59
III. 2. 6.1 Détermination de la teneur totale en composés phénoliques .....	59
III. 2. 6.2 Dosage des flavonoïdes.....	59
III. 2. 6.3 Teneur en tanins condensés.....	60
III. 2. 7 Techniques chromatographiques.....	61
III. 2. 7.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	61
III. 2. 7.2 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) .....	61
III. 2. 8 Détermination de la teneur en éléments minéraux d' <i>Atriplex halimus</i> .....	62
III. 2. 9 Evaluation de l'activité anti-oxydante .....	63
III. 2.10 Détermination de IC50.....	64
III.3 Le probiotique : <i>Lactobacillus</i> sp.....	64
III.3.1 Isolement des souches .....	64
III.3.2 Purification des isolats de bactéries lactiques .....	65
III.3.3 Identification des lactobacilles.....	65
III. 3.3.1 Etudes des caractères morphologiques.....	65
III.3.3.2 Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	66
III. 3.4 Conservation .....	66
III.3.4.1 Conservation à court terme .....	66
III.3.4.2 Conservation à long terme .....	67
III.3.5 Détermination du potentiel probiotique des lactobacilles .....	67
III.3.5.1 Résistance au pH acide .....	67
III. 3.5.2 Tolérance aux sels biliaires .....	67
III.3.5.3 Test d'auto-agrégation .....	68
III.3.5.4 Test d'hydrophobicité.....	68
III. 3.5.5 Etude de l'antibiorésistance .....	68
III. 4 Révélation de potentiel antibactérien des extraits de <i>Atriplex halimus</i> vis-à-vis <i>V.cholerae</i> .....	69
III. 4. 1 Méthode de diffusion par disque.....	69
III. 4. 2 Détermination des paramètres antibactériens.....	69

---

III. 4. 2.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .....	69
III. 4. 2.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	70
III. 4. 2. 3 Le rapport CMB/CMI .....	71
III. 4. 3 Méthode par « bioautographie » .....	71
III. 5 Etude des interactions bactériennes entre le probiotique et Vibriion cholérique .....	71
III. 5 .1 Méthode directe de Tagg et Mc Given (1971) .....	71
III. 5 .2 Méthode indirecte .....	72
III.6 Détermination de l'activité antibactérienne de l'association des extraits <i>d'Atriplex halimus</i> et de <i>Lactobacillus. sp</i> contre <i>V.cholerae</i> .....	73
III.6. 1 Méthode de diffusion par puits (test préliminaire).....	73
III.6 .2 Association des extraits et surnagent de lactobacilles.....	74
IV. Analyse statistique .....	74
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b> .....	
I .1 Analyse physico-chimique des sites de prélèvements .....	75
I .1 .1 Température et pH des eaux analysées.....	75
I .2 Dénombrement des <i>Vibrio</i> .....	76
I .3 Caractérisation des vibrions cholériques .....	76
I .3.1 Isolement et identification .....	76
I .3.1.1 Aspect macroscopique et microscopique.....	77
I .3.1.2 Test d'agglutination.....	78
I .4 Profil de sensibilité des souches .....	80
I .4.1 Production de bêta–lactamases .....	81
I .5 Croissance de <i>Vibrio cholerae</i> en présence du Sel (NaCl) : .....	82
II. Etude phytochimique d' <i>Atriplex halimus</i> .....	82
II. 1. Caractéristiques des extraits .....	82
II. 1.1Extrait méthanolique .....	82
II. 2 Screening phytochimique .....	83
II. 3 Analyses phytochimiques quantitatives .....	84
II. 3 .1 Teneur en poly phénols des deux extraits.....	84
II.4 Détermination des phytoconstituants par chromatographie sur couche mince .....	85
II.5 Identification des molécules bioactives par HPLC .....	87
II .6 Dosage de des sels minéraux <i>d'Atriplex halimus</i> .....	90
II.7 Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d' <i>Atriplex halimus</i> .....	90
III. Isolement et caractérisation des lactobacilles entant que probiotique.....	91
III. 1 Détermination des bactéries lactiques.....	91
III.1.1 Identification des <i>Lactobacillus sp.</i> .....	91

III.1.1.1 Etude des caractères morphologiques .....	91
III.1.1.2 Caractérisations physiologiques et biochimiques .....	92
III.1. 2 Evaluation du potentiel probiotique des lactobacilles.....	93
III.1. 2.1 pH.....	93
III.1. 2.2 Sels biliaires .....	94
III.1. 2.3 Hydrophobicité .....	95
III.1. 2.4 Auto agrégation.....	96
III.1. 2.5 Antibiorésistance des lactobacilles .....	96
IV Evaluation du potentiel antibactérien des extraits de plante et de <i>Lactobacillus</i> sp .....	97
IV .1 Activité antibactérienne des extraits de la plante <i>Atriplex halimus</i> .....	97
IV .1.1 Déterminations des diamètres des zones d'inhibition.....	97
IV .1.2 Détermination des CMI par la méthode de microdilution .....	99
IV .1. 3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	102
IV .1. 4 Le rapport CMB/CMI .....	103
IV .1. 5 Méthode par « bioautographie » .....	104
IV.2 Etude des interactions entre <i>Lactobacillus</i> sp et la souche <i>Vibrio cholerae non o1</i> .....	105
V. Détermination de l'activité antibactérienne de l'association des extraits d' <i>Atriplex halimus</i> et de <i>Lactobacillus. sp</i> contre <i>V.cholerae</i> .....	106
V. 1 Effets de l'association des extraits et <i>Lactobacillus</i> sp. contre <i>V.cholerae</i> .....	107
V. 2 Association des extraits et surnagent de lactobacilles.....	108
<b>Conclusion</b> .....	109
Références bibliographiques .....	109
Annexe .....	
Résumé	

Tableau N0	Titre	page
01	Caractères biochimiques des vibrios.	06
02	Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d' <i>A.halimus</i> .	22
03	Structure des squelettes des polyphénols.	25
04	Principales espèces utilisées comme probiotiques.	35
05	Origine des sites des différents prélèvements d'eau dans la région de Mascara	45
06	Tests d'identification des <i>Vibrio cholerae</i> .	50
07	Antibiotiques utilisés.	52
08	Valeurs moyennes de pH et température des stations analysées.	75
09	Concentrations des <i>Vibrio sp</i> dans les prélèvements hydriques.	76
10	Nombre et fréquence d'isolement des <i>Vibrio sp</i> dans les différents sites d'eaux analysées.	78
11	Screening phytochimique des deux extraits.	83
12	Teneurs de l'extrait méthanolique et aqueux d' <i>A. halimus</i> en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés.	84
13	Rapports frontaux des extraits et des témoins.	85
14	Identité des métabolites secondaires dans l'extrait méthanolique de <i>l'Atriplex halimus</i> .	88
15	Identité des métabolites secondaires dans l'extrait méthanolique de <i>l'Atriplex halimus</i> .	88
16	Composition en quelques éléments minéraux des feuilles de l' <i>Atriplex halimus</i> .Screening phytochimique des deux extraits.	89
17	Caractéristiques phénotypiques et physiologiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i> .	92
18	Caractérisation des souches de <i>Lactobacillus</i> basée sur le critère de fermentation des sucres.	92
19	Viabilité (log UFC) des souches de <i>Lactobacillus sp</i> à pH faible d'une part et en présence de 0,3% bile d'une autre part.	93
20	Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Lactobacillus sp</i> .	96
21	Valeurs moyennes (moyenne $\pm$ SD de trois essais) des paramètres antibactériens des extraits sur <i>Vibrio cholerae non o1</i> .	101
22	Résultats de Bioautographie des composés isolés de <i>d'Atriplex halimus</i> .	104
23	Diamètre de la zone d'inhibition de la culture et surnagent des lactobacilles vis à vis <i>Vibrio cholerae non o1</i> .	104
24	Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des associations entre les extraits et le surnagent de lactobacilles.	106
25	Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des associations entre les extraits et le surnagent de lactobacilles.	107

Figure N°	Titre	Page
01	Biotype et sérotype de <i>Vibrio cholerae</i> .	07
02	Pentamère de toxine cholérique B de <i>Vibrio cholerae</i>	09
03	Description du rôle du TCP (Toxin coregulated pilus) de <i>V. cholerae</i> , un exemple de pilus de type IV.	10
04	Mécanisme d'action des vibrions cholériques.	15
05	Représentation <i>Atriplex halimus</i> .	20
06	<i>Atriplex halimus</i> .	21
07	Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.	26
08	Structures des acides benzoïque et cinnamique.	27
09	Structure de base des flavonoïdes	27
10	Les principaux mécanismes d'action des probiotiques	32
11	Inhibition des bactéries pathogènes par les probiotiques	34
12	Voix de fermentations des hexoses chez les bactéries lactiques	37
13	Application des bactéries lactique dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie	38
14	Localisation des sites de prélèvements d'eaux dans la wilaya de Mascara et ses Communes.	44
15	Carte de situation géographique de Bouhanifia.	
16	Méthode de laboratoire pour le diagnostic du <i>V.cholerae</i>	48
17	Protocole de sérotypage des souches de <i>Vibrion cholerae</i> .	51
18	Protocole d'isolement, identification et antibiorésistance des <i>Vibrio cholerae</i> .	54
19	Procedure d'extraction méthanolique	56
20	Procedure de macération aqueuse	56
21	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	59
22	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	60
23	Courbe d'étalonnage de la catéchine.	60
24	Protocole de dosage des sels minéraux.	63
25	Forme libre et réduite du DPPH.	64
26	Technique de détermination des CMI par la méthode de microdilution	70
27	Schéma récapitulatif de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis-à-vis <i>Vibrio cholerae</i> .	73
28	Taux de bactéries isolées exprimé par famille bactérienne	77
29	Pourcentage des souches de <i>Vibrio</i> isolées.	77
30	Pourcentage de résistance des souches <i>Vibrio cholerae</i> aux antibiotiques.	80
31	Chromatogramme typique de l'extrait méthanolique réalisé par HPLC-DAD..	87
32	Chromatogramme typique de l'extrait aqueux réalisé par HPLC-DAD..	87
33	Pourcentage d'hydrophobicité.	95
34	Pourcentage d'auto-agrégation.	95
35	Effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de l' <i>Atriplex halimus</i> sur les différentes souches.	97
36	Cinétique de croissance des souches <i>Vibrio cholerae non o1</i> en présence de l'extrait aqueux (à droite) et l'extrait méthanolique (à gauche) à différentes concentrations.	100

---

<b>Photo N0</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	<i>Atriplex halimus.</i>	44
<b>02</b>	Aspect macroscopique et microscopique après coloration de Gram de <i>V.cholerae non 01.</i>	78
<b>03</b>	Détermination des bêta –lactamases.	82
<b>04</b>	Chromatographie sur couche mince des extraits de la plante <i>Atriplex halimus.</i>	86
<b>05</b>	Aspect macroscopique et microscopique après coloration de Gram de <i>Lactobacillus sp.</i>	91
<b>06</b>	Effet antibactérien de l'extrait aqueux (A) et l'extrait méthanolique (B) d' <i>A.halimus</i> sur <i>V.cholerae.</i>	98
<b>07</b>	Action de l'extrait méthanolique et aqueux d' <i>Atriplex halimus</i> sur la croissance <i>in vitro</i> de la souche <i>Vibrio cholerae 2 et4</i> respectivement.	102
<b>08</b>	Bioautographie des extraits de <i>l'Atriplex halimus</i> contre <i>Vibrio cholerae.</i>	103
<b>09</b>	Evaluation de l'activité antibactérienne de surnageant de <i>Lactobacillus sp.</i>	105
<b>10</b>	Synergie entre l'extrait méthanolique de <i>Atriplex halimus</i> et le surnagent de la souche <i>Lactobacillus brevis</i> contre la souche <i>V.cholerae.2.</i>	108

---

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>Ca</b>	Ion de calcium
<b>CASFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>Cm</b>	Centimètre
<b>CMB</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DPPH</b>	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>EAG</b>	Equivalent d'acide gallique
<b>EC</b>	Equivalent cathéchine
<b>EQ</b>	Equivalent Quercétine
<b>EPS</b>	Exopolysaccharides
<b>EPSA</b>	Eau peptonée salée hyper alcaline
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer (III)
<b>GNAB</b>	Gélose nutritive alcaline biliée
<b>h</b>	Heure
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Eau oxygénée
<b>HCl</b>	Chlorure d'hydrogène
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Acide nitrique
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration équivalente à 50% de DPPH
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion de Potassium

---

<b>Log</b>	Logarithme
<b>LAB</b>	Lactobacilles
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>mg</b>	Miligramme
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>N</b>	Normalité
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion de Sodium
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Ion ammonium
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Ammoniaque
<b>OH</b>	Fonctions hydroxyles
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PBS</b>	Solution tampon phosphate
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>Rd</b>	Rendement
<b>TCBS</b>	Thiosulfate-Citrate-Bile Sodium
<b>UFC</b>	Unité formant colonie
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>VNC</b>	Viables non cultivables

---

# *INTRODUCTION*

A travers le monde, de nombreuses maladies infectieuses dont souffrent les hommes et les animaux sont d'origine hydrique. L'environnement aquatique constitue l'habitat naturel pour les bactéries du genre *Vibrio*. L'espèce la plus redoutable en santé publique est *Vibrio cholerae* (Tamatcho Kweyan *et al.* , 2009). Cette espèce survit à l'état libre dans les rivières, les estuaires et les eaux continentales du monde entier ou en association avec les crustacés, le phytoplancton et le poisson. *Vibrio cholerae* inclut les isolats appartenant aux sérogroupes O1 et O139 et les vibrions non O1, non O139 (Tiekoura Konan *et al.* , 2010). *Vibrio cholerae non O1* et *non O139* sont responsables de gastroentérites, de lésions cutanées, d'otites et de septicémie.

En 2018, l'Algérie a recensé cent personnes contaminées par le choléra, et les analyses ont confirmé la contamination des eaux par la bactérie *Vibrio cholerae*. La pression de sélection exercée par l'usage des antibiotiques a favorisé l'émergence de souches de *Vibrio cholerae* résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays aussi bien en Afrique que dans d'autres continents (Anné *et al.* , 2008).

Ces souches constituent une menace directe pour la santé humaine et l'environnement. Pour limiter et minimiser ces risques et gérer la propagation de germes multirésistants aux antibiotiques chimiques, de nombreuses recherches ont ciblé l'utilisation des probiotiques qui sont des micro-organismes utiles. Leur présence permet notamment de contrer la prolifération des micro-organismes nuisibles qui peuvent provoquer des maladies. Les bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur le développement de microorganismes pathogènes et la synthèse de toxines (Ishibashi et Yamazaki ., 2001). ( Liao , Nyachoti ., 2017)

D'autre part les plantes médicinales ont toujours joué un rôle vital important dans la phytothérapie, et sont à considérer comme des médicaments à part entière, avec tous les bénéfices qu'elles peuvent apporter par de nouvelles molécules bioactives. Contrairement aux médicaments de synthèse, la plante médicinale n'apporte pas seulement un principe actif, mais une multitude de composés aux effets thérapeutiques complémentaires (Gbohaïda *et al.*, 2015), exerçant une activité biologique importante : inflammatoire, anti-cancérogène, anti-oxydante, antifongique et antibactérienne (Epifano., 2007)

Parmi ces plantes *Atriplex halimus* est la plante autochtone la plus représentée sur le pourtour méditerranéen. C'est une plante halophyte existant dans les zones steppiques algériennes (Nedjmi., 2010), cette espèce est un arbuste fourrager autochtone qui tolère bien les conditions d'aridité (sécheresse, salinité) (Souayah *et al.* , 1998)

En Algérie, *Atriplex halimus* est spontanée dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides, connue pour son potentiel antimicrobien et appliquée en thérapeutique pour traiter diverses infections (Emam ., 2011). Cette espèce est utilisée en pharmacopée traditionnelle pour des fins thérapeutiques, principalement pour soigner l'hyperglycémie (Nedjmi., 2010)

La présente étude a pour objectif d'apprécier les risques sanitaires lié au germe pathogène *Vibrio cholerae* afin de les gérer par évaluation de l'effet des outils biologiques naturels; les polyphénols issus de la plante médicinale *Atriplex halimus* d'une part et d'autre part l'effet d'un probiotique (lactobacille), ensuite l'association des deux comme moyen de lutte contre les vibrions cholériques et des alternatifs à l'antibiothérapie. Dans ce contexte

La première partie a porté sur une synthèse bibliographique faisant rappel à trois chapitres .Après une présentation des risques sanitaires liés aux Vibrions cholériques, le second chapitre est consacré à la description de la plante médicinale *Atriplex halimus* suivie par un rappel sur les polyphénols comme substances bioactives .Le dernier chapitre résume les principales caractéristiques de lactobacilles comme probiotique .

La deuxième partie expérimentale est consacrée à :

Premièrement une appréciation de risque sanitaire lié au *Vibrio cholerae* par une étude microbiologique ciblant la recherche, isolement de *Vibrio cholerae* dans l'environnement hydrique.

Caractérisation de *Lactobacillus sp* comme probiotique.

Une étude phytochimique permettant de valoriser la plante médicinale *Atriplex halimus* vu son importance biologique et médicale, par l'extraction de ses polyphénols et une analyse qualitative et quantitative de ces molécules bioactives, étude de son pouvoir antioxydant et détermination de son teneurs en sels minéraux.

La dernière étude vise à tester le potentiel antibactérien des polyphénols de *Atriplex halimus* sur la prolifération de l'agent causal de choléra et l'action des probiotiques sur ce pathogène, ensuite l'effet de l'association et la combinaison à la fois des extraits et de probiotique sur cette bactérie pathogène. Les résultats obtenus sont interprétés et discutés à la lumière de la littérature .Enfin cette thèse est clôturée par une conclusion et des perspectives.

# *SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*

***CHAPITRE I***  
***RISQUES SANITAIRES LIÉS AUX VIBRIONS***  
***CHOLÉRIQUES***

La santé de la population peut être affectée par plusieurs risques sanitaires, ces risques résultent d'agents infectieux, de produits chimiques, de produits utilisés dans le système de soins, ou de dysfonctionnements des organisations de soins. Le risque dû aux agents infectieux occupe une place importante dans le grand ensemble qu'est le risque sanitaire.

## **I. Définition d'un risque sanitaire**

Le risque sanitaire correspond à la probabilité de survenue d'un problème (expression du danger), défini au sein d'une population donnée, pendant une période déterminée (**Host ., 2006**).

### **I. 1 Risques biologiques**

Les risques biologiques résultent de la manipulation d'organismes biologiques ou de microorganismes naturellement pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites, ou animaux infectés) ainsi que de la manipulation de micro-organismes génétiquement modifiés (pathogène ou non). Les microorganismes ont des effets pathogènes et des virulences très différentes et sont susceptibles d'entraîner des désagréments, voire des maladies graves et/ou létales pour l'être humain, les animaux et les végétaux. (**CUSSTR ., 2009**)

### **I. 2 Risques chimiques**

La pollution chimique est probablement fréquente, il s'agit de contamination par composés inorganiques par exemple : sodium et chlorures, nitrates issus des engrais agricoles, d'effluents domestiques et industriels, métaux lourds, phosphates. Les contaminants organiques comme les détergents et produits phytosanitaires. (**Festy et al ., 2003**)

### **I. 3 Gestion des risques**

Le risque peut être géré de manière préventive, l'action se situe avant l'apparition de conditions défavorables à la santé (principe de prévention). Dans le cas où ces conditions défavorables se sont déjà produites, la gestion consiste à supprimer, limiter ou réparer les risques ou les effets. Enfin, en situation d'incertitudes ou de connaissances insuffisantes mais en cas de suspicion de dommages graves ou irréversibles, c'est le principe de précaution qui s'applique (**Host ., 2006**).

### I. 3.1 Différents types d'actions pour diminuer le risque

Il existe toutefois plusieurs manières de le diminuer afin de préserver les populations et les milieux. Il est d'usage de distinguer trois grands types d'actions :

- La prévention du risque : elle englobe les actions et mesures tendant à empêcher la réalisation du risque.
- La prévision du risque tente d'anticiper la réalisation effective du risque par des procédés scientifiques, afin d'en optimiser la gestion avant, pendant et après la crise. Il s'agit d'un travail à court terme.
- La culture du risque (ou l'éducation du risque) vise à favoriser la prise de conscience du risque par les populations, notamment lorsque la crise survient (**Gleyze ., 2001**).

### I. 4 Risques biologiques liés à l'environnement aquatique

Les maladies d'origine hydrique rencontrées chez l'homme sont liées à des microorganismes pathogènes qui peuvent être des bactéries, des protozoaires, des helminthes, ou des virus. Ces pathogènes, le plus souvent d'origine entérique, peuvent survivre dans l'eau et infecter les humains par ingestion et/ou contact cutanéomuqueux avec des eaux contaminées par des fèces humains ou animaux (**Asano et al ., 2007**). Le risque dépend de la virulence intrinsèque du pathogène, mais aussi de sa capacité à survivre dans un environnement non optimal pour sa croissance (**Drechsel et al ., 2011**). Parmi ces pathogènes on cite les vibrions.

### I.5. Caractérisation et description des *Vibrios*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles Gram (-), mobiles grâce à un flagelle polaire monotriche contenu dans un manchon prolongeant la membrane extérieure, et aussi grâce à des flagelles latéraux péritriches présents chez certaines espèces. Elles sont anaérobies facultatives, capables d'un métabolisme respiratoire et d'un métabolisme fermentatif (**Dominique ., 1993**)

Ces bactéries sont nitrate réductase positives et chimio-organotrophes, fermentant le D-glucose comme source de carbone et d'énergie et utilisant des ions  $\text{NH}_4^+$  comme source d'azote, croissent sur le milieu sélectif TCBS, donnent une réaction oxydase positive et dégradent les glucides par métabolisme fermentaire ce qui permet de les distinguer des *Enterobacteriaceae* qui ont une réaction d'oxydase négative et des *Pseudomonaceae* qui sont aérobies strictes. (**Veron &Popoff., 1989**).

### I.5.1 Morphologie et structure des *Vibrios*

Les bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae* sont des bacilles droits (*Aeromonass spp.*) ou incurvés « en virgule » (*Vibrio spp.*). Ces bacilles ont un diamètre moyen de 0,5  $\mu\text{m}$ , leur longueur est variable. Il est fréquent d'observer à côté de formes longues (4à5 $\mu\text{m}$ ), des formes coccobacillaires trapues (1 à 1,5  $\mu\text{m}$ ) (**Randrianarivelo ., 2010**).

### I.5.2 Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques essentiels pour l'identification conventionnelle des *Vibrio* sont consignés dans le tableau 01 qui fait apparaître des caractères communs aux trois espèces (*V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*) et des caractères distinctifs. Les premiers permettent, dans une démarche de diagnostic bactériologique, de confirmer l'appartenance des isolats aux trois espèces. Ils concernent l'oxydase positive, la lysine décarboxylase positive, la lipase positive et l'arginine dihydrolase négative. Les seconds permettent de différencier les trois espèces entre elles. Ils concernent la fermentation des glucides (saccharose, lactose et arabinose), la croissance en présence NaCl à différentes concentrations (0%, 3 % et 8% NaCl) et la sensibilité au composé vibriostatique O129 (**El Marrakchi., 2012**).



### I.6.1. Classification et Sérogroupes de *V. cholerae*

Les espèces du *V.cholerae* sont classées en sérogroupes sur la base de la nature des glucides qui composent la partie polysaccharidique de leurs antigènes somatiques O. En 2003, il y aurait au moins 206 sérogroupes (Faruque *et al.* , 2006). Seuls les sérogroupes O1 et O139 sont associés aux épidémies et pandémies du choléra. Les souches appartenant aux autres sérogroupes (non O1 et non O139) peuvent provoquer des diarrhées sporadiques, des abcès ou des septicémies, mais ne provoquent pas d'épidémies du choléra (Fournier., 1996).

Parmi les souches du séro groupe O1, on distingue trois sérotypes: Ogawa, Inaba et Hikojima (Figure1). Les souches du séro groupe O1 peuvent être classées en deux biotypes en fonction de quelques caractères phénotypiques : le biotype classique et le biotype El Tor hémolytique (Huss., 2004) (Figure 01)

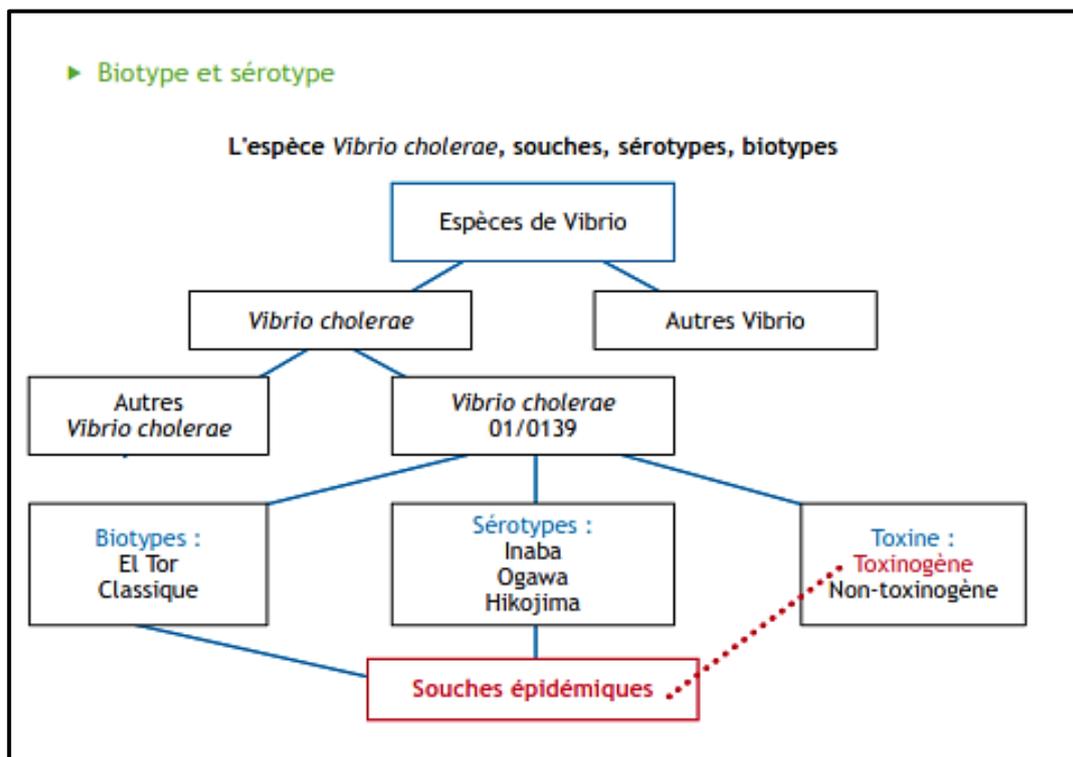


Figure 01 : Biotype et sérotype de *Vibrio cholerae*. (Dunoyer., 2013)

### I.6.2. Structure du génome

D'un point de vue génétique, et contrairement à bon nombre d'autres bactéries, les *Vibrionaceae* présentent la particularité de posséder deux chromosomes circulaires de contenu génétique et de taille dissemblables. Grâce à l'utilisation de la génomique

facilitée notamment par la petite taille des génomes bactériens, ces chromosomes ont été mis en évidence chez les espèces pathogènes pour l'homme par séquençage complet des génomes de *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000)

### I.6 .3 Ecologie de *V. cholerae*

Hôtes naturels du milieu marin. Les *Vibrios* sont présents soit à l'état libre, soit associés à différents supports, sédiments, particules en suspension, plancton. Ils sont également retrouvés dans l'intestin et les tissus des poissons, des crustacés et des coquillages, et sont donc présents naturellement dans la matière première de produits alimentaires (Copin *et al.*).

Les souches impliquées en pathologie humaine peuvent être également isolées d'aliments divers (pommes de terre, œufs, légumes et viandes) ce qui suggère la possibilité d'une contamination d'origine fécale, transitant par les eaux usées d'origine domestique. (Morris., 1990)

Leur densité dans l'environnement marin évolue en fonction de divers facteurs climatiques et environnementaux, tels que la température de surface de l'eau, la salinité, la turbidité, le pH, la chlorophylle A (Copin *et al.*).

Des études, sur des expérimentations en microcosme simulant des environnements marins, estuariens, d'eaux saumâtres ou d'eaux douces, ont permis entre autres de quantifier la relation entre l'abondance de la bactérie et la température de l'eau : il est, en effet, plus fréquent d'isoler la bactérie durant la période chaude. D'autres travaux ont montré que la fréquence d'isolement de la bactérie est également reliée avec la salinité du milieu, avec des valeurs optimales pour des salinités comprises entre 0,2 et 2‰ (Colwell and Huq., 1994)

L'espèce *V. cholerae* peut survivre dans un environnement moins salé que les espèces halophiles, et sa croissance est possible dans un milieu dépourvu en sel.

Son écologie est grandement dépendante des potentialités nutritionnelles du milieu (Singleton *et al.*., 1982).L'association avec des organismes supérieurs joue un rôle déterminant sur sa croissance, sa répartition et sa survie en milieu naturel (Nalin *et al.*., 1979).

#### I.6.4 Pouvoir pathogène et toxino-gène des *V. cholerae*

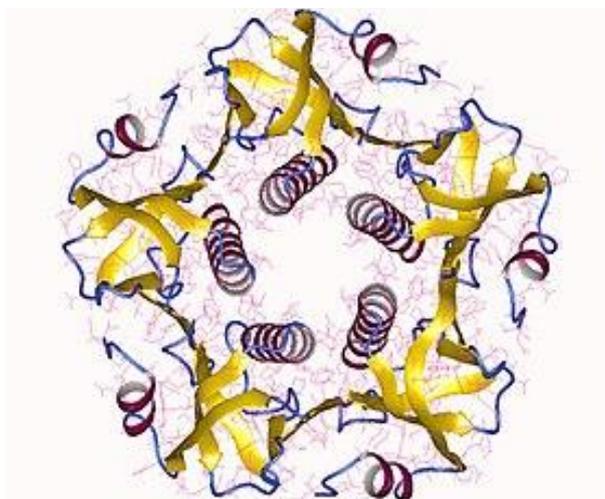
Sur la base de l'antigène O, les vibrions cholériques, sont divisés en deux sérotypes. Le choléra est typiquement associé au sérotype O1, mais le sérotype O139 a aussi été responsable de plusieurs cas de choléra en Asie (**Ministry of Health by ESR, 2001**). Ces sérotypes produisent des facteurs de virulence :

##### I.6.4 .1 Facteurs de virulence « majeurs » chez *V. cholerae*

###### 1. La toxine cholérique

La pathologie due à *Vibrio cholerae* est provoquée principalement par une toxine cholérique CT codée par les gènes *ctxA* et *ctxB* (**Reidl and Klose., 2002**).

Elle est composée de deux sous-unités A et B, codées par deux gènes distincts (*ctxA* et *ctxB*) regroupés dans un même opéron, porté par le prophage transductible CTXD. La sous-unité A, d'un poids moléculaire 27,2 kDa, est impliquée dans l'activité enzymatique toxique et comporte deux domaines, A1 et A2 reliés par un pont disulfure et des interactions non-covalentes. Elle est associée, de façon non-covalente également, à un pentamère de sous-unités B de 11,6 kDa, chacune correspondant au domaine de fixation de la toxine à la cellule cible (Figure 02) (**Labreuche., 2006**).



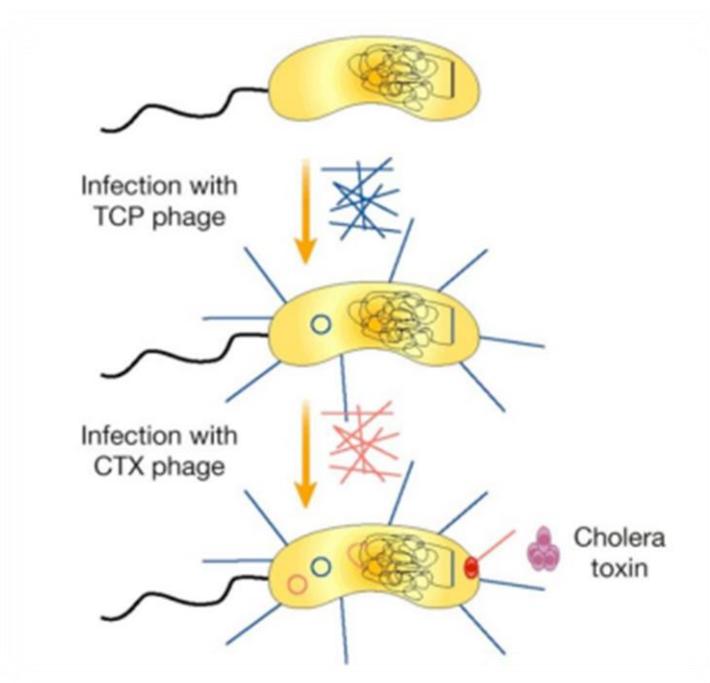
**Figure 02:** Pentamère de toxine cholérique B de *Vibrio cholerae* . (**Williams et al., 2006**)

Des études génétiques ont montré que la souche de *V. cholerae* O139 s'est transformée à partir d'un biotype El Tor (**Faruque et al., 2003**).

## 2. Toxin-Coregulated Pilus (CTP)

Le Toxin-Coregulated Pilus (TCP) est un facteur de virulence majeur dans le processus infectieux de *V. cholerae* : indispensable à la colonisation du tractus intestinal de l'homme (Figure 03) (Tacket *et al.* , 1998) , le TCP sert également de récepteur au bactériophage filamentueux CTX $\Phi$  dont le génome code entre autre la toxine cholérique.

La capacité des souches de *V. cholerae* à provoquer le choléra chez l'homme dépend de la présence, dans leur génome de deux ensembles de gènes appelés îlots de pathogénicité. Le premier, appelé toxin coregulated pilus (TCP), contient les gènes responsables de la synthèse de facteurs permettant la colonisation des muqueuses par *V. cholerae* .Les gènes contenus dans TCP codent en particulier pour la synthèse de filaments bactériens favorisant l'adhésion de la bactérie aux cellules intestinales humaines (Bompangue Nkoko ., 2009).



**Figure 03:** Description du rôle du TCP (Toxin coregulated pilus) de *V. cholerae*, un exemple de pilus de type IV (Donnenberg, 2000)

### I.6.4 .2 Facteurs de virulence « accessoires » chez *V. cholerae*

#### 1. Hémolysine désignée Hly A

Produite par *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* et des souches non O1. Sont capables de produire une toxine hydrosoluble cytolytique qui a été désignée Hly A ou hémolysine *El Tor*. Cette hémolysine pourrait bien jouer un rôle dans la pathogénie des gastro-entérites causées par des souches de *Vibrio cholerae* (El Marrakchi., 2012).

#### 2. Capsule

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, certaines bactéries sécrètent une capsule généralement constituée de polysaccharides peu solubles s'accumulant autour de la paroi (CPS), Chez *V. cholerae* l'opéron wbf codant le sérotype O139 pathogène à l'origine d'épidémies, code également une capsule polysaccharidique impliquée dans les mécanismes de colonisation (DE Decker., 2010).

#### 3. Biofilm bactérien chez *V. cholerae*

Le biofilm se définit comme une population de bactéries adhérant à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS). La première étape de la formation du biofilm passe par la synthèse d'EPS qui apportera plasticité au biofilm, résistance aux agents antimicrobiens, à la phagocytose, aux espèces oxygénées réactives et à des conditions nutritives limitantes. Il semblerait donc que la régulation du biofilm chez *V. cholerae* participe activement à la pathogénèse. (Labreuche., 2006)

La capacité à former des biofilms est répandue parmi les vibrions et joue un rôle important dans la pathogénicité de *V. cholerae* (Faruque *et al.* , 2006)

#### 4. Lipopolysaccharide

Dans le cas de *Vibrio cholerae*, les lipopolysaccharide (LPS) et plus particulièrement l'antigène O sont considérés comme des facteurs de virulence puisqu'ils sont, tout d'abord la base de la désignation des sérogroupes auxquels sont associés les caractères virulents et cholériques de la bactérie (Waldor et Colwell ., 1994). De plus, le LPS joue le rôle de facteur d'adhésion dans la colonisation intestinale. Le fait remarquable est que la

composition antigénique du sérotype O139 est différente du sérotype O1, ce qui rend les deux sérotypes immunologiquement distincts (**Faruque et al., 2006**)

Des travaux de génétique bactérienne ont montré que *V. cholerae* O139 résulte d'un transfert de matériel génétique d'une souche de *V. cholerae non-O1*, ne produisant pas la toxine cholérique, à une souche de *V. cholerae* O1, produisant la toxine cholérique. Ce transfert a provoqué la modification de la structure chimique du lipo-polysaccharide de la souche réceptrice, et donc la conversion du sérotype O1 en sérotype O139, alors que cette souche gardait sa capacité à produire la toxine cholérique et donc à provoquer le choléra. *V. cholerae* O139 possède de plus une capsule polysaccharidique, dont la structure de base est identique à celle de la partie polysaccharidique spécifique du lipopolysaccharide O139. (**Quilici., 2011**)

#### **I.6.5. Dose infectante et concentration**

La dose infectante, c'est la quantité de bactéries requise pour que la maladie se développe, est liée à l'état de santé de la personne et au métabolisme de son estomac.

La dose infectieuse, déterminée expérimentalement, est de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{11}$  bactéries (**Cash et al., 1974**). L'acidité gastrique est peu propice à la survie de la bactérie dans l'estomac. Lorsque les vibrions cholériques sont inclus dans des aliments ou que l'acidité gastrique a été neutralisée par une solution de bicarbonate de soude, la dose infectieuse est de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  bactéries seulement. Après le passage de la barrière gastrique, les vibrions se fixent dans la partie proximale de l'intestin grêle, traversent la couche de mucus et sécrètent la toxine cholérique.

-La dose à laquelle 50 pour cent des personnes sont infectées est d'environ  $10^6$  bactéries *V. cholerae*.

-Un seul organisme infecté, par exemple un copépode ou un plancton dans les eaux de surface, peut porter  $10^4$ - $10^6$  bactéries *V. cholerae* et la diarrhée d'apparence « eau de riz » d'une personne contaminée peut contenir  $10^7$ - $10^9$  *V. cholerae* par millilitre (**UNICEF., 2013**)

## I. 6. 6 Choléra

### I.6.6.1. Définition

Le choléra est une maladie diarrhéique causée par des sérogroupes toxigènes de la bactérie *Vibrio cholerae*, qui peut causer une déshydratation rapide et la mort. Le choléra est étroitement associé à la pauvreté, un mauvais assainissement et l'absence d'eau potable saine. Ainsi, le fardeau du choléra est concentré en Afrique et en Asie du Sud, représentant environ 99 % des cas dans le monde entier. Le choléra peut être endémique et provoquer des épidémies. Les bactéries de choléra se propagent par la contamination fécale-orale directe ou l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. (OMS., 2018).

Le choléra se manifeste de façon endémique et sous forme des épidémies :

- **Endémie**

Pays où des cas de choléra ont été signalés au cours de trois des cinq dernières années (OMS) ou sont présents en permanence dans une zone géographique ou un groupe de population donnée.

- **Epidémie**

Pays, endémiques ou non, où le nombre de cas de choléra dans une région donnée ou au sein d'un groupe spécifique de personnes est supérieur aux prévisions pendant une certaine période .

Une « flambée » est plus limitée en termes géographiques et démographiques qu'une « épidémie », qui se caractérise par une ampleur et un degré de propagation plus important (UNICEF., 2013).

### I.6.6.2. Transmission

*Vibrio cholerae* se trouve dans les selles des malades et de certains sujets (porteurs sains) qui constituent alors un des réservoirs du vibrion.

Les patients et les porteurs sains sont hautement contagieux par le vibrion présent dans les selles et les vomissements.

Les personnes infectées peuvent transmettre la bactérie pendant 1 à 4 semaines.

Le choléra est transmis par voie féco-orale à travers :

L'eau et les aliments contaminés : ce sont les principaux modes de transmission.

Les mains sales : transmission directe de personnes à personnes (manuportage) (**Marion et al**)

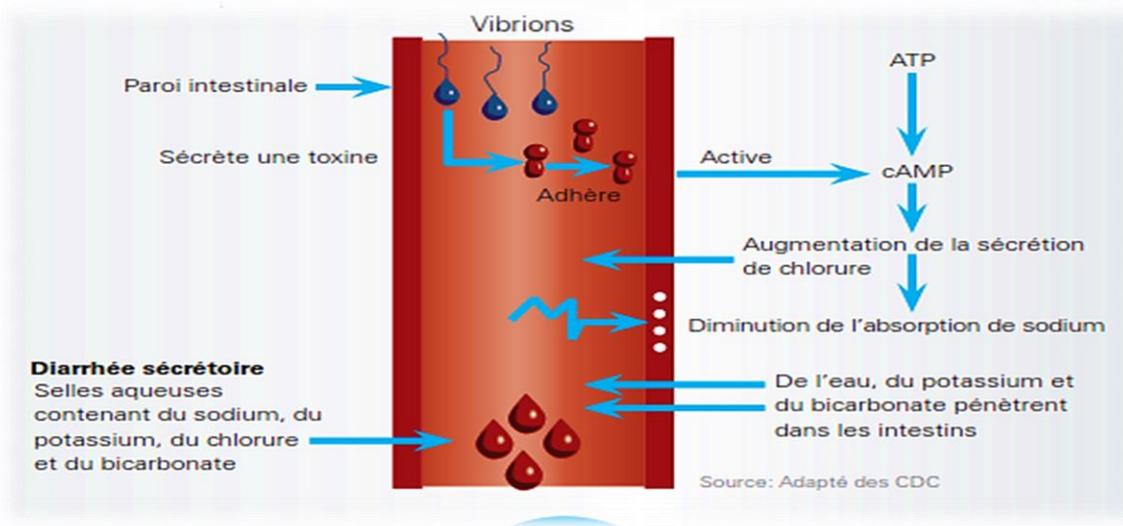
### I.6.6.3. Facteurs de risque

Les facteurs favorisants sont humains et climatiques : pauvreté, conflits armés, catastrophes naturelles (cyclones, inondations), réchauffement des eaux (phénomène El Nino, en particulier en Afrique de l'Est (**Jammy., 2002**).

- Une forte dose infectante ( $10^8$  à  $10^{11}$  vibrions/ml).
- L'insuffisance de l'eau potable dans les agglomérations.
- Les mauvaises conditions d'hygiène sanitaire.
- La forte densité de la population.
- La manipulation des cadavres (**Tubaya ., 2007**).

### I.6.6.4 Manifestations cliniques

Le choléra est une maladie diarrhéique sécrétoire. L'entérotoxine produite par *V. cholerae* O1 et O139 provoque la sécrétion de quantités importantes de liquides et d'électrolytes dans les intestins (Figure04). Cela entraîne rapidement une diarrhée aqueuse, une diminution de la circulation et du volume sanguin, des acidoses métaboliques, une perte de potassium et par la suite un collapsus cardiovasculaire et la mort. Dans des cas plus graves, la diarrhée peut rapidement causer la perte de 10% minimum du poids du corps, suivi d'un choc hypovolémique précédant le décès. Cependant, 75% ou plus des infections initiales avec *V. cholerae* O1 ou O139 peuvent être asymptomatiques, suivant la dose infectieuse (**Centers for Disease Control and Prevention., 2002**) (Figure04).



**Figure 04:** Mécanisme d'action des vibrions cholériques. (Centers for Disease Control and Prevention., 2002)

#### I.6.6.5 Choix des antibiotiques de lutte

Les options d'antibiotiques pour le choléra sont les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides. La plupart des *V. cholerae* sont résistants au chloramphénicol, au co-trimoxazole et à la furazolidone qui ne sont donc plus utilisés et ne seront même plus évoqués (Kitaoka *et al.*, 2011).

La doxycycline est recommandée en traitement de première intention chez l'adulte (y compris la femme enceinte) et l'enfant. Si une résistance à la doxycycline est documentée, l'azithromycine et la ciprofloxacine représentent des alternatives.

#### I.6.7 Résistance de *V.cholerae*

La résistance observée chez *V. cholerae* est médiée par des plasmides ou des transposons. La majorité des plasmides isolés chez *V. cholerae* sont cryptiques, mais certains, connus sous le nom « R-factors » codent pour des déterminants de résistance aux antibiotiques: il s'agit de plasmides de grande taille (110-170kb) auto-transférables, portant des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la gentamicine, à la kanamycine, à la streptomycine, à la spectinomycine, aux sulfamides, aux tétracyclines et au triméthoprim (Sack.,2001).

### I.6.8 Réservoir et sensibilité

Des réservoirs potentiels peuvent jouer un rôle comme certains mollusques, crustacés, poissons, plantes aquatiques et l'eau saumâtre. Il existe donc un risque d'augmentation des cas de choléra dû à une élévation du niveau de la mer et à une hausse de la température atmosphérique. La bactérie est sensible à l'acidité ( $\text{pH} \leq 4,5$ ), la dessiccation, la chaleur ( $>70^\circ\text{C}$ ) et l'irradiation par rayons gamma.

## I. 7 *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139

### I.7.1 Maladies et infections

Les souches de *V. cholerae* non-O1 et non-O139 ont été isolées du sang, de blessures, d'otites, de la bile, du liquide péritonéal, d'expectorations et du liquide cérébro-spinal (Madden et Cardell., 1989).

*Vibrio cholerae* non-O1 est responsable de gastro-entérites. Les symptômes les plus fréquents sont des diarrhées, parfois sanglantes, accompagnées occasionnellement de vomissements et de crampes abdominales. Des cas d'otites ou d'infections de blessures sont également signalés. Des septicémies ont été observées mais surtout chez des individus immunodéprimés (Miossec., 2002).

Dans des conditions environnementales défavorables, la formation de cellules viables mais non cultivables (VNC) a été démontrée. Ces cellules VNC sont incapables de former des colonies par étalement sur gélose mais sont encore capables d'avoir une activité métabolique. De plus, elles restent potentiellement pathogènes et peuvent redevenir actives lorsque les conditions environnementales favorables sont restaurées (Alam *et al.* , 2002).

### I.7.2 Facteurs de pathogénicité des *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139

Les vibrions non cholériques (non O1 et non O139) ne produisent pas de toxine analogue à la toxine cholérique et sont donc incapables d'entraîner une épidémie. En revanche, ils possèdent d'autres facteurs de pathogénicité. Ces facteurs peuvent être classés en trois catégories (Fournier et Quilici., 2002) : les entérotoxines, une minorité de souches de *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 produit une entérotoxine thermostable (ST), les hémolysines cytolysines identiques à celle produite par les souches de *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire, pourrait contribuer à la capacité de certains isolats à envahir la circulation sanguine chez les immunodéprimés (Traore ., 2013) et les capsules polysaccharidiques qui augmente la

résistance des bactéries à la phagocytose et leur permet de provoquer des septicémies (Fournier et Quilici .,2002)

Il existe aussi des *V. cholerae non O1/non O139* qui possèdent une toxine de type cholérique et qui sont isolés de malades diarrhéiques, ces vibrions ne possèdent pas de facteurs d'attachement et en général ne donnent pas lieu à diffusion (Cohen et Karib ., 2007).

Une minorité de souches de *V. cholerae non-O1/non-O139* produisent également des facteurs cytotoxiques, des enzymes exocellulaires (Traore ., 2013).

### I.7.3 Voies d'exposition et dose infectante

Du fait de leur habitat, deux voies d'exposition sont à l'origine des infections à vibrions non cholériques chez l'homme :

L'ingestion d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits en particulier, à l'origine d'infections gastro-intestinales, pouvant dans certains cas entraîner des complications extra-digestives, et le contact direct avec l'eau de mer ou l'environnement marin, à l'origine d'infections extra-intestinales (infections de plaies, septicémies). Les vibrions non cholériques sont le plus souvent à l'origine d'infections sporadiques, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives (AFSSAPS ., 2011).

Les doses minimales infectieuses ne sont pas connues avec précision, malgré quelques essais réalisés sur des volontaires (Morris, 1990). Trois souches de *V. cholerae non-O1/non-O139* productrices d'une toxine analogue à la toxine ST d'*E. coli* a provoqué une diarrhée chez 6 personnes sur 8, à des doses variant de  $10^6$  à  $10^9$  UFC dans de l'eau tamponnée, après neutralisation de l'acidité gastrique.

### I.8 Autres espèces de *Vibrio*

Huit autres espèces de vibrions ont été isolées de cas cliniques humains. Il s'agit de *V alginolyticus*, *V cincinnatiensis*, *V damsela*, *V fluvialis*, *V jûrnissii*, *V hollisae*, *V mimicus* et *V melschnikovii*. Toutefois, leur implication dans les différentes pathologies observées apparaît beaucoup moins claire, et le nombre établi de cas cliniques en relation à ces vibrions reste limité (Labreuche., 2006).

✓ *Vibrio parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* est le principal agent responsable de gastro-entérites alimentaires liés aux produits de la mer. La contamination se fait par consommation de poissons et fruits de mer crus, insuffisamment cuits ou re-contaminés après cuisson. Son pouvoir pathogène est dépendant des deux hémolysines entérotoxiques TDH et TRH (Helsens ., 2018).

✓ *Vibrio vulnificus*

*Vibrio vulnificus* colonise préférentiellement les eaux peu salées et chaudes. Cette bactérie est responsable des infections d'origine alimentaire les plus graves avec un taux de létalité supérieur à 50% pour les formes septicémiques. La contamination par *V. vulnificus* par voie digestive associée à la consommation de produits de la pêche et de coquillages a été documentée aux Etats-Unis et en Asie (Helsens ., 2018).

✓ *Vibrio mimicus*

L'habitat naturel de *V. mimicus* est similaire à celui de *V. cholerae*, c'est-à-dire l'écosystème aquatique, y compris l'eau de mer, l'eau douce et l'eau saumâtre, où il a été trouvé à la fois comme bactérie libre et en association avec le zooplancton, les crustacés, les mollusques filtreurs, les œufs de tortues et les poissons. Les infections chez l'homme surviennent à la suite de la consommation ou de l'exposition à ces sources (Nur Al Hasan *et al.* ., 2010).

## ***CHAPITRE II***

# ***ATRIPLEX HALIMUS SOURCE DE POLYPHÉNOLS***

Les halophytes sont des plantes naturellement tolérantes aux sels, utilisées pour des applications économiques, écologiques, alimentaires et dans la production d'antioxydants et d'autres substances bioactives (**Mahi., 2015**). Les *Atriplex* fait partie de ces plantes halophytes.

## II.1 Définition

Les *Atriplex* sont les espèces les plus intéressantes et les plus importantes pour les régions sèches et salées. Le genre *Atriplex* comprend environ 200 espèces appartenant à la famille *Chenopodiaceae* (**Donia Abd el Raheim, Soliman., 2013**). Ces espèces sont distinguables par leur morphologie, leur cycle de développement et par leur adaptation écologique (**Barrow and Osuna., 2002**).

Plusieurs espèces exprimant de fortes potentialités de croissance, de prélèvement et de stockage de sel dans leurs parties aériennes, sont intéressantes pour la fixation et le dessalement des sols dans les zones arides et semi-arides (**Mahi., 2015**).

## II.2 Origine et diffusion

Les *Atriplex* sont réparties dans les régions tempérées et subtropicales; on trouve également des exemplaires de ce genre dans les régions polaires, bien qu'en nombre très réduit. C'est la plante indigène la plus représentée sur le pourtour méditerranéen, couvrant pas moins de 80 000 ha, en Syrie, Jordanie, Egypte, Arabie saoudite, Libye et Tunisie (**Martinez et al, 2003**). Certaines espèces sont spontanées en Algérie, d'autres ont été introduites (**Chouaki., 2006**).

### II.2.1 *Atriplex* en Algérie

En Algérie l'*Atriplex* est spontané dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides. Les plus grandes superficies correspondent aux zones dites steppiques (Batna, Biskra, Boussaâda, Djelfa, Saïda, M'sila, Tébessa, Tiaret) (**Berri., 2009**).

## II.3 Caractéristiques

Les espèces du genre *Atriplex* sont caractérisées par le haut degré de tolérance à l'aridité et à la salinité; et pour procurer des fourrages riches en protéines et en carotène. Par ailleurs, elles ont la propriété de produire une abondante biomasse foliaire et de la maintenir active durant les périodes défavorables de l'année (**Mulas., Mulas G., 2004**).

#### II.4 Description botanique de l'*A. halimus*

*A. halimus* est un arbuste buissonneux, d'un aspect blanc argenté de 1 à 2 mètres, étalé, très ample. Il est connu à l'Ouest Algérien et au Maroc sous le nom de «Chenane », «Guettaf », «Aramass» (Chikhi., 2013).

Feuilles assez grandes 2- 5 cm oblongues ou ovales obtuses (Figure 05). Fruit petit lisse (Programme UICN).

Ses fleurs très petites sont cachées entre les bractées, en long glomérule. Les graines sont petites et rougeâtres. La floraison a lieu en Avril -Mai (Kherraze *et al.* , 2010).

Les tiges sont très rameuses d'une couleur blanche-grisâtre plus ou moins anguleuses entièrement feuillées (Negre ., 1961).

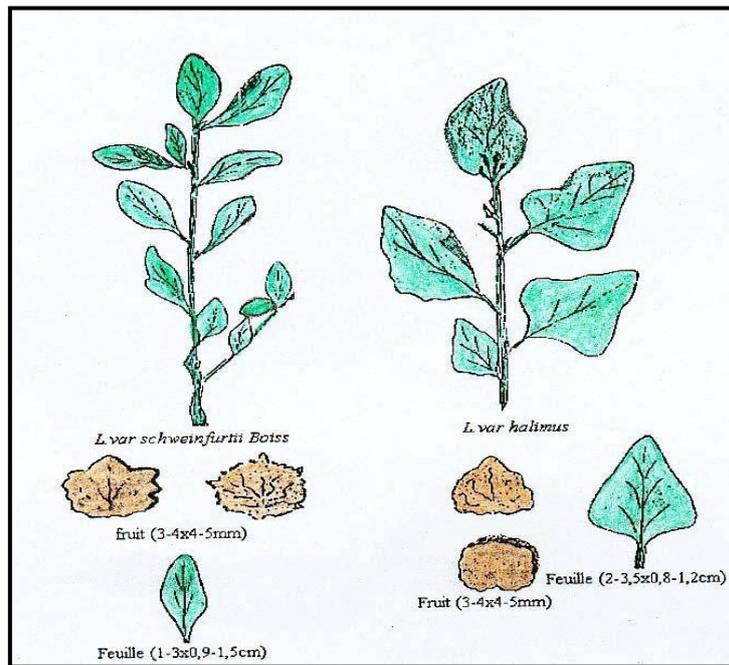


Figure 05: Représentation *Atriplex halimus* (Maalem, 2011).

#### II.5 Position systématique

D'après Chadefaut et Emberger en 1960, la systématique d'*Atriplex halimus* dans le règne végétal est la suivante :

**Règne** : Végétal.

**Embranchement** : Spermaphytes (phanérogames).

**Sous-embranchement** : Angiosperme.

**Classe** : Dicotylédones.

**Sous-classe** : Apétales.

**Ordre** : Centrospermales.

**Famille** : *Amarantacees*(*Chenopodiacees*).

**Genre** : *Atriplex*.

**Espèce** : *Atriplex halimus*.

**Nom vernaculaire français** : Arroche halime ou pourpier de mer.

**Nom anglais** : Sea-orache.

**Nom arabe** : G'ttaf, Ghassoul el aachebi, echnane.

**Nom amazigh** : Elhirmess



**Figure 06:** *Atriplex halimus*.

## II.6 Composition chimique

*Atriplex halimus* se caractérise par sa teneur élevée en cendres et fibres brutes, teneur modérée en protéines brutes et faible teneur en matières grasses brutes (**Gihad., 1993**).

Plusieurs extraits aqueux et éthanolique de *A. halimus* montrent la présence des phénols totaux, des saponines glycosides, des alcaloïdes, des tannins, des résines, des betaines et des flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure chez la plupart des espèces d'*Atriplex* (**Abd El-Rahman et al., 2006 ; Benhammou et al., 2009**).

*A. halimus* est riche en fibres alimentaires (cellulose), protéines, vitamines (B et C) et sels minéraux (sodium, calcium, potassium, magnésium, phosphore) (Tableau 02)

**Tableau 02.** Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d'*A. halimus* (Boussaid *et al.* , 2001).

Matière sèche (MS) %	Composition chimique des feuilles d' <i>Atriplex</i> exprimée en % (MS)						
	Matière azotée totale	Cellulose brut	Na	Ca	K	P	Mg
34,2	15,1	15,4	4,41	1,77	2,59	0,21	0,32

Parmi les principes actifs qui valorisent cette plante : phénols totaux, résines, betaines, tannins, flavonoïdes, saponines, glycosides, alcaloïdes (Bylka *et al.*, 2004).

## II.7. Applications des *Atriplex halimus*

### II.7.1. En thérapie

L'espèce *Atriplex halimus* L., est connue par ces propriétés hypoglycémiantes et hypolipidémiantes (Belhadj Tahar *et al.* , 2015).

Aharonson et Coll (1969) ont montré que l'extrait aqueux de l'*A. halimus* ainsi que le jus pressé des feuilles provoquent un effet hypoglycémiant chez des rats normaux et diabétiques.

En médecine traditionnelle, un cocktail de minéraux chez *A. halimus* était bénéfique contrôle glycémique chez les patients diabétiques (Day, 1990).

Draineur cutané et rénal, diurétique et dépuratif, il accompagne tout régime qui nécessite un drainage des tissus et la désincrustation des déchets et toxines (Belouad, 2001).

*A. halimus* produit les polyphénols et autres substances bioactives potentiellement utiles pour leurs propriétés médicinales et contribuent à la conservation naturelle des aliments (Benhammou *et al.*, 2009).

Grâce à leurs propriétés anti oxydantes, certains flavonoïdes ont un effet protecteur des tissus du foie contre le cancer (Emam., 2011).

En effet elle agit sur la maladie du sommeil (trypanosomiase) (Bellakhdar., 1997).

*Atriplex halimus* est utilisée dans le traitement de l'acidité gastrique : les graines crues et broyées, sont ingérées comme vomitif (Bellakhdar., 1997).

### II.7.2. Activités biologiques

*Atriplex* fournit des propriétés insecticides, par exemple contre *Tribolium castaneum* et *Culex Quinque fasciatus*. Différents extraits organiques (acétone, éthanol, éther de pétrole, éther et chloroforme) se sont révélés très toxiques pour les *Culex larves*, une forte activité aphicide contre *Aphis gossypii* avec des extraits d'éther et d'éther de pétrole. Une toxicité a été également montrée avec l'extrait d'éthanol contre le ver de la feuille de coton (El-Gougary., 1998).

Comme les autres halophytes, il était utilisé dans la médecine vétérinaire pour lutter contre les parasites internes (Bayoumi et El-Shaer., 1990).

Les extraits des parties aériennes de L'*Atriplex halimus* obtenus avec du méthanol ou de l'hexane ont montré une activité antibactérienne contre diverses bactéries pathogènes Gram positives et négatives (Abd El Rahman et al ., 2006). En plus de leurs utilisations traditionnelles, *A.halimus* possède de nombreuses propriétés biologiques, telles que les propriétés antioxydantes de principaux métabolites secondaires des feuilles et des tiges (Benhammou et al ., 2009).

### II.7.3. Intérêt fourrager

L'*Atriplex halimus*.L est utilisé fondamentalement comme plante fourragère. (Alazzeah et Abu-zanat., 2004).

Cette espèce est un arbuste fourrager autochtone qui tolère bien les conditions d'aridité (sécheresse, salinité,...). Peut contribuer à la valorisation des sols marginaux et dégradés et à l'amélioration des productions végétales et animales dans plusieurs régions démunies (Le Houérou, 1992).

### II.7.4. Phytoremédiation

Dans le sud de l'Espagne comme dans d'autres zones semi -arides, *Atriplex halimus* est utilisée pour la phytoremédiation des parcours contaminés par des métaux lourds et la population testée, en revanche, apparaît particulièrement sensible au cuivre (Cu) (Martinez., 2003).

### II.7.5. Intérêts écologiques

L'*Atriplex halimus* joue un rôle très important, dans le repeuplement des régions arides et semi-arides méditerranéennes. Les formations à base de buissons fourragers forment une bonne couverture végétale à feuillage dense qui protège le sol des agressions climatiques, sources d'érosion (pluie, vent, grêle, etc.). Ils ont une croissance rapide, et leur exploitation peut donc commencer rapidement (**Dutuit et al ., 1991**).

Dotées d'une biomasse aérienne et racinaire assez importante, elles constituent un outil efficace et relativement peu coûteux dans la lutte contre l'érosion et la désertification des sols surtout en zones steppiques (**Essafi et al ., 2007**).

### II.8. Richesse des halophytes en composés phénoliques

Pour certaines halophytes, l'accumulation en composés phénoliques est stimulée dans des conditions de salinité accentuées (**Sahli., 2018**).

Cet enrichissement en polyphénols totaux est un mécanisme d'adaptation des plantes à la salinité, car les composés phénoliques améliorent les effets ioniques de NaCl dans les tissus (**Parida et al. ,2004**).

#### II.8.1 Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) (**Lenoir., 2002**). Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Rezaire., 2012**).

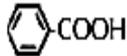
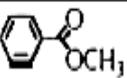
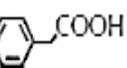
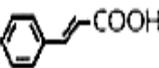
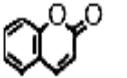
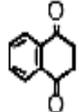
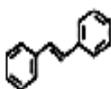
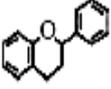
Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (**Kühnau., 1976**). Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al ., 2003**).

Les phénols totaux sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pendant leur développement mais aussi comme réponse aux conditions de stress tels que les infections, blessures, radiation UV (**Atanasova et Ribarova., 2009**).

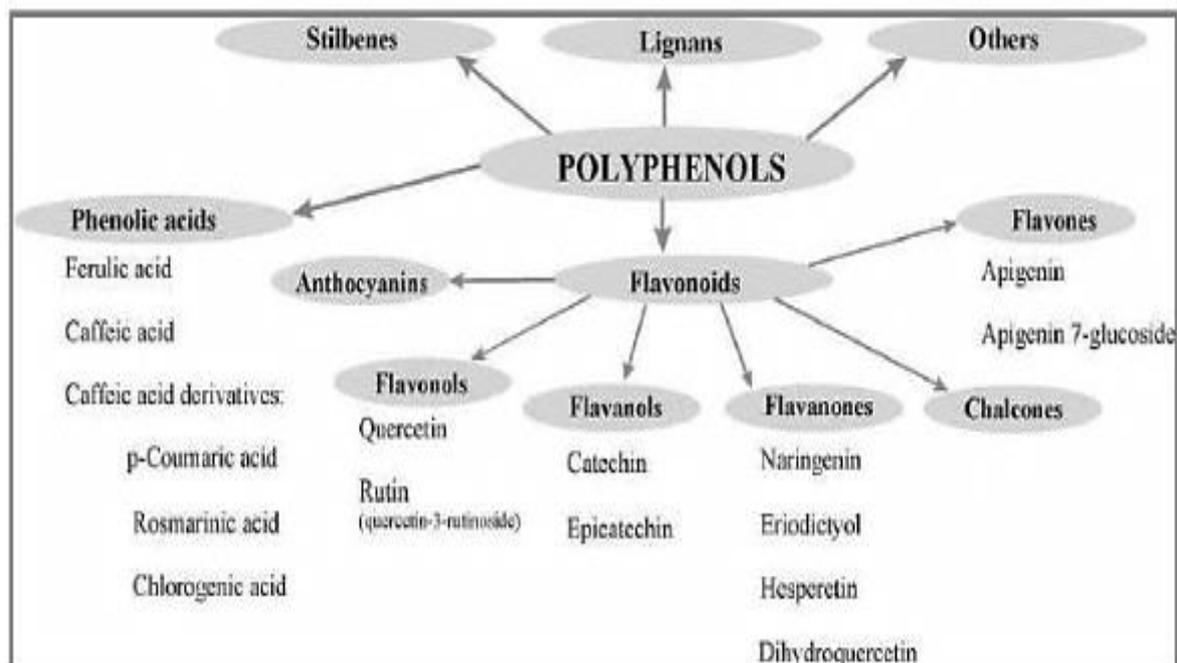
## II.8.2 Classification

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 03).

**Tableau 03** : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier et al, 2006).

Nombre de Carbone	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide p- hydroxyphényl-acétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide p - coumarique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculitine	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiferine	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine	

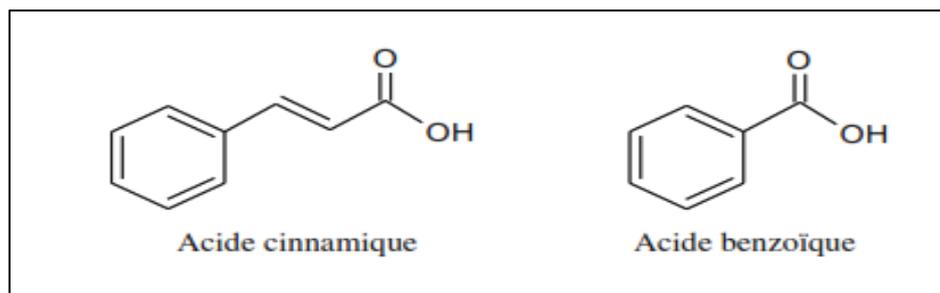
Les composés phénoliques comprennent les phénols simples, les acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique), coumarines, flavonoïdes, stilbènes, tanins hydrolysables et condensés, lignanes et lignines (Figure 07). Celles-ci composés parmi les métabolites secondaires les plus répandus dans le règne végétal, agissant principalement comme phytoalexines, attractifs pour les pollinisateurs, contributeurs à la pigmentation des plantes, antioxydants et agents de protection contre les rayons UV (Blainski., 2013).



**Figure 07 :** Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe (Boros *et al.*, 2010).

### II.8.2.1 Acides-phénoliques

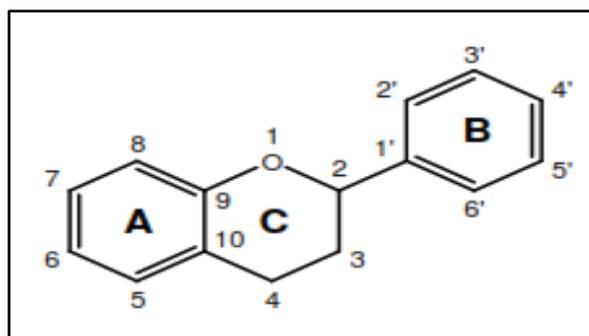
Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque (C6-C1) et cinnamique (C6-C3) (Figure 08) (Abedini., 2014).



**Figure 08** : Structures des acides benzoïque et cinnamique (Abedini., 2014).

### II.8.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C (Figure 09). On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols et les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier *et al.*, 2006).



**Figure 09**: Structure de base des flavonoïdes (Lhuilier., 2007).

Ils se révèlent avoir de nombreuses activités biologiques, y compris antimicrobienne, inhibition de l'adhésion mitochondriale, antiulcéreux, antiarthritique, antiangiogénique, anticancéreux, inhibition de la protéine kinase (Biju john *et al.*, 2014)

### II.8.2 .3 Coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux superoxydes et peroxydes. Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle (Igor., 2002).

#### II.8.2.4 Stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes, la stilbène oxydase et les peroxydases (Perret ., 2001).

#### II.8.2.5 Tanins

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux .On distingue: les tanins hydrolysables et condensés (Muanda ., 2010).

#### II.8.2.6 Lignanes et les lignines

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane. Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (El Gharras., 2009).

### II.8.3 Facteurs modifiant la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols diffère qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs:

- Facteurs climatiques et environnementaux: la zone géographique, la sécheresse, le sol, les agressions et les maladies.
- Le patrimoine génétique, la période de récolte et le stade de développement de la plante.
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur en phénols (Bentabet *et al* ., 2014).

### II.8.4 Solubilité des composés phénoliques

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales

peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. La solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (Mahmoudi *et al.*, 2013)

### II.8.5 Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. En outre, "*in Vitro*", un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses (Omar J.M. Hamza *et al* 2006).

Les actions bénéfiques des polyphénols sur la santé humaine sont le plus souvent attribuées à leur capacité à agir en tant qu'antioxydants (Crişan., 2013). Les polyphénols peuvent piéger avec succès les radicaux libres via leurs groupes OH. Il existe une forte corrélation entre le contenu de substances phénoliques et activité antioxydante totale de divers extraits de plantes (Zam., 2013).

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes comme les xanthones, la quercétine, la myricétine et l'epicatechin-3-gallate ont été révélés comme des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Brühlmann *et al.*, 2004).

Les polyphénols présentent d'autres activités anti-inflammatoire (Sakurai *et al.*, 2010) et antivirale et en particulier anti-HIV (Liu *et al.*, 2005).

### II.8.6 Polyphénols et autres pathologies

Les polyphénols ont montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies, telle que la sclérose en plaque, l'ostéoporose et les pathologies liées au vieillissement cérébral (maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson) (Achat S., 2014).

### II.8. 7 Pouvoir antimicrobien des polyphénols contre une large gamme de pathogènes humains

Les composés phénoliques sont largement réputés pour leur pouvoir antimicrobien qui couvre un large éventail de pathogènes. A titre d'exemple, l'acide gallique et l'epigallocatechine gallate sont capables d'inhiber plusieurs souches bactériennes et

fongiques (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio Cholerae*, *Microsporium gypseum*, et *Helicobacter pylori*) (**Sahli., 2017**).

Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions : le premier consiste d'inhiber la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (**Wu et al ., 2013**) et le deuxième provoque l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (**Tsuchiya et Linuma., 2000**).

## ***CHAPITRE III***

### ***LACTOBACILLES AUTANT QUE PROBIOTIQUES***

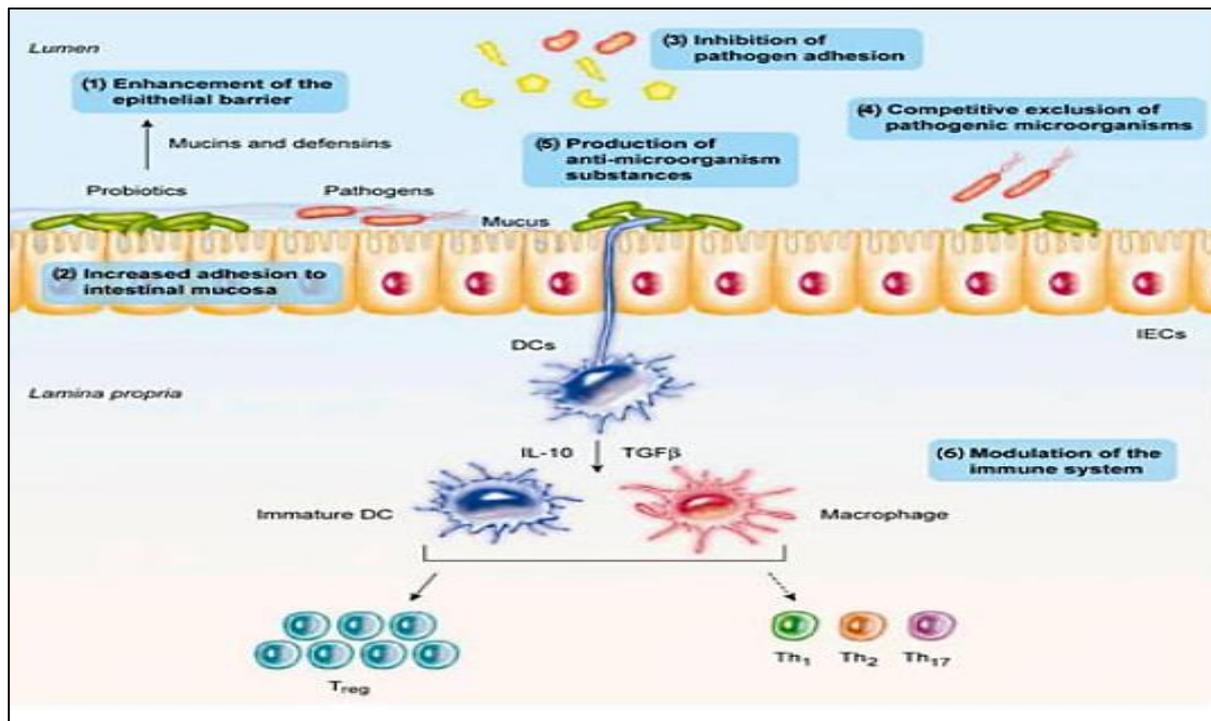
Essentielles au maintien d'une bonne santé ; les probiotiques qui sont de bonnes bactéries, contribuent à l'équilibre du microbiote intestinal et participent donc à la protection des différentes muqueuses de l'organisme. Ils entrent aussi en jeu dans le processus de digestion des aliments. Sont reconnus pour avoir des effets bénéfiques en améliorant, entre autres, l'équilibre microbien. L'administration de probiotiques empêche les agents pathogènes de se fixer facilement et de provoquer des infections.

### **III .1 Définition des probiotiques**

On appelle probiotiques, des organismes vivants (bactéries et champignons) qu'on ajoute généralement aux aliments et qui ont un effet bénéfique sur la santé (**Braegger., 2002**). La FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments (**FAO/OMS., 2002**) et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

### **III .2 Modes d'action des probiotiques**

Les probiotiques exercent plusieurs mécanismes pour expliquer le mode d'action. Ils peuvent modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui peut compromettre l'établissement de pathogène, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire (Figure 10). Les probiotiques entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses (**DEA Laetitia Bonifait et al ., 2009**).



**Figure10** : Les principaux mécanismes d'action des probiotiques (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

### III .3 Évaluation des micro-organismes probiotiques

Pour l'évaluation des micro-organismes probiotiques, le comité d'experts sur les probiotiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture / Organisation mondiale de la Santé (FAO/OMS) a proposé des lignes directrices. Les probiotiques doivent : • pouvoir survivre au passage à travers le tube digestif; • pouvoir croître dans l'intestin; avoir la capacité de proliférer dans l'intestin. Cela signifie qu'ils doivent être résistants aux sucs gastriques et capables de se développer en présence de bile, ou être consommés dans un véhicule alimentaire qui leur permet de survivre au passage dans l'estomac et à l'exposition à la bile.

### III .4 Conditions de l'appellation d'une souche un probiotique

L'établissement de normes et de lignes directrices a constitué une étape essentielle afin que les probiotiques soient acceptés comme des produits légitimes. Pour qu'une souche bactérienne puisse acquérir l'appellation probiotique, elle doit être parfaitement caractérisée.

Le genre et l'espèce du microorganisme doivent être identifiés selon des méthodes acceptées à l'échelle internationale et sa nomenclature doit être corroborée par référence aux Listes approuvées des noms bactériens (Approved Lists of Bacterial Names) (Reid., 2003).

De plus, des études *in vitro* et *in vivo* doivent être réalisées pour mettre en évidence le mécanisme d'action du probiotique, afin de prédire son champ d'utilisation et d'identifier ses effets secondaires potentiels (DEA Laetitia Bonifait *et al.* , 2009).

### III .5 Effets santé attribués aux probiotiques

Ces micro-organismes sont impliqués dans l'amélioration de la santé intestinale et influencent positivement le développement et l'activité du système immunitaire. De nombreux effets leur sont attribués : aide à la malabsorption du lactose due à l'activité lactase bactérienne, stimulation du système immunitaire, lutte contre la constipation, la prévention des infections uro-génitales (Lemétais ., 2012).

#### III .5.1 Effets immunologiques des probiotiques

Les probiotiques agissent par l'activation des macrophages locaux, augmentant les antigènes aux lymphocytes B et la production d'immunoglobulines A sécrétoire (IgA). Ils agissent aussi sur la modulation des profils des cytokines et l'induction d'une hypo réponse aux antigènes alimentaires (Guarner *et al.* , 2008).

#### III .5.2 Effets non immunologiques des probiotiques

Après la digestion de la nourriture, les probiotiques combattent les pathogènes, avec l'aide des nutriments et l'abaissement du pH, leur créant un environnement défavorable. Ils agissent aussi par la production de bactériocines, ou par l'élimination des radicaux superoxydes. Les probiotiques stimulent la production de mucine par l'épithélium : ils améliorent la fonction de la barrière intestinale et rentrent en concurrence avec l'adhésion du pathogène, et modifient également les toxines dérivées de ces derniers (Guarner *et al.* , 2008).

#### III .5.3 Effets santé des probiotiques sur le stress oxydant

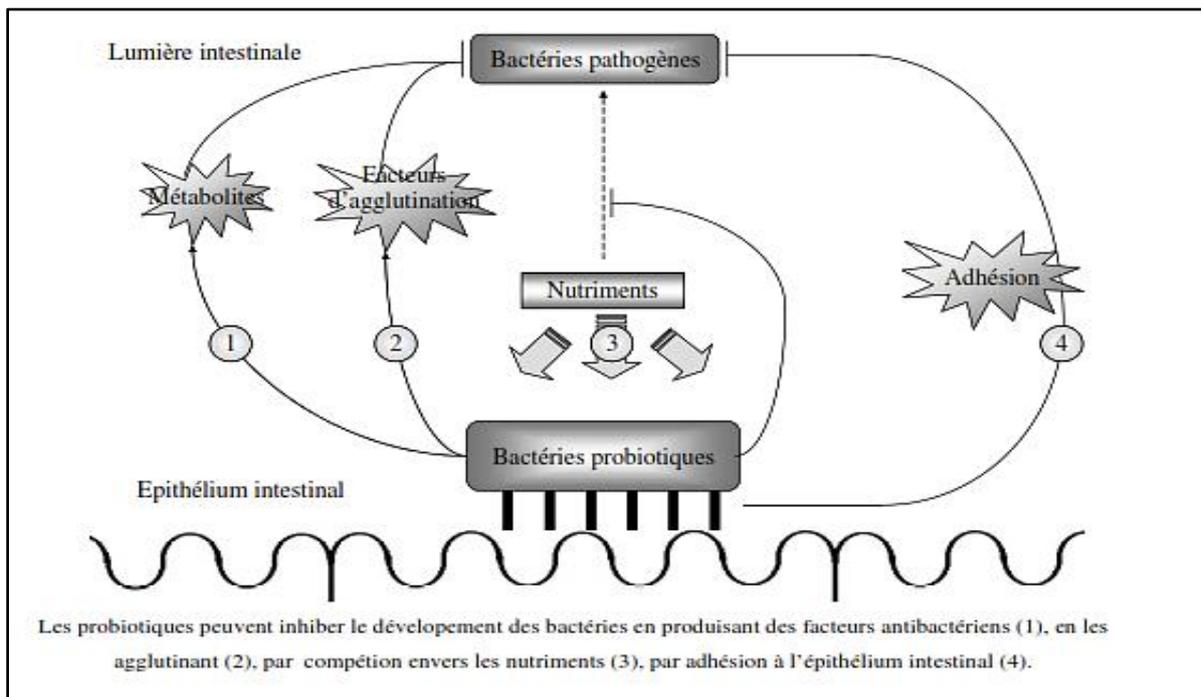
Les souches probiotiques ont été étudiées pour leur capacité à diminuer le stress oxydant. Ces souches sont notamment capables de diminuer la peroxydation lipidique et de piéger des radicaux libres et des molécules génotoxiques (Verdenelli *et al.* , 2010). Le pouvoir réducteur des bactéries lactiques permet également de prédire des capacités antioxydantes intéressantes (Saide and Gilliland., 2005). De nombreuses études sur le pouvoir antioxydant des bactéries probiotiques ont été menées chez l'animal. Ainsi, une étude menée chez des rats carencés en vitamine E montre l'effet antioxydant d'extraits cellulaires de *Lactobacillus spp.* SBT 2028 sur le statut antioxydant (Kaizu *et al.* , 1993).

### III .5.4 Propriétés antivirales

Les probiotiques peuvent également agir sur plusieurs types de virus comme le Rotavirus qui est l'agent pathogène le plus fréquemment retrouvé dans le cas de diarrhées chez l'enfant (Lorrot & Vasseur., 2007). Une méta-analyse a montré que la consommation de probiotiques permettait de réduire l'intensité et la durée des épisodes infectieux chez des patients souffrant des diarrhées (Allen *et al.* , 2004) .

### III .5.5 Propriétés antibactériennes

Les capacités d'inhibition de la croissance de souches pathogènes sont l'un des critères fréquemment utilisés pour sélectionner des souches probiotiques. Ces capacités antibactériennes sont essentiellement liées à la capacité des bactéries lactiques à synthétiser différents métabolites comme l'  $H_2O_2$ , des bactériocines, l'acide acétique, l'acide lactique ou l'oxyde nitrique qui sont capables de réduire la croissance bactérienne (Figure11) (Turpin ., 2011).



**Figure 11** : Inhibition des bactéries pathogènes par les probiotiques. (Turpin ., 2011).

### III .6 Types de microorganismes probiotiques

Plusieurs microorganismes sont utilisés comme probiotiques : Les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* mais également aux genres *Enterococcus*, *Propionibacterium* (Geraldine ., 2002).

Les bactéries non lactiques :

D'autres bactéries, dont le métabolisme est différent des précédentes, font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis* et *B. cereus*. L (Piquepaille, 2013). Des levures comme *Saccharomyces boulardii*.

Cependant, cette définition ignore l'action des bactéries mortes (Geraldine ., 2002).

Les principales espèces incorporées dans les produits probiotiques sont représentées dans le tableau 04.

**Tableau 04.** Principales espèces utilisées comme probiotiques (Robinson, 2002) (Ronka et al., 2003) (Ranadheera et al ., 2010).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ,	<i>Escherichia coli</i> Nissle,
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i> ,	<i>Saccharomyces boulardii</i> ,
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i> ,	<i>Streptococcus thermophilus</i> ,
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp Bulgaricus</i> ,	<i>Bifidobacterium longum</i> ,	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i> ,	<i>Bifidobacterium lactis</i> ,	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i> ,	<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> ,	<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i> ,	<i>Bifidobacterium essensis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> ,	<i>Bifidobacterium</i> <i>laterosporus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>		<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus rhamnous</i> ,		<i>Pediococcus acidilactis</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i> ,		<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus lactis</i> ,		
<i>Lactobacillus brevis</i>		

### III .7 Criblage des probiotiques potentiels par des tests *in vitro*

Les tests *in vitro* sont réalisés pour déterminer les mécanismes par lesquels les souches probiotiques exercent leurs effets bénéfiques (**Guarner et al ., 2008**).

Les principaux tests utilisés sont:

- Résistance à l'acidité gastrique;
- Résistance aux sels biliaires;
- Adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines;
- Activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes;
- Activité de l'hydrolase sur les sels biliaires;
- Capacité de réduire l'adhésion des pathogènes aux surfaces;

### III .8 Les bactéries lactiques

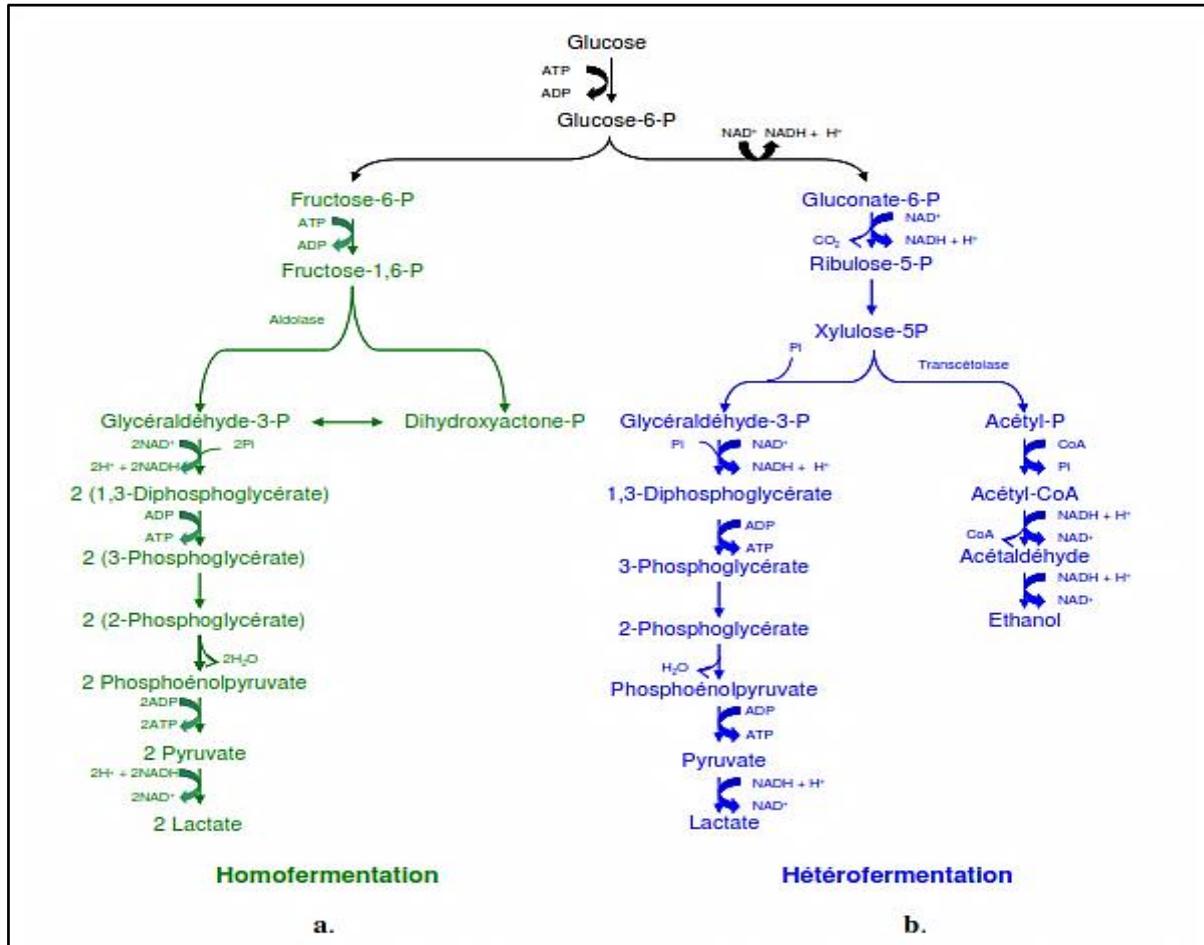
#### III .8.1 Connaissances générales

Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes, assez hétérogènes sur les plans physiologique et morphologique, qui ont la particularité de produire, des quantités importantes d'acide lactique à partir de l'hydrolyse du lactose et de la fermentation du glucose et/ou du galactose (**Edima ., 2007**).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes en forme de coques ou de bâtonnets, Gram positif, incapables de produire la catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), généralement immobiles et asporulées (**Dellagio et al ., 1994**).

Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (**Stiles et Holzapfel., 1997**). Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes, elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis à vis du sel. Enfin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques et ont une exigence marquée en acide aminés, dérivés de base puriques et pyrimidiques et vitamines B (**Caplice et Fitzgerald ., 1999**).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes) (Figure 12) (Vandamme *et al.*, 1996).



ATP : adénosine triphosphate. ADP : adénosine diphosphate. NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup>: couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide. Pi : phosphate inorganique.

**Figure12** : Voies de fermentations des hexoses chez les bactéries lactiques. (Vandamme *et al.*, 1996).

### III .8.2 Niche écologique

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles sont présentes dans de différentes niches écologiques comme le lait, les produits laitiers, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales (Drouault et Corthier ., 2001). Elles colonisent des milieux naturels variés telles que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères : intestin, bouches, vagin et la surface de la peau (Badis *et al.* ., 2005) .

### III .8.3 Classification

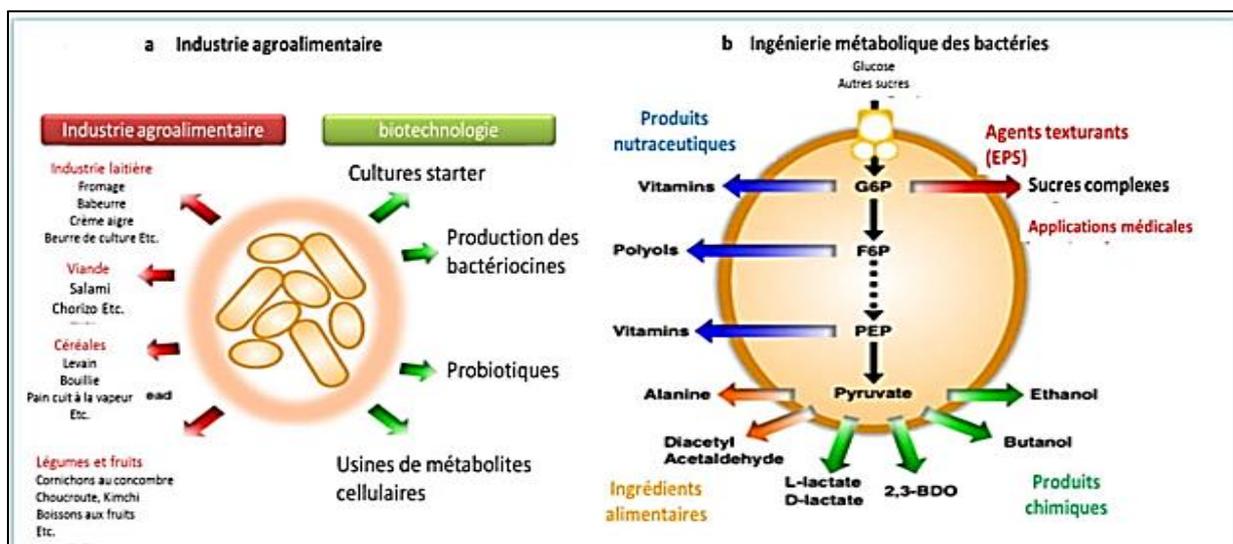
Les bactéries lactiques appartiennent au Phylum des *Firmicutes* et sont ensuite retrouvées dans la classe des *Bacilli*, puis dans l'Ordre des *Lactobacillales*. Celui-ci compte six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacterium*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*), qui renferment elles-mêmes trente-cinq genres distincts. (Seulement six d'entre eux disposeraient de propriétés probiotiques : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Dans ce cadre, le genre le plus étudié et le mieux connu est *Lactobacillus* (The Universal Protein Resource., 2015).

### III .8.4 Domaines d'utilisation

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments (Figure 13). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart., 2009).



**Figure 13:** Application des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie. (Kalbaza ., 2018)

-Dans le domaine thérapeutique

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al* ., 2008). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al* ., 2011). Uehara *et al* (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes.

Les bactéries lactiques possèdent aussi des propriétés antitumorales contre le cancer du côlon. De plus, elles sont capables de diminuer le taux de cholestérol sanguin (Bazo ., 2011).

### III .8.5 Substances à activités antimicrobiennes des bactéries lactiques

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutéline et les bactériocines.

#### III .8.5 .1 Acides organiques

Comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation alimentaire et permettent d'inhiber la croissance des bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. Sous la forme indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor *et al.*, 2006). Ainsi, l'accumulation d'acide organique est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles.

#### III .8.5.2 Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (El-Ziney *et al* ., 1998). La reutéline est secrétée spécifiquement par *Lactobacillus reuteri*, elle a un spectre très large d'activité antimicrobiennes (antibactérienne, antifongique, antivirale) (Axelsson *et al.*, 1989).

Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les protozoaires.

### III .8.5.3 Bactériocine

Est une toxine spécifique produite par une bactérie et émise dans le milieu où elle vit afin de se protéger, favorisant ainsi sa propre croissance au détriment des autres bactéries présentes dans le milieu. Il s'agit d'un peptide antimicrobien qui tue ou bloque le développement d'autres bactéries. Généralement les bactériocines produites par des bactéries Gram positif sont inhibitrices d'autres souches Gram positif, et sont moins efficaces contre les souches Gram négatifs (Dillensege., 2019).

### III .8.5.4 Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition, se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (Zalan *et al* ., 2005).

### III .8.5.5 Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les microorganismes aérobies (Singh ., 2018). Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Ammor *et al* ., 2006).

## III .9 Les lactobacilles

### III .9. 1 Généralités

Le genre *Lactobacillus*, qui contient près de 80 espèces, représente la plus grande famille de bactéries lactiques. Il s'agit d'une bactérie Gram positive, en forme de bâtonnet, non sporulant et parfois de coccobacilles dépourvus de catalase et de cytochrome. Ces bactéries sont caractérisées par une forte exigence en facteurs de croissance, en vitamines et en minéraux sous forme ionique .Elles sont généralement anaérobies facultatives et leur produit de fermentation des sucres est l'acide lactique. Les Lactobacilles se développent quand le pH se situe entre 4,5 et 6,4. On trouve ce type de pH à la surface des plantes,

dans les produits laitiers, la viande, l'eau, la bière, les fruits. Chez les humains, les lactobacilles font partie de la flore normale de la bouche, du tube digestif et de l'appareil génital féminin. Elles sont caractérisées par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN: le GC% varie de 32 à 53% (**Kandler et Weiss., 1986**). Elles sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe).

### **III .9.2 Habitat**

Les lactobacilles sont associés à de nombreux habitats différents. Certaines espèces sont des bactéries commensales de l'homme. Ils peuvent être isolés à partir de différentes niches écologiques principalement à partir de la bouche, de l'intestin et du vagin d'êtres humains et d'animaux mais aussi à partir d'aliments tels que des végétaux, les viandes, les poissons et les produits laitiers (**Stiles et Holzapfel .,1997**) (**Claesson et al ., 2008**).

### **III .9.3 Description des Lactobacilles**

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et en général immobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs, fins ou très courts ou sous la forme de coccobacille ; ils se retrouvent isolés, groupés en paires ou en chaînes parfois très longues. La formation de chaînes de cellules est courante (**De Vos et al ., 2009**).

### **III .9.4 Classification des lactobacilles**

Originellement elles ont été classées par Orla-Jensen (1919): en trois sous genres: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Ce classement avait été fait suivant des critères de température optimale de croissance et de produits de fermentation des sucres. Néanmoins, les travaux de taxonomie moléculaire ont incité.

### **III. 10 Distinction entre prébiotiques et probiotiques**

Il est fréquent de voir associé au terme probiotique celui de prébiotique. Les prébiotiques, à la différence des probiotiques, ne sont pas des micro-organismes mais le terme de prébiotique désigne un ingrédient alimentaire non digestible par l'hôte mais stimulant sélectivement la croissance et / ou l'activité de certaines bactéries du côlon comme par exemple les bifidobactéries (**Gibson., 1995**).

Tous les prébiotiques sont des glucides, naturels ou synthétiques, dont les plus communs sont : l'oligofructose (présent naturellement dans le blé, les oignons, les bananes, le

miel, l'ail, les poireaux), l'inuline, les galacto-oligosaccharides, ou encore les oligosaccharides du lait maternel .Le lactulose (Le lactulose est un disaccharide de synthèse), utilisé comme médicament dans le traitement de la constipation et de l'encéphalopathie hépatique (**Lou Le Rouzic ., 2021**).

### **III. 11 Mécanismes d'action des prébiotiques**

Les prébiotiques peuvent influencer l'organisme de deux façons. Ils peuvent être utilisés de manière indirecte comme substrat pour certaines bactéries commensales et les produits de cette fermentation, les acides gras à chaîne courtes, peuvent ensuite influencer les différents processus moléculaires et cellulaires des tissus de l'hôte. De nouvelles recherches suggèrent que les prébiotiques peuvent agir de manière directe en se fixant sur les récepteurs des cellules cibles (**Selle *et al.* ., 2018**).

# *PARTIE EXPÉRIMENTALE*

# *CHAPITRE I*

## *MATÉRIEL ET MÉTHODES*

## **I. Objectifs du travail**

Vibron cholérique est un germe pathogène qui contamine l'eau causant un déséquilibre des espèces d'origines hydriques, qui peut toucher l'être humain par contact directe ou indirect avec l'environnement aquatique, et constitue un véritable risque sanitaire, dont le contrôle reste un élément primordial afin de réduire les risques liés à sa transmission. L'utilisation des outils biologiques comme les plantes médicinales et les probiotiques pourraient être une nouvelle approche alternative aux traitements par les antibiotiques afin de pallier au phénomène de résistance.

Dans ce travail, notre propos est d'évaluer :

Le risque sanitaire de contamination des eaux de différents sites de la ville de Mascara (Algérie) par la recherche, l'isolement des *Vibrio* cholérique, identification phénotypique et sérologique des souches de *Vibrio cholerae* la détermination de profil de résistance de ce germe aux antibiotiques.

Extraction des polyphénols de la plante l'*Atriplex halimus* et étude de leur potentiel antioxydant et antimicrobien.

Evaluation de l'effet antibactérien de *Lactobacillus sp* autant qu'un probiotique sur *Vibrio cholerae*.

Test des différentes interactions et associations des extraits et probiotiques vis-à-vis le développement de germe nuisible *Vibrio cholerae* pour la recherche de nouveaux composés alternatifs naturels.

Le travail a été réalisé au laboratoire de Bioconversion- Génie-microbiologique et Sécurité Sanitaire au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mascara.

## II. Matériel

### II.1 *Vibrio cholerae*

Ces souches ont été isolées à partir des eaux de surfaces de la wilaya de Mascara et ses communes. (Figure 14)

Le choix des sites d'échantillonnage a été fait sur la base de l'utilisation quotidienne de l'eau par les populations. Les prélèvements d'eau ont été effectués pendant la période estivale dans des flacons en verre stériles de 500 mL (à 50 cm sous la surface d'eau). Tous les échantillons effectués ont été maintenus à 4°C.

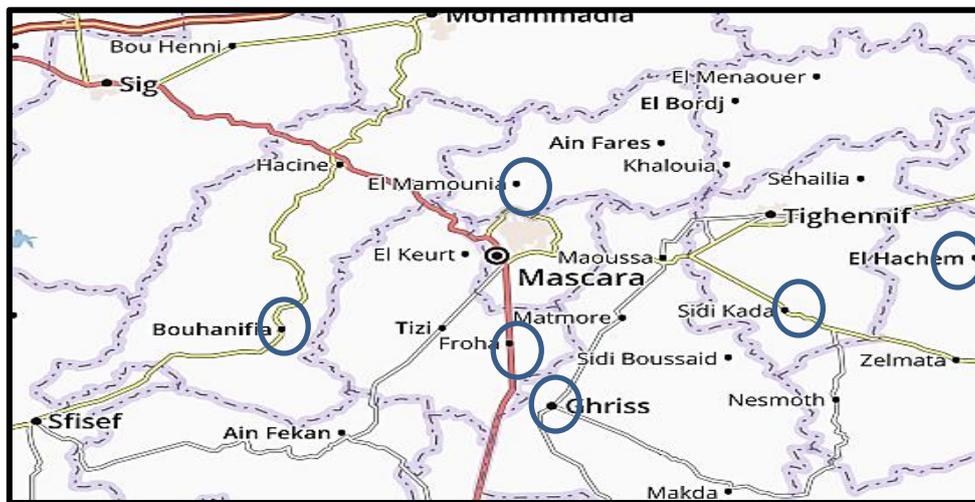


Figure 14: Localisation des sites de prélèvements d'eaux dans la wilaya de Mascara et ses Communes (Google Maps)

### II.2 Plante médicinale : *Atriplex halimus*

#### ➤ Collecte de la plante *A. halimus*

La collecte de l'échantillon de la plante *A. halimus* a été effectuée dans la région de Bouhanifia située à 26,7 Km au sud-est de la wilaya de Mascara Algérie, durant le mois de mai au mois de juin de l'année 2015.



Figure 15: Carte de situation géographique de Bouhanifia (Google Maps).

L'espèce a été identifiée par Monsieur Dr Zahafi B au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mascara. La photo n°1 représente la plante d'étude.



**Photo 01 : *Atriplex halimus*.**

### **II. 3 Probiotique : *Lactobacillus sp***

#### **➤ Origine et collection des échantillons**

La niche écologique utilisée, pour l'isolement des lactobacilles est les selles fraîches des nourrissons sains allaités aux seins et nés naturellement, âgés de 3 à 6 mois. Les échantillons de selles des nourrissons ont été collectés dans des récipients stériles et acheminés, dans des glacières directement au laboratoire pour être analysés le jour même.

### **III .Méthodes**

#### **III. 1 Recherche et caractérisation de *Vibrio cholerae* dans les eaux analysées**

##### **III. 1 .1 Condition de prélèvement**

Tous prélèvement hydrique a été accompagné d'une fiche de renseignements sur la quelle est enregistré les observations suivantes :

- Origine de l'eau.
- Adresse exacte du lieu de prélèvement.
- Date et l'heure de prélèvement.

### III. 1 .2 Site de prélèvement

L'étude a été menée sur les eaux de surface de plusieurs sites (station d'épuration, l'eau de l'oued, Jet d'eau, eau usée) au niveau de la ville de Mascara (Algérie). Les prélèvements ont ciblé essentiellement l'eau de différents sites de la région de Mascara entre 2016\_2017 selon le tableau 05:

**Tableau 05 :** Origine des sites des différents prélèvements d'eau dans la région de Mascara.

Nombre des échantillons prélevés	Origine du prélèvement
3	Station d'épuration de Mascara (avant le traitement)
3	Oued Mascara
3	Jet d'eau Sidi said
3	Station thermale (Bouhanifia)
3	Eaux usées

### III. 1 .3 Méthode de prélèvement

Des flacons stériles, sont plongés sous l'eau à une profondeur de 10 à 30cm. Ils sont ouverts sous l'eau, et sont remplis jusqu'au bord, ensuite, les flacons sont renfermés et étiquetés, et transportés au laboratoire (Rodier., 1996). Les échantillons d'eaux ont été conservés dans une glacière dont la température est maintenue à 4°C conformément au guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.

### III. 1 .4 Analyse physicochimique des échantillons d'eaux collectés

#### III. 1 .4.1 Mesure de la température

La température est un facteur écologique important du milieu. Elle influe sur la densité de l'eau et joue un rôle primordial dans les phénomènes de stratification des lacs et des mers. Une élévation de la température perturbe fortement le milieu et elle peut être un facteur d'accroissement de la productivité biologique (Gaujous, 1995).

La mesure de la température se fait directement sur le terrain en utilisant un thermomètre à mercure. Elle joue un rôle important dans les processus bactériens comme la nitrification et la dénitrification (Leynaud ., 1968).

### III. 1 .4 .2 Potentiel d'hydrogène (pH)

C'est un paramètre qui permet la mesure de la concentration des protons H<sup>+</sup> dans un milieu aqueux en déduisant sa nature (acide, basique ou neutre) (Nehme ., 2014). Cette mesure s'effectue directement sur l'eau avec un pH mètre en plongeant l'électrode de 6 à 8 cm dans l'eau. Les résultats sont exprimés en unité pH.

### III. 1 .5 Etude bactériologique quantitative

#### III. 1 .5.1 Numération des *Vibrios*

Les prélèvements d'eau ont été analysés à l'état brut ou dilués dans de l'eau physiologique stérile à 3 % de NaCl (Boukef *et al.* , 2010). 1ml d'échantillon est dilué dans 9 ml de solution physiologique stérile ce qui représente la solution diluée au 1/10, et à partir de cette dernière des dilutions décimales sont réalisées .Les dénombrements ont été effectués par prise de 100 µL d'échantillon d'eau brut ou dilué (série de dilution 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>), selon la technique de comptage en boîtes gélosées se basant sur l'utilisation du milieu sélectif : Thiosulfate-Citrate-Bile Sodium (TCBS- BioRad) et milieu GNAB pour les dénombrements des *Vibrionaceae* (Maugeri *et al.*, 2004). Toutes les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 24 heures à 37°C avant leur lecture. À chaque dénombrement, la concentration en bactéries a été estimée en nombre d'unité formant colonies (UFC) par 100 ml d'eau selon la formule suivante (Boukef *et al.* , 2010) :

$$\text{Nombre d'UFC par 100 mL de l'eau} = \frac{\text{nombre de colonies}}{\text{volume déposé} \times \text{dilution}}$$

### III. 1 .6 Etude bactériologique qualitative

#### III. 1 .6.1 Isolement du *Vibrio cholerae*

L'isolement de cette espèce nécessite un enrichissement (Figure15).

#### III. 1 .6.2 Enrichissement dans l'eau peptonée alcaline (EPA)

L'enrichissement dans l'eau peptonée alcaline peut faciliter l'isolement de *V. cholerae* quand peu de micro-organismes sont présent. *Vibrio spp* se développe très rapidement dans EPA et sera présent au bout de 6 à 8 heures en quantité plus importante que les organismes n'appartenant pas au genre *Vibrio* (Centers for Disease Control and Prevention., 1994). Ce dernier a été réalisé dans du bouillon d'eau peptonée alcaline (EPA)

ou d'eau peptonée salée hyper alcaline (EPSA), incubé à 37°C pendant 24 heures (5 ml d'échantillon pour 10 ml d'EPSA) (Tamatcho *et al.*, 2009)(Figure15).

Le voile qui s'est développé à la surface de ce milieu a été ensemencé sur milieu d'isolement (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose: TCBS) et (la gélose nutritive alcaline biliée GNAB) (Quilici, 2011) (Figure15). Les boîtes de culture sont ensuite incubées pendant 24 heures à T<sup>0</sup> de 37°C. Les colonies suspectes ont été purifiées, identifiées, à partir des caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques (Ndoutamia *et al.*, 2014) (Figure15).

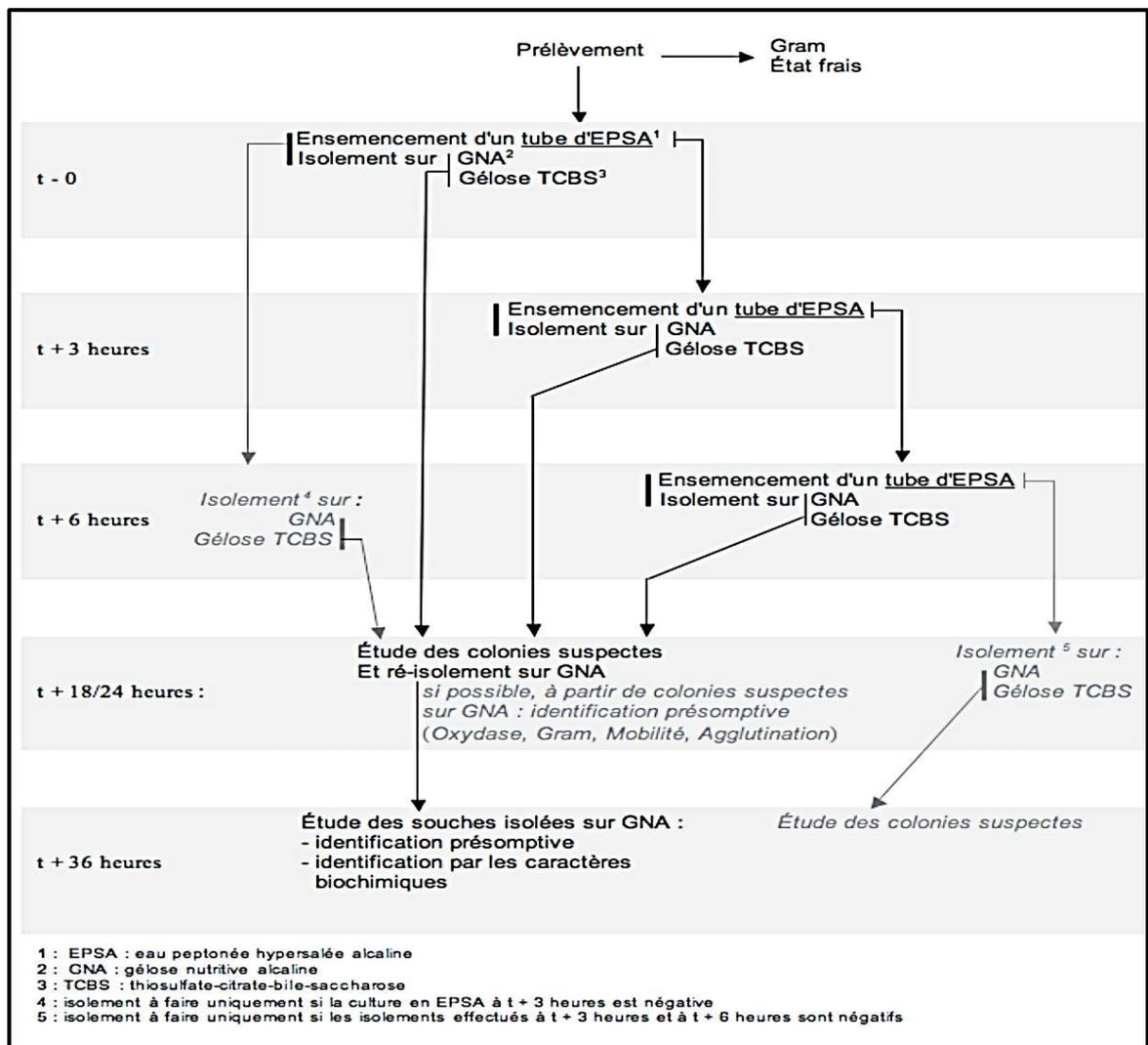


Figure16: Méthode pour la recherche, identification du *V. cholerae* selon (Quilici, 2011).

La gélose Hektoen et la gélose nutritive (Annexe), ont été aussi utilisée pour cette recherche (Figure17).

### **III. 1 .7 Identification des *Vibrio cholerae***

#### **III. 1 .7 .1 Identification morphologique de *Vibrio cholerae***

L'identification des souches isolées est réalisée par la recherche des caractères morphologiques .Elle est faite sur des souches pures par la recherche de la mobilité et de la coloration de Gram.

À partir des colonies suspectes sur GNAB on a réalisé un :

- **Examen macroscopique**

Après 24 heures d'incubation dans une étuve à 37°C, les géloses sont examinées. Les colonies bactériennes de morphologies différentes sont repérées selon leur taille, couleur, l'aspect, opacité/transparence, régularité des contours, profil convexe/plat, autre caractère particulier (Figure15).

- **Examen microscopique**

C'est une technique rapide et facile qui permet de voir la bactérie vivante et d'apprécier sa mobilité, sa morphologie et son mode de groupement.

- **La coloration Gram**

- Principe**

La coloration de Gram permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grands groupes. La structure des bactéries conditionne le résultat de leur coloration de Gram. La paroi des bactéries à Gram positif est composée d'épaisses couches de peptidoglycane sur lesquelles sont liés des acides teichoïques. Des acides lipoteichoïques sont fixés à la membrane plasmique tandis que les bactéries à Gram négatif possèdent une couche plus fine de peptidoglycane surmontée d'une membrane externe sur laquelle sont fixés des lipopolysaccharides. La paroi des bactéries à Gram + constitue un rempart, une barrière interdisant le passage de l'alcool, celle des bactéries à Gram <sup>-</sup> l'autorise et le cytoplasme coloré en violet se décolore (**Pagliariro ., 2006**).

#### **III .1.7 .2 Identification biochimique de *Vibrio cholerae***

L'identification biochimique est réalisée sur les souches pures, par la recherche de l'oxydase, de la lysine décarboxylase, de l'ornithine décarboxylase, de l'uréase, de la tryptophanase, de la βgalactosidase et de l'utilisation des glucides (glucose, lactose et mannitol) (**Rodier et al ., 1996**) (Tableau06).

Tableau 06 : Tests d'identification des *Vibrio cholerae*.

Caractère recherché	Principe	Milieu ou réactif
<b>Type de Gram</b>	La coloration de Gram permet de différencier deux grands groupes de bactéries: les Gram + et les Gram – et d'observer la morphologie des bactéries.	-Violet de Gentiane -Lugol -Alcool – Fushine.
<b>Test oxydase</b>	Repose sur la mise en évidence d'un enzyme bactérienne, la phénylène diamine oxydase, à partir d'une culture bactérienne.	Disques
<b>Uréase</b>	Consiste à constater l'alcalinisation du milieu, due à l'utilisation de l'urée comme source d'azote, par la bactérie.	Milieu urée-indole
<b>Production d'indole</b>	Le milieu contient du L-tryptophane(1):sa dégradation par les bactéries possédant une tryptophanase s'accompagne d'une production d'indole, révélée au moyen du réactif de Kovacs.	Réactif de Kovacs
<b>Production de Tryptophanase</b>	La dégradation du tryptophane par les bactéries possédant une tryptophane-désaminase s'accompagne d'une production d'acide indole-pyruvique révélé au moyen d'une solution de perchlorure de fer par l'apparition d'une coloration brune.	Chlorure de fer
<b>-Fermentation des sucres</b> <b>-Formation H<sub>2</sub>S</b>	Le milieu TSI qui contient du saccharose en plus du glucose et du lactose donne des réactions de type A/A (pente alcaline, culot acide), sans gaz, ni H <sub>2</sub> S.	TSI (Triple Sugar Iron)
<b>Fermentation du mannitol</b>	La fermentation du mannitol induit une acidification qui provoque une coloration jaune du milieu.	Mannitol mobilité
<b>Mise en évidence de la mobilité</b>	La motilité est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène.	
<b>Production de β-galactosidase</b>	Le lactose pénètre dans la bactérie grâce à une enzyme: le lactose perméase. A l'intérieur de la bactérie, une autre enzyme, la β-galactosidase, scinde la molécule de lactose en glucose et galactose.	Disque d'ONPG
<b>-Lysine décarboxylase</b> <b>-Ornithine décarboxylase</b> <b>-Arginine didihydrolase</b>	Différenciation des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif.	Milieu de Moëller

### III. 1 .7. 3 Identification des souches de *Vibrio* par galeries API 20 E

Des galeries API 20 E ont été utilisées pour confirmer l'identification des souches de *Vibrio* réalisée grâce aux tests classiques. La culture de l'inoculum 0,5 Mc Farland correspond à une concentration de ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) sur la galerie API 20E a été utilisée pour l'identification biochimique. Le principe est basé sur l'inoculation des microtubules avec une suspension qui réhydrate les milieux. L'incubation est à 37 °C à l'étuve pendant 24 heures au cours duquel se déroulent les réactions biochimiques (décarboxylation, fermentation, désamination) qui se traduisent par des produits colorés spontanés révélés par addition des réactifs. L'identification des *Vibrio cholérique* est obtenue à l'aide de catalogue API 20 E (Ndoutamia *et al.* , 2014).

### III. 1 .7 . 4 Sérotypage des souches de *Vibrio cholerae*

La détection de *Vibrio cholerae* O1 s'est également effectuée par la recherche d'une réaction (d'agglutination) entre le germe et antisérums polyvalents anti O1. Le sérogroupage O repose sur des anticorps qui distinguent des différences structurelles au niveau de l'antigène O stable à la chaleur (lipopolysaccharide) de la bactérie. Les tests sérologiques sont basés sur le fait que les anticorps contenus dans le sérum, produits en réponse à l'exposition à des antigènes bactériens, agglutinent visiblement les bactéries portant des antigènes homologues (Isaacson ., 1975). Pour cela une suspension de croissance fraîche à partir d'une sous-culture de 6 à 16 heures de *V. cholerae* a été ajoutée à une goutte de taille égale du groupe O1 antisérum polyvalent. La suspension antisérum-culture est homogénéisée en inclinant la lame d'avant en arrière (Figure 16). Une réaction qui se produit en 0,5 à 1 min, indique un résultat positif (Quilici ., 2011) .

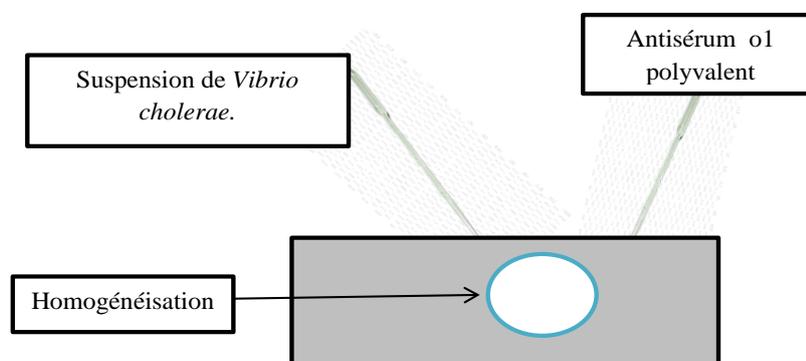


Figure17: Protocole de sérotypage des souches de *Vibrio cholerae*.

### III. 1.8 Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques

Un antibiogramme a été systématiquement réalisé sur les souches isolées selon la technique de diffusion en milieu gélosé NCCLS (2000). Les antibiotiques testés sont regroupés dans le tableau 07 :

**Tableau 07 :** Antibiotiques utilisés.

Antibiotiques testés	Charge des disques (µg)	Famille
Ampicilline	10	B-lactamines
Amoxicilline	30	B-lactamines
Cefazoline	30	B-lactamines
Amoxicilline-acide clavulanique	30	B-lactamines
Tétracycline	30	Tétracyclines
Erythromycine	15	Macrolides
Doxycycline	30	Tétracyclines
Acide nalidixique	30	Quinolones
Chloramphenicol	30	Phénicolés
Trimethoprime + sulfaméthoxazole	1.25/23.75	Sulfamides
Colistine	10	Polymyxines
Spiramycine	100	Macrolides
Gentamicine	10	Aminosides

La lecture et l'interprétation ont été faites selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM., 2014). Le contrôle de qualité a été effectué avec la souche de référence *E.coli* ATCC 25922.

#### III. 1.8.1 Sélection des souches productrices des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont une famille d'enzymes (EC 3.5.3.6), responsables de la résistance des bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques bêta-lactamines (Acoby., 2005). Le groupe EC3.5 rassemble des enzymes appartenant à la famille des hydrolases. Elles ont pour particularité de catalyser des réactions d'hydrolyse dans des molécules possédant un carbone et un azote liés par liaison simple, double ou triple. Spécifiquement EC 3.5.3.6 regroupe l'arginine-déiminase. L'arginine dihydrolase (ADH) ou arginine désiminase est une hydrolase qui catalyse la réaction suivante :



➤ **Détection par méthode iodométrique**

**-Principe**

Il repose sur la combinaison de l'acide provenant de l'attaque de la pénicilline G (substrat antibiotique) avec l'iode d'un complexe lugol amidon. En présence de bêta - lactamase, l'amidon reste incolore et en l'absence d'attaque de la pénicilline, l'amidon se combine avec l'iode et donne une coloration bleue.

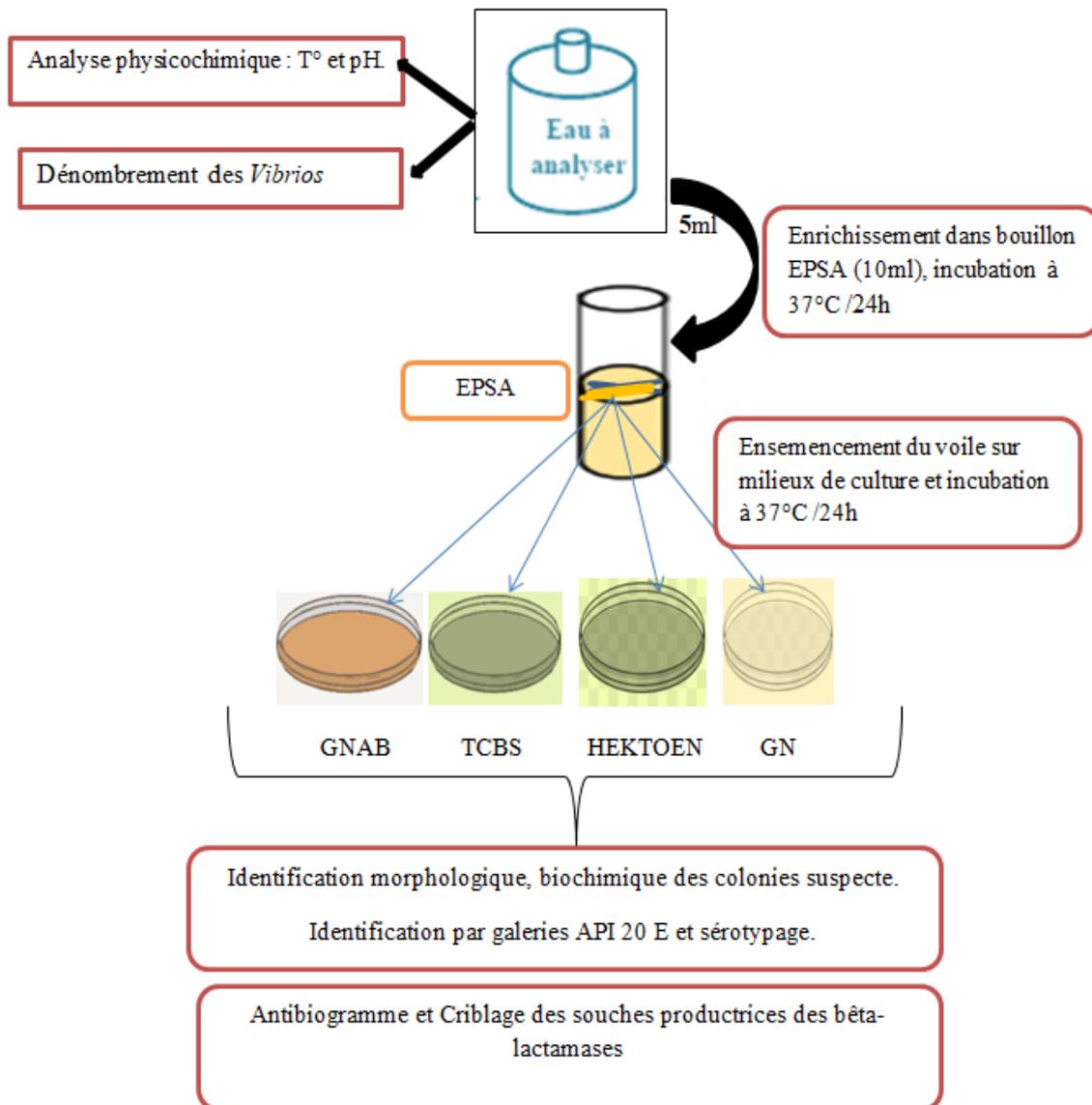
**-Méthode**

- La pénicilline G est dissoute dans du tampon phosphate stérile 0,1 M (pH 6,0) pour obtenir une concentration de 6 mg/l ;

- 1 g d'amidon est ajouté dans 100 ml d'eau distillée stérile, et mis dans un bain marie jusqu'à la dissolution.

- La solution de lugol est préparée en dissolvant 2,03 g d'iode et 53,2 g d'iodure de potassium (KI) dans un petit volume d'eau distillée, puis complétée à 100 ml, conservée dans un flacon de verre coloré.

Pour détecter la bactérie productrice de bêta-lactamases, on dépose 0,1 ml de la solution de Pénicilline G dans un puits d'une plaque de microdilution ou dans des tubes à hémolyse, et on ajoute 2 gouttes de solution d'amidon et une goutte de lugol ; cette solution est mélangée à une suspension de germes. Si la souche produit une bêta-lactamase, la décoloration est obtenue après 10 minutes (**Catlin, 1975**).



**Figure18:** Protocole d'isolement, identification et antibiorésistance des *Vibrio cholerae*.

### III. 1.9 Croissance de *Vibrio cholerae* en présence du Sel (NaCl)

Etant donné que la plante *Atriplex halimus* est type hypersalé, on veut tester l'effet de sel sur la croissance des souches de *Vibrio cholerae*. Les sels minéraux sont dosés dans l'expérience (Voir page p 62).

Pour étudier la capacité des isolats à croître dans un milieu hyper-salé. Les souches de *Vibrio cholerae* sont cultivées dans des bouillons nutritifs ajustés à une concentration de NaCl (13,37 %).Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture des tubes se fait en sélectionnant les tubes troubles (Lamari ., 2014) .

### **III. 1. 10 Purification et conservation**

La purification consiste à avoir une culture pure par repiquages successifs d'une colonie isolée sur milieu GNAB.

La conservation des souches de *Vibrio* a été faite par inoculation en stries en tube inclinés de milieu gélosé (GN) et incubé à une température de 37°C /24h permettant la croissance. Les cultures pures sont conservées à une basse température (+4°C) (**Guiraud ,1998**). Les souches de *Vibrio cholerae* isolées à partir des échantillons environnementaux peuvent être conservées sur des boîtes de gélose GNA pour des conservations à court terme ou congelé à -80°C (dans un bouillon nutritif stérile à 10% de glycérol) pour une conservation à long terme.

### **III. 2 Etude phytochimique de la plante *A. halimus***

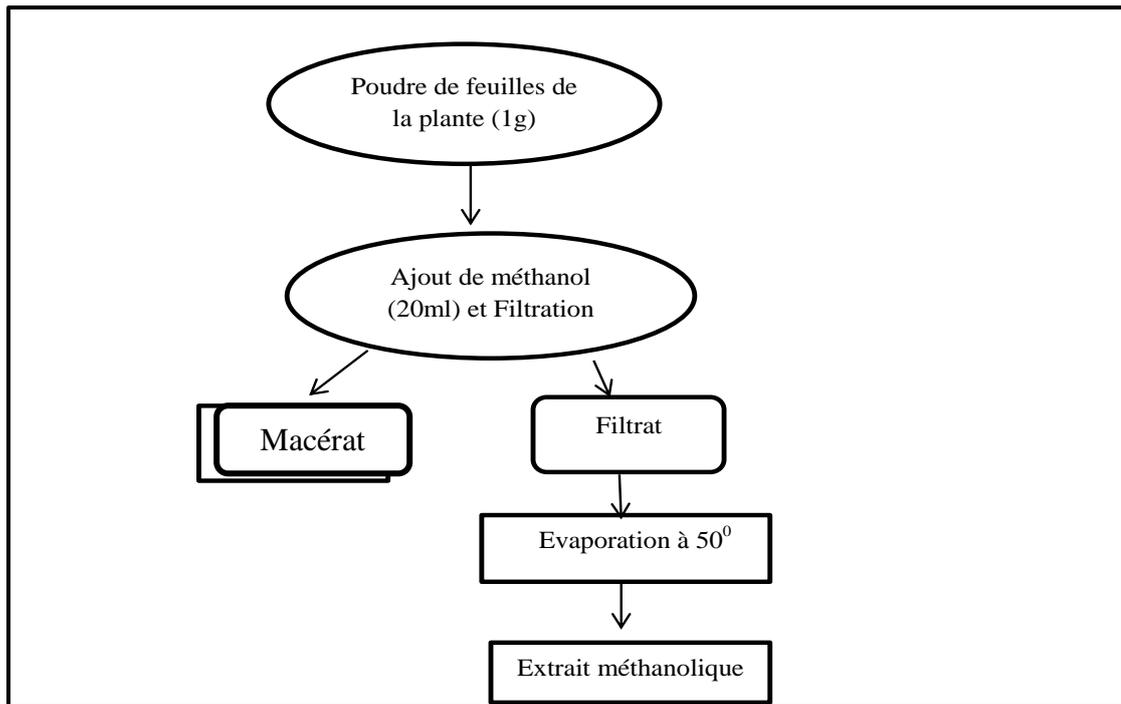
#### **III. 2 .1 Extraction des polyphénols**

##### ➤ **Préparation de poudre de plante**

La plante est débarrassée de ses impuretés, ensuite séchée à l'abri de la lumière à une température ambiante. La partie aérienne (les feuilles) d'*Atriplex halimus* est ensuite réduite en une poudre fine à l'aide d'un broyeur. La poudre ainsi obtenue va servir à la réalisation des différentes opérations d'extractions et analyses.

##### **III. 2 .1.1 Extrait méthanolique**

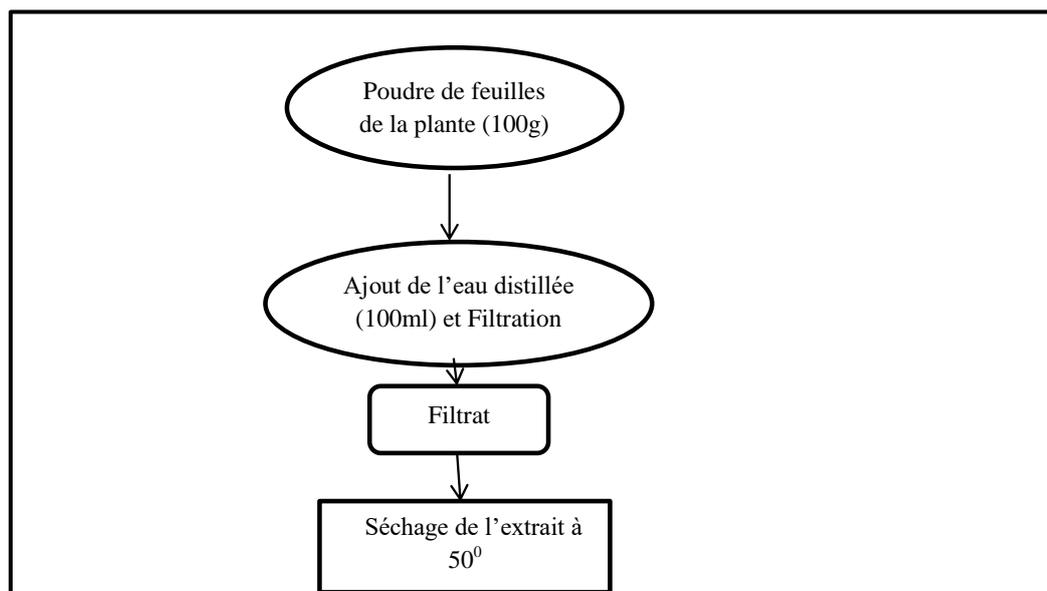
Les feuilles *A. halimus* (1 g) ont été réduites en poudre et extraites pendant 24 h avec 20 ml de méthanol pur à température ambiante, après la filtration par filtre millipore, le solvant a été évaporé sous vide à 50°C (**Benhammou et al, 2013**) .L'extrait a été conservé dans des flacons opaques bien scellés à température + 4°C.



**Figure19:** Procédure d'extraction méthanolique. (Benhammou *et al*, 2013)

### III. 2 .1.2 Extrait aqueux

Une macération aqueuse a également été effectuée sur 100 g de poudre de feuilles avec 1000 ml d'eau distillée et placée sous agitation pendant 24h. Après filtration sur papier wattman, l'extrait a été séché à l'étuve à 50°C (Binta ., 2003).



**Figure 20:** Procédure de macération aqueuse. (Binta ., 2003).

### **III. 2. 2 Stérilisation des extraits**

Les deux extraits méthanolique et aqueux ont été stérilisés par des filtres stériles (porosité de filtre : 0.22µm) pour servir à réaliser diverses analyses.

### **III. 2. 3 Détermination des rendements d'extraction**

Le rendement est déterminé par le calcul du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100% (Béné K *et al.*, 2015).

$$\text{Rd}\% = (\text{m1} \times 100) / \text{m0}$$

m1 : masse en gramme de l'extrait finale ;

m0 : masse en gramme de la matière végétale sèche ;

Rd : rendement.

### **III. 2. 4 Détermination du pH pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux**

Le potentiel d'hydrogène (pH) désigne la mesure de l'activité chimique des protons (les ions hydrogène) en solution. Notamment, le pH nous informe sur l'acidité ou l'alcalinité d'une solution. La mesure du pH a été effectuée par le biais du pH-mètre en immergeant l'électrode dans l'extrait d'*Atriplex halimus* après étalonnage à l'aide d'une solution tampon (AFNOR., 1986).

### **III. 2. 5 Analyses phytochimiques qualitatives**

Le screening phytochimique consiste à réaliser une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration, de précipitation ou de floculation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actif. Il consiste à détecter la présence des différentes grandes familles des métabolites secondaires de la plante à étudier. Les groupes phytochimiques contenus dans chaque extraits ont été recherchés selon les méthodes standard décrites par: (Rizk., 1982) (Bruneton, 1999) (Ranarivelo., 2004).

#### **III. 2. 5. 1 Détection des flavonoïdes**

1 mL de de l'extrait de plante est additionné de 0,5 mL de HCl concentré et de quelques grains de tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes.

### **III. 2. 5. 2 Test des saponosides**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été versés dans un tube à essai, puis le tube a été agité vigoureusement. 5 minutes après, la présence d'une mousse persistante met en évidence la présence des saponosides.

### **III. 2. 5. 3 Test des tannins**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été versés dans un tube, puis 2 mL du trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1 % ont été ajoutés. Lorsque le mélange donne une coloration verdâtre ou bleu noirâtre, les tannins sont présents.

### **III. 2. 5. 4 Test des polyphénols**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été transférés dans un tube, ensuite 1 mL du réactif de Folin Ciocalteu (RFC) et 1 mL de bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ont été ajoutés. Lorsque le mélange donne une coloration vert foncé, cela indique la présence des polyphénols.

### **III. 2. 5. 5 Test des alcaloïdes**

Les alcaloïdes ont été mis en évidence par le réactif de Mayer. L'ajout de quelques gouttes de ce réactif à 2 mL de la solution d'extrait de plante entraîne la formation d'un précipité rouge orangé en présence des alcaloïdes.

### **III. 2. 5. 6 Test des composés Anthracéniques**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été transférés dans un tube et 2 mL d'hydroxyle d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ont été ajoutés et le tube a été agité. Lorsque le mélange donne une coloration rouge, nous avons la présence des composés anthracéniques.

### **III. 2. 5. 7 Test des stérols/ terpénoïdes**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été mis dans un tube et 2 mL d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ont été ajoutés. L'apparition d'un anneau rouge brun ou violet, indique la présence des stérols ou des terpénoïdes.

### **III. 2. 5. 8 Test des sucres réducteurs**

Deux millilitres (2 mL) de l'extrait de plante ont été transférés dans un tube, puis 2 mL de liqueur de Fehling ont été ajoutés. Le tube a été chauffé jusqu'à l'ébullition, puis refroidit. L'apparition d'un précipité rouge brique, révèle la présence des sucres réducteurs.

### III. 2. 6 Analyses phytochimiques quantitatives

#### III. 2. 6.1 Détermination de la teneur totale en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits méthanolique et aqueux a été déterminée par spectrométrie en utilisant le test de réactif "Folin-Ciocalteu" (Sigma Aldrich, France). Un volume de 200 ml de l'extrait a été mélangé avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans de l'eau et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium à 7,5% dans un tube à essai. Après 30 min d'agitation, l'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-vis Jenway 6405. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE / g de matière végétale sèche) (Singleton et Rossi., 1965).

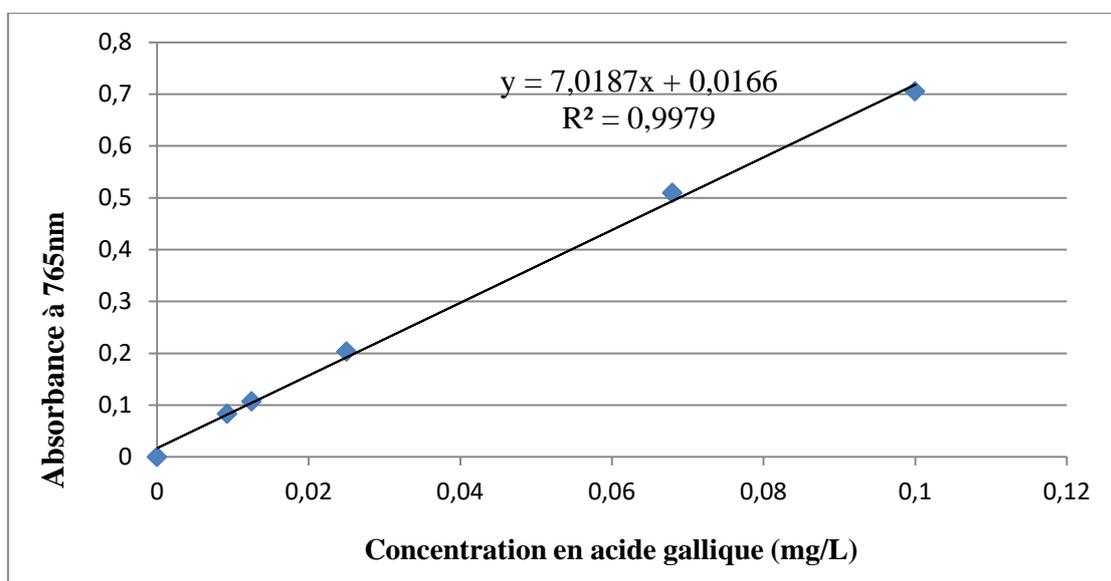


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

#### III. 2. 6.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été mesurée par le dosage colorimétrique au chlorure d'aluminium (Zhishen et al., 1999). Une aliquote (1 ml) d'extraits ou de solutions étalon de quercétine a été ajoutée à une fiole jaugée de 10 ml contenant 4 ml d'eau distillée. Au flacon, on a ajouté 0,30 ml de  $\text{NaNO}_2$  à 5%, après cinq minutes, on a additionné 0,3 ml d' $\text{AlCl}_3$  à 10%. Après 5 minutes, 2 ml de  $\text{NaOH}$  1M ont été ajoutés et le volume a été complété jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée. La solution a été mélangée et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. La teneur totale en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent quercétine (QE / g de matière végétale sèche).

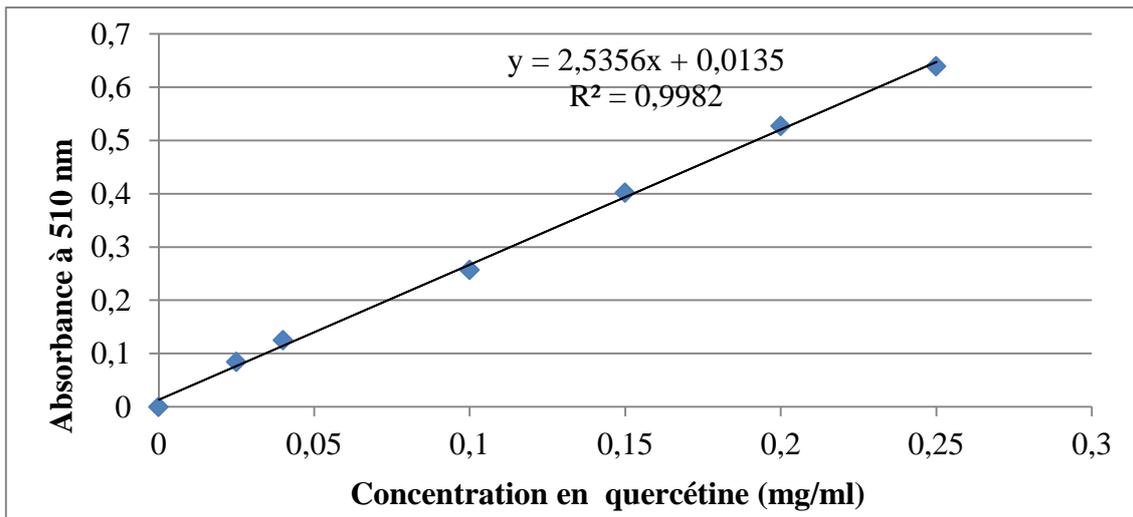


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

### III. 2. 6.3 Teneur en tanins condensés

On a utilisé la méthode à la vanilline-HCl pour déterminer la teneur en tanins condensés, pour cela un volume de 0,1 ml des aliquotes de chaque extrait a été mélangé avec 3 ml de vanilline à 4% et 1,5 ml de réactif HCl, le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante et l'absorbance a été lue à 500 nm. La catéchine a été utilisée comme standard et les résultats obtenus ont été exprimés en mg d'équivalent catéchine / g de poids sec (Price *et al.*, 1978).

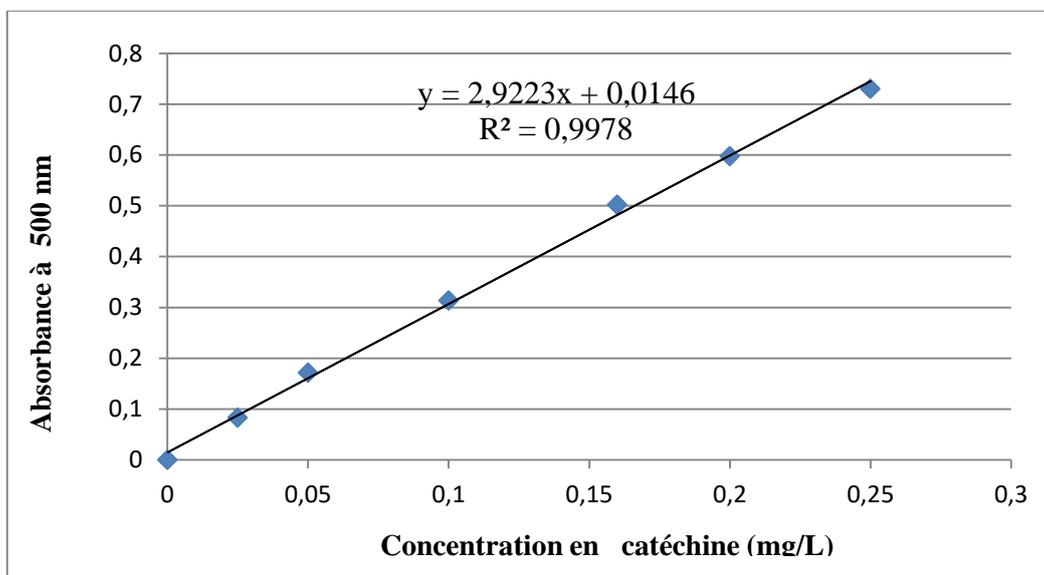


Figure 23: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

### **III. 2. 7 Techniques chromatographiques**

#### **III. 2. 7 .1 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La CCM est une méthode de séparation physico-chimique faisant intervenir une phase stationnaire ou adsorbant et une phase mobile ou éluant. L'identité d'une substance inconnue peut être orientée en comparant son Rf avec celui d'un authentique témoin (**Drissa., 2003**).

Le support utilisé dans cette étude, est une plaque de gel de silice.

Une concentration de 1mg/ml est préparée pour chaque extrait de la plante.

Les témoins utilisés sont : acide gallique, quercétine, catéchine.

Pour la migration des composés, divers systèmes constitués d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants d'éluion ont été utilisés.

L'analyse chromatographique sur couche mince de l'extrait a été effectuée par un système de séparation BAW (Butanol/Acide acétique/Eau: 40/50/10).

- **Rapport frontal (Rf)**

Le rapport frontal d'un composé organique en CCM est calculé à partir de la relation suivante :

$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$ . (**Drissa., 2003**).

- **Révélation**

Après le développement, les plaques ont été séchées. Les taches de migration seront alors visualisées à l'oeil nu ou sous irradiation UV. Les substances chimiques ont été révélées sous lampes UV 254 et 366 nm.

#### **III. 2. 7 .2 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

L'analyse qualitative des extraits aqueux et méthanoliques d'*Atriplex halimus* a été réalisée par HPLC. La chromatographie en phase liquide à haute performance base sa technique sur la pression de la phase mobile (l'éluant). Elle se différencie de la chromatographie sur colonne du fait que l'éluion se fait par une pompe qui confère une forte pression agissant sur la séparation des composés (**Snyder et al, 2011**).

Les analyses LC-PDA ont été réalisées sur un chromatographe Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La séparation a été réalisée sur une colonne Ascentis Express C18 (15 cm × 4,6 mm de diamètre intérieur garnie de 2,7 m) (Supelco, Bellefonte,

PA, USA). L'eau/acide acétique (0,075 %) à pH 3 (solvant A) et le méthanol/acide acétique (0,075 % ; solvant B) ont été sélectionnés comme phase mobile, en mode gradient linéaire : 0-5min : 5 % B, 5-60min : 5-100%. Le débit était de 0,8 ml/min et divisé en 0,35 ml/min en MS. Le volume d'injection était de 2 µL. Les chromatogrammes ont été extraits à 280 nm.

### **III. 2. 8 Détermination de la teneur en éléments minéraux d'*Atriplex halimus***

#### **-Principe**

En soumettant une substance-végétale à l'incinération, on obtient un résidu de cendres constitués par les éléments minéraux (**Didier ., 1996** ).

#### **- Mode opératoire**

L'incinération est opérée sur 100 g de poudre végétale dans des capsules de silice. Les éléments minéraux étudiés ont été dosés dans le résidu d'une prise d'essai de 500 mg de produit calcinée à 500° C pendant 6 à 8 heures. Après calcination, les cendres sont reprises au bain de sable par 5 cc de HCl pur, évaporés à sec pour insolubiliser la silice. Puis l'hydrolyse est effectuée en reprenant par 3 cc de HNO<sub>3</sub> à 10 % et en portant à l'ébullition pendant 5 minutes (cette hydrolyse est importante pour le dosage du phosphore) (Figure23). Après filtration on complète à 100 cc avec de l'eau bi-distillée (**Guéguen ., 1959**).

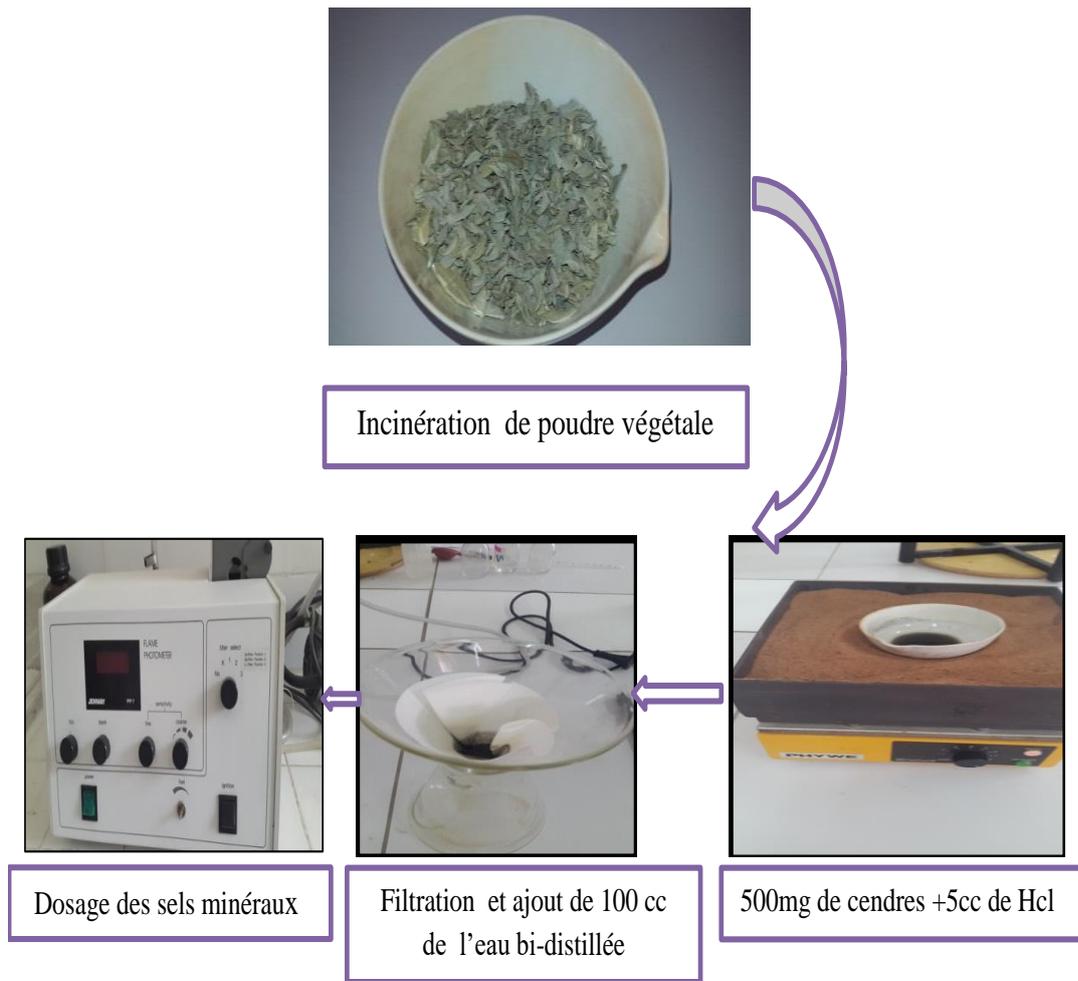


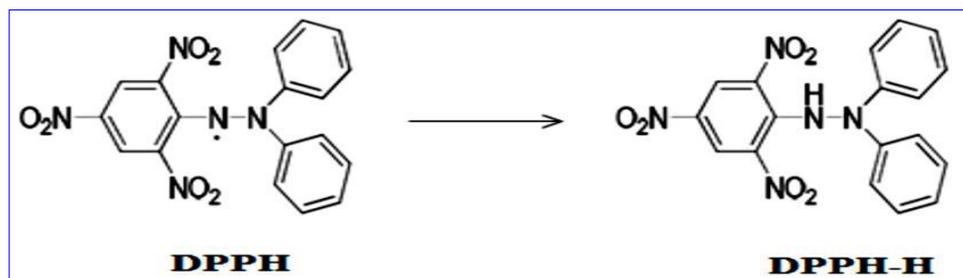
Figure 24: Protocole de dosage des sels minéraux. (Guéguen ., 1959).

Le sodium, le potassium, le calcium sont dosés par spectrophotométrie de flamme, par passage direct de la solution obtenue après incinération ; on établit une comparaison avec des solutions standards contenant l'élément à doser. Après avoir établi à partir d'une gamme étalon une courbe d'étalonnage qui permet de traduire la relation entre la DO et la concentration pour chaque élément : Na<sup>+</sup>, K et Ca.

### III. 2. 9 Evaluation de l'activité anti-oxydante

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Figure24) (Maataoui et al., 2006).

Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo et al., 2003).



**Figure 25:** Forme libre et réduite du DPPH.

### ➤ Mode opératoire

La capacité de piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux a été évaluée selon **Béné et al (2015)**. Dix (10)  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 1990  $\mu\text{l}$  de solution de DPPH (Sigma Aldrich, France) (0,025 mg / ml de méthanol). Après 30 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre une ébauche de méthanol absolu. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif (**Benalia et al ., 2015**). Les résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues pour chaque extrait, dont le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ de l'activité antioxydante} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

### III. 2.10 Détermination de IC50

La valeur IC50 est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (**Samarth et al., 2008**)

### III.3 Le probiotique : *Lactobacillus sp.*

#### III.3 .1 Isolement des souches

Le milieu de De Man Rogosa Sharp (MRS) (**Annexe**), c'est un milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles est utilisé pour l'isolement de ces bactéries (**Guiraud et Rosec., 2004**). Les lactobacilles sont généralement des aéro-anaérobies ; leur incubation en

anaérobiose a été assurée par la mise des boîtes de Pétri en jarres fermées avec un indicateur de CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 24 à 72 h (Bahri., 2014).

### **III.3.2 Purification des isolats de bactéries lactiques**

Plusieurs repiquages successifs ont été réalisés sur gélose et bouillon MRS afin de purifier les souches de bactéries lactiques jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes et bien développées. Après observation microscopique seul les bactéries à Gram+, catalase- et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon MRS jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

### **III.3.3 Identification des lactobacilles**

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

#### **III. 3.3.1 Etudes des caractères morphologiques**

##### **a) Examen macroscopique**

Permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux gélosés MRS en tenant compte des critères suivants : la taille, la forme, la consistance, le contour, la viscosité, la pigmentation et la couleur de la colonie, sa texture et son relief.

##### **b) Examen microscopique**

L'examen microscopique est révélé par :

##### **b.1 Observation à l'état frais**

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité et le mode de groupement des bactéries.

##### **b.2 Coloration de Gram**

Les colonies obtenues sur milieux gélosés MRS sont soumises à une coloration de Gram, à fin de déterminer la composition de leur parois ainsi que la forme des cellules (coques et bacilles), leur arrangement (Guiraud., 2003).

#### **III.3.3.2 Etude des caractères biochimiques et physiologiques**

##### **➤ Épreuve de la catalase**

La recherche de l'enzyme catalase est le deuxième test de pré-identification. La catalase est une enzyme dont la fonction principale, est la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène moléculaire et en eau (Bourgeois et Leveau., 1980). Son action a été mise en évidence par contact de la colonie avec une solution fraîche d'eau oxygénée. La

présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement gazeux abondant (du dioxygène) (**Marchal et al, 1982**).

➤ **Recherche de type fermentaire**

La production du CO<sub>2</sub> à partir du glucose est mise en évidence sur milieu MRS contenant la cloche de Durham. Le milieu est réparti dans des tubes à essais à raison de 10ml, stérilisés à 120°C durant 15 min. Après inoculation avec la souche étudiée, le développement d'une souche hétérofermentaire se traduit par l'apparition du gaz dans la cloche du Durham, qui est absent chez les homofermentaires (**Gibson et Abd el Malek., 1945**).

➤ **Croissance à différentes températures**

Les souches sontensemencées dans des bouillons MRS à 15 et 45°C pendant 48 heures. L'apparition de trouble indique la croissance des souches (**Hariti et al ., 2009**).

➤ **Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH**

Le milieu Moëller (**Annexe**), contenant 0,5 % de L-arginine a été utilisé dans ce test pour mettre en évidence la présence de l'enzyme arginine di-hydrolase chez les bactéries sélectionnées.

Le test est considéré comme positif (dégradation de l'arginine et accumulation de l'ammoniaque)

➤ **Profil de fermentation des sucres**

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité de fermentation des glucides. Chaque souche fermente des sucres différents. En nous basant sur ce critère d'identification nous pouvons sélectionner les bactéries lactiques (**Wood et Holzappel., 1995**). L'étude du profil fermentaire des sucres des souches isolées a été réalisée sur milieu MRS liquide sans sucre ni extrait de viande, additionné de 1 % de sucre à tester et 0,02g/l de pourpe de bromocrésol (**Tourneur., 1972**), inoculé par 0,1 ml de la suspension de la souche à tester. Pour créer les conditions de l'anaérobiose, une couche de l'huile de vaseline stérile a été ajoutée à la surface du milieu. Les sucres test sont : glucose, lactose, fructose, saccharose, xylose, arabinose, maltose, raffinose, mannose, cellobiose et mannitol. Après 24h d'incubation à 37°C, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré au jaune traduit la fermentation de sucré testé.

### **III. 3.4 Conservation**

#### **III.3.4.1 Conservation à court terme**

Les souches sontensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, ces cultures sont gardées à + 4°C. Les repiquages des cultures se fait tous les trois semaines (**Saidi et al ., 2002**).

### **III.3 .4 .2 Conservation à long terme**

Pour la préservation des souches de lactobacilles, les isolats ont été également conservés dans des congélateurs à -20°C dans des tubes stériles contenant 12 % de glycérol sur les milieux liquides MRS (Bazo., 2011).

### **III.3 .5 Détermination du potentiel probiotique des lactobacilles**

Une souche est dite à potentiel probiotique, si elle réagit positivement aux tests ci-dessous

#### **III.3 .5.1 Résistance au pH acide**

La résistance des souches lactiques aux conditions de pH bas a été évaluée selon la méthode décrite par Maragkoudakis *et al.* (2006) et Guo *et al.* (2010) avec quelques modifications. Les cellules d'une culture jeune de chaque souche sont recueillies par centrifugation (3000g, 15 min). Les culots sont lavés deux fois avec une solution stérile du PBS (pH 7.2) et remises en suspension. 1 ml de chaque suspension est ajouté à 9 ml d'une solution de PBS stérile dont le pH est ajusté à 2.0 et 3.0 respectivement par du HCl (4N). Les suspensions sont agitées au vortex pendant 10s et ensuite incubées à 37°C pendant 3 h. La viabilité des bactéries est déterminée par des dilutions en cascade et dénombrement sur gélose MRS.

#### **III. 3 .5.2 Tolérance aux sels biliaires**

Pour exercer leurs effets bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal (TGI), les LAB doivent résister à la toxicité des sels biliaires qui a été testée en suivant les étapes du protocole décrit par Ruiz *et al.* (2016).

Des bouillons MRS sontensemencés chacun par une souche lactique, puis centrifugés à 4500 g pendant 15 min. Les cellules bactériennes sont lavées 2 fois en utilisant le tampon PBS (pH 7,2). Ensuite, les culots bactériens sont récupérés dans des tubes contenant le tampon PBS ajusté à pH 8 avec une concentration de 0,3 % des sels biliaires. La DO de chaque suspension bactérienne a été ajustée ( $\approx 10^8$  UFC/mL) et les tubes sont incubés à 37°C pendant 4 h qui reflète le temps de passage des aliments dans le duodénum. Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules viables (UFC/mL) après 4 h par rapport à l'inoculum initial.

### **III.3. 5.3 Test d'auto-agrégation**

L'auto agrégation a été réalisée selon la méthode de **Xu et al (2009)** avec des modifications mineures. Les cellules d'une culture bactérienne fraîche sont récupérées par centrifugation à 4000 g pendant 10 min, le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon PBS et remis en suspension dans la même solution. La densité optique de la suspension est ajustée (A0h) =  $0,5 \pm 0,02$  à 600 nm. La suspension bactérienne (3 ml) est agitée par vortex pendant 10 s. Après incubation à 37°C pendant 2 h, la densité optique du surnageant est mesurée à 600 nm (A2 h) et le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé en ;

$$\% \text{ Autoagrégation} = 1 - (A2 \text{ h}/A0 \text{ h}) \times 100.$$

A0h : La densité optique de la suspension.      A2 h : La densité optique du surnageant.

### **III.3.5.4 Test d'hydrophobicité**

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Iyer et al (2010)** : des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à froid à 12000 rpm/5min suivi de deux lavages successifs puis suspendu dans 1.2 ml de tampon urée phosphate magnésium (pH 6.5). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1.0 à 450nm (DO initiale).

Ensuite 0.6 ml du xylène a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 10 min. Les tubes sont vortexés pendant 2 min puis laissés au repos pendant 15 min pour la séparation de deux phases.

La densité optique de la phase aqueuse est ensuite mesurée c'est la densité optique finale ((DO finale). L'hydrophobicité est présentée par la différence de la densité optique calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale} \times 100.$$

### **III. 3.5.5 Etude de l'antibiorésistance**

La méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, des pré-cultures ont été préparées dans du bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18heures. (1 ml) de chaque inoculum bactérien ( $10^8$  UFC/ml) a été inondé sur une couche de milieu MRS solide. Les boîtes ont été laissées sécher à température de laboratoire. Chaque boîte reçoit sept

disques d'antibiotiques à savoir: Ampicilline (10 µg), Pénicilline (10U/I), gentamycine (10 µg), Chloramphénicol (30µg) et Vancomycine (30 µg), Acide Nalidixique (30 µg). Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Leroy et al., 2007**).

### **III. 4 Révélation de potentiel antibactérien des extraits de *Atriplex halimus* vis-à-vis *V.cholerae***

#### **➤ Préparation de l'inoculum**

En premier lieu une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) (**Chaouche et al., 2016**). Une suspension de  $10^5$  UFC/ml est obtenue après une série de dilution.

#### **III. 4. 1 Méthode de diffusion par disque**

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. Les extraits bruts méthanoliques et aqueux ont été solubilisés dans du DMSO pour obtenir des concentrations de 6.25 mg/ml à 200 mg/ml.

La gélose de Mueller-Hinton (**Annexe**) est coulée dans des boîtes de Pétri. La surface de gélose est inondée par 1 ml de suspension bactérienne ( $10^5$  UFC/ml). Des disques de papier buvard de 6 mm de diamètre (Bio Mérieux) imbibés de 50 µl de chaque extrait (méthanolique et aqueux) ont été déposés à la surface de la gélose. Le DMSO est utilisée comme contrôle négatif alors que la gentamycine sert comme un contrôle positif. Les boites sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 mn et mises à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures (**Celiktas et al., 2007**). L'appréciation de l'efficacité des extraits a été faite selon le critère de **Ponce et al (2003)**. Ainsi, une substance est dite inefficace si le diamètre d'inhibition est inférieur à 8 mm alors qu'elle est dite efficace si le diamètre est supérieur à 8 mm.

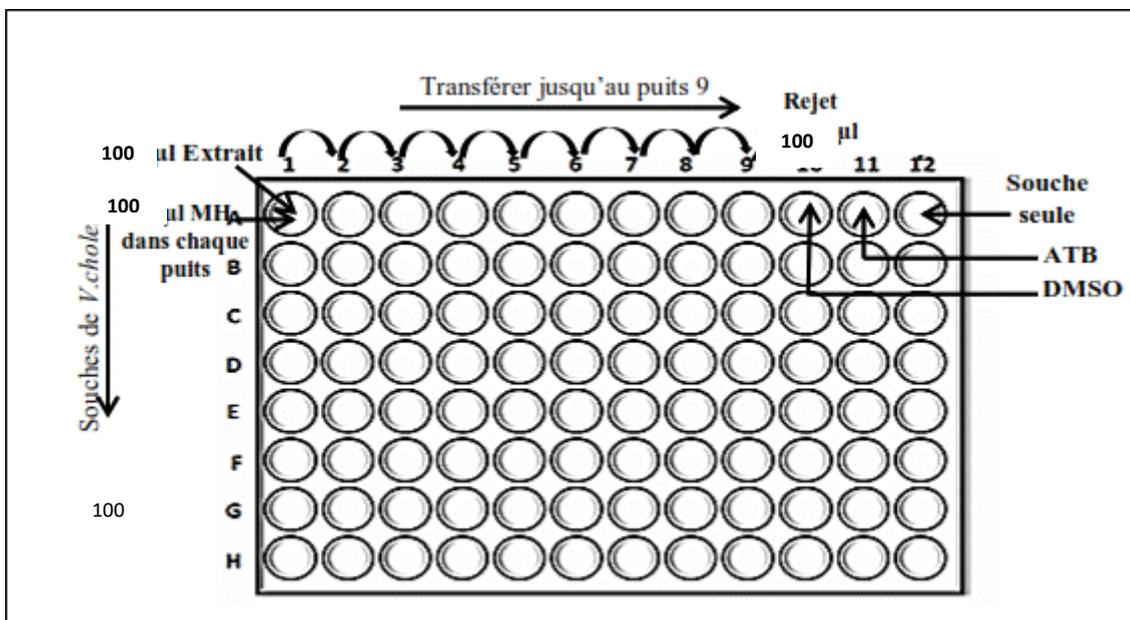
#### **III. 4. 2 Détermination des paramètres antibactériens**

##### **III. 4.2.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures (**Moroh et al. 2008**).

Une microplaque de 96 puits contenant chacun 100 µl du milieu du test Muller Hinton est utilisée auquel on rajoute une série de dilution binaire de l'extrait (méthanolique et aqueux) à tester dont la concentration de départ est de 200 mg/ml. L'inoculation est la dernière étape dans la préparation de microplaque, une suspension bactérienne d'une opacité de 0,5 Mc Farland équivalent de  $1 \times 10^8$  UFC/ml est ajoutée dans chaque puits de microplaque. (Figure25)

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il est à noter que la Gentamycine est utilisée comme un témoin positif (**Chikhi., 2013**).



**Figure26:** Technique de détermination des CMI par la méthode de microdilution.

### III. 4.2.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

À partir de la concentration minimale inhibitrice(CMI) la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée, en ensemençant par étalement de 100 µL des échantillons des puits n'ayant montré aucune croissance microbienne visible à l'œil nu dans les microplaques après 18 h à 24 h d'incubation sur bouillon Muller Hinton. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01% de bactéries survivantes (99,99% de destruction) après un temps d'exposition à l'extrait de 18 h à 24 h correspond à la CMB de l'extrait sur la souche testée. (**Boris ., 2019**)

### **III. 4.2. 3 Le rapport CMB/CMI**

Il permet de préciser le pouvoir antibiotique de la substance (Fauchere., 2002). Lorsque la CMB de l'extrait est égale à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4 l'extrait est bactéricide tandis qu'il est qualifié bactériostatique quand sa CMB est supérieure à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est plus élevé que 4 (Kamanzi .,2002).

### **III. 4. 3 Méthode par « bioautographie »**

C'est une technique qui permet la détection de composés antimicrobiens au sein d'un extrait de plante. La méthode est similaire à la méthode de l'antibiogramme, mais dont l'extrait à tester diffuse dans l'agar inoculé à partir de la plaque de chromatographie. La technique utilisée est la bioautographie par immersion. La plaque CCM contenant le spot de la solution de l'extrait méthanolique ou aqueux est placée dans une boîte de Pétri, puis recouverte du milieu gélosé Muller Hinton. Après solidification, les bactéries sontensemencées et la boîte de Pétri est ensuite incubée à 37°C pendant 24h (Tasdemir *et al* ., 2004). Afin de permettre une meilleure diffusion des composés, les boîtes peuvent rester à basse température durant quelques heures avant incubation. La présence d'une bande claire entourant le spot sur la plaque indique la présence d'activité antibactérienne (Abdini ., 2018). Pour observer les résultats, une solution de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/ml est vaporisée sur la surface de la gélose et incubée de nouveau pendant quatre heures. L'INT est alors transformée par une déshydrogénase en un composé d'une couleur rouge foncé. L'inhibition de la croissance bactérienne est révélée par la présence de zones claires (Abdini ., 2018).

### **III. 5 Etude des interactions bactériennes entre le probiotique et Vibriion cholérique**

Deux méthodes sont utilisées, directe qui repose sur un contact cellulaire et indirecte qui consiste à tester le surnageant de cultures bactériennes lactiques sur la cellule bactérienne indicatrice par méthode des puits.

#### **III. 5 .1 Méthode directe de Tagg et Mc Given (1971)**

Cette méthode permet de tester l'effet inhibiteur de la culture lactique par contact direct vis-à-vis les souches indicatrices (Vibriion cholérique).

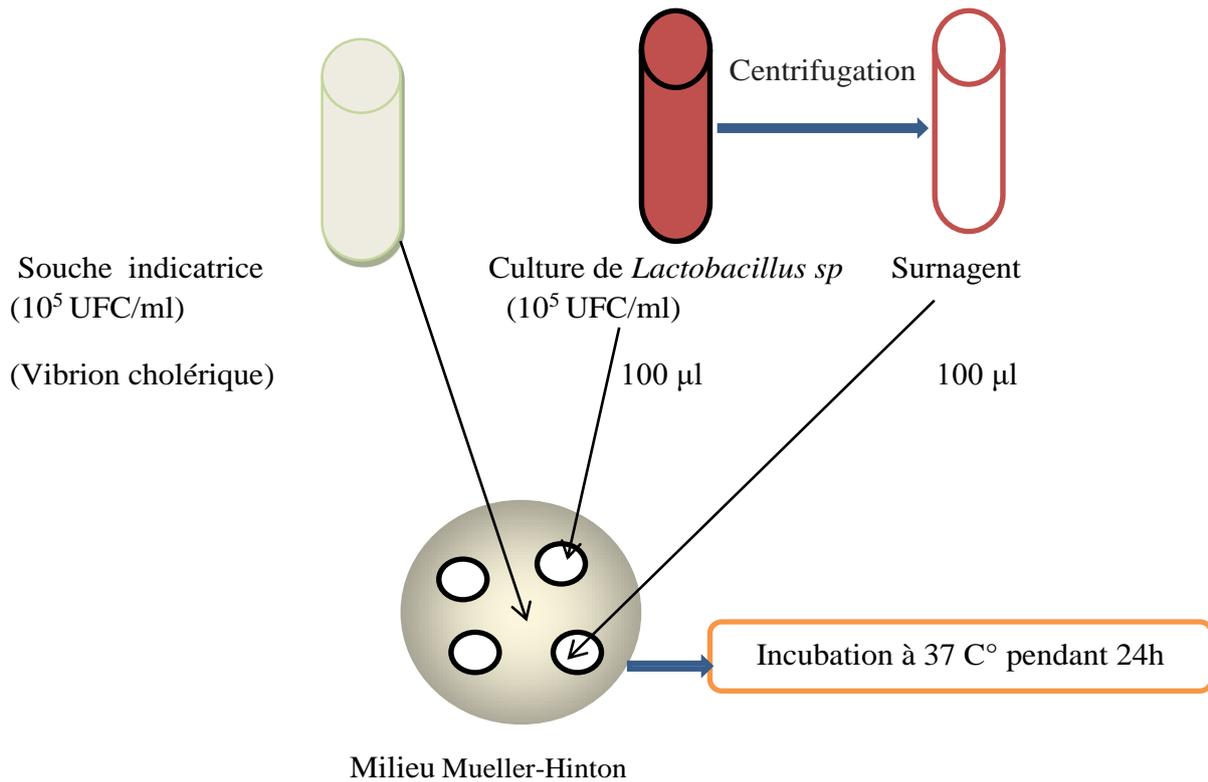
Les cultures inhibitrices de lactobacilles sont cultivées en milieu MRS liquides, tandis que la souche pathogène est cultivée dans le bouillon nutritif, puis incubées pendant 18h à 37°C.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur la surface du milieu Muller Hinton inoculé préalablement par écouvillonnage avec la culture indicatrice (pathogène) et remplis avec 100 µl de culture lactique (Figure26)

Ensuite, Les cultures sont portées à incubation à 37 C° pendant 24h, un résultat positif se traduit par la présence de zones d'inhibition formées autour des puits (**Hwanhlem et al ., 2011**).

### **III. 5 .2 Méthode indirecte**

Il s'agit de détecter des zones d'inhibition après co-culture entre le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche pathogène. Les lactobacilles ont été cultivées dans un bouillon MRS pendant 16 h à 37 ° C et le bouillon a été centrifugé à 9 000 tr /min pendant 10 minutes et le surnageant a ensuite été stérilisé par filtration en utilisant des filtres ayant taille des pores de 0,2 µm et stockés à 4 ° C jusqu'à une utilisation ultérieure. Pour effectuer un test de diffusion de puits d'agar ; une aliquote de 100 µl de l'agent pathogène indicateur a étéensemencée sur la gélose et une aliquote (100 µl) du surnageant brut de la culture lactique à tester a été versée dans les puits (Figure26) .Les boites prêtes sont par la suite incubées à une températures de +4 C° pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion de la substance (**Doumandji et al ., 2010**).Ensuite, les boites ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h et le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits était mesuré en millimètres (**Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R. ,1983**).



**Figure 27** : Schéma récapitulatif de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis-à-vis *Vibrio cholerae*.

### III.6 Détermination de l'activité antibactérienne de l'association des extraits d'*Atriplex halimus* et de *Lactobacillus. sp* contre *V.cholerae*.

#### III.6. 1 Méthode de diffusion par puits (test préliminaire)

Des concentrations de 16,25 mg/ml à 200 mg/ml sont préparées par la solubilisation des extraits bruts méthanoliques et aqueux dans du DMSO. Les boîtes de Pétri sont remplies de 15 ml de gélose Mueller-Hinton dans lesquelles estensemencé un millilitre de la suspension bactérienne (*V.cholerae*  $10^5$  UFC/ml), en surfusion et sont ensuite séchées pendant 10 minutes puis la surface de la gélose est inondée par 0.1ml de l'inoculum (*Lactobacillus sp*) ( $10^5$  UFC/ml). À l'aide d'un emporte-pièce stérile, on pratique des cavités dans la gélose, ensuite chaque cavité est remplie par 50 µl de l'extrait à tester à différentes concentrations. Les boîtes de Pétri avant de les incuber à 37°C pendant 24h sont placées à 4°C pendant 4 heures pour faciliter la diffusion de l'extrait. L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits.

### **III.6 .2 Association des extraits et surnagent de lactobacilles**

On introduit dans la gélose Mueller-Hintonensemencée par le germe *V.cholerae* ( $10^5$  UFC/ml) des puits ; le premier est rempli par la concentration minimale inhibitrice de chaque extrait sur la souche ciblée, le deuxième est rempli par 50  $\mu$ l de surnagent et le dernier puits contient le mélange de même volume de probiotique (surnagent) et les extraits. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h, ensuite les diamètres de chaque auréole ont été mesurés.

### **IV. Analyse statistique**

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata .Les résultats sont exprimés en  $\bar{X} \pm SEM$  (Erreur Standard de Mesure).Les fréquences sont représentées en % .Une différence de Log 1 UFC/ml est considérée comme significative. Les données ont été analysées par le Test ANOVA et Student. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Excel 2003.

## ***CHAPITRE II***

### ***RÉSULTATS ET DISCUSSION***

## I.1 Analyse physico-chimique des sites de prélèvements

### I.1 .1 Température et pH des eaux analysées

Les analyses physico-chimiques ont concerné les paramètres suivants : la température et le pH. Ces caractéristiques physico-chimiques des eaux étudiées sont regroupées dans le tableau 08.

**Tableau 08:** Valeurs moyennes de température et de pH des stations analysées.

Origine de prélèvement	Température (T°C)	pH
S1 : Station d'épuration de Mascara (avant le traitement)	22,5± 0,12	7.65± 0,11** *
S2 : Oued Mascara	20± 0,50	7.57± 0,38** *
S3 : Jet d'eau	19± 0,31	7.92± 0,33** *
S4 : Station thermale (Bouhanifia)	25± 0,0 2	8.09± 0,01** *
S5 : Eaux usées	22± 1,1	7,75± 0,25 ** *
** *: p < 0, 001		

D'après les résultats illustrés dans le tableau 08, il y avait une différence significative des valeurs des températures des cinq stations avec (p<0, 001), y compris le potentiel d'hydrogène (pH).

La température enregistrée au niveau des eaux de différents prélèvements oscille entre 19°C et 25°C. La température de l'eau constitue un facteur important dans l'environnement aquatique qui régit presque la totalité des réactions physiques, chimiques et biologiques (**Chapman et al ., 1996**). Les variations de la température ont des effets importants car elles influencent le développement des micro-organismes (**Liss and Allen., 1992**). Les vibrions se développent lorsque la température augmente (> 15°C) et dans les milieux humides alcalins et salés (**Miossec ., 2002**).

Les valeurs du pH des eaux examinées varient de 7,57 à 8,09. Cette gamme favorise la croissance des vibrions puisque ces bactéries sont alcalophiles prolifèrent quand le milieu

est alcalin. Selon **Cohen et Karib (2007)** ces bactéries croient à valeurs de pH allant de 7,5 à 9,2.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Benfetta et al (2017)** qui ont enregistré des valeurs de pH neutres à basiques variant de 7 à 8,4 dans les stations d'épurations de la wilaya de Mascara. La gamme de pH biologique se situe entre 6,5 et 8,5 (**Maiga et al., 2006**), donc la distribution des *Vibrios* dans l'environnement aquatique est sous l'effet des variations de température, de pH, plus la pluviométrie et la matière organique.

## **I.2 Dénombrement des *Vibrio***

Le tableau 9 représente la concentration des *Vibrio sp* recherchés dans les eaux prospectées.

**Tableau 09:** Concentrations des *Vibrio sp* dans les prélèvements hydriques.

<b>Sites de prélèvement</b>	<b><i>Vibrio sp</i> (UFC/100 ml)</b>
<b>S1</b>	$2,5 \times 10^3$
<b>S2</b>	$8 \times 10^3$
<b>S3</b>	$3,4 \times 10^3$
<b>S4</b>	$2 \times 10^3$
<b>S5</b>	$11 \times 10^3$

Les résultats relatifs aux dénombrements des vibrions dans l'eau ont montré que ces bactéries ont été réparties entre  $25 \times 10^2$  et  $11 \times 10^3$  (UFC /100mL). Le taux le plus élevé a été enregistré dans les eaux usées. Les eaux usées domestiques rejetées après consommation contiennent des polluants, notamment organiques qui favorisent la croissance bactérienne. En effet, certaines eaux usées contiennent une charge polluante importante (**Allalguia et al, 2014**).

## **I.3 Caractérisation des vibrions cholériques**

### **I.3.1 Isolement et identification**

Les analyses bactériologiques ont permis l'identification de genres bactériens appartenant aux familles et aux pourcentages suivants : des *Enterobacteriaceae* 70%, des *Aeromonadaceae* 10% et des *Vibrionaceae* 20% (Figure27).

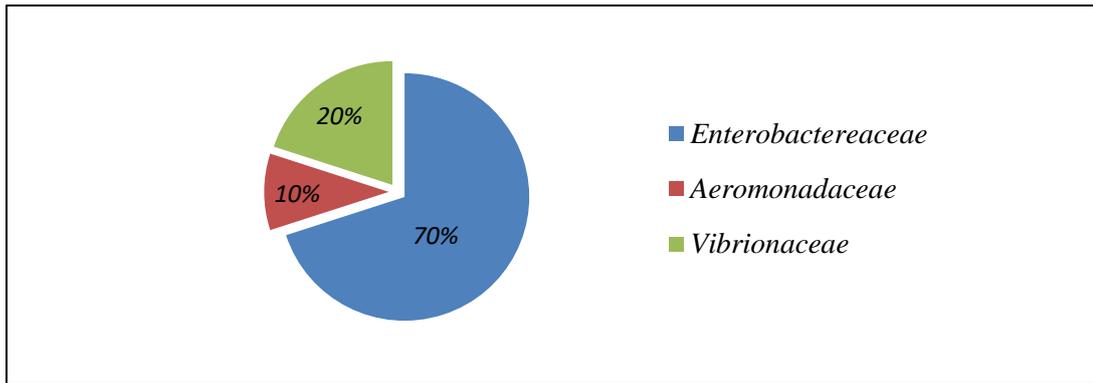


Figure 28: Taux de bactéries isolées exprimé par famille bactérienne.

Dans la famille des *Enterobacteriaceae* c'est principalement : *E coli*, *Salmonella sp*, *Enterobacter* qui ont été isolées, pour les *Aeromonadaceae* nos échantillons étaient contaminés par *Aeromonas hydrophyla*. Notre isolement révèle la présence de diversité de germes qui sont d'une part des indicateurs de contamination et d'autre part sont dotés de pouvoir pathogène et peuvent engendrer plusieurs maladies à transmission hydrique. Donc l'eau est la principale source d'exposition humaine aux risques microbiologiques.

### I.3.1.1 Aspect macroscopique et microscopique

Après 24h, les colonies de *Vibrio cholerae* étaient reconnaissables sur GNAB par leur forme ronde, aspect translucide et bleuté et aux bords réguliers.

Les vibrions sont visibles sous forme des bacilles à Gram négatif en virgule et mobiles à l'état frais.

L'identification des *Vibrionaceae* a permis de quantifier 40% de *Vibrio cholerae* et 60% des *Vibrio non cholérique* dont *Vibrio mimicus* (Figure 28).

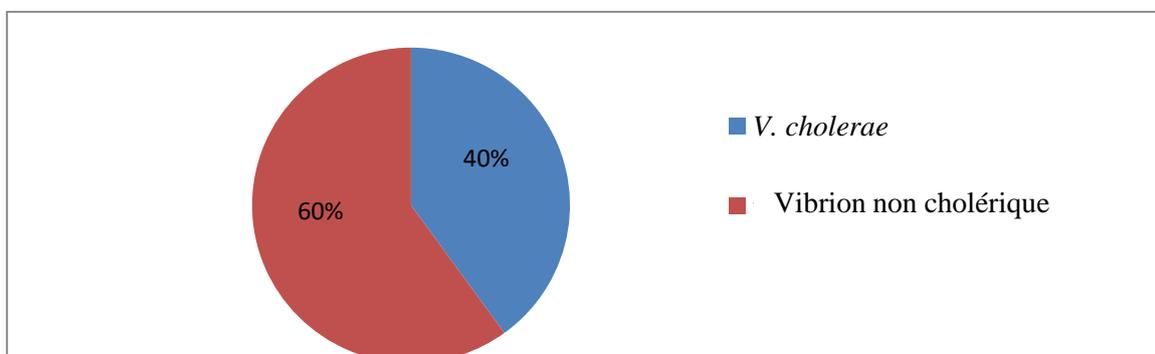


Figure 29: Pourcentage des souches de *Vibrio* isolées.

### I .3.1.2 Test d'agglutination

L'ensemble des examens macroscopiques, microscopiques et l'identification biochimiques confirment que 40% de souches sont *Vibrio cholerae*. Par contre le test de latex réalisé montre que ces souches identifiées sont non auto agglutinables appartenant aux *Vibrio cholerae* non O1. L'aspect macroscopique et microscopique de *Vibrio cholerae* non O1 est démontré dans la photo 02.



**Photo 02:** Aspect macroscopique et microscopique après coloration de Gram de *V.cholerae non O1*. (Gx100).

Ces souches typiquement aquatiques sont réparties comme suit :

**Tableau 10 :** Nombre et fréquence d'isolement des *Vibrio sp* dans les différents sites d'eaux analysées.

Nombre et pourcentage de souches de <i>Vibrio</i>			
Sites de prélèvement	<i>Vibrio.sp</i> totaux	<i>Vibrio non cholérique</i>	<i>Vibrio cholerae non O1</i>
Station d'épuration de Mascara (avant le traitement)	02 (20%)	02(33,33%)	00(00%)
Oued Mascara	02(20%)	01(16,66%)	01(25%)
Jet d'eau Sidi said	01(10%)	00(00%)	01(25%)
Station thermale (Bouhanifia)	02(20%)	01(16,66%)	01(25%)
Eaux usées	03(30%)	02(33,33%)	01(25%)
Fréquence des souches	100%	60%	40%

Etant donné que sur le plan statistique, nous avons enregistré une variabilité dans le nombre et le pourcentage des souches isolées dans les lieux cités précédemment (voir annexe).

La présence de *Vibrio cholerae non O1* dans l'eau de oued, jet d'eau, station thermale et eau usée (25%) est une menace pour la santé publique, et il a été décrit que des *V. cholerae non-O1* et *non-O139* se retrouvent dans des environnements aquatiques dans le monde entier, en particulier dans des eaux faiblement saumâtres, et malgré qu'ils soient halophiles, ils prolifèrent aussi dans les eaux douces (**Croci et al ., 2001**).

Le danger lié à ce germe réside dans son habitude à résister à conditions environnementales car ces bactéries ont la capacité de s'adapter à des stress provoqués par la variation de certains facteurs du milieu, comme la température, le pH ou le manque de ressources nutritives. Cette adaptation va se traduire par des changements métaboliques et phénotypiques qui vont conditionner leur survie ; ce qui peut être comparé à un phénomène de dormance. Les cellules sont dites alors « Viables mais Non Cultivables » (VNC) (**Guegan., 2006**).

Dans ce travail, les souches étaient isolées entre le mois de mai et juin où la température est plus au moins élevée, selon certains auteurs , la prévalence et la concentration des *Vibrio cholerae non O1* est étroitement liée à la température de l'eau, le développement de cette espèce étant important en période estivale (**Croci et al ., 2001**).

Vivre en communauté pour cette bactérie aggrave sa virulence ,ce qui est signalé par **Thomas ( 2004)** qui déclare que *V. cholerae non-O1* peut acquérir des gènes de virulence ou des îlots de pathogénicité lorsque coexistent d'importantes populations de bactéries ou de bactériophages, car le milieu hydrique est un réservoir universel et permanent de vibrions cholériques pathogènes .

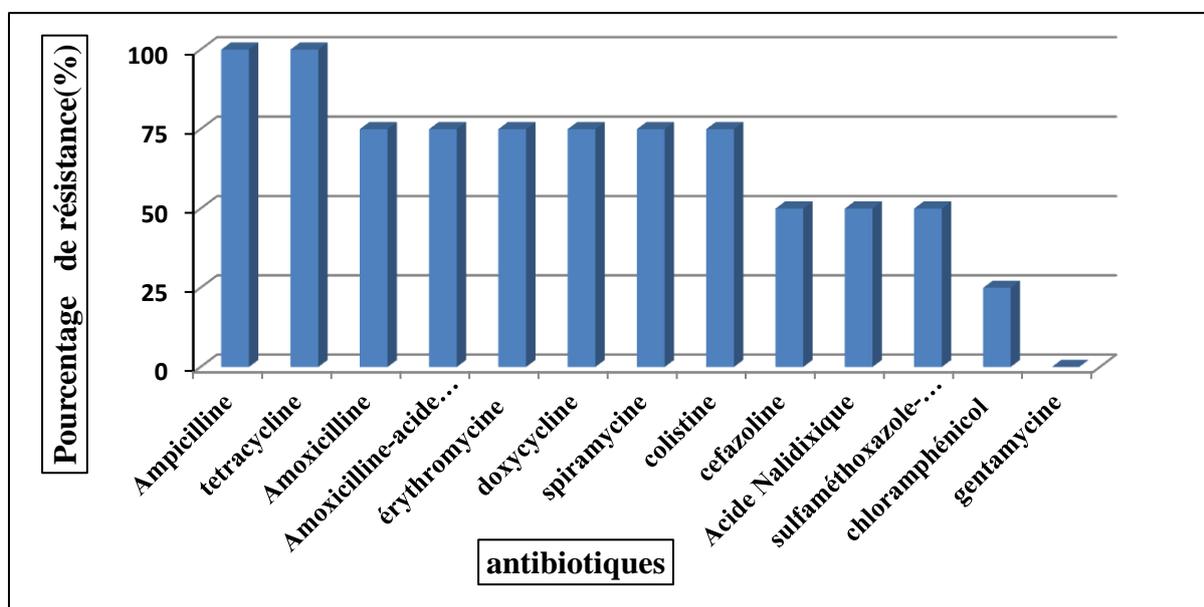
Tous les humains sont supposés sensibles à une gastroentérite en cas d'ingestion d'un nombre suffisant de *V. cholerae non-O1/non-O139* dans des aliments appropriés, ou susceptibles de voir leur blessure s'infecter si celle-ci est exposée à l'eau ou des coquillages ou crustacés contenant des vibrions. Une septicémie se développe le plus couramment chez des populations immunodéprimés (**Boore et al ., 2004**).

En 1992, dans le Sud de l'Inde, une épidémie de choléra était associée à un nouveau sérotype de *Vibrio cholerae non O:1*; il est baptisé O : 139 (selon le schéma de Sakazaki), synonyme de Bengal, en relation avec son lieu d'isolement initial (côte du golfe de Bengal) (**Albert ., 1994**).

En Algérie entre le 07 Août et le 15 septembre 2018, nous avons assisté dans certaines localités isolées dans les wilayas de Bouira, Blida, Tipaza à l'apparition de cas de gastro entérite aiguë avec diarrhées profuses cholériques survenant chez des personnes vivant au sein d'une même famille. L'identification du germe en cause par l'institut Pasteur Algérien a révélé la présence de *Vibrio cholerae* O1 Sérotype Ogawa chez 83 patients dont deux (02) décès ont été déplorés depuis la déclaration des premiers cas.

#### **I.4 Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques**

La lecture et l'interprétation ont été faites selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2014). Les résultats de l'antibiorésistance des vibrions cholériques sont regroupés dans la figure 29.



**Figure30:** Pourcentage de résistance des souches *Vibrio cholerae* isolées aux antibiotiques.

L'étude de la sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques a révélé des profils variables et très inquiétants. Ainsi on constate une résistance à 100% pour l'ampicilline, la tétracycline et un taux de 75% à l'amoxicilline, érythromycine, doxycycline, amoxicilline-acide clavulanique, spiramycine et colistine. Les isolats étaient fréquemment résistants au cefazoline, acide nalidaxique et l'association sulfaméthoxazole-trimatoprim avec une fréquence de 50%. Le chloramphénicol est touché par 25% de résistance par nos souches.

La grande majorité des souches de *V. cholerae* résistant pour l'ampicilline possèdent des gènes de la bêta-lactamase. Celui-ci leur confère une grande résistance pour les antibiotiques de la famille des bêta-lactames.

Selon **Guevard (2007)** cette résistance est due à de multiples mécanismes dont la résistance plasmidique, transférable et chromosomique.

Selon **Urassa** entre 1997 et 1999, il y a eu une augmentation significative de la proportion d'isolats de *V. cholerae* O1 résistants à la tétracycline alors que *V. cholerae* des échantillons d'eau et de sédiments à Hong Kong en 2006 étaient sensible à la tétracycline et au chloramphénicol (**Wang et al ., 2006**), par opposition aux études faites par **Adeyemi en 2008** qui a marqué une résistance à ces antibiotiques.

Le taux de bactérie *Vibrio cholerae* O1 Multi- Résistante (BMR) était globalement de 27% en 2002 et de 91% en 2006 (**Anné et al ., 2008**).

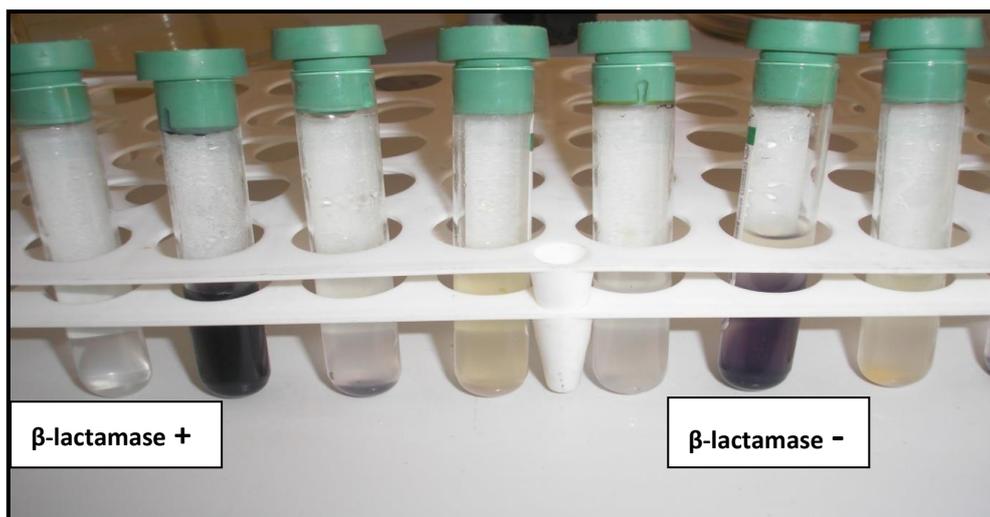
Ces différences observées peuvent être en raison du fait que les antibiotiques de première génération, y compris l'ampicilline, le chloramphénicol et la tétracycline ont été complètement abusés dans cet environnement.

Malheureusement actuellement la tétracycline et la doxycycline sont les antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine et les plus prescrits en cas d'une infection par *Vibrion cholérique*.

On constate que la gentamycine est très active contre toutes les souches isolées de différents échantillons analysés, ces résultats sont semblables avec les études faites par **Tiekoura et al (2010)** qui déclare que *Vibrio cholerae* demeure sensible aux aminosides, et aux quinolones.

### I .4.1 Production de bêta–lactamases

L'augmentation de la résistance aux bêta–lactamines est due à la production de bêta–lactamases, ainsi la sécrétion de cette enzyme chez les souches de *Vibrio cholerae* est de 50%.(Photo 03).**Eddabra (2011)** a décelé que 46,56% des souches de *Vibrio* totaux possèdent une résistance acquise caractérisée essentiellement par production de pénicillinase à bas niveau ou cephalosporinase à bas niveau ; parmi cette population sécrétrice de cette enzyme *Vibrio cholerae non O1*. La résistance aux  $\beta$ -lactamines est probablement causée par la production de bêta–lactamases de type pénicillinase.



**Photo 03 :** Détermination des bêta –lactamases.

### **I .5 Croissance de *Vibrio cholerae* en présence du Sel (NaCl) :**

La mise en culture des souches en présence de concentration en NaCl qui égale à 13, 37% nous a permis de voir leurs aptitudes à croître en présence de cette concentration.

Les résultats obtenus montrent que les souches *Vibrio cholerae* 2 et 4 résistent à cette concentration donc leur sensibilité aux extraits de plantes est due aux principes actifs de la plante mais non pas à sa salinité par contre la croissance de *Vibrio cholerae* 3 et 1 est inhibée.

## **II. Etude phytochimique d'*Atriplex halimus***

### **II. 1. Caractéristiques des extraits**

#### **II. 1.1Extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique obtenu est de couleur verte foncée avec un aspect visqueux présentant des formes en cristaux avec un rendement de 18% et un pH de 6,28. Une étude qui a été faite par **Belyagoubi et al (2009)** indique un rendement de 24% de la même espèce et de la même partie utilisée pour l'extraction (feuillage) mais d'une région différente.

#### **II. 1.2Extrait aqueux**

L'extrait aqueux à un rendement de 13,05% est de couleur marron avec un aspect poudreux après l'évaporation de l'eau .Son pH est de 7,93. Ces résultats sont différents à ceux de nos collaborateurs **Khaldi et al (2015)** qui ont décelé un rendement de 0,052% à

partir d'une plante isolée de la même région. Cette différence en rendement dépend du génotype, la physiologie, la période de la cueillette et la technique d'extraction utilisée.

## II. 2 Screening phytochimique

Des investigations phytochimiques ont permis de mettre en évidence des classes majeures de composés chimiques appartenant à des métabolismes secondaires. Les résultats du criblage phytochimique des extraits méthanoliques et aqueux sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau11:** Screening phytochimique des deux extraits.

Phytoconstituents	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Tannins	+++	++
Flavonoïdes	+++	++
Alcaloïdes	+	-
Quinones	+	+
Sucres réducteurs	+++	-
Saponines	+	+++
Coumarines	+	-
Terpénoïdes	-	-

+++ : Abondant. - : Absent

Plusieurs familles de phytoconstituants ont été détectées. Ce sont des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, et des saponines. Cependant, l'extrait aqueux est très riche en saponosides alors que ces métabolites sont en faible quantité dans l'extrait méthanolique. De même les résultats trouvés par **Sekkoum (2011)** ont montré que l'*Atriplex halimus.L* contient des saponines, des tanins et sont dépourvu d'alcaloïdes. Ces molécules sont donc à l'origine de propriétés biologiques très importantes. Une étude réalisée par **Niekerk et al (2004)** montre que les composés actifs étaient les tannins, les saponines, les résines, les flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure. Les résultats mettent également en évidence la présence de sucres réducteurs dans l'extrait méthanolique, contrairement à l'extrait aqueux où ces composés sont absents. Nos résultats ne sont pas cohérents avec ceux de **Chikhi (2014)** qui a détecté en plus de ces métabolites dans l'extrait aqueux, la présence de triterpénoïdes.

Les résultats de l'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique sont presque similaires à ceux trouvés par ( **Rahman SMA et al ., 2011**) qui ont détecté des quantités plus élevées de flavonoïdes, glycosides et alcaloïdes, suivis par les stéroïdes et les saponines, tandis que les tanins et l'anthroquinone étaient entièrement absent.

## **II. 3 Analyses phytochimiques quantitatives**

### **II. 3 .1 Teneur en poly phénols des deux extraits**

Les résultats de dosage montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, que l'extrait aqueux avec une teneur de  $8,4 \pm 0,04$  mg EAG (d'équivalent d'acide gallique) /g de matière sèche (Tableau12). Cette concentration obtenue avec les feuilles d'*Atriplex halimus* diffèrent relativement avec ceux de Belyagoubi *et al* (2009) qui ont trouvé une teneur en polyphénols de l'ordre de  $10,12 \pm 2,24$  mg EAG/g.

Cette étude montre que l'extrait aqueux contient une concentration de polyphénols totaux d'environ  $6,2 \pm 0,31$  mg EAG/g, d'après **Chikhi (2014)** cet extrait contient une teneur d'environ  $12,47\mu\text{g}$  EAG/mg.

L'extrait méthanolique renferme une concentration en flavonoïdes de  $2,22 \pm 0,13$  mg d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche, alors quelle est de  $1,16 \pm 0,52$  dans l'extrait aqueux.

Concernant les tannins, ces composés phytochimiques étaient plus abondants dans l'extrait méthanolique avec une concentration de  $1,27 \pm 0,14$  mg d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche.

La variabilité des teneurs en polyphénols chez ces espèces végétales est due probablement à la composition phénolique des extraits, aux facteurs génotypiques, les conditions biotiques, l'étape physiologique et abiotiques (facteurs édaphiques), la nature du sol, le type du microclimat, et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes. (**Belhadj Tahar ., 2015**)

Enfin, le dosage démontre que les deux extraits contiennent des composés phénoliques avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait méthanolique en raison de sa solubilité plus élevée dans le méthanol (**Bylka., 2001**)

**Tableau 12:** Teneurs de l'extrait méthanolique et aqueux d'*A. halimus* en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés.

	<b>poly phénols (a)</b>	<b>Flavonoïdes(b)</b>	<b>Tannins (c)</b>
<b>Extrait méthanolique</b>	8,4±0,04	2,22±0,13	1,27±0,14
<b>Extrait aqueux</b>	6,2±0,31	1,16± 0,52	0,75± 0,23

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

(b) mg d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche.

(c) mg d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche.

#### **II.4 Détermination des phytoconstituants par chromatographie sur couche mince**

L'examen par chromatographie sur couche mince (CCM) des deux extraits obtenus précédemment, en utilisant le système d'élution (butanol, acide acétique, eau), a donné une bonne séparation des molécules, les profils CCM de ces extraits montrent que les deux extraits méthanolique et aqueux sont riches en substances bioactives qui ont été présentées sous forme de taches révélées sous les lampes UV à 254 et 365 nm.

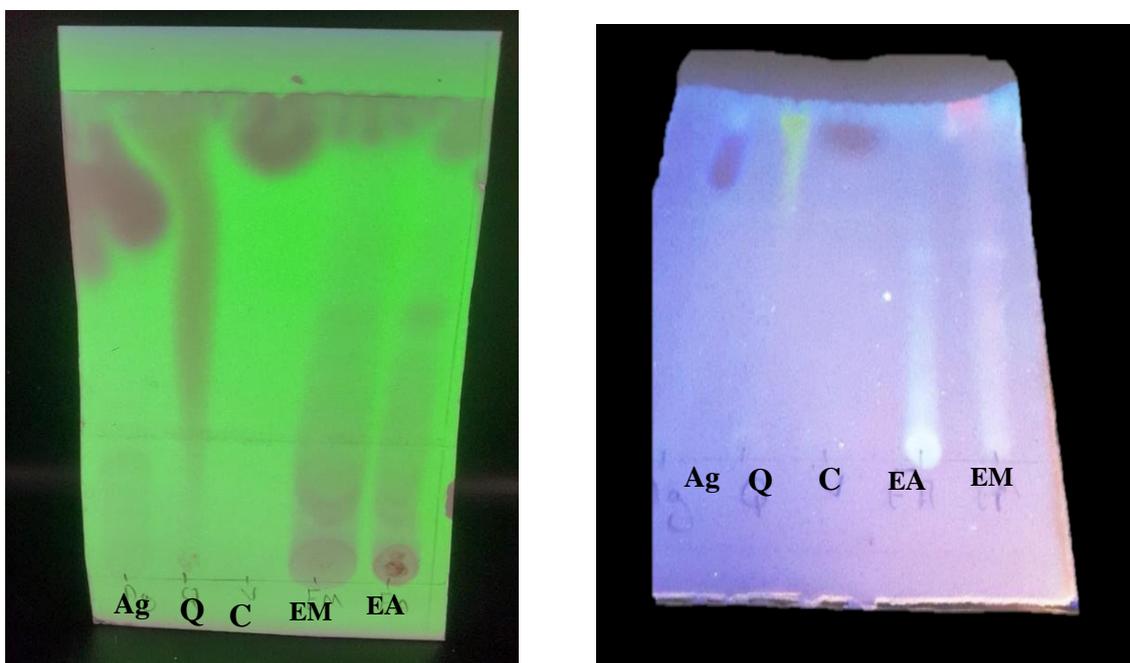
La séparation des molécules résulte de la combinaison de trois paramètres ; la nature du support chromatographique, le solvant d'élution et les propriétés chimiques des composés phénoliques. Il ressort que certains éluants sont plus efficaces que d'autres, d'où le choix porté sur le système : butanol/ acide acétique/ eau (40/50/10 : V/V/V). Pour la révélation des chromatogrammes, nous avons opté pour l'observation sous la lampe UV. Après détection des spots, nous nous sommes basées sur la comparaison des rapports frontaux des spots obtenus par les extraits avec ceux des témoins afin d'identifier les molécules qui leurs correspondent (Tableau 13).

**Tableau 13:** Rapports frontaux des extraits et des témoins.

<b>Extrait aqueux (EA)</b>	<b>Extrait méthanolique(EM)</b>	<b>Acide gallique (Ag)</b>	<b>Quercétine (Q)</b>	<b>Catéchine (C)</b>
<b>0,17</b>	0,14	0,17	/	/
<b>0,48</b>	0,48	/	0,48	/
<b>0,62</b>	0,62	/	/	/
<b>0,75</b>	0,95	/	/	0,95

La comparaison avec les standards phénoliques a démontré la présence de la quercétine qui est un flavonoïde majeur dans les deux extraits. L'acide gallique a été identifié dans l'extrait aqueux. La catéchine était présente dans l'extrait méthanolique. Ces composés phénoliques sont des phytoconstituants très importants de la plante à cause de leur capacité de piégeage de radicaux libres. Les flavonoïdes sont le principal groupe de composés polyphénoliques qui possèdent cette propriété (Yanishlieva-Maslarova., 2001). Selon Ybert *et al* (2000) les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et antivirales.

A 254 nm, nous avons observé des spots visibles. A 365 nm des spots colorés ont été apparus, particulièrement des tâches franches de couleur bleu violet et bleu clair avec des Rf respectifs de 0,62 et 0,75 dans le solvant BAW (Photo 04). Selon Bruneton (2003), la fluorescence bleue à 365nm pourrait indiquer la présence des coumarines ou des stérols et triterpènes. Une tache rouge est apparue dans l'extrait méthanolique révélée par la lampe UV à 365 nm. Dially (2005) déclare que les bandes colorées en bleu qui apparaissent sous UV à 365nm correspondraient aux acide phénols alors que la tache rouge apparue à 365 nm correspondrait aux anthocyanidine -3-glycoside.



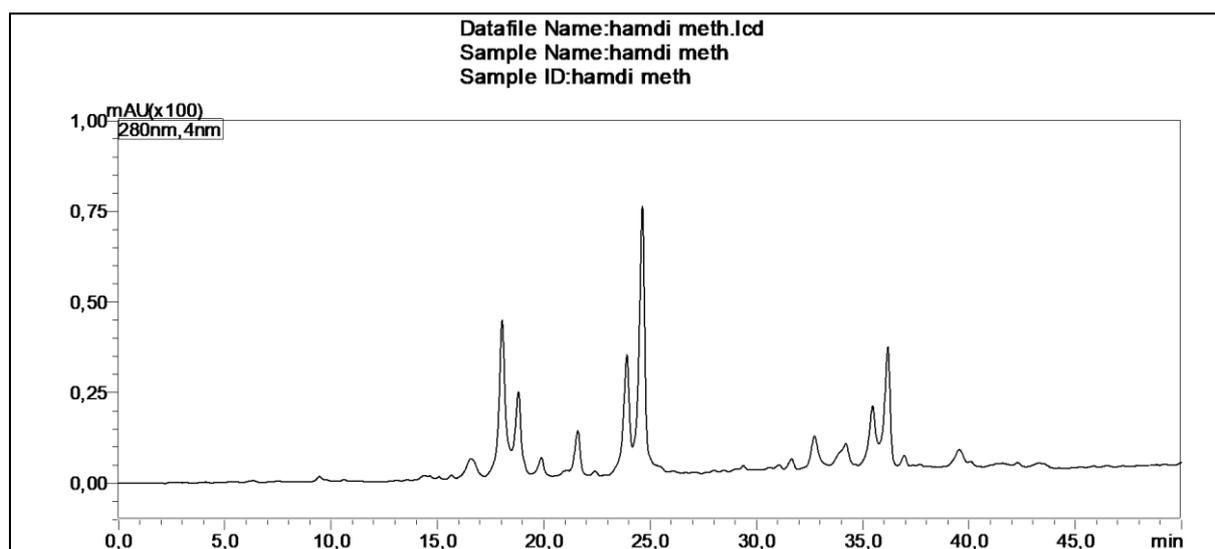
**Photo 04:** Chromatographie sur couche mince des extraits de la plante *Atriplex halimus*.

Ag : Acide gallique    Q : Quercétine    C : Catéchine    EM : Extrait méthanolique    EA : Extrait aqueux.

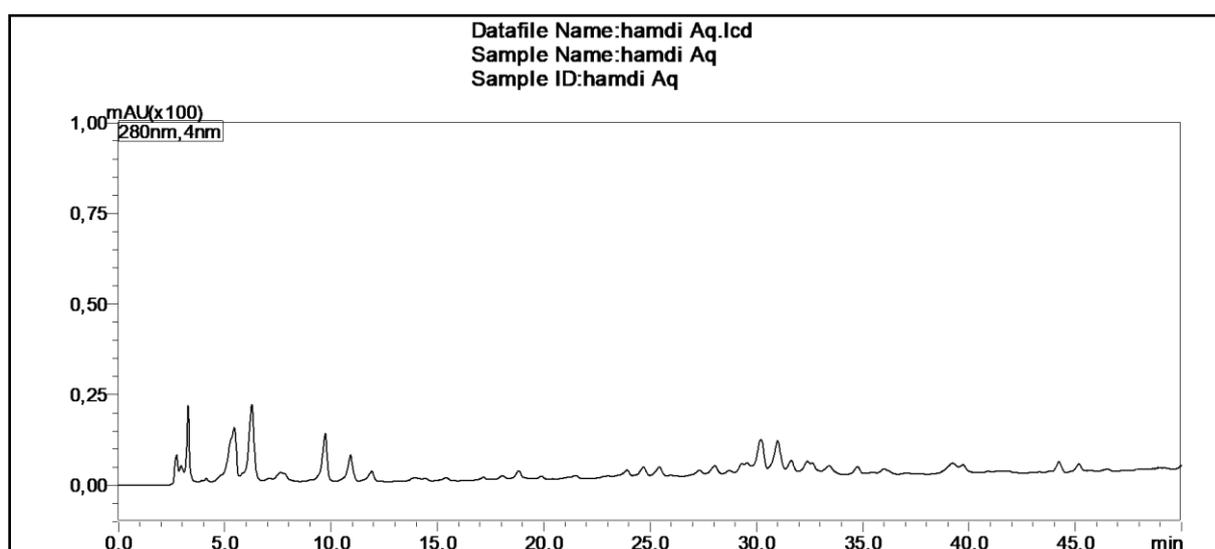
## II.5 Identification des molécules bioactives par HPLC

La technique de HPLC a permis d'identifier huit molécules bioactives dans l'extrait méthanolique et six composants dans l'extrait aqueux sous forme de profils chromatographiques différents.

Les pics des chromatogrammes obtenus ont été identifiés par comparaison des temps de rétention des extraits par rapport à ceux des standards. Les chromatogrammes sont représentés dans les figures 30 et 31.



**Figure 31:** Chromatogramme typique de l'extrait méthanolique réalisé par HPLC-DAD.



**Figure 32:** Chromatogramme typique de l'extrait aqueux réalisé par HPLC-DAD.

L'étude phytochimique par HPLC des extraits des feuilles de l'*Atriplex halimus* a montré que l'extrait méthanolique présente plus de composés phénoliques identifiés et quantifiés comparativement à l'extrait aqueux. L'analyse a révélé des composés phénoliques qui sont spécifiques pour chacun. Les molécules bioactives extraites sont illustrées dans ces tableaux :

**Tableau 14:** Identité des métabolites secondaires dans l'extrait méthanolique de l'*Atriplex halimus*.

RT	Lambda max	MH-	Compound
<b>18,046</b>	229 282 334	577 269	Apigénine 7-O-néohesperidoside
<b>18,815</b>	283 313	337 163	Acide 3-p-coumaroylquinique
<b>21,605</b>	212 292	341	Caféoyl hexoside
<b>23,916</b>	285 325	367	Acide 4-O-féruoylquinique
<b>24,644</b>	234 296 334	431	Apigénine 7-O-rutinoside
<b>32,739</b>	251 348	593	Kaempférol-3-O-rutinoside
<b>35,470</b>	268 326	353	Acide 4-caféoylquinique
<b>36,191</b>	268 337	431	Apigénine-6-C--D-glucoside (Isovitexin)

**Tableau 15 :** Identité des métabolites secondaires dans l'extrait aqueux de l'*Atriplex halimus*

RT	Lambda max	MH-	Compound
<b>5,449</b>	271	169	Acide gallique
<b>6,273</b>	260	441	Dérivé d'acide quinique

<b>9,727</b>	253	301	Acide ellagique
<b>10,914</b>	267	197	Acide syringique
<b>30,218</b>	254 354	609	Rutine
<b>31,004</b>	254 310	325	Acide p-coumarique -O-glucosyl ester

L'extrait méthanolique est constitué principalement de composants appartient à la classe des flavones (Apigénine 7-O-néohespéridoside, Apigénine-6-C--D-glucoside, Apigénine 7-O-rutinoside), Acide 3-p-coumaroylquinique, Caféoyl hexoside qui est un Phénylpropanoïdes, Acide 4-O-féruloylquinique, Kaempférol-3-O-rutinoside qui appartient à la classe des flavonols et acide 4-caféoylquinique.

Alors que l'extrait aqueux est caractérisé par des composés phénoliques notant l'acide gallique qui appartient de la famille des acides hydroxybenzoïque, L'acide ellagique est un polyphénol antioxydant . L'acide syringique ; un composé aromatique naturel de la famille des acides hydroxybenzoïques .La rutine est un bioflavonoïde, acide p-coumarique -O-glucosyl ester .Dérivé d'acide quinique qui est un acide hydroxycinnamique. Ces molécules sont responsables de nombreuses vertus pharmacologiques. **Emam (2011)** a montré la richesse de l'*A. halimus* d'Egypte (Wadi-surd) en flavonoïdes et en acide gallique. Les recherches menées par **Sahar Salah El Din (2015)** sur la fraction d'acide phénolique de *Atriplex lindleyia* a conduit à l'identification de cinq composants avec la prédominance de l'acide ellagique (26,4 %) et la catéchine (31,3 %) respectivement.

L'identification chromatographique menée sur l'extrait butanolique de l'espèce *Atriplex halimus* faite par **Belhadj-Tahar en 2015** a permis de caractériser les principaux composés phénoliques, il s'agit des acides phénols et des flavonoïdes. L'analyse par HPLC-SM des composés phénoliques a permis l'identification de la quercétine, l'acide gallique, l'acide ferulique, la catéchine, la quercétine-3-O-sulphate-7-O  $\alpha$  arabinopyranoside, l'acide syringique, l'acide shikimique, et le kampferol-3-O-sulphate-7-O- $\alpha$  arabinopyranoside.

Une étude réalisée par **Rabab M (2012)** a décelé que l'extrait polaire d'*Atriplex lindleyi* Moq. *susp. Gonfler* est riche en flavonoïdes et les glycosides flavonoïdes qui sont utiles en médecine comme antidiabétiques et médicament antioxydant.

Le kaempférol 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside et quercétine 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside ont été isolés dans les feuilles d'*A. hortensias* (**Bylka et al ., 2001**).

**Al-Jaber et al (1991)** ont décelé la naringine, naringenine 7-O-glucoside, isorhamnetine 3 O-rhamnosyl (1-6) glucopyranoside et isorhamnetine 7-O-glucopyranoside dans l'espèce *A.farinosa*.

## II .6 Dosage des sels minéraux d'*Atriplex halimus*

Les résultats de la teneur en macroéléments sont regroupés dans le tableau 16 :

**Tableau 16 :** Composition en quelques éléments minéraux des feuilles de l'*Atriplex halimus*.

Sels minéraux	Na	K	Ca
Pourcentage%	5,26	2,92	0 ,71

Les feuilles de notre plante renferment une concentration en sodium de 5,26g/100g, alors le potassium son taux est de 2,92g/ 100g. Le calcium se trouve dans cette plante halophyte par une concentration de 0,71g / 100 g . Une étude faite par **Boussaid et al (2001)** a décelé des concentrations de 4,41g/ 100g pour le sodium, 0,15g/ 100g pour le potassium et un taux de 1,77g/ 100g pour le calcium . D'autre part une étude récente faite par **Zouadi (2020)** a trouvé les teneurs suivantes en sodium, potassium , calcium respectivement : 7,23--3,47-3,27g/ 100g. Ces différences de valeurs de sels minéraux d'*Atriplex halimus* dépend de plusieurs paramètres tels que le climat, l'âge de la plante et la saison de cueillette (**Abbade et al ., 2004**). Plusieurs auteurs ont signalé la richesse de l'*A. halimus* en fibres alimentaires (cellulose), protéines, vitamines (B et C) et les sels minéraux (sodium, calcium, potassium, magnésium, phosphore) (**Roux., 2005 et Emam ., 2011**). La nature du sol influe également sur l'absorption des éléments minéraux de Gtaff (**Zouadi ., 2020**).

## II.7 Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'*Atriplex halimus*

L'activité antioxydante des extraits d'*A. halimus* a été évaluée *in vitro* par la méthode de réduction de radical libre DPPH. Les résultats obtenus confirment que les deux extraits de l'*Atriplex halimus* possèdent un potentiel antioxydant . L'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant avec,  $IC_{50} = 4,13 \pm 0,07$  mg/ml tandis que l'extrait aqueux affiche une  $IC_{50} = 5,53 \pm 0,05$  mg/ml.

Nos résultats sont compatibles avec ceux obtenus par **Khaldi et al (2015)**. Cette capacité de réduction des radicaux est due principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques.

La fraction d'acétate d'éthyle d'*A. halimus* L à une bonne aptitude à piéger le radical DPPH. Cette activité est probablement due à l'abondance des flavonols (kaempférol, quercétine..) qui représentent la classe majeure des espèces *Atriplex* (**Belhadj Tahar., 2015**).

### **III. Isolement et caractérisation des lactobacilles entant que probiotique.**

#### **III. 1 Détermination des bactéries lactiques**

L'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS gélifié a conduit à une diversité de souches.

##### **III.1.1 Identification des *Lactobacillus* sp.**

L'identification des différents isolats est basée sur différents tests morphologiques et biochimiques. Ces tests ont permis de savoir l'appartenance ou non des isolats au genre *Lactobacillus*.

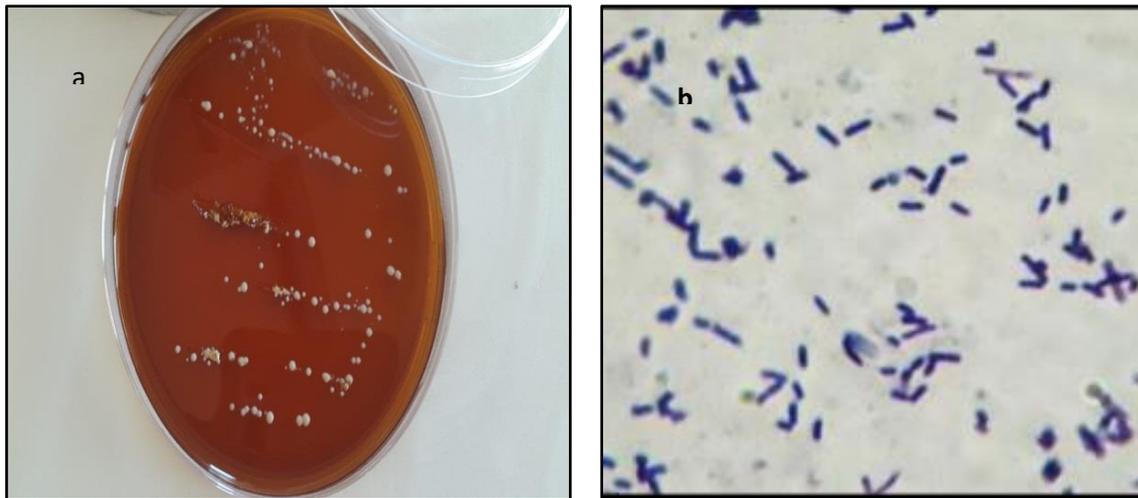
##### **III.1.1.1 Etude des caractères morphologiques**

###### **➤ Examen macroscopique**

L'observation macroscopique des colonies isolées sur gélose MRS, a permis de les décrire. Les colonies isolées et purifiées sont apparues de tailles variables d'environ 1 à 2 mm de diamètre avec une couleur blanchâtre ou laiteuse. Par contre, une croissance bactérienne au fond du tube en milieu liquide se traduit par un trouble assez dense (consistant par rapport au témoin).

###### **➤ Examen microscopique**

L'aspect microscopique des candidats isolés après coloration de Gram révèle des cellules en forme de bâtonnets à Gram positif. Ces bâtonnets sont associés en paires ou en courtes chaînettes (Photo 05).



**Photo 05:** Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) après coloration de Gram de *Lactobacillus sp.* (Gx100).

### III.1.1.2 Caractérisations physiologiques et biochimiques

Les tests physiologiques et biochimiques des isolats ont permis d'établir une identification des bacilles Gram positive, catalase négative. Six souches de lactobacilles ont été décelées. Selon la classification de **Orla –Jensen (1919)** trois souches appartiennent au Groupe **I**; obligatoirement homofermentaire (Thermobacteria) et trois souches sont hétérofermentaires obligatoires appartiennent au Groupe **III** (Betabacteria). Le tableau 17 démontre les résultats des tests d'identification.

**Tableau 17 :** Caractéristiques phénotypiques et physiologiques des souches du genre *Lactobacillus*.

Souches	Forme et Gram	Catalase	Production de Gaz	Croissance à		ADH
				15°	45°	
LB1	Bacilles G+	-	-	-	+	-
LB2	Bacilles G+	-	-	-	+	-
LB3	Bacilles G+	-	+	-	+	+
LB4	Bacilles G+	-	+	-	+	+
LB5	Bacilles G+	-	+	+	-	+
LB6	Bacilles G+	-	-	-	+	-

#### ➤ Profil fermentaire des sucres

L'identification des espèces de lactobacilles est basée essentiellement sur la fermentation des sucres (**Stiles et Holzapfel., 1997**). Un total de 11 sucres a été utilisé pour l'ensemble des isolats, afin d'établir leur profil fermentaire, qui sont les suivants : Glucose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannitol, Saccharose, Fructose, Xylose, Arabinose, Mannose, et Cellobiose (Tableau 18).

**Tableau18:** Caractérisation des souches de *Lactobacillus* basée sur le critère de fermentation des sucres.

Fermentation des glucides	<i>L.acidophilus</i> Lb1 et Lb6	<i>L.salivarius</i> Lb2	<i>L. fermentum</i> Lb3 et Lb4	<i>L. brevis</i> Lb5
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	-	+	-	-
Saccharose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Xylose	-	-	+	+
Arabinose	-	-	+	+
Mannose	+	-	+	-
Cellobiose	+	-	-	-

+ : réaction positive, - : réaction négative

La détermination des principales caractéristiques physiologiques et biochimiques et une comparaison de nos résultats avec ceux rapportés à plusieurs auteurs. (**Wood ET Holzapfel ., 1995**) (**Car et al ., 2002, Batt et al., 2014 et Carvalho et al., 2014**) ont permis de mettre en évidence six espèces différentes appartenant au genre *Lactobacillus*. Les souches sélectionnées sont:

- Lb1 est représentée par *Lactobacillus acidophilus* 1.
- La souche Lb2 c'est l'espèce *Lactobacillus salivarius*.
- Lb3 appartenant à l'espèce *Lactobacillus fermentum*1.
- Lb4 appartenant à l'espèce *Lactobacillus fermentum*2.
- Lb5 est identifiée comme *Lactobacillus brevis*.
- Lb6 est représentée par *Lactobacillus acidophilus* 2.

### III.1. 2 Evaluation du potentiel probiotique des lactobacilles

#### III.1. 2.1 pH

Les résultats de l'étude de l'habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées sont présentés dans le tableau19 :

**Tableau19:** Viabilité (Log UFC) des souches de *Lactobacillus sp* à pH faible d'une part et en présence de 0,3% bile d'une autre part.

Souche	(LogUFC) initial	(Log UFC) à pH 2	(Log UFC) à pH 3	0.3% bile (Log UFC)

<i>L.acidophilus 1</i>	8,00	0	7,95	7,74
<i>L.salivarius</i>	8,00	4,36	7,66	7,25
<i>Lactobacillus Fermentum 1</i>	8,00	0	7,39	7,45
<i>Lactobacillus Fermentum 2</i>	8,00	5,42	7,96	7,55
<i>Lactobacillus brevis</i>	8,00	0	7,47	7,9
<i>Lactobacillus acidophilus2</i>	8,00	0	0	0

D'après les résultats récapitulés dans le tableau 19, Il apparaît que le pH 2, a un effet inhibiteur sur presque la totalité de nos isolats. Car sur les 6 souches de lactobacilles testées, 2 ont résisté après 3 h d'incubation et 4 souches ont été complètement inhibées.

A pH 3 la viabilité de toutes les souches a été maintenue, après une exposition de 3h puisque cinq souches tolèrent cette acidité. Une seule souche n'a pas pu supporter ce milieu acide. Le pH du suc gastrique est souvent maintenu à 3, un pH 2 pendant 3 h est souvent utilisé comme une condition extrême de simuler les conditions dans l'estomac (**Guo et al., 2010**).

**Wang et al. (2010)** ont déclaré la survie de 11 souches de *Lactobacillus* isolées des selles de nourrissons et de la choucroute Taiwanaise à pH 3, et seulement 7 isolats ont survécu à pH 2.

### III.1. 2 .2 Sels biliaires

Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries lactiques pour gagner leur site. Les résultats mentionnés dans le tableau montrent que la viabilité de la majorité des lactobacilles testés n'a pas été affectée par la bile. Cinq souches pourraient résister avec des réductions dans leur nombre (UFC /ml). Alors que, la souche *Lactobacillus acidophilus 2* n'a pas survécu du tout (Tableau 19).

Une concentration de 0,3% est souvent considérée comme critique pour la sélection des souches résistantes (**Guo et al., 2010**).

L'effet de la bile sur la viabilité des lactobacilles a été étudié par plusieurs auteurs **Ren et al. (2014)** ont révélé que les souches de *Lactobacillus* étudiées pour leur potentiel probiotique ont

présenté une excellente tolérance à la bile à des concentrations de 0,3% et 0,5%, ils ont même présenté une résistance à 1% de sels biliaires.

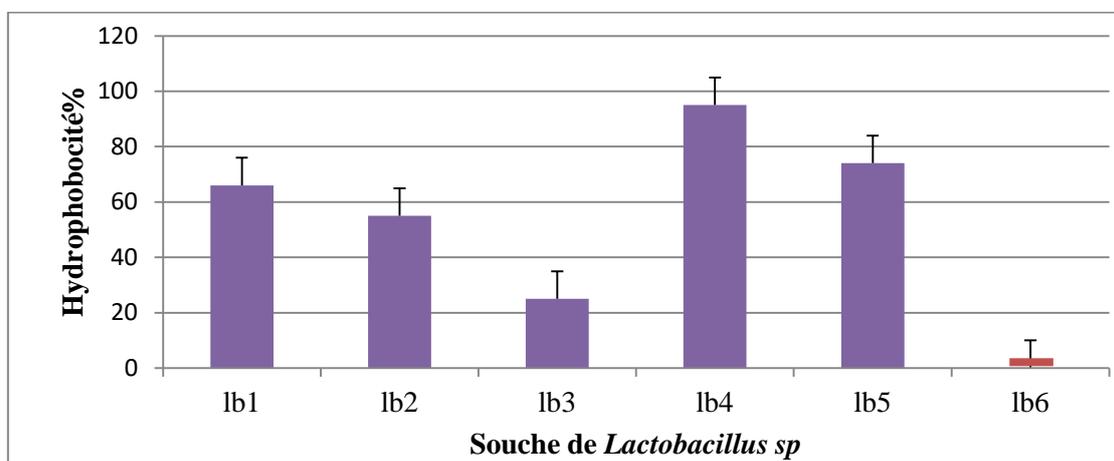
**Guo et al. (2010)** ont constaté qu'une concentration de 0.3% de sels biliaire n'a présenté aucun effet sur la totalité des bactéries lactiques obtenues à partir des excréments d'animaux, et la plupart d'entre eux ont même développé en présence de 1% bile. Les probiotiques doivent résister aux barrières physiologiques du tube digestif qui sont représentées principalement par l'acidité corrosive de l'estomac et la toxicité des sels biliaires (**Buntin et al., 2008**).

### III.1. 2.3 Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est l'une des propriétés physico-chimiques qui facilite le premier contact entre le microorganisme et les cellules hôtes (**Guglielmotti et al ., 2007**). Toutes les souches ont présenté des valeurs élevées d'hydrophobicité comprises entre 25% et 95 %. Une faible hydrophobicité a été enregistré par *Lactobacillus fermentum* 1 (Lb3). (Figure32)

Une étude conduite par **Guglielmotti et al (2007)**, a montré que des espèces de *Lactobacillus* ont révélé une hydrophobicité qui varie entre 5% et 63%.

**Kaushik et al. (2009)** a suggéré que l'hydrophobicité permet aux probiotiques d'adhérer et de résider dans les intestins de l'hôte plus longtemps pour délivrer leurs effets bénéfiques.

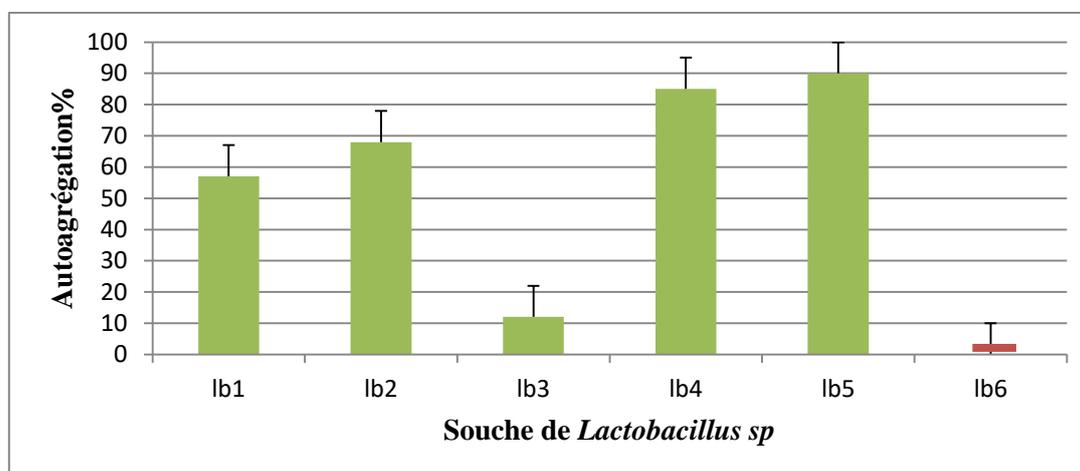


Lb1 : *Lactobacillus acidophilus* 1. Lb2 : *Lactobacillus salivarius*. Lb3 : *Lactobacillus fermentum*1  
Lb4 : *Lactobacillus fermentum* 2. Lb5 : *Lactobacillus brevis*.. Lb 6: *Lactobacillus acidophilus* 2

**Figure 33** : Pourcentage d'hydrophobicité.

### III.1. 2.4 Auto agrégation

Le pourcentage d'auto-agrégation des isolats est présenté dans la figure33:



Lb1 : *Lactobacillus acidophilus* 1. Lb2 : *Lactobacillus salivarius*. Lb3 : *Lactobacillus fermentum*1  
 Lb4 : *Lactobacillus fermentum* 2. Lb5 : *Lactobacillus brevis*.. Lb 6: *Lactobacillus acidophilus* 2

**Figure 34:** Pourcentage d'auto-agrégation.

L'auto-agrégation la plus importante est observée chez la souche *L. brevis* (Lb5) dont le pourcentage atteint 90 % et on constate une diminution relative du pourcentage avec le reste des isolats. L'auto- agrégation est la capacité des bactéries à interagir de manière non spécifique pour former un biofilm sur les cellules de la muqueuse intestinale afin d'empêcher la colonisation des pathogène (**Boris et al ., 1998**), elle joue un rôle important dans l'adhésion aux cellules intestinale (**Dunne et al.,2001**).

(**Kassaa et al., 2014**) ont rapporté des valeurs d'auto-agrégation de 30 à 76 % de différentes souches de lactobacilles. L'étude de l'adhérence à la surface abiotique des bactéries lactiques ayant un effet anti-*Vibrio* constitue une étape importante dans le processus de sélection des bactéries probiotiques. En effet, les souches adhérentes peuvent coloniser l'intestin et entrent en antagonisme avec les bactéries pathogènes (**Servin et Coconnier, 2003**).

### III.1. 2.5 Antibiorésistance des lactobacilles

La sensibilité des souches de lactobacilles à une gamme d'antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion en disques. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 20.

**Tableau 20 :** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Lactobacillus sp*.

	AM	P	CH	G	VA	AN
<b>Lb1</b>	S	S	S	S	R	R
<b>Lb2</b>	S	S	S	S	R	R
<b>Lb4</b>	S	S	S	S	R	R
<b>Lb5</b>	S	S	S	S	R	R

**AM** : Ampicilline, **P** : Pénicilline, **CH** : Chloramphénicol, **G** : Gentamycine, **VA** : Vancomycine, **AN** : Acide nalidaxique, **S** : Sensible, **R** : Résistante.

Les quatre souches de lactobacilles testées étaient sensibles aux bêta-lactamines. Plusieurs auteurs signalent que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la paroi bactérienne telles que les bêta-lactamines comme la pénicilline, l'ampicilline (**Charteris et al ., 1998, Danielsen et Wind., 2003** ).

Toutes les souches ont été résistantes à l'acide nalidixique. Ces résultats s'accordent avec les travaux de **Peres et al (2014)** qui ont montré des résistances à cet antibiotique ainsi qu'à la streptomycine.

La gentamycine exerce un effet inhibiteur sur nos isolats alors que la résistance des lactobacilles aux aminosides a été signalée par **Katala et al. (2001)**.

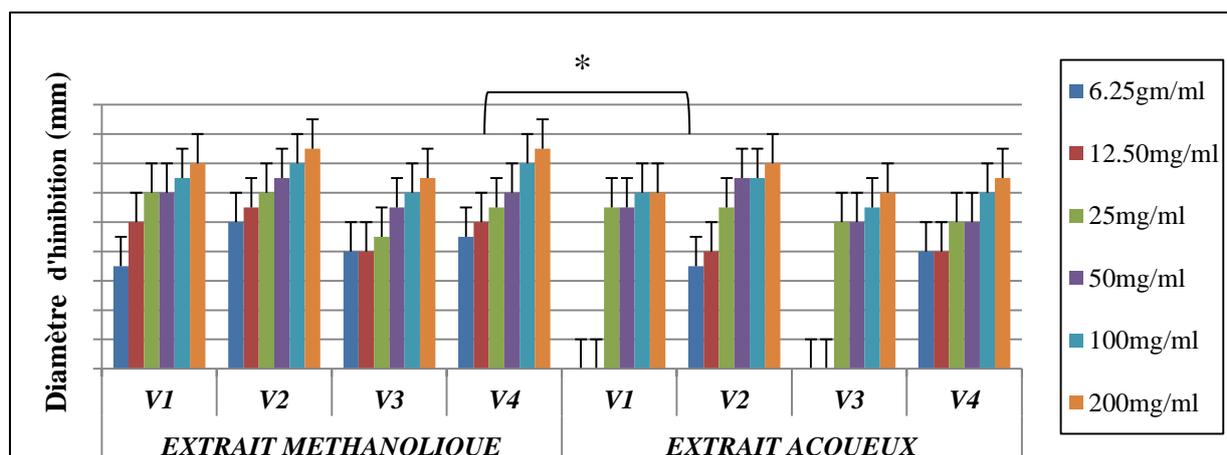
Les quatre espèces étaient résistantes à la vancomycine. Selon (**Elisha et Courvalin., 1995**) les espèces hétérofermentaires de lactobacilles sont naturellement résistantes à la vancomycine, alors que les espèces homofermentaires sont sensibles à cet antibiotique.

#### **IV Evaluation du potentiel antibactérien des extraits de plante et de *Lactobacillus sp***

##### **IV .1 Activité antibactérienne des extraits de la plante *Atriplex halimus***

##### **IV .1.1 Déterminations des diamètres des zones d'inhibition.**

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et aqueux de plante contre quatre souches de *Vibrio cholerae* sont illustrés dans la figure34.



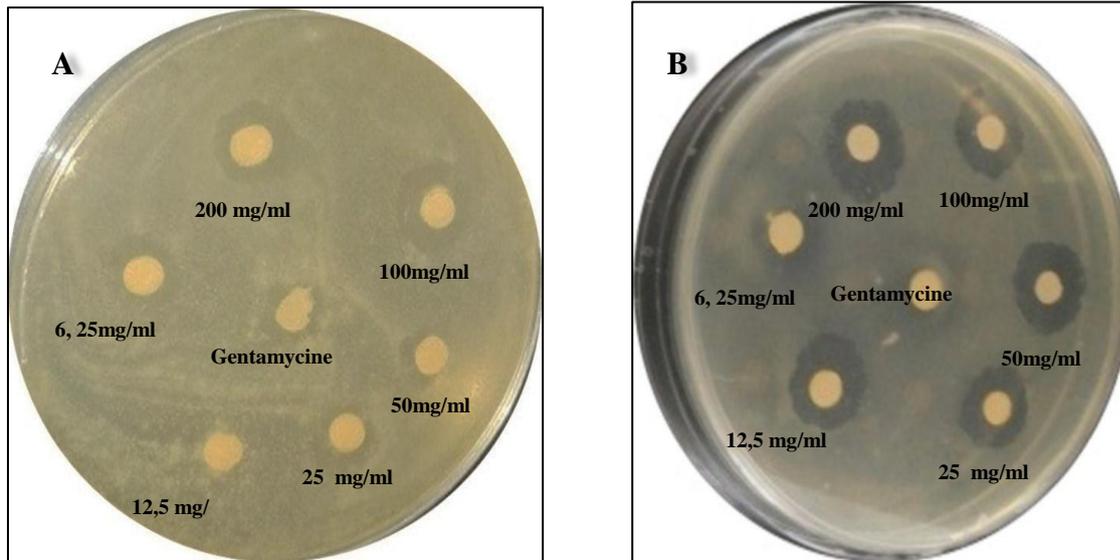
**Figure 35.** Effet de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de l'*Atriplex halimus* sur les différentes souches. (\* :  $p < 0,05$ )

L'analyse Anova à deux facteurs valide la différence significative entre l'extrait méthanolique et aqueux à l'encontre des souches de vibrions cholériques ( $p < 0,05$ ) (voir annexe)

L'extrait méthanolique a révélé son efficacité sur toutes les souches quelle que soit la dose. Cependant, à partir de la dose de 12,5mg/ml, cet extrait est actif sur *Vibrio cholerae*1. La zone d'inhibition de  $10 \pm 0,50$  a été constatée à cette concentration.

La souche *Vibrio cholerae* 2 demeure plus sensible à cet extrait puisque elle a enregistré des zones d'inhibitions comprise entre 10 et 15 mm. De même, l'extrait aqueux a prouvé une activité anti-*Vibrio*, mais moins efficace que celle de l'extrait méthanolique puisque cette activité disparaît avec la dose de 12,5 mg/ml. Cet extrait s'est révélé puissant sur ces souches à des teneurs allant de 25 à 200 mg/ml montrant des zones d'inhibitions variantes entre 10 à 14mm (Figure34).

Ces premiers résultats affirment que les deux extraits sont doués d'un effet antibactérien intéressant, démontré dans la photo06.



**Photo 06:** Effet antibactérien de l'extrait aqueux (A) et l'extrait méthanolique (B) d'*A.halimus* sur *V.cholerae*.

En effet **Rahman et al en 2011**, déclarent que les extraits d'*A. halimus* ont été très actifs contre *Listeria ivanovii* LI4 (pVS2) donnant une grande zone d'inhibition (40 mm). Les travaux menés dans notre laboratoire par **Khaldi et al (2015)** sur ces deux extraits, mettent en évidence le pouvoir antimicrobien à une teneur de 600 mg/ml de l'extrait méthanolique sur des souches ; Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Salmonella*, *Shigella sp.*) alors que la même concentration de l'extrait aqueux exerce un effet inhibiteur sur *E. coli* avec un diamètre de 8 mm.

#### **IV .1.2 Détermination des CMI par la méthode de microdilution**

Les différents extraits détiennent des activités antimicrobiennes selon leur nature, et leur effet inhibiteur est décelé par la réduction de la croissance des souches.

D'après les courbes obtenues (Figure35) les extraits (aqueux et méthanolique) d'*Atriplex halimus* ont montré une activité inhibitrice sur les souches testées. *V. cholerae* 1 a été inhibée à une CMI de 100 mg/ml pour l'extrait aqueux et une CMI de 50mg/ml pour l'extrait méthanolique, respectivement.

Pour la souche V3 les valeurs de CMI étaient plus élevées par rapport aux autres isolats avec 100 mg/ml pour l'extrait methanolique et de 200 mg/ml pour l'extrait aqueux. Notre étude concorde avec celle de **Khaldi et al(2015)** qui ont montré que l'extrait aqueux et méthanolique ont un effet bactériostatique avec une concentration minimale inhibitrice de

200 mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Clostridium*. Ces hautes concentrations expliquent et confirment la multi résistance de cette souche à divers antibiotiques.

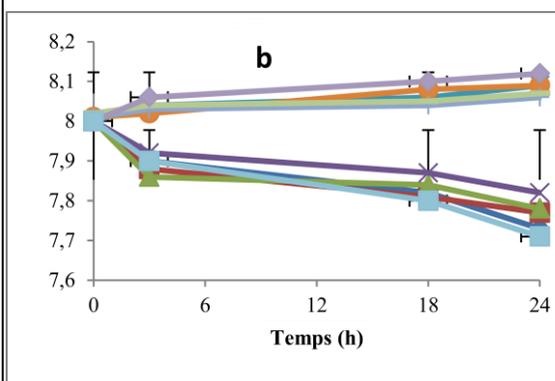
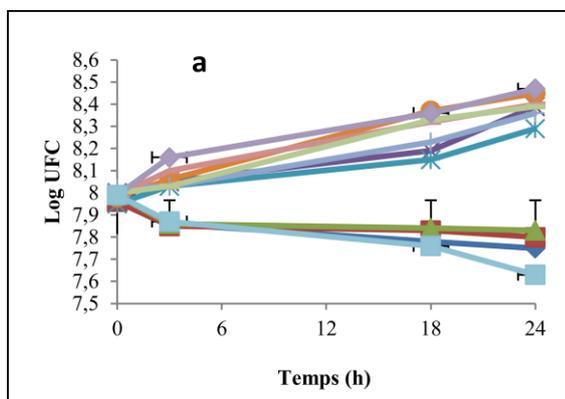
La souche *Vibrio cholerae* 2 a été inhibée à une CMI de 100 mg/ml pour l'extrait aqueux et une CMI de 25 mg/ml pour l'extrait méthanolique.

L'extrait aqueux exerce un pouvoir inhibiteur sur *Vibrio cholerae* 4 avec une CMI de 200 mg/ml alors que la CMI est de 50 mg/ml pour l'extrait méthanolique (Figure35).

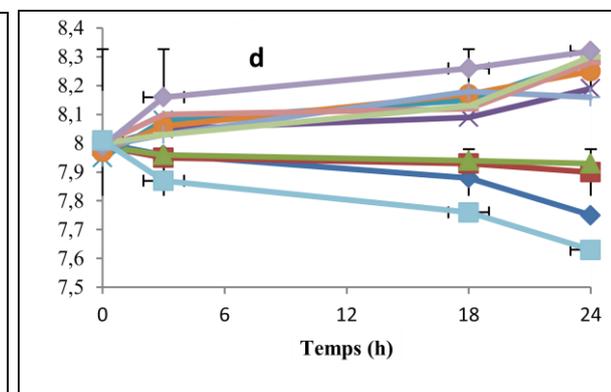
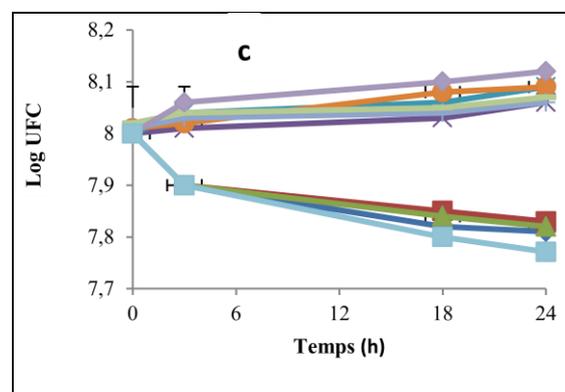
*Atriplex halimus* produit des polyphénols et autres substances bioactives potentiellement utiles et ayant des propriétés médicinales (**Donia Abd el Raheim M et al ., 2012**) et qui peuvent être une alternative thérapeutique pour pallier à l'émergence de la résistance aux antibiotique.

Dans ce même contexte *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *S. aureus* et *E. coli* (souche clinique), se sont avérés être les plus difficiles à inhiber avec tous les extraits sauf l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Atriplex parvifolia*, qui possède une activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes, avec des valeurs de CMI allant de 0,156 à 1,25 mg/ml. (**Ben Sassi et al ., 2007**)

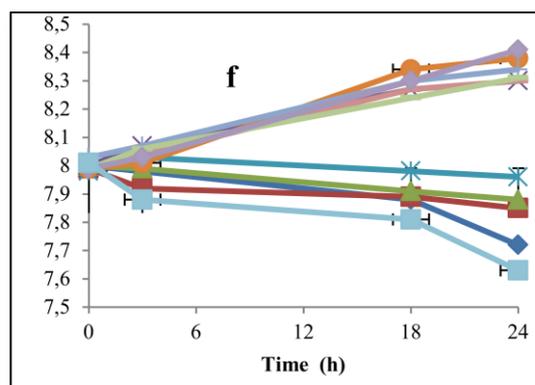
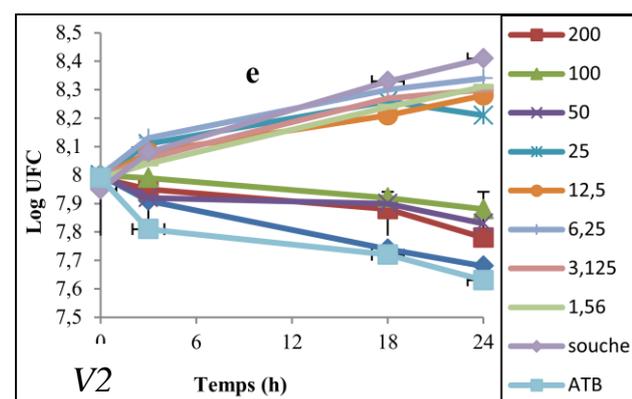
VI



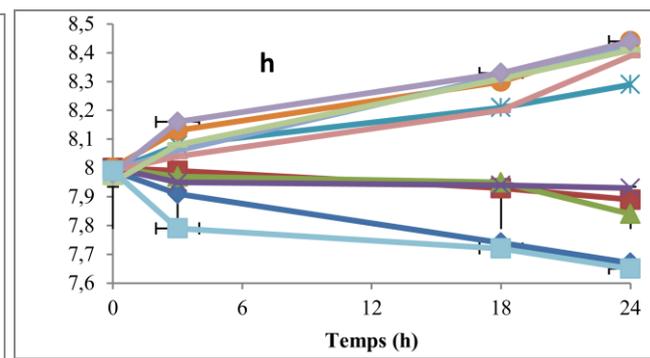
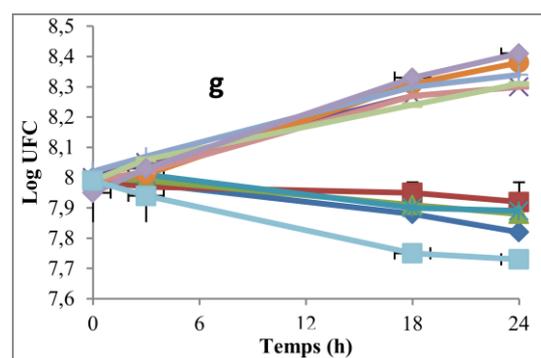
V3



V4



V2



**Figure 36:** Cinétique de croissance des souches *Vibrio cholerae non o1* en présence de l'extrait aqueux (à droite) et l'extrait méthanolique (à gauche) à différentes concentrations.

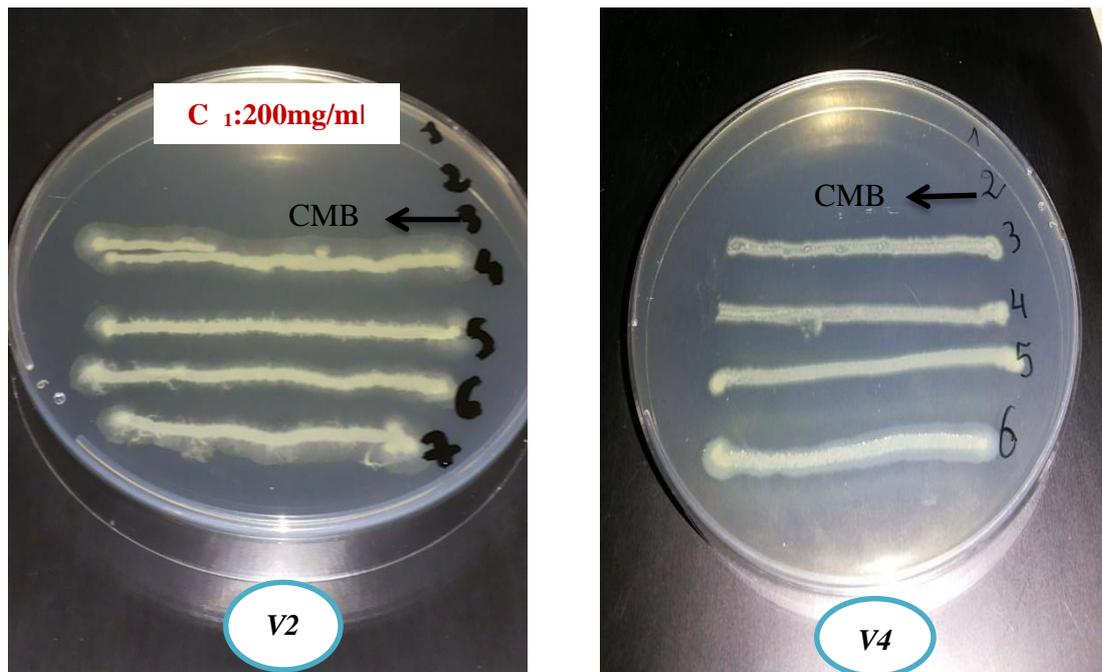
Les différents paramètres antibactériens obtenus pour chaque extrait végétal testé sont représentés dans le tableau21.

Chaque extrait possède un pouvoir inhibiteur à des activités variables qui sont relativement liées à leur composition en substances bioactives et la virulence de la souche bactérienne.

**Tableau21 :** Valeurs moyennes des paramètres antibactériens des extraits sur *Vibrio cholerae non o1*.

Souches	Extrait méthanolique			Extrait aqueux			Effet
	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI	
<i>Vibrio cholerae 1</i>	50	100	2	100	200	2	Bactéricide
<i>Vibrio cholerae 2</i>	50	50	1	200	200	1	Bactéricide
<i>Vibrio cholerae 3</i>	100	100	1	200	200	1	Bactéricide
<i>Vibrio cholerae 4</i>	25	100	4	100	100	1	Bactéricide

La concentration minimale bactéricide est comprise entre 50 et 200 mg/ml. La concentration minimale bactéricide la plus importante est celle indiquée sur V2 avec un CMB de 50 mg/ ml pour l'extrait méthanolique. L'extrait aqueux était également très performant par son spectre large, et sa faible CMB vis-à-vis V4. La CMB est de 100mg/ml.



**Photo 07** : Action de l'extrait méthanolique et aqueux d'*Atriplex halimus* sur la croissance *in vitro* de la souche *Vibrio cholerae* 2 et 4 respectivement.

Ce pouvoir antimicrobien de nos extraits a une relation étroite avec leur richesse en métabolites secondaires citant : les acides phénoliques, coumarines, tannins et surtout les flavonoïdes. Les flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques. (Ozawa *et al.* , 1987). La variation de l'effet entre les deux extraits est peut être due à la teneur en polyphénols. Cette divergence dans les résultats explique le rôle que peuvent jouer les facteurs environnementaux et climatiques sur la composition biochimique et sur la qualité de l'extrait de l'espèce végétale. L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs (Wagner ., 1993)

#### IV .1. 4 Le rapport CMB/CMI

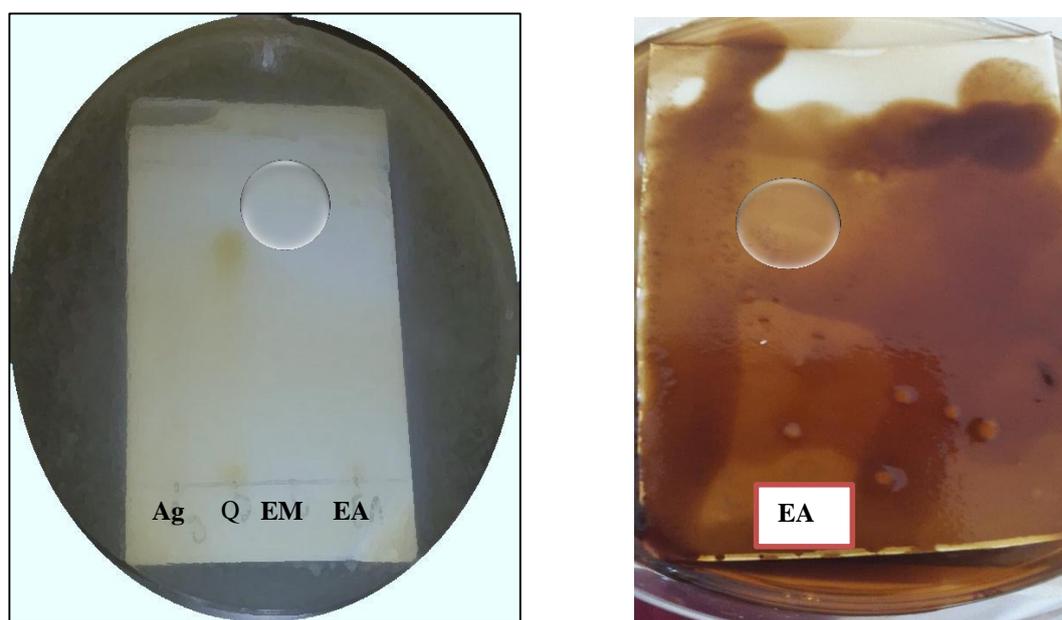
Ces différents ratios obtenus varient de 1 à 4 pour les deux extraits végétaux. En général, les deux extraits aqueux et méthanolique ont une activité bactéricide vis-à-vis *Vibrio cholerae non O1* (Tableau 21).

Bien que ces souches microbiennes soient reconnues comme étant résistantes à plusieurs antibiotiques, les résultats de l'activité antibactérienne suggèrent que les deux extraits d'*A. halimus* constitueraient un moyen préventif ou de lutte contre les affections microbiennes. Cela pourrait expliquer l'utilisation de cette plante par la population dans le cadre des troubles

digestifs, des douleurs abdominales et des diarrhées. Les germes tels que *Vibrio cholerae* sont des entéropathogènes qui sont souvent à l'origine des gastroentérites et quelques maladies (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2016).

#### IV .1. 5 Méthode par « bioautographie »

Pour la méthode de bioautographie contre la bactérie à Gram négatif *Vibrio cholerae* nous constatons la présence d'une couleur jaune autour des fractions des extraits méthanolique et aqueux et qui contiennent majoritairement les composés phénoliques. Ce qui signifie que ces métabolites présentent une activité inhibitrice contre cette souche. L'inhibition est montrée dans la photo 08.



**Photo 08** : Bioautographie des extraits de *Atriplex halimus* contre *Vibrio cholerae*.

Les résultats rassemblés dans le tableau 22, sont exprimés de (+) à (++++) selon les zones d'inhibition observées autour des composés. L'extrait méthanolique a démontré une activité modérée alors que l'extrait aqueux a exercé une faible activité.

Les intensités et nombres de taches observées sur la CCM de « bioautographie » préliminaire d'activité antibactérienne des extraits, avec le système éluant de développement formé du mélange butanol /acide acétique /eau (4:5:1) (v/v/v), permettent d'émettre que les feuilles d'*Atriplex halimus* dispose d'une forte présence de substances naturelles à activité antimicrobienne.

**Tableau22:** Résultats de Bioautographie des composés isolés de *d'Atriplex halimus*.

Extraits	Nombre de spots jaunes	Activité antimicrobienne
Méthanolique	3	++
Aqueux	2	+

Activité modérée (++) ; faible activité (+)

#### IV.2 Etude des interactions entre *Lactobacillus sp* et la souche *Vibrio cholerae non o1*

Quatre souches de *Lactobacillus sp* Lb1, 2, 4,5 ont été sélectionnées pour tester leur pouvoir antimicrobien. L'effet inhibiteur des espèces de *Lactobacillus sp* sélectionnées comme probiotique a été testé sur la croissance de quatre souche de *Vibrio cholérique*, le diamètre d'inhibition de la culture et chaque surnagent est présenté dans le tableau 23.

**Tableau 23 :** Diamètre (mm) de la zone d'inhibition de la culture et surnagent des lactobacilles vis à vis *Vibrio cholerae non o1*.

Souches pathogènes	<i>Lactobacillus acidophilus 1</i>		<i>Lactobacillus salivarius</i>		<i>Lactobacillus fermentum 2</i>		<i>Lactobacillus brevis</i>	
	Culture surnagent (mm)		Culture surnagent		Culture surnagent		Culture surnagent	
<b>V1</b>	6± 0,23	6± 0,75	8± 0,61	8± 0,55	00± 0,12	00± 2,14	8± 2,24	09± 0,68
<b>V2</b>	11± 0,5	9± 0,33	00± 0,27	4± 0,42	8± 0,62	9± 0,94	10± 1,21	10± 2,65
<b>V3</b>	8± 0,6	8± 0,75	8± 1,15	10± 1,58	10± 1,87	10± 1,66	9± 3,22	10± 1,62
<b>V4</b>	10± 0,54	9± 2,11	12± 3,14	12± 1,51	11± 2,13	12± 1,32	11± 0,28	12± 2,37

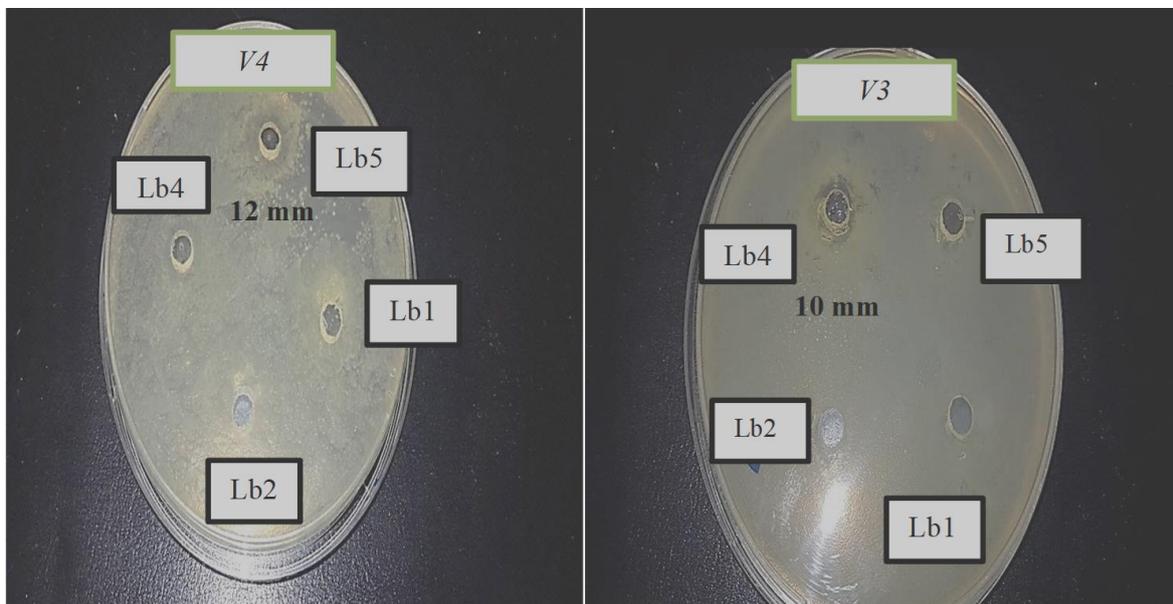
#### **V :** *Vibrio cholerae non O1*

L'inhibition était plus importante vis-à-vis *V4* avec des diamètres d'inhibitions entre 9 et 12 mm tandis que *V1* représente l'espèce la plus résistante à l'effet de *Lactobacillus* et le surnagent.

Le potentiel antimicrobien des lactobacilles à l'encontre des bactéries pathogènes peut être associé à de nombreux éléments. La capacité de compétition des bactéries lactiques résulte de la production des divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes. Des nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (**Rodrigues et al ., 2002** ).

On remarque que le spectre d'activité de ces souches a été élargi par le contact entre le surnageant et les Vibrien par apport à la coculture (lactobacille et Vibrien). Une des caractéristiques intéressantes des lactobacilles est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (Yateem *et al.*, 2008). Les lactobacilles, d'origine humaine, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives *in vitro*, et *in vivo*, sur les pathogènes. Ces substances sont les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Servin, 2004) ou encore la reutérine, diacétyl (Guetarni *et al.*, 2017).

La souche *Lactobacillus brevis* (Lb5) a manifesté une forte activité antagoniste contre tous les germes nuisibles avec une moyenne des zones d'inhibitions de 8 à 12 mm.



**Photo 09** : Evaluation de l'activité antibactérienne de surnageant de *Lactobacillus sp* sur les souches de *Vibrio cholerae*.

**V. Détermination de l'activité antibactérienne de l'association des extraits d'*Atriplex halimus* et de *Lactobacillus. sp* contre *V.cholerae*.**

**V. 1 Effets de l'association des extraits et *Lactobacillus sp.* contre *V.cholerae***

Les résultats de l'association des extraits testés avec le probiotique sont démontrés dans le tableau 24.

**Tableau 24** : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) des associations entre les extraits et la souche *Lactobacillus sp.*

Mode d'inhibition (mm)	V1	V2	V3	V4
<i>Lactobacillus brevis</i>	8± 0,03	10± 0,50	09± 0,21	11± 0,02
Extrait méthanolique	12± 0,04	15± 0,43	12± 0,1	14± 0,8
Extrait aqueux	11± 0,45	12± 0,15	11± 0,23	11± 0,17
Association extrait méthanolique et lactobacille	11,5± 0,54	17± 0,11**	13± 0,09**	14± 0,61
Association extrait aqueux et lactobacille	11± 0,71	14± 0,38**	12± 0,43	12± 0,50
(** : p < 0,01)				

L'analyse de variance à deux facteur valide la différence significative entre les modes d'inhibitions exercés ; par la souche de lactobacille seule et chaque extrait séparément, ensuite la combinaison entre eux (p<0,01). Ce test a révélé que la combinaison entre les extraits de la plante et la souche *Lactobacillus brevis* contre les vibrions (V1, 3,4) n'a pas un effet supplémentaire, car les diamètres d'inhibitions restent presque les mêmes en utilisant les extraits seuls sans probiotique. De ce fait, on peut déduire qu'il n'y a pas une grande différence entre l'association et l'utilisation de l'extrait seul contre *V.cholerae*, par contre l'association a inhibé fortement *V.cholerae*.2 avec un diamètre de 17mm, lorsque l'extrait méthanolique est utilisé avec le probiotique, donc les extraits augmentent l'activité antibactérienne de *Lactobacillus brevis*. Cette association pourrait être utilisée pour éradiquer ce pathogène. La présence des extraits de plante favorise la prolifération des bonnes bactéries (probiotique).Donc l'utilisation des extraits en quantité d'au moins 100 mg /ml a potentialisé l'effet anti-pathogène de bactéries lactobacille (10<sup>5</sup>UFC/ml) vis à-vis l'agent nuisible. Il a été rapporté que l'utilisation de probiotiques améliore la qualité de l'eau, et réduit les vibrions

pathogènes (Dalmin *et al.* , 2001).Leurs modes d’actions sont multiples et plus ou moins directement dirigés vers la santé de l’animal, le milieu d’élevage, l’eau et le sol soit en colonisant le milieu plus vite qu’un agent pathogène, soit en intervenant dans le recyclage de la matière organique dans les bassins de production. D’autres agissent par exclusion compétitive avec les bactéries pathogènes dans l’hôte (émission de substance antibiotiques, compétition stérique, vis-à-vis des nutriments et de l’oxygène disponibles) (DE Decker., 2010)

## V. 2 Association des extraits et surnagent de lactobacilles

Les résultats de l’association entre les extraits et le surnagent sont représentés dans le de le tableau 25.

**Tableau 25:**Diamètre des zones d’inhibitions (mm) des associations entre les extraits et le surnagent de lactobacilles.

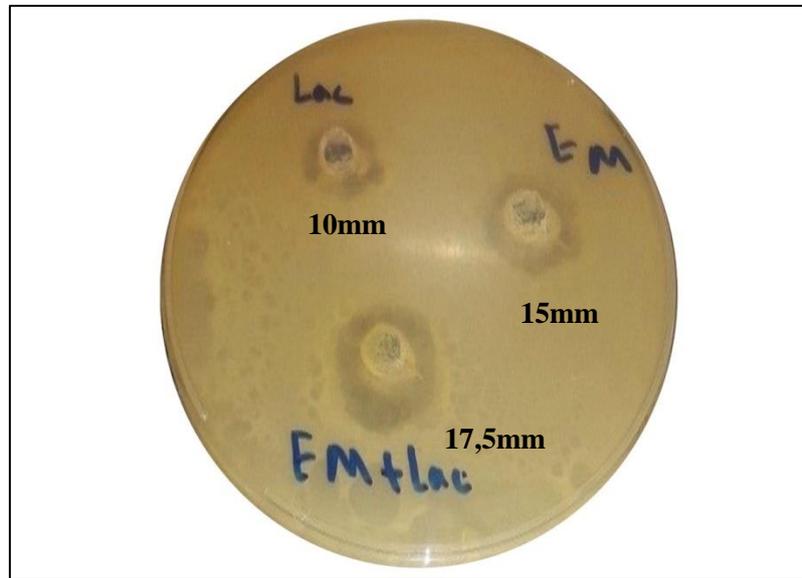
Mode d’inhibition (mm)	VI	V2	V3	V4
Surnagent de <i>L. brevis</i>	9± 0,23	10± 0,02	10± 0,51	12± 0,06
Extrait méthanolique	12± 0,17	15± 0,80	12± 0,09	14± 0,35
Extrait aqueux	11± 0,56	12,5± 0,03	11± 0,48	10± 0,09
Association extrait méthanolique et surnagent	12,5±0,65	17,5±0,54**	13± 0,20 **	15,5± 0,13**
Association extrait aqueux et surnagent	11± 0,47	13,5±0,61**	12± 0,91**	14± 0,66**
<b>(** : p &lt; 0,01)</b>				

D’après les résultats mentionnés dans le tableau 25, on a constaté l’existence de différence significative entre l’effet antimicrobien induit par le surnagent de *Lactobacillus brevis* seul et être associé avec les extrait de l’*Atriplex halimus* (p<0,01).

Cette étude a pu montrer que l’effet est synergique, vérifié par la combinaison des différents extraits avec le surnagent contre les quatre souches testées surtout avec les combinaisons contenant l’extrait méthanolique.

On constate à l’élargissement du spectre d’activités du à l’association envers le vibron cholérique ; la comparaison des diamètres des zones d’inhibitions exercés par le surnagent seul et chaque un des extraits par apport aux diamètres de combinaisons a prouvé que l’action antimicrobienne a été augmentée par un effet synergétique. En revanche aucun effet n’a été enregistré contre VI par l’association.

L'effet inhibiteur de surnagent s'exprime via différents mécanismes : abaissement du pH, production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), production d'acide lactique et/ou d'acide acétique, production et sécrétion de bactériocines, de peptides, d'acides organiques, d'acides gras à courtes chaînes, inhibition de l'adhésion et de l'expansion des pathogènes (Servin, 2004).



**Photo 10:** Synergie entre l'extrait méthanolique de *Atriplex halimus* et le surnagent de la souche *Lactobacillus brevis* contre la souche *V.cholerae.2*.

# *CONCLUSION*

L'eau constitue un environnement favorable pour le développement de nombreux microorganismes : virus, parasites, bactéries et parmi ces derniers le vibron cholérique qui trouve le milieu aquatique un foyer convenable pour exprimer sa pathogénicité , donc ce germe nécessite la gestion de son risque sanitaire .Cette étude nous avons permis d'isoler l'agent étiologique *Vibrio cholerae* dans les eaux courantes et de tester l'effet antimicrobien des biomolécules naturelles extraites à partir de plante médicinale *Atriplex halimus* . Parallèlement aux travaux consacrés à la recherche de nouvelles molécules à activité antibactérienne, on s'est penché sur un deuxième axe d'étude en se basant sur l'étude de caractère probiotique de Lactobacilles isolés des selles infantiles et l'évaluation de leur activité antibactérienne , ensuite l'association entre les extraits de la plante et le probiotique dans le but de la recherche de nouveaux inhibiteurs.

Les premiers résultats révèlent que toutes les souches isolées appartiennent à l'espèce *Vibrio cholerae non o1* et sont multi résistantes aux antibiotiques. L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des extraits riches en substances naturelles bioactives tels que : les flavonoïdes, les tanins, les saponines et les quinones.

En outre les deux extraits de l'*Atriplex halimus* possèdent un potentiel antioxydant dû à l'abondance des composés phénoliques. Le dosage des sels minéraux de feuilles de cette plante halophyte a montré sa richesse en sodium, calcium et potassium.

L'activité antimicrobienne des extraits de l'*Atriplex halimus* est mise en évidence par les différents tests microbiologiques comme la méthode de diffusions sur milieux solides, la microdilution, la bioautographie. Les tests d'efficacité des extraits affirment que les extraits : aqueux et méthanolique possèdent une activité antimicrobienne sur *Vibrio cholerae non o1*.

Six souches de lactobacilles ont été isolées à partir des selles de nourrissons. L'évaluation des aptitudes probiotiques de ces souches a permis de sélectionner quatre souches à potentiel probiotique qui diffèrent entre eux.

Notre recherche suggère la forte potentialité d'activité antimicrobienne exercée par *Lactobacillus brevis* sur les quatre souches de *Vibrio cholerae non o1*.

L'association des extraits de plante et le probiotique élargie le spectre d'activité sur les candidats pathogènes .L'ensemble de ces résultats ne constituent qu'un moyen de gestion sanitaire et une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle

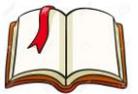
biologiquement actives agissant comme de puissants antimicrobiens. Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antibiotiques. Ainsi, la combinaison de ces deux stratégies de recherche devrait contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre les maladies d'origine hydrique et le problème récurrent de résistance des bactéries.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de sensibiliser les populations sur les dangers liés à l'utilisation des eaux non traitées et insister sur les mesures d'hygiène et sur le développement de l'éducation sanitaire.

Mener une étude plus approfondie sur les extraits de *Atriplex halimus* par isolement, purification et identification de ses composants bioactives et l'étude de leur pouvoir antimicrobien sur d'autres souches d'origine diverses. Confirmer par des tests « *in Vivo* » l'intérêt thérapeutique.

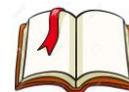
Des études complémentaires seront également importantes afin d'évaluer les différentes associations bénéfiques entre les extraits de plante et les probiotiques afin de gérer et minimiser le risque de la transmission des microorganismes pathogènes de l'environnement hydrique et prévenir les pathologies gastriques dues à l'ingestion de l'eau contaminée.

***RÉFÉRENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***



## A

-  Abbade A., El Hadrami A., El Hadrami I et Ben Chaabane A., 2004 .Seasonal chemical composition of leaves of three *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) natural populations grown in a common garden. Pakistan. Journal of Biological Sciences, 7(2):203-208.
-  Abd El-Rahman H.H., Mohamed M.I., Gehad A.E.A., Awadallah I.M., 2006. Ameliorating the Anti-nutritional factors effect in *Atriplex halimus* on sheep and goats by ensiling or polyethylene glycol supplementation. Int. J. AgrBiol .8 (6): 766–776
-  Abedini A., 2013 .Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes.Thèse de doctorat p 56. Université Lille .France.
-  Achat S., 2014. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques .These de doctorat .p 30
-  Acoby GA, Munoz-Price LS ., 2005. The new  $\beta$ -lactamases. N Engl J Med . 352 .pp :380-91-Catlin, B. W., 1975. Iodometric detection of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 7(3): 265-270.
-  Adeyemi , Adeleye , Enyinnia , Vivian , Nwanze, Rita , Smith., Stella , Omonigbehin ., 2008. Emmanuel Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *Vibrio* species isolated from seafoods in Lagos, Nigeria African Journal of Biotechnology .7 (20): 3791-3794.
-  AFSSAPS ., 2011. Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale. P4.
-  Aharonson Z., Shani (Mishkinsky) J., Sulman F.G., 1969. , Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) a feeding source of the Sand Rat (*Psammomys obesus*), *Diabetologia*, 5(6); pp. 379-383.
-  Alam M. J, Tomochika K.I., Miyoshi S.I. and Shinoda S., 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan., *FEMS Microbiology Letters*, 208.p .83-87 .
-  Alazzeah A.Y., M.M., Abu-Zanat. , 2004. Impact of feeding saltbush (*Atriplex* sp.) on some mineral concentrations in the blood serum of lactating Awassi ewes. *Small Ruminant Research*. 54: 81-88.
-  Albert J. M., 1994. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2345-2349.
-  Al-Jaber NAA, Mujahid T G, Al-Hazmi HMG. , 1991. Flavonoids from *Atriplex farinosa*. *Journal of King Saud University*. 3, 163-167.
-  Allalgua A, Ayari A, Boutmedjet S, Znati N, Kaouachi N, BOualleg C., 2014.Caractérisation physico-chimique et bactériologiques des eaux brutes et potables



du Barrage Ain Dalia (Souk-Ahras).1er Séminaire National sur la Santé et Bio-Surveillance des Ecosystèmes Aquatiques, Souk Ahras, Algeria.



Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF.,2004.Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane Database Syst Rev, CD003048.



Ammor S, Tauveron G, Dufour E, and Chevallier I., 2006. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Food Control. 17: 454-461.



Anné BJC, Kacou-Ndouba A, Kouadio-Guessennd N, *et al* ., 2008.Profils de résistance aux antibiotiques des souches de Vibrio cholerae O1 d'origine humaine isolées en Côte-d'Ivoire de 1991 à 2006. Rev Bio-Africa 6:15–20.



Asano, T., Burton, F., Leverenz, H., Tsuchihashi, R., Tchobanoglous, G., 2007. Water reuse : issues, technologies, and applications. New York (US): Metcalf& Eddy.



Atanasova M, Ribarova F., 2009. Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*) Revue de Génie Industriel .4 : 21-25



Axelsson L. T, Chung T. C, Dobrogosz W. J, Lindgren S. E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbiol. Ecol. Health Dis. 2: 131-136.

## B



Badis A, Laouabdia-Sellami N. Guetarni D, Kihal M, Ouzrout. R ., 2005.Characterisation phenotypique des bacteries lactiques isolees à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "ARABIA ET KABYLE". Sciences & Technologie C – N°23, pp. 30-37.



Bahri ., 2014.Isolment et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants. Thèse de doctorat. Université Constantine I. p.35.



Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R. (1983). Detection and activity of lacticin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol . 45(6), 1808-1815.



Barrow J. R. and Osuna P., 2002. Phosphorus solubilization and uptake by darkseptate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Journal of Arid Environments, 51: 449-459



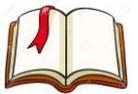
Baumann P, Furniss AL, Lee JV. 1984. Genus I. *Vibrio pacini* 1854, p 518–538 In Kreig NR, Holt JG. (Ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1 Williams and Wilkins, Baltimore, MD .



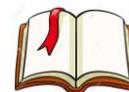
Bayoumi M T, EL shaer H M., 1990. Impact of halophytes on animal health and nutrition. In: VR .Squires. A. T. Ayoub (Eds), *Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands .p.267.



-  Bazo M., 2011. Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Université du Québec à Montréal.
-  Belhadj Tahar S, Hadj Mahammed M, Yousfi M., 2015. Study of the antioxidant activity of phenolic extracts of *Atriplex halimus* L. and *Haloxylon scoparium* Pomel Northern Sahara. *J Chem Pharm Res* .7:258–64.
-  Belhadj Tahar S., Hadj- Mahammed M, Yousfi M., 2015. Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de l'*Atriplex halimus* L et de l'*Haloxylon scoparium* pomel du Sahara septentrional. 281 (5389): 1-10.
-  Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle médecine arabe ancienne et savoir populaire. Ibis Press, P .764.
-  Belouad A., 2001. Plantes médicinales d'Algérie, éd. office des Publications Universitaires, Alger, p .284.
-  Belyagoubi-Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova PanovskT (2009) Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie* 12:1259–66.
-  Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, Aouni M., 2007. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharm Biol.*45(5):421-428.
-  Benalia A, Bendahmaneb M., Ait-Hamadouche N., 2015. Green Tea Protective Effect against Total Alkaloids of Tobacco Inducing Reprotoxic. Effects in Male Albino WISTAR Rats. *J. Appl. Environ. Biol. Sci...* 5(12) : 08-18.
-  Béné K, Fofié G.B.Y, Gnahoué G, Camara D, Zirih G.N ., 2015. Étude ethnobotanique, activité antifongique in vitro sur *Candida albicans* et toxicité sur les cellules HFF de *Harrisonia abyssinica* Oliv. (Simaroubaceae), une plante de la pharmacopée ivoirienne. *J. Appl. Biosci* .94 :8815 – 8824.
-  Benfetta H, Sahnoun ., Achour B., Ouadja A. , 2017. Épuration des eaux usées dans la wilaya de MASCARA. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n 31: 249-258.
-  Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova Panovska T., 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*. 12: 1259–1266.
-  Benhammou, N., Ghambaza, N., Benabdelkader, S., Atik-Bekkara, F. and Kadifkova Panovska, T. , 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *International Food Research Journal*. 20. Pp: 2057-2063.
-  Bentabet N, Boucherit-Otmani Z , Boucherit K , Ghaffour K., 2014 Preliminary phytochemical study of leaves and roots of *Fredolia aretioides*, endemic plant of Algeria *Der Pharma Chemica* , 6(1):443-447 .



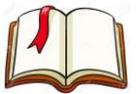
-  Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61(2): 160-174
-  Berri R., 2009. Contribution à la détermination de la biomasses consommable d'une halophyte : *Atriplex*., pp. 21.
-  Biju john, Sulaiman C T, Satheesh George and V R K Reddy., 2014. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from KERALA. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6 (1):406-408.
-  Binta MT ., 2003. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL (MELIACEAE) .Thèse de doctorat en Pharmacie .Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali.
-  Blainski A, Lopes C G and João Carlos Palazzo de Mello., 2013 .Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L .*Molecule*. 18(6): 6852-6865.
-  Bompangue Nkoko D., 2009. Dynamique des épidémies de choléra dans la région des grands lacs africains cas de la république démocratique du Congo. Thèse de doctorat .p43.
-  Boore A, Iwamoto M, Mintz E, Yu P., 2004. GLOBE (Global Link for Online Biomedical Expertise) Manuel Contrôle des maladies transmissibles.
- Boris A ., 2019. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes : *Alchornea floribunda* (Euphorbiaceae) et *Bridelia ferruginea* (Phyllanthaceae). 7(3), 331-345
-  Boris S, Soares JE, Vazques F, Barbes C., 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and immunity*, 66: 1985-1989.
-  Boros B, Jakabova S, Dornyei A, Horvath G, Pluhare Z, Kilar F, Felinger A, 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
-  Boukef I, S. Mejri, R. Mraoua B. Bejaoui, M. Belhassan, A. Harzallah, A. Boudabous, M. Elbour., 2010. Spatial distribution of thermotolerant Vibrionaceae populations in a coastal lagoon (Bizerta lagoon: Northern Tunisia). *Mar. Life*, 17 (1-2) : 13-23.
-  Bourgeois C.M., Leveau J.Y., 1980. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires- le contrôle microbiologique techniques et documentations (3). APRIA ED., PARIS.
-  Boussaid M., Ben fadhel N., Zaouali Y., Ben salah A., Abdelhanafi A. ,2001 : “Plantes pastorales en milieux arides de l’Afrique du Nord”, *Options Médit.*, 46 : 55-59.



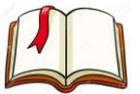
-  Boussaid M., Benfadhel N., Zaouali Y., Ben salah A., Abdelkefi A., 2001 : “Plantes pastorales en milieux arides de l’Afrique du Nord”, Options Médit. 46 ; 55-59.
-  Braegger C., 2002 .Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l’enfant .Die deutsche Fassung dieses Artikels ist in der Paediatrica erschienen. 13(5) :29–33.
-  Bruhlmann, C, Marston A, Hostettmann K., Carrupt P.A, Testa B., 2004. Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as AcetylcholinesteraseInhibitors. Chem. Biodivers.1:819-829.
-  Bruneton J., 2003. Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales. Lavoisier, Paris. p 915.
-  Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p. 1120.
-  Buntin N, Chanthachum S, Hongpattarakere T., 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 30: 141-148.
-  Bylka W., 2004. A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. Acta Physiol Plant. 26(4), 393-398.
-  Bylka W, Stobiecki M, Franski R., 2001. Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. Acta Physiologiae Plantarum .23:285–90.

### C

-  Caplice E, et Fitzgerald G.F. ,1999. Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food microbial.50:131-149.
-  Carr FG, Chill D et Maida N., 2002.The lactic acid bacteria: A literature survey Critical Rev.Microbiol.28:281-370.
-  CASFM. , 2014.Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie .p :31.
-  Cash R. A., Music S. I., Libonati J. P., Snyder M. J., Wenzel R. P. and Hornick R. B. , 1974 Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. J Infect Dis. 129, 45-52.
-  Catlin, B. W. Iodometric detection of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 1975. Vol; 7(3). P: 265-270.
-  Celiktas O. Y, Hames Kocabas E.E, Bedir, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser K.H.C., 2007.Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations .Food Chemistry.100(2) :553-559.



-  Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Géorgie. ,2002 .Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra. P40.
-  Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgie : CDC ; 1994.
-  Chadeffaut M et Emberger L., 1960. Traité de botanique : systématique les végétaux vasculaires. Tome II. Ed. Masson et Cie, Paris. P. 1540.
-  Chaouche T M, Haddouchi F, Zerhouni K, SIDI-Yekhelef A ., 2016 .Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre* Afrique SCIENCE. 12(3): 144 – 150.
-  Chapman D., Kimstach V., 1996.Chapman Edition, 2nd éd. E & FN Spon, London, ISBN 0 419 21590 5 (HB) 0 419 21600 6 (PB),).pp: 59-126.
-  Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636–1643.
-  Chikhi I ., 2014. Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Thèse de doctorat en chimie. p54.
-  Chouaki S., 2006 .Deuxièmes rapports nationaux sur l'état des ressources phylogénétiques .INRAA
-  Claesson MJ, van Sinderen D, O'Toole PW.. 2008. *Lactobacillus* phylogenomics-- towards a reclassification of the genus. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 58:2945-54.
-  Cohen N., Karib H., 2007 .*Vibrio* spp dans les produits de la pêche: Risques et prévention. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - N°3. p 6.
-  Colwell RR, Huq A ., 1994. Environmental Reservoir of *Vibrio cholerae* .The Causative Agent of Choleraa. *Ann N Y Acad Sci* 740:44–54.
-  Copin S, Robert-Pillot A, Mélanie Gay, Quilici M-L .*Vibrio* impliqués en pathologie humaine : une étude de leur répartition dans des produits de la mer consommés en France. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* no 68/Sécial Vigilance sur la chaîne alimentaire. p. 22.
-  Crişan CC, Călinescui, Zălaruc, Moldovanz ., 2013. Moldovan techniques for extracting polyphenols from *coreopsis Tinctoria nutt.* *Fruits U.P.B. Sci. Bull., Series B.* 75(4) .P 171.
-  Croci L , Serratore P , Cozzi L , Stacchini A , Milandri S, Suffredini E. & Toti L., 2001.Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett Applied Microbiology.*32:57-61.
-  Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human. Diet.* Blackwell Publishing Ltd., Oxford. p384



CUSSTR ., 2009.Commission Universitaire de Sécurité et Santé au Travail Romande. Dangers et risques biologiques.

## D



Dalmin G, Kathiresan K and Purushothaman A. (2001). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian J. Exp. Biol. 39: 939 - 942.



Danielsen M, Wind A., 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. To antimicrobial agents. Inter. J. Food. Microbiol. 82(1):1-11



Day C., 1990 .Hypoglycaemic compounds from plants, in: C.J .Bailey, P.R .Flatt (Eds.), News Antidiabetics Drugs, Smith –Gordon, London, p. 267.



DE Deckers ., 2010 .Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* : épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse.



De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmanet WB., 2009 .Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In: « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » . (3). Springer éd., New York. London, UK.



DEA Laetitia Bonifait, Chandad F, Grenier D., 2009. Les probiotiques en santé buccale : mythe ou réalité.75(8). p 586.



Dellagio F, de Roissard H, Torriani S, Curk M.C. et Janssens D., 1994.Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1: 25-116.



Diallo A M ., 2005 .Etude de plantes médicinales de Niafunke phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* .Thèse de Doctorat .Université de Bamako .p : 125.



Didier J ., 1996. Dosages des éléments minéraux majeurs chez les végétaux .Méthodes utilisées au laboratoire de diagnostic Foliaire de l 'C.R. S.T .C.M.P. p : 2.



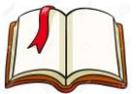
Dillenseger, H., 2019. Les bactériocines: en alternative aux traitements antibiotiques .Thèse de doctorat, Université de Bordeaux. p : 19



Dominique F ., 1993 .Bactéries pathogènes indigènes des eaux estuariennes: cas des vibrios revue bibliographique .p4.



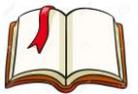
Donia Abd EL Raheim M, Alqasoumi SI, Soliman GA, Khataibeh MH , Ansari MN ., 2012. Effect OF *Atriplex farinosa*, *Atriplex nummularia* and *Ficus ingens* on ulcerative colitis in RATS. IJBPAS, 2(6): 1247-1259.



-  Donia Ael R, Alqasoumi SI, Soliman GA, Radwan AM. Secondary metabolites and antifertility potential of *Atriplex farinosa* Forssk. *Phytopharmacology* 2012; 2(1): 16-25.
-  Donnenberg M.S., 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406, p.768-774.
-  Dortu C. et Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bio conservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13:143-154.
-  Doumandji, A., Bousbia, N., Hellal, A.,2010.Effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* isolé à partir de selles de nourrisson allaité au sein. *Sciences et Technologies*, 31 : 14-21.
-  Drechsel P, Scott C. A, Raschid-Sally L., Redwood M, Bahri A., 2011. L'irrigation avec des eaux usées et la santé. Québec (CA): Presses de l'Université du Québec.
-  Drissa S., 2003.Etude de la prise en charge du paludisme par les thérapeutes traditionnels dans les aires de sante de kendie (Bandiagara) et de finkolo (Sikasso). Thèse de doctorat .p :
-  Drouault S. et Corthier G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32 :101-117.
-  Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald , Daly C , Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK ., 2001. In Vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386-392.
-  Dunoyer J., 2013 Lutter contre Le choléra . MANUEL PRATIQUE EAH ET SMPS DE LUTTE CONTRE LE CHOLÉRA .p17.
-  Dutuit P, Pourrat Y, Dodemanv L. ,1991. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELPUREF. John Libbey Eurotext. Paris . pp. 65-73. Stratégie d'implantation d'un système d'espèces adaptées aux conditions d'aridité du pourtour méditerranéen .

## E

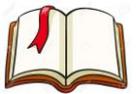
-  Eddabra R.,2011 .Evaluation de la contamination bactériologique des eaux usées des stations d'épuration du grand Agadir: isolement et caractérisation moléculaire et antibiorésistance des espèces du genre *Vibrio*. Thèse de doctorat en microbiologie Université.STRASBOUR. P: 03.
-  Edima HC ., 2007. *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse de doctorat : Université de NGAoundéré. p : 5.



-  El Gharas, H., 2009. Polyphenols , Food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology* .44(12): 2512-2518.
-  EL Marrakchi S., 2012 .Thèse de doctorat : Les Vibrions pathogènes chez l'homme. p25.
-  El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfaxi I, El-Mecherfi K.E, Bazukyan I, Choiset I, Rabesona H, Sitohy M, Popov Y. G , Kuliev A. A, Mozzi F, Chobert J. M., Haertlé T., 2011. Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* 22 : 509-516.
-  El-Gougary, O.A., 1998. Insecticidal and synergistic activity of *Atriplex halimus* L. extracts. *J. Egyptian Soc. Parasitol.*, 28: 191-196.
-  Elisha BG, Courvalin P (1995). Analysis of genes encoding D-alanine, D-alanine ligase related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene*. 152:79–83.
-  El-Ziney M.G, Uyttendaele M, Debevere J. et Jakobsen M, 1998. Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/ glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20 (10): 913-916.
-  Emam S.S., 2011. Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of natural products*. 4. pp. 25-41.
-  Epifano F, Genovese S, Menghini L. and Curini M., 2007. Chemistry and pharmacology of
-  Essafi N E., Mounsif M., ABousalim A. H., Bendaou M., Brhadda N., 2007. Effets du stress hydrique sur la valeur nutritive d'*Atriplex halimus* L. *Sécheresse*, 18 (2): 123-128.

## F

-  FAO/WHO., 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada.
-  Faruque SM, Biswas K, Udden SMN, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ ., 2006. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 6350–6355.
-  Fauchere IL, Avril JL., 2002. *Bactériologie générale et médicale*. Editions Ellipses. Paris1, p. 368.
-  Festy B, Hartemann P, Ledrans M, Levallois P, Payment P, Tricard D., 2003 .Qualité de l'eau. In *Environnement et santé publique*. Fondements et pratiques, pp.333-368.



 Fournier J.M & Quilici M.L., 2002. Infections à vibrions non cholériques. Encycl. Méd. Chir. (éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses. p 7.

 Fournier J.M., 1996. Choléra. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris).Maladies Infectieuses, 8-026- F-10. p 5.

## G

 Gaujous D., 1995. La pollution des milieux aquatiques. Edit. Lavoisier Paris. p 217.

 Gbohaïda V, Mèdoatinsa Seindé E, Nonviho G, et al ., 2015. Étude chimique et évaluation de l'influence de la granulométrie sur la cinétique d'extraction des polyphénols naturels de *Pterocarpus erinaceus* acclimaté au Bénin. Int J Innov Appl Stud .12:325–33.

 Geraldine Favre ., 2002 . Prébiotiques et probiotiques : ont-ils un réel intérêt pour la santé ? Rôle du pharmacien dans leur conseil à l'officine .Thèse de doctorat. Université JOSEPH FOURIER.GRENOBLE .p22.

 Gibson et Abd El Malek. ,1945. The formation of carbone dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the processus. J. Dairy Res. 14.p. 35.

 Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. J. Nutr.125 : 1401-12.

 Gihad E.A., 1993. Utilization of high salinity tolerant plants and saline water by desert animals. In: Lieth, H. and A.A. Massoom (eds), Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants, p: 4437. Kluwer Acad. Publication, the Netherlands.

 Gleyze J., 2001 .Apport de l'information géographique dans l'analyse des risques. Application à l'étude des perturbations du réseau routier à la suite de catastrophes. Bulletin d'Information de l'IGN n° 72 (2001/3).p :70.

 Guarner F, Khan A. G, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J. et Le Mair T., 2008. Recommandation Pratique: Probiotiques Et Prébiotiques. WGO Global Guideline, Organisation Mondiale de Gastroentérologie. p28.

 Guegan J.F., 2006. Quantification des risques d'émergence d'épidémies à choléra dans le bassin méditerranéen en relation avec le changement climatique .Centre I.R.D. de Montpellier .p .13.

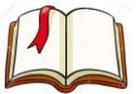
 Guéguen L., 1959 .Etude de la composition minérale de quelques espèces fourragères. influence du stade de développement et du cycle de végétation. Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences, 8 (3) : 245-268.



-  Guetarni H., Taibouni NE., Tahi S. 2017: Isolation of the Lactic Acid Bacteria from Sigoise and Chemlale Olive Varieties in Ain Defla (Algeria). *Electronic Journal of Biology*. 13(4): 408-415.
-  Guévart É, Jürgen N., Jérémie S, Antoine M., Joseph-Marie B., 2007. Antibioprophylaxie ciblée à large échelle au cours de l'épidémie de choléra de Douala en 2004, *Cahiers Santé*. 17(2):63-68.
-  Guglielmotti D.M, Marco M.B., Golowezye M., Reinheimer J.A. et Quiberoni A.D.L., 2007. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* 17: 916-925.
-  Guiraud J.P., 1998. *Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agroalimentaire*, Eds. Dunod Paris. Pages: 89-92 ,289-295.
-  Guiraud J.P., 2003. *Microbiologie alimentaire*". Ed RIA. Dunod.
-  Guiraud J-P et Rose J-P., 2004. *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR.
-  Guo X H, Kim J M, Nam H M, Park SY, Kim J M. ,2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*. 16(4): 321-326.
-  Guo X H, Kim J M, Nam H M, Park SY, Kim J M., 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*. 16(4): 321-326.

## H

-  Hariri A, Ouis N, Sahnouni F, Bouhadi D., 2010. Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments Lactiques dans des milieux a base des extraits de Caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Congrès International BIOMED 1 Marrakech*. p: 37-55
-  Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., et al. ,2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera *Vibrio cholerae* génome contains two unique circular chromosomes. *Pathogen Vibrio cholerae. Nature* 406, pp. 477–483.
-  Helsens N ., 2018. Etude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche. Thèse de de Doctorat. Université de Rennes.
-  Host S, Camard J, Franconi A, Lefranc A, Grémy I., 2006. L'évaluation des risques sanitaires : principe et méthode Observatoire régional de santé d'Île-de-France. p : 2.
-  Huss H.H, Ababouch L. and Gram L., 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO, Fisheries Technical paper .N°=444*.pp.35-40
-  Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011. Isolation and screening of lactic acidbacteria from That traditional fermented



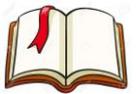
fish (Plasom) and production of Plasom from s electedstrains. Food Control., 22: 401-407

### I

-  Igor Passi, L.B. ,2002. Etude des activités biologique de Fagara zanthoxyloïdes, lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako. p 133.
-  Ishibashi N et Yamazaki S., 2001. Probiotics and safety. American Journal Clinical Nutrition 73:465-470.
-  Iyer R., Tomar S.K., Uma Maheswari T., Singh R., 2010. Streptococcus thermophilus strains: multifunctional lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 20 : 133-141.

### K

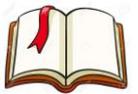
-  Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H and Suzuki Y., 1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E." Journal of Dairy Science. 76(9): 2493-2499.
-  Kalbaza K., 2018. Bactéries lactiques de produits artisanaux : identification et caractéristiques technologiques. Thèse de doctorat .Université d’Oran .p43.
-  Kamanzi AK. 2002. Plantes médicinales de Côte d’ivoire : Investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques. Thèse de doctorat, Université de Cocody, Abidjan, p 176.
-  Kandler O. ET Weiss N., 1986.Regular nonspring Gram-positive rods. In: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Williams, Wilkins, Baltimore. 2 : 1208-1209.
-  Kassaa I A , HAmze M , Hober D , Chihib N E , Drider D et al . , 2014. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in north Lebanon. Microbial Ecology, 67: 722-734.
-  Katala AK, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H., 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Inter. J. Food. Microbiol. 67(1-2): 147-152.
-  Kaushik J K, Kumar A, Duary R K, Mohanty A K, Grover S, Batish V K. ,2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of Lactobacillus plantarum. PloSone. 4(12), e8099.
-  Khaldi A, Amamra D, Tir Touil A, et al ., 2015. Effects of Atriplex halimus on resistant bacterial strain of different origins. International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences, pp : 22–23.
-  Kherraze M, El Hafed , Lakhdari K ., 2010 .Atlas floristique de la vallée de l’oued RIGH par écosystème .p 58.
-  Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of Vibrio cholerae. J. Med. Microbiol; 60:397–407.



-  Kühnau, J., 1976. "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev Nutr Diet.* 24: 117-191.

**L**

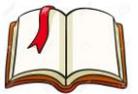
-  Labreuche Y., 2006 .Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas* .Thèse de doctorat.p25 et 31.
-  Lamari ., 2014. Utilisation de bactéries lactiques probiotiques pour prémunir les poissons d'élevage contre des vibrions pathogènes. Université de Bretagne occidentale. P50.
-  Le Houérou H N., 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agro forestry Systems*, 18(2): 107–148.
-  Lemetais G., 2012. Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche. Thèse de doctorat .Université de bourgogne .p29.
-  Lencer W.L., Hirst T.R. and Holmes R.K., 1999. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1450: 177-190.
-  Lenoir L .,2002. Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. p 54.
-  Leroy S, Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I., Talon R., 2007. Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique: bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* 25 (5): 172.
-  Leynaud G., 1968. Les pollutions thermiques, influence de la température sur la vie aquatique B.T.I. Ministère de l'agriculture.
-  Lhuilier., 2007.Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *Agauria polyphylla* Baker (ericaceae), *Tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *Embelia concinna* baker (myrsinaceae). p 43.
-  Liao F, Nyachoti M ., 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. 3(4):331-343.
-  Liss S N. ,Allend G., 1992.«Microbiological Study of Bleached Kraft Pulp Mill Aerated Lagoon»
-  Liu S, Lu H., Zhao Q., He, Y., Niu J., Debnath A.K., 2005. The aflavin derivatives in black tea and cat echin derivatives in green teainhibit HIV-1 entry by targeting gp 41. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Gen Subj.*, 1723: 270-81.
-  Lorrot M, Vasseur M., 2007.Physiopathologie de la diarrhée à Rotavirus  
Physiopathology of Rotavirus diarrhea.14(3) :S145-S151.Archives de Pédiatrie.
-  Lou Le Rouzic ., 2021. Les aliments fermentés et le syndrome de l'intestin Irritable. .Universités CLERMONT AUVERGNE.



-  Lugasi A, Hóvari J, Sagi K. V. et Biro L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* .47 :(1-4) :119-125.

## M

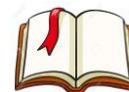
-  Mâalem S., 2011. Analyse moléculaire de la diversité génétique de plantes Xéro/Halophytes du genre *Atriplex* moyennant RAPD-PCR. *Algérien journal of arid environment*. 1(1): 50-59.
-  Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.
-  Madden J.M. and Mc Cardell B.A. ,1989. *Vibrio cholerae*. In: DOYLE M.P. (ed). *Foodborn Food Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker, p.525-542.
-  Mahi Z ., 2015 .Etude de la Peroxydation Lipidique (MDA) et l'Activité Antioxydative (POD) Chez Deux halophytes: *Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt sous l'effet du Sel. *International Journal of Innovation and Applied Studies*.10 (1) : 450-458.
-  Mahmoudi S, Khali Mahmoudi N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus*L.) .Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09 : 35 – 40.
-  Maiga et al. ,2006. Performances épuratoires d'une filière de trois étages de bassins de lagunage à microphytes sous climat sahélien : cas de la station de traitement des eaux usées de l'EIER. *Sud Sciences & Technologies*, 14 : 1-9.
-  Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16 (3):189-199.
-  Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. ,1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.
-  Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, et Bingen E ., 2016. Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales. pp: 149–161.
-  Marion B, Nathalie C et al., Guide réponse pharmaceutique au cholera pharmacie & aide humanitaire . p 5 -8 et 9.
-  Martinez J.P., Ledentj F, Bajji M, Kinetj M ., Lutts S. , 2003: “Effect of water stress on growth, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L.”, *Plant growth Regul.*, 41, 63-73.
-  Mathab, M.C, Nikolovia R.V, Lall N. and Nyazema N.Z., 2006. Antibacterial activities of Medicinal Plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 286-293.



-  Maugeri T.L., M. Carbone, M.T. Fera, G.P. Irrera, C. Gugliandolo, 2004 - Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *J. appl. Microbiol.*, 97 : 354-361.
-  Ministry of Health by ESR, 2001. *Vibrio cholerae*. *Vibriosp.* dans les produits de la pêche: Risques et prévention.
-  Miossec L., 2002. Les vibrions pathogènes pour l'homme : le risque associé au milieu marin en France *Vibrions et risque sanitaire*.
-  Moroh J.-L. A, Bahi C, DJE K, Loukou Y. G, Guede-Guina F., 2008. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) *milne-redheat* (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 77: 44 – 61.
-  Morris J.G., 1990. , Non-O group 1 *Vibrio cholerae* : a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiologic Reviews*, 12, 179-191.
-  Muanda FN., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. p71.
-  Mulas M., Mulas G., 2004. Groupe de recherche sur la désertification potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and medium -term priority environmental action programme (smap). p38, 39.

## N

-  Nalin D.R., Daya V., Reid A., Levine M. M. et Cisneros L., 1979. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.*, 25 :768-770. Variations temporelles de *Vibrio cholerae* en conditions environnementales dans un site aquacole (lagune Ebrie, cote d'ivoire)
-  NCCLS., 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed, NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, PA....
-  Ndoutamia G, Bessimbaye N, Kera-hinzoumbé C , Henry yandäï F , Sangaré L , Traoré A , Bonkougou I , Savadogo A et Barro N., 2014. Profil de résistance des agents étiologiques des diarrhées isolés au Tchad *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8(6) : 2452-2461.
-  Nadjimi B, Guit B, Toumi M, et al. , 2010. *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* (Chenopodiaceae) : description, écologie.
-  Nègre R., 1961. Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome 1. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (France).
-  Nehme N., 2014. Evaluation de la qualité de l'eau du bassin inférieur de la rivière de Litani, Liban: approche environnementale. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine (France).p 359.



 Niekerk WA, Sparks CF, Rethman NFG, Coertze RJ ., 2004. Mineral composition of certain Atriplex species and Cassia sturtii. South African Journal of Animal Science. 34(1) : 105-107.

 Nur A. Hasan Nur A. Hasan, Christopher J. Grim, Bradd J. Haley, and Rita R. Colwell et al ., 2010. Comparative genomics of clinical and environmental Vibrio mimicus . Proceedings of the National Academy of Sciences . 107(49):21134-21139.

## O

 Omar J.M. Hamza, Carolien J.P. van den Bout-van den Beukel, Mecky I.N. Matee, Mainen J. Moshi, Frans H.M. Mikx, Haji O. Selemani, Zakaria H. Mbwambo, André J.A.M. Van der Ven, Paul E. Verweij, 2006. "Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections," Journal of Ethnopharmacology. 108 (1) :124- 132.

 Organisation mondiale de la Santé (OMS) ., 2018. Normes de surveillance des maladies évitables par la vaccination.

 Orla –Jensen S., 1919. The Lactic Acid Bacteria ; Host and Son : Copenhagen.

 oxyprenylated secondary plant metabolites. Phytochemistry. 68: 939-953.

 Ozawa T, Lilley T.H. & Haslam E., 1987. Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit, Phytochemistry. 26 (11) : 2937-2942.

## P

 Pagliero E., 2006. Etude fonctionnelle de Pmp23, une nouvelle enzyme de clivage du peptidoglycane chez Streptococcus pneumoniae .Thèse de doctorat. p 03.

 Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Murcia G. S, Jiménez A. M., Codina C., 2003 .Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. Life Sciences. 73: 1667-1681.

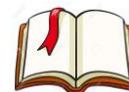
 Parida A K, Das A B, Sanda Y, Mohanty P ., 2004 .Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, Aegiceras corniculatum, Aquatic Botany, 80 : 77-87.

 Peres C M., Alves M., Hernandez-Mendoza A , Moreira L, Silva S., Bronze M R., Vilas-Boas L., Peres C. et Malcata FX., 2014. Novel Isolates of Lactobacilli from Fermented Portuguese Olive as Potential Probiotics. LWT -Food Science and Technology. 59(1): 234-246.

 Perret C., 2001. Analyse des tannins inhibiteurs de la stilbène oxidase produite pour Botrytis cinerea, Thèse de doctorat .p.32.

 Piquepaille C., 2013. Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales .Thèse de doctorat. Université de Limoge.p22

 Ponce AG, Fritz R, Del Alle C. Roura SI., 2003. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 36: 679-684.



-  Price M L, Van Scoyoc S, Butler L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26: 1214-1218.

## Q

-  Quilici M-L A., 2011. Le diagnostic bactériologique du choléra .*REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES.*– N°431 pp.:51-65.

## R

-  Rabab M, Seham S. El-Hawary, Amira M. Abo-youssef., 2012. Biological investigation of some wild Aizoaceae and Chenopodiaceae species growing in Egypt. *Journal of Natural Products*, 5:193-206.

-  Rahman SMA, Abd-Ellatif SA, Deraz SF, Khalil AA ., 2011. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from Western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *Afr J Biotechnol* .10 (52) :10733–43.

-  Ranarivelo Y., 2004. Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

-  Randrianarivelo R ., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosmafragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat : p 62.

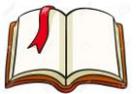
-  Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. , 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.*;16(4):658-72.

-  Reidl J, Klose KE., 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: Out of the water and in to the host. *FEMS Microbiology Reviews.*;26 (2):125–39.

-  Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, LIU C, Liu H, Wang M, Li L, Sun Y, Li X, Tian M, Jin N. ,2014. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe.* 30: 1-10.

-  Rezaire A ., 2012 .Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane.

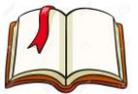
-  Rizk A. M., 1982. Constituants of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, 52 (2) : 35-42.



-  Robinson R. K., 2002. Dairy Microbiology handbook: the Microbiology of milk and milk products. John Wiley and Sons, Inc., New York.
-  Rodier J., 1996 .L'analyse de l'eau ; Eaux Naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 8ème édition. Dunod.1:135-145.
-  Roux D., 2005. Les nouvelles plantes qui soignent. Ed. S.A.M. pp. 31.
-  Ruiz P, Barragán I, Seseña S., Palop M. L., 2016. Functional properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from goat colostrum for application in food fermentations. International journal of dairy Technology, 69(4) : 559–568.

## S

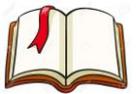
-  Sack. D A., Lyke C., Mc Laughlin C., and Swanvanichkij V., 2001. Antimicrobial resistance
-  Sekkoum K ., 2011. Composition phytochimique et effet, in vitro, des extraits de quelques plantes médicinales du Sud-Ouest Algérien sur la cristallisation lithiasique oxalocalcique. Thèse de doctorat .Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès.
-  Sahli R., 2018 Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques. Thèse de doctorat En "Sciences du médicament et des autres produits de santé" et En "Génie Biologique. p 7 et 8.
-  Sahli R., 2017 Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques .Thèse de doctorat. p22.
-  Saide J. A. O. and Gilliland S. E., 2005. "Antioxidative activity of Lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity." Journal of Dairy Science. 88(4): 1352-1357.
-  Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E, Prevost H. et Kihal M., 2002. Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. Journal Algérien des Régions Arides., 01: 01-11.
-  Sakurai T , Kitadate K , Nishioka H , Fujii H, Kizaki K., Kondoh Y, Izawa T., Ishida H., Radák Z., Ohno H., 2010.Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. J. Nutr. Biochem. 21 :47-54.
-  Samarth R, M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A., 2008. Evaluation of antioxidant and radical scavenging activities of certain radioprotective plant extract, Food Chem, 106: 868-873.
-  Selle A, Brosseau C , Barbarot S, Bodinier M., 2018. Les prébiotiques : une stratégie nutritionnelle pour prévenir des allergies. Prebiotics: a nutritional strategy to prevent allergies.



-  Servin AL, Coconnier MH, 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and the interaction with pathogens. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 741-754. p 128
-  Servin AL., 2004 .Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.*FEMS Microbiol.* 28:405-440.
-  Singh VP ., 2018.Recent approaches in food bio-preservation a review.*Opent Vet .J .8* : 104-111.
-  Singleton F.L., Atwell R., Jangi S. and Coiwell R.R., 1982. Influence of salinity and organic nutrient concentrations on survival and growth of *Vibrio cholera* in aquatic microcosms. *Environ. Microbiol.*, 43(5): 1080–1085.
-  Singleton VL, Rossi JA., 1965.Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult.* 16:144–158.
-  Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W., 2011. Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons.
-  Souyah N, khouja M.L, Rejeb MN, et Bouzid S., 1998. Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L. (Chenopodiacees) .pp. 131 – 135.
-  Stiles M. E and Holzapfel W. H., 1997.Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.*36: 1-29.

## T

-  Tagg JR, Mc Given AR ., 1971. Assay system for bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology* 21: 943.
-  Tamatcho Kweyan BP, Fotsing Kwetche PR, Njine T, et al ., 2009.Quelques facteurs déterminant la distribution des bactéries du genre *Vibrio* dans l'environnement aquatique de Yaoundé, Cameroun. *Cameroon J Exp Biol* 05:96–103.
-  Tasdemir D., Donmez A.A., Calis I, Ruedi P., 2004. Evaluation of Biological Activity of Turkish Plants. Rapid Screening for the Antimicrobial, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibitory Potential by TLC Bioautographic Methods. *Pharmaceutical Biology*, 42 (4-5) : 374-383.
-  The Universal Protein Resource. Lactobacillales. UniProt. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>.
-  Thomas, J., 2004. Mémoire de l'école nationale de la santé publique épidémies de choléra en Afrique : analyse d'une étiologie multifactorielle.
-  Tiekoura Konan B, Guessennd KAN, Anne Blessa JC, et al ., 2010. Caractérisation moléculaire des souches de *Vibrio cholerae* non O1, non O139 isolées des eaux lagunaires de Grand-Lahou (Côte-d'Ivoire). *Eur J Sci Res* 45:333–45.
-  Tourneur C., 1972 .Aptitude à la proteolyse des lactobacillus presents dans les fromages et les lactoserums de fromage.*Lait.*52:149-174.



-  Traore G., 2013. Risques de contraction des affections a *Vibrio* sp. et a *Paragonimus* sp liés à la consommation des crabes et des crevettes vendus sur les marches d'Abidjan et de d'Abou .p27.
-  Tsuchiya, H., Linuma, M., 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophora flavanone G isolated from *Sophora exigua*, *Phytomedicine*, 7:161-165.
-  Tubaya D ., 2007 .Etude des facteurs de risques du choléra. Université de Lubumbashi -DIPLOME D'études approfondies en santé publique, option épidémiologie et médecine préventive.
-  Turpin W., 2011. Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire. Université Montpellier.

## U

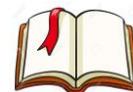
-  Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H., 2006. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.
-  UNICEF., 2013. Guide pratique de lutte contre le choléra. p .16 et 21.
-  Urassa W.K, MhandO Y.B, Mhalu F.S, Mgonja S.J., 2000.Antimicrobial susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O1 strains during two cholera outbreaks in DAR ES SALAAM, TANZANIA. *East African medical journal*. 77(7): 350-353.

## V

-  Vandamme P, Pot B, Gillis M, DeVos P, Kersters K et Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407.
-  Verdenelli M, Ricciutelli M. , Gigli F, Cenci G, Trotta F, Caldini G, Cresci and. Orpianesi C., 2010 ."Investigation of the antigenotoxic properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 by gas chromatography-mass spectrometry." *Italian Journal of Food Science* 22(4): 473-478.
-  Veron M, Popoff M ., 1989. Vibrionacee, in LE MINOR C. et VERON M. *Bactériologie médicale*. 2e Edition. Paris : Flammarion Médecine-science. Pp : 473-500.

## W

-  Wagner H., 2003.Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstaffe, Gustav Fisher Verfag. Sturtgart-New-York. p50.
-  Waldor M K, Colwell R., & Mekalanos J.J., 1994. The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence



determinants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(24): 11388-11392.



Wang C Y, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. , 2010. Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Anaerobe.16 (6): 578-585.



Williams J P., 2006 .biophysical Journal, Department of Biological sciences, , Gas Phase Characterization of the Noncovalent Quaternary Structure of Cholera Toxin and the Cholera Toxin B Subunit Pentamer. , p : 3246-3254.



Wood B.J.B. and Holzapfel, W.H., 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol. 2, Blackie Academic and Professional Glasgow .London.



Wu T, Zang X., He M., Pan S, Xu X., 2013. Structure activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase, J. Agric.Food Chem. 6:8185-8190.

## X



Xu H, Jeong H S, Lee H Y, Ahn J., 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Letters in applied microbiology, 49(4): 434442.

## Y



Yanishlieva-Maslarova N V., 2001 .Inhibiting oxidation .in Pokorny et al .,2001.



Yateem A , Balba M.T, AL-Surrayai T , Al-Mutairi B. and Al-Daher R. , 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. International Journal of Dairy Science, 3(4): 194-199.



Ybert E., 2001. Petit Larousse de la Médecine. Larousse/VUEF. Canada. p.1087.

## Z



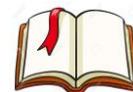
Zalan Z, Barath A, and Halasz A., 2005: "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains." Food Technol Biotech .43: 219-225.



ZamW, Bashour G, Abdelwahed W, Khayata W., 2013. Simple and fast method for the extraction of polyphenol and the separation of proanthocyanidins from carob pods Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP) Sch. Acad. J. Pharm. 2(5):375-380.

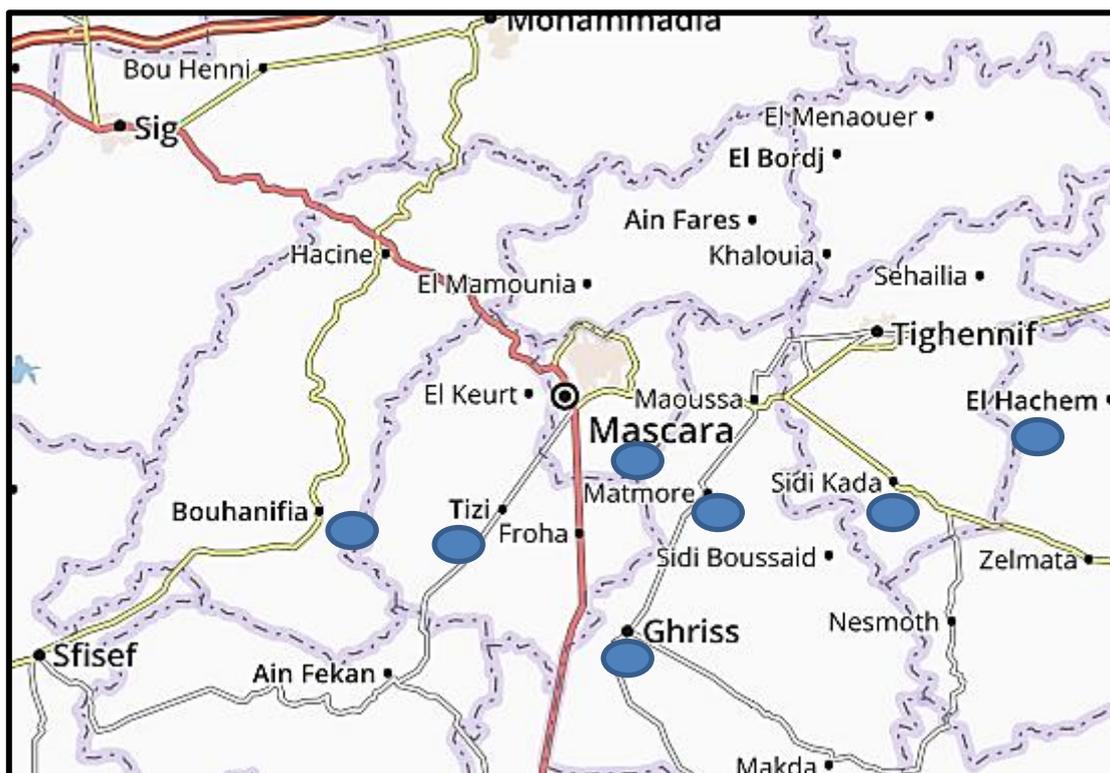


Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-559.



Zouadi ,2020 .Valorisation des protéines et de substances actives extraites de plantes (*Atriplex halimus*, *Griffonia simplicifolia* et *Lupinus albus*) comme additifs dans la formulation de produits alimentaires diététiques. Thèse de Doctorat .Université de Blida.

# ***ANNEXES***



**Localisation des sites de prélèvements d'eaux dans la wilaya de Mascara et ses Communes.**

## La composition des milieux de culture (g/l)

### ❖ La gélose au Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS)

#### Formule type

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone .....	10,0
- Extrait autolytique de levure.....	.5,0
- Saccharose .....	..20,0
- Bile de boeuf bactériologique .....	.5,0
- Cholate de sodium .....	.3,0
- Citrate de sodium.....	10,0
- Thiosulfate de sodium.....	10,0
- Chlorure de sodium.....	10,0
- Citrate ferrique ammoniacal .....	.1,0
- Bleu de bromothymol .....	.0, 04
- Bleu de thymol .....	.. 0,04
- Agar agar bactériologique.....	14,0

pH 8,6

### ❖ Eau peptonée alcaline (EPA)

-Peptone.....	10
- Chlorure de sodium .....	10

pH 8,6

❖ **Eau peptonée salée alcaline ((EP SA)**

-Peptone.....	20
- Chlorure de sodium .....	30

pH 8,6

❖ **Agar GNAB**

- Peptone de viande.....	10
-Extrait de viande.....	3
-Chlorure de sodium.....	5
-Bile de bœuf desséchée.....	2
-Agar .....	18

pH 8,6

❖ **Gélose nutritive**

-Peptone.....	5
-Extrait de viande.....	1
-Extrait de levure .....	2
- Chlorure de sodium .....	5
-Agar .....	15

pH 7,4

### ❖ Gélose Hektoen

-Protéose peptone .....	12
-Extrait de levure.....	3
-Chlorure de sodium .....	5
-Thiosulfate de sodium .....	5
-Sels biliaires .....	9
-Citrate de fer ammoniacal .....	1,5
-Salicine.....	2
-Lactose.....	12
-Saccharose .....	12
-Fuchsine acide .....	0,1
- Bleu de bromothymol .....	0,065
-Agar.....	14

pH 7,5

### ❖ PBS (phosphate buffer saline)

-Chlorure de sodium.....	8
-Chlorure de potassium.....	0,2
-Phosphate disodique.....	1,15
-Phosphate monopotassique .....	0,2

pH=7,3

### ❖ Milieu MRS (g/l)

-Peptone .....	10
-Extrait de viande .....	10
-Extrait de Levure .....	5
-Glucose .....	20
-Phosphate dipotassique .....	2
-Acétate de sodium .....	5

-Tween 80 (polysorbate 80) .....	1
-Citrate d'ammonium .....	2
-Sulfate de magnésium .....	0,2
-Sulfate de manganèse .....	0,1
-Agar .....	15

pH 5,7

### ❖ Gélose Mueller Hinton

-Peptone.....	17,5
-Extrait de viande.....	2
-Amidon.....	1,5
-Agar.....	17

pH 7,3

### ❖ Milieu De Moeller

-Extrait de levure.....	3
L-ornithine (monochlorhydrate)	
L-arginine (monochlorhydrate).....	5 (suivant le cas)
L-lysine (monochlorhydrate)	
Glucose.....	1 g
Bromocrésol pourpre.....	0,16 mg
Éthanol.....	1 mL
Chlorure de sodium.....	5

pH = 6,8

# Coloration de Gram

## Mode opératoire

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme (normalement on fixe avec de l'alcool et on flambe), sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Immerger les lames dans la solution de Cristal violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames.
- Immerger les lames dans du Lugol en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air.
- Observer à l'objectif X100, en immersion avec de l'huile.

## Résultat

Les bactéries Gram + sont colorées en violet foncé, les bactéries Gram - sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi.

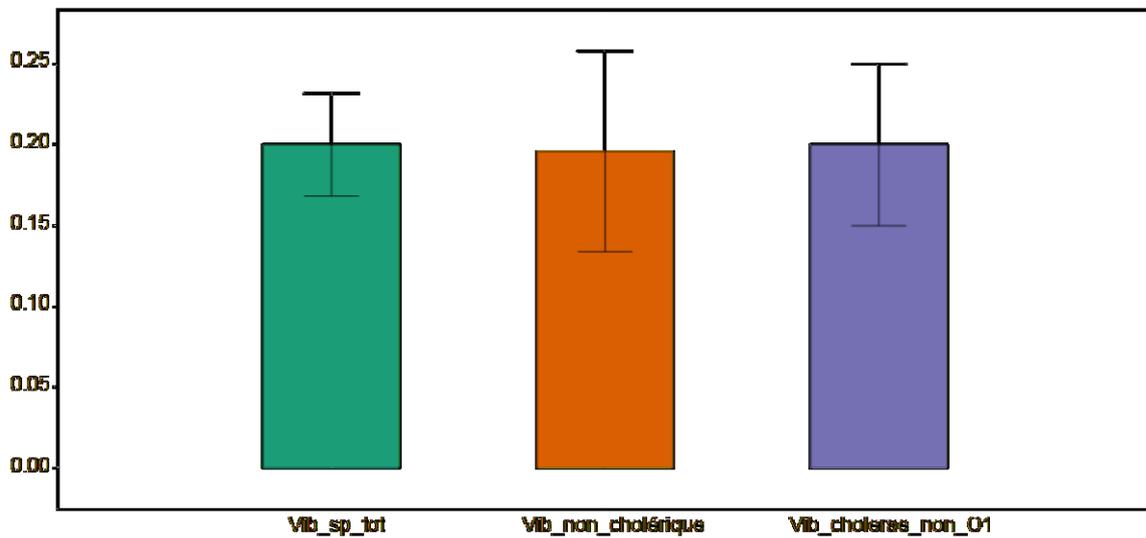
## Analyses statistiques

### Valeurs moyennes de pH et température des stations analysées

	Sample mean	95% conf. Interval	t	p (same mean)
pH	7.796	(7.5353 8.0567)	83.03	1.26E-07
Température	21.7	(18.801 24.599)	20.785	3.17E-05

### Comparaison des souches

Nombre et pourcentage de souches de *Vibrio* est très variable (Fig 1.).



**Figure : 01**

### Comparaison de souches/milieu

Tab: Anova des deux paramètres

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Extrait	72.52	1	5.8544	0.02018*
Souche	70.56	3	1.8988	0.014533
Extrait:Souche	9.9	3	0.2663	0.04929*
Residuals	495.5	40		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'

## Comparaison de Mode/Diamètre

Tab: Anova des modes/diamètre

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Mode</b>	4	47.88	11.95	5.361	0.00695**
<b>Diamètre</b>	3	12.64	4.18	2.66	0.061
<b>Mode-Diamètre</b>	6	19.22	6.55	3.658	0.00145**
<b>Signif. codes:</b>	0 '****'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	

## Comparaison Diamètre des zones d'inhibitions (mm).

Tab: Anova des extraits/diamètre

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Extrait</b>	4	47.88	11.969	4.91	0.00987 **
<b>Diamètre</b>	3	13.98	3.41	1.15	0.0816
<b>Extrait-Diamètre</b>	3	18.88	5.713	2.314	0.00647**
<b>Signif. codes:</b>	0 '****'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	



# Pouvoir antimicrobien des extraits de l'*Atriplex halimus* contre l'agent pathogène *Vibrio cholerae*

## Antimicrobial Potency of *Atriplex halimus* Extracts against the Pathogen *Vibrio cholerae*

A. Hamdi · A. Tir Touil

© Lavoisier SAS 2022

**Résumé** Le genre bactérien *Vibrio* fait partie des bactéries ubiquistes des eaux et des zones côtières, certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux aquatiques. Parmi elles, *Vibrio cholerae* est reconnue pour son impact clinique, sanitaire et économique. La propagation de clones multirésistants aux antibiotiques est une menace pour la santé publique. Dans ce travail, notre objectif est d'évaluer le risque de contamination des eaux de différents sites de la ville de Mascara (Algérie) par vibrion cholérique, de déterminer sa résistance aux antibiotiques et de rechercher de nouveaux composés alternatifs naturels actifs issus de la plante médicinale *Atriplex halimus*, sur cet agent pathogène. Les premiers résultats révèlent la présence de *Vibrio cholerae* dans les eaux prélevées. Ces souches étaient multirésistantes à la plupart des antibiotiques surtout à l'ampicilline, à la tétracycline, à l'amoxicilline, à l'érythromycine et à la doxycycline. Les extraits aqueux et méthanolique de la plante possèdent une activité antibactérienne contre *Vibrio cholerae*. L'extrait aqueux exerce un effet inhibiteur avec une teneur de 100 à 200 µl/ml, alors que l'extrait méthanolique est actif avec des concentrations plus faibles de l'ordre de 25 à 100 µl/ml. Ces résultats encouragent la conduite à l'identification de substances bioactives, capables de restaurer l'activité de plusieurs classes d'antibiotiques synthétiques sur ces souches multirésistantes.

**Mots clés** *Vibrio cholerae* · *Atriplex halimus* · Composés phénoliques · Substance bioactive · Effet antibactérien

**Abstract** The bacterial genus *Vibrio* is one of the ubiquitous bacteria in coastal areas and waters. Among its strains *Vibrio cholerae* which is recognized for its clinical, health,

and economic impact. The spread of multi-drug resistant clones is a threat to public health. The aim of this study was to search for *Vibrio cholerae* in water and then valorize a medicinal plant, *Atriplex halimus*, by testing the antibacterial effect of these extracts on the isolates of *Vibrio cholerae* detected. Water samples from different sites in Mascara (Algeria) were taken. *Vibrio cholerae* strains were identified after isolation by biochemical testing and serotyping. Antibiotic resistance was determined by an antibiogram, and the antimicrobial potency of extracts of the medicinal plant *Atriplex halimus* was tested by the method of diffusion on agar and microdilution in liquid medium. The first results bring to light the presence of *Vibrio cholerae* in the water sampled. These strains were multiresistant to most antibiotics, especially ampicillin, tetracycline, amoxicillin, erythromycin, and doxycycline. The two extracts of the plant have antibacterial activity against *Vibrio cholerae*. The aqueous extract has an inhibitory effect with a content of 100 to 200 µg/ml while the methanolic extract displays lower concentrations of the order of 25 to 100 µg/ml. These results encourage the identification of bioactive substances capable of restoring the activity of several classes of synthetic antibiotics on these multiresistant strains.

**Keywords** *Vibrio cholerae* · *Atriplex halimus* · Phenolic compound · Bioactive substance · Antibacterial effect

## Introduction

À travers le monde, de nombreuses maladies infectieuses dont souffrent les hommes et les animaux sont d'origine hydrique. L'environnement aquatique constitue l'habitat naturel pour les bactéries du genre *Vibrio*. L'espèce la plus redoutable en santé publique est *Vibrio cholerae* [1]. Cette espèce survit à l'état libre dans les rivières, les estuaires et les eaux continentales du monde entier ou en association avec les crustacés, le phytoplancton et le poisson. *Vibrio cholerae* inclut les isolats appartenant aux sérogroupes O1 et O139 et

A. Hamdi (✉) · A. Tir Touil  
Laboratoire de bioconversion,  
génie microbiologique et sécurité sanitaire (LBGMSS),  
faculté de sciences de la nature et de la vie,  
université Mustapha-Stambouli de Mascara,  
29000 Mascara, Algérie  
e-mail : amina.hamdi@univ-mascara.dz, ayati1987@yahoo.fr

les vibrions non O1, non O139 [2]. *Vibrio cholera* non O1 et non O139 sont responsables de gastroentérites, de lésions cutanées, d'otites et de septicémie. Les septicémies à *Vibrio cholerae* non O1/non O139 sont observées chez les immunodéprimés ou chez les sujets présentant des atteintes de l'appareil digestif (contamination endogène).

En Algérie en 2018, 100 personnes ont été contaminées par le choléra, et les analyses ont confirmé la contamination des eaux par la bactérie *Vibrio cholerae*.

La pression de sélection exercée par l'usage des antibiotiques a favorisé l'émergence de souches de *Vibrio cholerae* résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays aussi bien en Afrique que dans d'autres continents [3]. Contrairement aux médicaments de synthèse, la plante médicinale n'apporte pas seulement un principe actif, mais une multitude de composés aux effets thérapeutiques complémentaires [4]. Parmi ces plantes *Atriplex halimus* est la plante autochtone la plus représentée sur le pourtour méditerranéen. En Algérie, *Atriplex halimus* est spontanée dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides. Cette plante est utilisée en pharmacopée traditionnelle pour des fins thérapeutiques, principalement pour soigner l'hyperglycémie [5].

Compte tenu de l'importance biologique et médicale de cette espèce et dans le but de sa valorisation, notre étude s'est portée sur l'effet des polyphénols de l'*Atriplex halimus* sur la bactérie pathogène *Vibrio cholerae* afin de gérer le risque de la contamination et l'émergence de germes par la recherche d'une alternative à l'antibiothérapie.

## Matériel et méthodes

### Étude bactériologique

L'étude a été menée sur les eaux de surface (station d'épuration, l'eau de l'oued, jet d'eau, eau usée) dans la ville de Mascara (Algérie). Les prélèvements, effectués en 2016–2017, viennent essentiellement de l'eau de différents sites de la région de Mascara (Tableau 1).

Tableau 1 Origine des différents prélèvements d'eau dans la région de Mascara	
Prélèvements	Origine du prélèvement
3	Station d'épuration de Mascara (avant le traitement)
3	Oued Mascara
3	Jet d'eau
3	Station thermale (Bouhanifia)
3	Eaux usées

### Recherche, isolement et identification du *Vibrio cholerae*

Comme l'isolement de cette espèce nécessite un enrichissement ; ce dernier a été réalisé dans du bouillon d'eau peptonée salée hypercalcaïne (EPSA), incubé à 37 °C pendant 24 heures (5 ml d'échantillon pour 10 ml d'EPSA) [2].

Le voile qui s'est développé à la surface de ce milieu a été ensemencé sur milieu d'isolement (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose: TCBS) et la gélose nutritive alcaline bilieuse GNAB (Sigma-Aldrich, France). Les boîtes de culture sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C. Les colonies suspectes ont été purifiées, identifiées, à partir des caractères morphologiques et à l'aide de tests classiques (microscopiques) et la galerie API 20E [6]. La détection de *Vibrio cholerae* séro-groupe O1 s'est effectuée par la recherche d'une réaction (d'agglutination) entre le germe et les antisérums polyvalents anti-O1 [7].

La gélose Hektoen et la gélose nutritive ont également été utilisées pour cette recherche.

### Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques

Un antibiogramme a été systématiquement réalisé sur les souches isolées selon la technique de diffusion en milieu gélosé [8].

Les antibiotiques testés étaient : ampicilline (10 µg), amoxicilline (30 µg), céfazoline (10 µg), amoxicilline-acide clavulanique (30 µg), tétracycline (30 µg), érythromycine (15 µg), doxycycline (30 µg), acide nalidixique (30 µg), chloramphénicol (30 µg), sulfaméthoxazole-triméthoprim (25 µg), colistine (10 µg), spiramycine (10 µg), gentamicine (10 µg). La lecture et l'interprétation ont été faites selon les critères du comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie [9]. Le contrôle de qualité a été effectué avec la souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922.

### Collecte et préparation d'extraits de plante

La collecte de l'échantillon de la plante *Atriplex halimus* a été effectuée dans la région de Bouhanifia située à 26,7 km au sud-est de la wilaya de Mascara, Algérie.

### Extrait méthanolique

Les feuilles *Atriplex halimus* (1 g) ont été réduites en poudre et extraites pendant 24 heures avec 20 ml de méthanol à température ambiante ; après la filtration par filtre millipore, le solvant a été évaporé sous vide à 50 °C [10]. L'extrait a été conservé dans des flacons opaques bien scellés à température +4 °C.

### Extrait aqueux

Une macération aqueuse a également été effectuée sur 100 g de poudre de feuilles avec 1 000 ml d'eau distillée et placée sous agitation pendant 24 heures. Après filtration sur papier Wattman, l'extrait a été séché à l'étuve à 50 °C [11].

Le rendement est déterminé par le calcul du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100 % [12].

$$\text{Rd\%} = (\text{m}_1 \times 100) / \text{m}_0$$

$\text{m}_1$  : masse en gramme de l'extrait final ;

$\text{m}_0$  : masse en gramme de la matière végétale sèche ;

Rd : rendement.

### Détermination de la teneur totale en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits méthanolique et aqueux a été déterminée par spectrométrie en utilisant le test de réactif « Folin-Ciocalteu » (Sigma-Aldrich, France). Un volume de 200 ml de l'extrait a été mélangé avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans de l'eau et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium à 7,5 % dans un tube à essai. Après 30 minutes d'agitation, l'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-vis Jenway 6405. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE/g DW) [13].

### Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été mesurée par le dosage colorimétrique au chlorure d'aluminium [14]. Une aliquote (1 ml) d'extraits ou de solutions étalon de quercétine a été ajoutée à une fiole jaugée de 10 ml contenant 4 ml d'eau distillée. Au flacon, on a ajouté 0,30 ml de  $\text{NaNO}_2$  à 5 %, après cinq minutes, on a additionné 0,3 ml d' $\text{AlCl}_3$  à 10 %. Après cinq minutes, 2 ml de NaOH 1M ont été ajoutés, et le volume a été complété jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée. La solution a été mélangée et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. La teneur totale en flavonoïdes a été exprimée en milligrammes d'équivalents quercétine (QE/g de matière végétale sèche).

### Teneur en tanins condensés

On a utilisé la méthode à la vanilline-HCl pour déterminer la teneur en tanins condensés ; pour cela, un volume de 0,1 ml des aliquotes de chaque extrait a été mélangé avec 3 ml de vanilline à 4 % et 1,5 ml de réactif HCl, le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante, et l'ab-

sorbance a été lue à 500 nm. La catéchine a été utilisée comme standard, et les résultats obtenus ont été exprimés en milligrammes d'équivalents catéchine (mg EC/g de poids sec) [15].

### Évaluation de l'activité antioxydante

La capacité de piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux (AQ) a été évaluée selon Béné et al. [12]. Dix (10) µl de chaque échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 1 990 µl de solution de DPPH (Sigma-Aldrich, France) [0,025 mg/ml de méthanol]. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre une ébauche de méthanol absolu. Les concentrations d'extraits fournissant 50 % d'inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) de DPPH ont été déterminées à partir du graphique. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif [16].

### Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique contre *Vibrio cholerae*

En premier lieu, une suspension bactérienne d'une opacité de 0,5 McFarland est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité est équivalente à une densité optique de 0,08–0,1 à 625 nm ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) [17].

### Méthode de diffusion en gélose

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. La gélose de Mueller-Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri. La surface de gélose est inondée par 1 ml de suspension bactérienne. Des disques de papier buvard de 6 mm de diamètre (BioMérieux) imbibés de 50 µl de chaque extrait ont été déposés à la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 minutes et mises à l'étuve à une température de 37 °C pendant 24 heures [18]. L'appréciation de l'efficacité des extraits a été faite selon le critère de Ponce et al. [19]. Ainsi, une substance est dite inefficace si le diamètre d'inhibition est inférieur à 8 mm, alors qu'elle est dite efficace si le diamètre est supérieur à 8 mm.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures [20].

Une microplaque de 96 puits contenant chacun 100 µl du milieu du test Muller-Hinton est utilisée auquel on rajoute une série de dilution au 1/2 de l'extrait à tester dont la

concentration de départ est de 400 mg/ml. L'inoculation est la dernière étape dans la préparation de microplaque, une suspension bactérienne d'une opacité de 0,5 McFarland équivalent de  $1 \times 10^8$  UFC/ml est ajoutée dans chaque puits de microplaque. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la CMI. Il est à noter que la gentamicine est utilisée comme un témoin positif [21].

### Analyse statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en  $x \pm \text{sem}$ . Les fréquences sont représentées en pourcentage (%).

## Résultats et discussion

### Isolement des bactéries

Les analyses bactériologiques ont permis l'identification de genres bactériens appartenant aux familles et aux pourcentages suivants : des Enterobacteriaceae 70 %, des Aeromonadaceae 10 % et des Vibrionaceae 20 % (Fig. 1).

L'identification des Vibrionaceae a permis de quantifier 40 % de *Vibrio cholerae* et 60 % des vibrions non cholériques, dont *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*.

Le test de latex réalisé montre que ces souches identifiées sont non autoagglutinables appartenant aux *Vibrio cholerae* non O1.

La présence de *Vibrio cholerae* non O1 dans l'eau d'oued, de jet d'eau, de station thermale et d'eau usée est une menace pour la santé publique, et il a été décrit que des *Vibrio cholerae* non O1 et non O139 se retrouvent dans des environne-

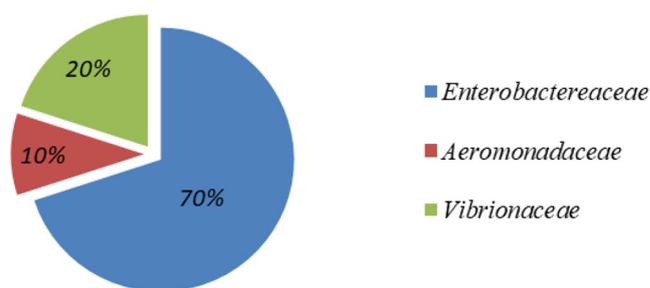


Fig. 1 Taux de bactéries isolées exprimé par famille bactérienne

ments aquatiques dans le monde entier, en particulier dans des eaux faiblement saumâtres ; et malgré qu'ils soient halophiles, ils prolifèrent aussi dans les eaux douces [22].

### Profil de sensibilité des souches

La lecture et l'interprétation ont été faites selon les critères du comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie [9]. Les résultats de l'antibiorésistance des vibrions cholériques sont regroupés sur la figure 2.

L'étude de la sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques a révélé des profils variables et très inquiétants. Ainsi, on constate une résistance à 100 % pour l'ampicilline, la tétracycline et un taux de 75 % à l'amoxicilline, érythromycine, doxycycline, amoxicilline-acide clavulanique, spiramycine et colistine. Les isolats étaient fréquemment résistants au céfazoline, acide nalidixique et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprimine avec une fréquence de 50 %. Le chloramphénicol est touché par 25 % de résistance par nos souches.

Ces différences observées peuvent être en raison du fait que les antibiotiques de première génération, y compris

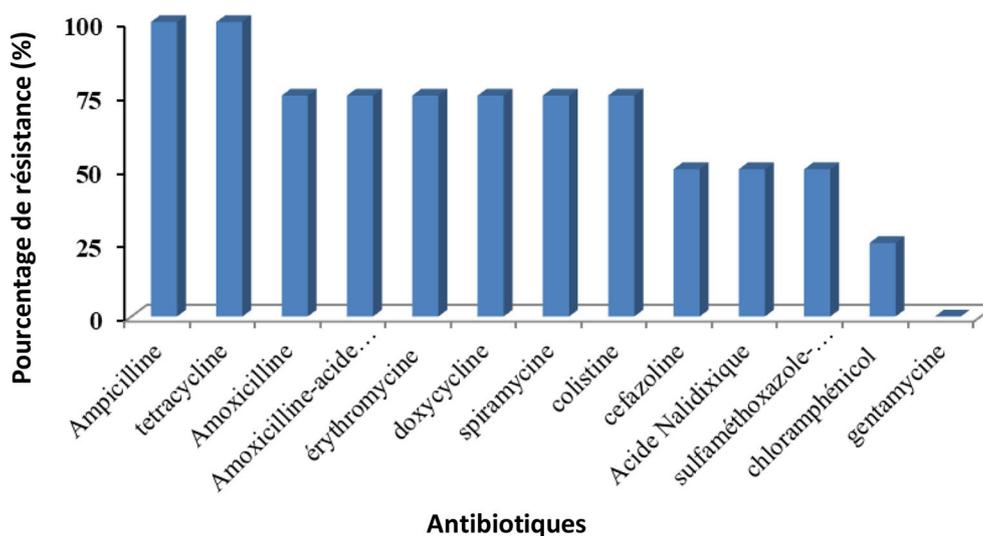


Fig. 2 Pourcentage de résistance des souches *Vibrio cholerae* aux antibiotiques

l'ampicilline, le chloramphénicol et la tétracycline ont été complètement abusés dans cet environnement. Malheureusement, actuellement, la tétracycline et la doxycycline sont les antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine et les plus prescrits en cas d'une infection par vibrion cholérique.

### Étude phytochimique des extraits de *Atriplex halimus*

#### Extrait méthanolique

L'extrait méthanolique obtenu est de couleur verte foncée, avec un aspect visqueux présentant des formes en cristaux avec un rendement de 18 %. Une étude qui a été faite par Belyagoubi-Benhammou et al. [23] indique un rendement de 24 % de la même espèce et de la même partie utilisée pour l'extraction (feuillage), mais d'une région différente.

#### Extrait aqueux

L'extrait aqueux a un rendement de 13,05 % et est de couleur marron, avec un aspect poudreux après l'évaporation de l'eau. Ces résultats sont différents de ceux de nos collaborateurs Khaldi et al. [24] qui ont décelé un rendement de 0,052 % à partir d'une plante isolée de la même région. Cette différence en rendement dépend du génotype, de la physiologie et de la technique d'extraction utilisée.

#### Teneur en polyphénols des deux extraits

Les résultats de dosage montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, flavonoïdes, tannins que l'extrait aqueux avec des teneurs de  $8,4 \pm 0,04$  ; de  $2,22 \pm 0,13$  et de  $1,27 \pm 0,14$  mg EAG (d'équivalents d'acide gallique)/g de matière sèche respectivement (Tableau 2). Ces concentrations obtenues avec les feuilles d'*Atriplex halimus*

<b>Tableau 2</b> Teneurs des extraits aqueux et méthanolique d' <i>Atriplex halimus</i> en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés			
	<b>Polyphénols<sup>a</sup></b>	<b>Flavonoïdes<sup>b</sup></b>	<b>Tannins<sup>c</sup></b>
<b>Extrait méthanolique</b>	$8,4 \pm 0,04$	$2,22 \pm 0,13$	$1,27 \pm 0,14$
<b>Extrait aqueux</b>	$6,2 \pm 0,31$	$1,16 \pm 0,52$	$0,75 \pm 0,23$

<sup>a</sup> mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche  
<sup>b</sup> mg d'équivalents de quercétine par gramme de matière sèche  
<sup>c</sup> mg d'équivalents d'acide tannique par gramme de matière sèche

différent relativement avec celles de Belyagoubi-Benhammou et al. [23] qui ont trouvé une teneur en polyphénols de l'ordre de  $10,12 \pm 2,24$  mg EAG/g.

Cette étude montre que l'extrait aqueux contient une concentration de polyphénols totaux d'environ  $6,2 \pm 0,31$  mg EAG/g ; d'après Chikhi [21], cet extrait contient une teneur d'environ  $12,47$  µg EAG/mg.

La variabilité des teneurs en polyphénols chez ces espèces végétales est due probablement à la composition phénolique des extraits, aux facteurs génotypiques, les conditions biotiques, l'étape physiologique et abiotiques (facteurs édaphiques), la nature du sol, le type du microclimat et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes [25].

Enfin, le dosage démontre que les deux extraits contiennent des composés phénoliques avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait méthanolique en raison de sa solubilité plus élevée dans le méthanol [26].

### Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'*Atriplex halimus*

L'activité antioxydante des extraits d'*Atriplex halimus* a été évaluée in vitro par la méthode de réduction de radicaux libres DPPH. Les résultats obtenus confirment que les deux extraits d'*Atriplex halimus* possèdent un potentiel antioxydant. L'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant avec,  $IC_{50} = 4,13 \pm 0,07$  mg/ml tandis que l'extrait aqueux affiche une  $IC_{50} = 5,53 \pm 0,05$  mg/ml.

Nos résultats sont compatibles avec ceux obtenus par Khaldi et al. [24]. Cette capacité de réduction des radicaux est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques.

La fraction d'acétate d'éthyle d'*Atriplex halimus* L. a une bonne aptitude à piéger le radical DPPH. Cette activité est probablement due à l'abondance des flavonols (kaempférol, quercétine...) qui représentent la classe majeure des espèces *Atriplex* [25].

### Activité antibactérienne des extraits de la plante *Atriplex halimus*

#### Déterminations des diamètres des zones d'inhibition

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et aqueux de plante contre quatre souches de *Vibrio cholerae* sont illustrés sur les figures 3, 4.

L'extrait méthanolique a révélé son efficacité sur toutes les souches quelle que soit la dose. Cependant, à partir de la dose de  $12,5$  mg/ml, cet extrait est actif sur *Vibrio cholerae* 1. La zone d'inhibition de  $10 \pm 0,50$  a été constatée à cette concentration.

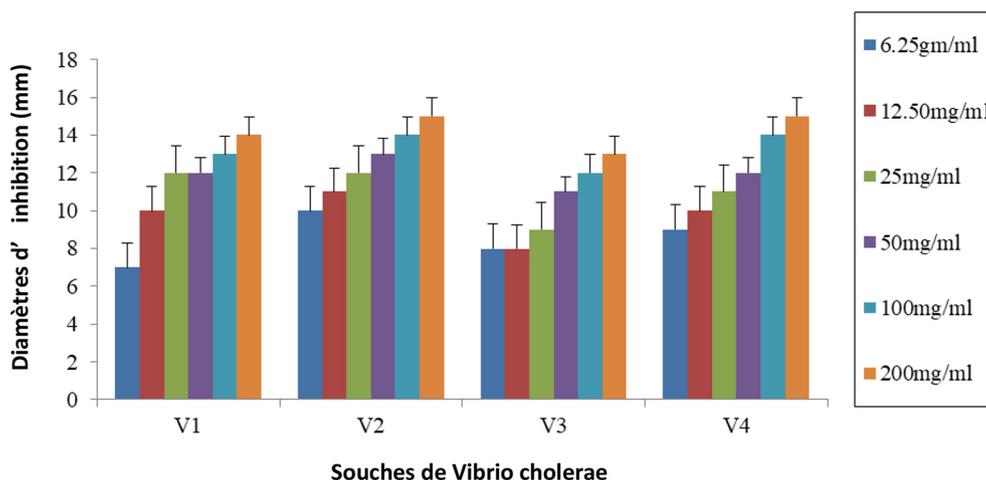


Fig. 3 Effet de l'extrait méthanolique de l'*Atriplex halimus* sur les différentes souches

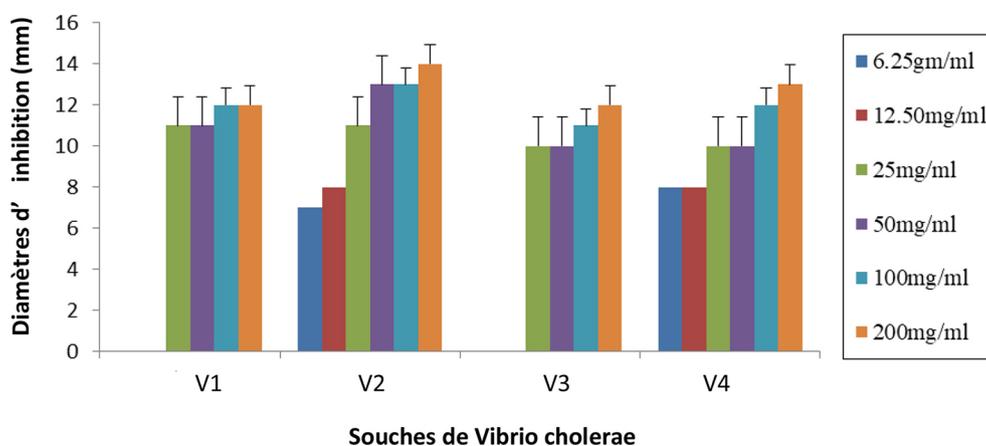


Fig. 4 Effet de l'extrait aqueux de l'*Atriplex halimus* sur les différentes souches. Les valeurs ont été exprimées en moyenne  $\pm$  ET de trois expériences indépendantes

La souche *Vibrio cholerae* 2 demeure plus sensible à cet extrait puisque elle a enregistré des zones d'inhibition comprises entre 10 et 15 mm.

De même, l'extrait aqueux a prouvé une activité antibactérienne, mais moins efficace que celle de l'extrait méthanolique puisque cette activité disparaît avec la dose de 12,5 mg/ml. Cet extrait s'est révélé puissant sur ces souches à des teneurs allant de 25 à 200 mg/ml, montrant des zones d'inhibition variantes entre 10 à 14 mm (Fig. 4).

Ces premiers résultats affirment que les deux extraits sont doués d'un effet antibactérien intéressant. En effet, Salwa et al. [27] déclarent que les extraits d'*Atriplex halimus* ont été très actifs contre *Listeria ivanovii* LI4 (pVS2) donnant une grande zone d'inhibition (40 mm). Les travaux menés dans notre laboratoire par Khaldi et al. [24] sur ces deux extraits mettent en évidence le pouvoir antimicrobien à une teneur de 600 mg/ml de l'extrait méthanolique sur des souches ; Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram

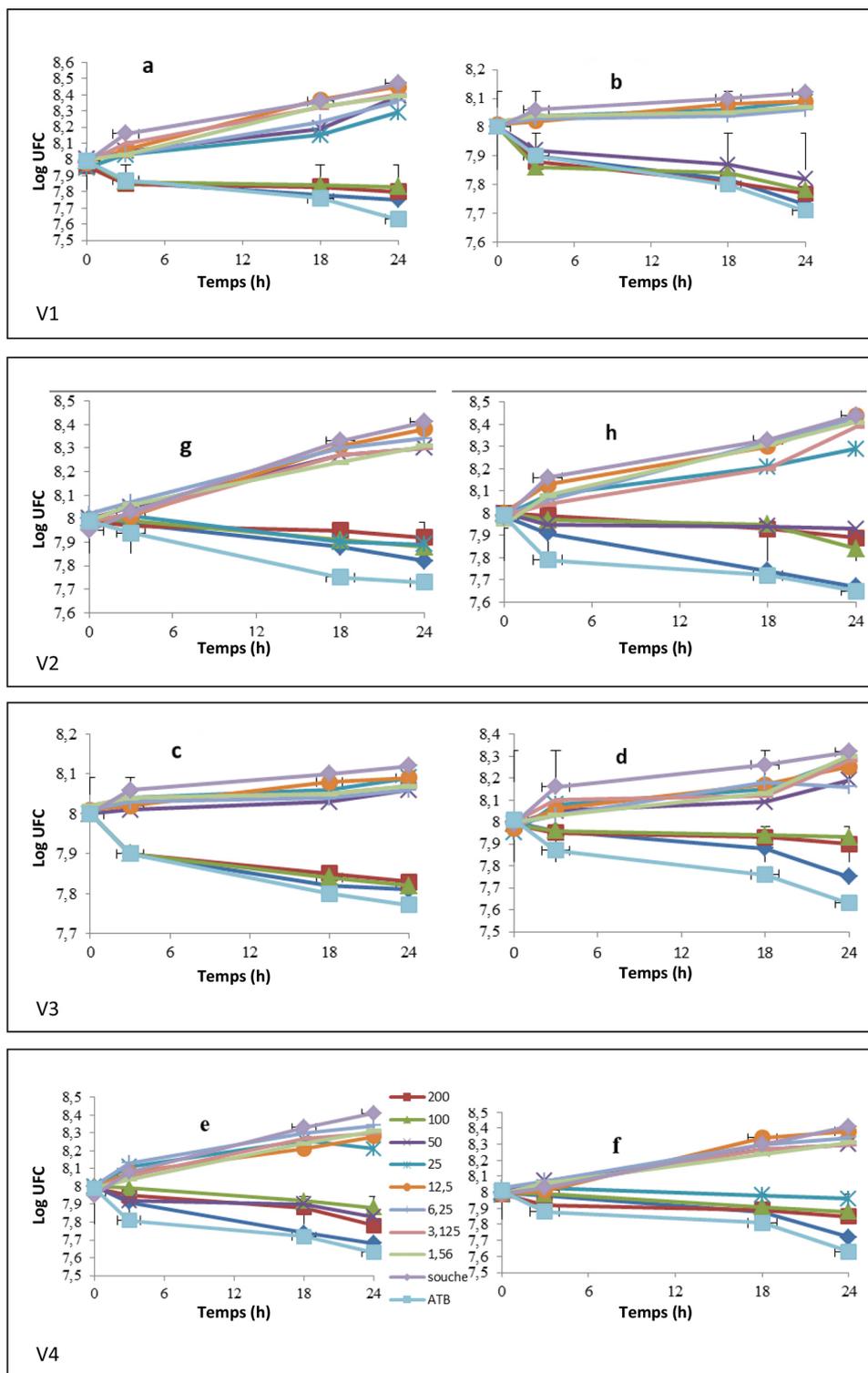
négatif (*Salmonella*, *Shigella* sp.), alors que la même concentration de l'extrait aqueux exerce un effet inhibiteur sur *Escherichia coli* avec un diamètre de 8 mm.

#### Détermination des CMI par la méthode de microdilution

Les différents extraits détiennent des activités antimicrobiennes selon leur nature, et leur effet inhibiteur est décelé par la réduction de la croissance des souches.

D'après les courbes obtenues (Fig. 5), les extraits (aqueux et méthanolique) d'*Atriplex halimus* ont montré une activité inhibitrice sur les souches testées. *Vibrio cholerae* 1 a été inhibée à une CMI de 100 mg/ml pour l'extrait aqueux et une CMI de 50 mg/ml pour l'extrait méthanolique, respectivement.

Pour la souche V3, les valeurs de CMI étaient plus élevées par rapport aux autres isolats avec 100 mg/ml pour



**Fig. 5** Cinétique de croissance des souches *Vibrio cholerae* non O1 en présence de l'extrait aqueux (à droite) et l'extrait méthanolique (à gauche) à différentes concentrations

l'extrait méthanolique et de 200 mg/ml pour l'extrait aqueux, notre étude concorde avec les résultats de Khaldi et al. [24] qui ont montré que les extraits aqueux et méthanolique ont un effet bactériostatique avec une CMI de

200 mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Clostridium*. Ces hautes concentrations expliquent et confirment la multirésistance de cette souche à divers antibiotiques.

Les deux extraits sont doués d'un pouvoir inhibiteur sur les souches *Vibrio cholerae* 2 et 4, avec une CMI allant de 25 à 200 mg/ml (Fig. 5).

*Atriplex halimus* produit des polyphénols et autres substances bioactives potentiellement utiles et ayant des propriétés médicinales [28] et qui peuvent être une alternative thérapeutique pour pallier l'émergence de la résistance aux antibiotiques.

## Conclusion

L'eau constitue un environnement favorable pour le développement de nombreux microorganismes : virus, parasites, bactéries, et parmi ces derniers le vibrion cholérique qui trouve dans le milieu aquatique un foyer convenable pour exprimer sa pathogénicité, donc ce germe nécessite la gestion de son risque sanitaire. Cette étude nous a permis d'isoler l'agent étiologique *Vibrio cholerae* dans les eaux courantes et de tester l'effet antimicrobien des biomolécules naturelles extraites à partir de plante médicinale *Atriplex halimus*. Les premiers résultats révèlent que toutes les souches isolées appartiennent au genre *Vibrio cholerae* non O1 et sont multirésistantes aux antibiotiques. Les tests d'efficacité des extraits affirment que les extraits, aqueux et méthanolique, possèdent une activité antimicrobienne sur *Vibrio cholerae*. L'ensemble de ces résultats ne constituent qu'un moyen de gestion sanitaire et une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives agissant comme de puissants antimicrobiens.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

## Références

1. Tamatcho Kweyan BP, Fotsing Kwetche PR, Njine T, et al (2009) Quelques facteurs déterminant la distribution des bactéries du genre *Vibrio* dans l'environnement aquatique de Yaoundé, Cameroun. *Cameroon J Exp Biol* 05:96–103
2. Tiekoura Konan B, Guessennd KAN, Anne Blessa JC, et al (2010) Caractérisation moléculaire des souches de *Vibrio cholerae* non O1, non O139 isolées des eaux lagunaires de Grand-Lahou (Côte-d'Ivoire). *Eur J Sci Res* 45:333–35
3. Anné BJC, Kacou-Ndouba A, Kouadio-Guessennd N, et al (2008) Profils de résistance aux antibiotiques des souches de *Vibrio cholerae* O1 d'origine humaine isolées en Côte-d'Ivoire de 1991 à 2006. *Rev Bio-Africa* 6:15–20
4. Gbohaïda V, Mèdoatinsa Seindé E, Nonviho G, et al (2015) Étude chimique et évaluation de l'influence de la granulométrie sur la cinétique d'extraction des polyphénols naturels de *Pterocarpus erinaceus* acclimaté au Bénin. *Int J Innov Appl Stud* 12:325–33
5. Nedjimi B, Guit B, Toumi M, et al (2013) *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* (Chenopodiaceae) : description, écologie et utilisations pastorales et thérapeutiques. *Fourrages* 216:333–8
6. Ndoutamia G, Bessimbaye N, Kerah-Hinzoumbé C, et al (2014) Profil de résistance des agents étiologiques des diarrhées isolés au Tchad. *Int J Biol Chem Sci* 8:2452–61
7. Quilici MLA (2011) Le diagnostic bactériologique du choléra. *Rev Fr Laboratoires* 431/b:51–65
8. NCCLS 2000 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed, NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, PA...
9. Jehl F (2014) Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie, p 31
10. Benhammou N, Ghambaza N, Benabdelkader S, et al (2013) Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *Int Food Res J* 20:2057–63
11. Binta MT (2003) Étude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* Vahl (Meliaceae). Thèse de doctorat en pharmacie faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie du Mali
12. Béné K, Fofé GBY, Gnahoué G, et al (2015) Étude ethnobotanique, activité antifongique in vitro sur *Candida albicans* et toxicité sur les cellules HFF de *Harrisonia abyssinica* Oliv. (Simaroubaceae), une plante de la pharmacopée ivoirienne. *J Appl Biosci* 94:8815–24
13. Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–58
14. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555–9
15. Price ML, Van Scoyoc S, Butler LGA (1978) Critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 26:1214–8
16. Benalia A, Bendahmane M, Ait-Hamadouche N (2015) Green tea protective effect against total alkaloids of tobacco inducing reprotoxic. Effects in male albino Wistar rats. *J Appl Environ Biol Sci* 5:08–18
17. Chaouche TM, Haddouchi F, Zerhouni K, et al (2016) Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre* Afr Sci 12:144–50
18. Celiktas OY, Hames Kocabas E, Bedir E, et al (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 100:553–9
19. Ponce AG, Fritz R, Del Alle C, et al (2003) Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36: 679–84
20. Moroh JLA, Bahi C, Dje K, et al (2008) Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) *milne-redheat* (Rubiaceae) sur la croissance in vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bull Soc R Sci Liège* 77:44–61
21. Chikhi I (2013) Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Thèse de doctorat en chimie. Spécialité: Chimie Bio-Organique & Thérapeutique, p54
22. Boore A, Iwamoto M, Mintz E, Yu P (2004) GLOBE (Global Link for Online Biomedical Expertise) Manuel — Contrôle des maladies transmissibles
23. Belyagoubi-Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova Panovska T (2009) Antioxidant activity of methanolic extracts and some

- bioactive compounds of *Atriplex halimus*. Comptes Rendus Chimie 12:1259–66
24. Khaldi A, Amamra D, Tir Touil A, et al (2015) Effects of *Atriplex halimus* on resistant bacterial strain of different origins. International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences, pp. 22–3
  25. Belhadj Tahar S, Hadj Mahammed M, Yousfi M (2015) Study of the antioxidant activity of phenolic extracts of *Atriplex halimus* L. and *Haloxylon scoparium* Pomel Northern Sahara. J Chem Pharm Res 7:258–64
  26. Bylka W, Stobiecki M, Franski R (2001) Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. Acta Physiologiae Plantarum 23:285–90
  27. Rahman SMA, Abd-Ellatif SA, Deraz SF, et al (2011) Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from Western Mediterranean coast, Egypt: natural alternatives for infectious disease treatment. Afr J Biotechnol 10:10733–43
  28. Donia ARM, Al Qasoumi S, Soliman G, Radwan A (2012) Secondary metabolites and antifertility potential of *Atriplex farinose* Forssk. Phytopharmacology 2:16–25

## Résumé

Le genre bactérien *Vibrio* fait partie des bactéries ubiquistes des eaux et des zones côtières, certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux aquatiques. Parmi elles, *Vibrio cholerae* est reconnue pour son impact clinique, sanitaire et économique. La propagation de clones multirésistants aux antibiotiques est une menace pour la santé publique. De ce fait plusieurs scientifiques sont à la recherche de nouveaux agents antimicrobiens et commencent à porter une attention particulière aux plantes médicinales puisque elles contiennent des biomolécules naturelles actives. Dans un autre contexte les probiotiques par leur effets bénéfiques sur la santé constituent une autre stratégie de lutte contre les micro-organismes néfastes. Dans ce travail, notre objectif est d'évaluer le risque de contamination des eaux de différents sites de la ville de Mascara (Algérie) par vibrion cholérique, déterminer la résistance de ces souches aux antibiotiques et gérer le risque sanitaire par la recherche de nouveaux composés alternatifs naturels actifs issus de la plante médicinale *Atriplex halimus*, et tester l'activité antibactérienne des probiotiques sur cet agent pathogène et enfin l'effet de l'association de ces deux derniers sur *Vibrio cholerae*. Les premiers résultats révèlent la présence de *Vibrio cholerae non O1* dans les eaux prélevées. Ces souches étaient multirésistantes à la plupart des antibiotiques en particulier à l'ampicilline, à la tétracycline, à l'amoxicilline, à l'érythromycine et à la doxycycline. Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et en tanins condensés sont élevées dans l'extrait méthanolique comparativement à l'extrait aqueux. Les résultats obtenus confirment que les deux extraits de l'*Atriplex halimus* possèdent un potentiel antioxydant, l'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant avec,  $IC_{50} = 4,13 \pm 0,07$  mg/ml tandis que l'extrait aqueux affiche une  $IC_{50} = 5,53 \pm 0,05$  mg/ml. Les deux extraits de la plante possèdent une activité antibactérienne contre *Vibrio cholerae*. L'extrait aqueux exerce un effet inhibiteur avec une CMI de 100 à 200  $\mu$ l/ml, alors que l'extrait méthanolique est actif avec des concentrations plus faibles de l'ordre de 25 à 100  $\mu$ l/ml. L'étude de l'effet de *Lactobacillus sp* a montré une activité inhibitrice envers *V.cholerae*. En ce qui concerne l'association entre les extraits d'*Atriplex halimus* et *Lactobacillus sp*.(probiotique), les résultats révèlent des effets inhibiteurs contre le pathogène avec des diamètres variant selon l'extrait. De ce fait, on peut déduire qu'il y a un élargissement du spectre d'activité dû à l'association contre *V.cholerae*. Ces résultats encouragent la conduite à l'identification de substances bioactives, capables de restaurer l'activité de plusieurs classes d'antibiotiques synthétiques sur ces souches multirésistantes.

**Mots clés :** *Vibrio cholerae*- *Atriplex halimus*, Composés phénoliques, *Lactobacillus sp*, effet antibactérien.

## Abstract

Some species of the bacterial genus *Vibrio* is part of the ubiquitous bacteria of waters and coastal areas are pathogenic for both humans and aquatic animals. The, *Vibrio cholerae* is being recognized for its negative clinical, health and economic impact. However, the recent spread of multidrug-resistant clones represents a real menace for the public health. Hence, many scientists are searching for new antimicrobial agents within phytochemicals produced by medicinal plants .On another hand, the probiotics, having beneficial effects on health, constitute another strategy to fight pathogenic microorganisms .our aim is not only to evaluate the risk of water contamination ,by the *Vibrio cholerae*, of different sites of the city of Mascara (Algeria) ,but also to determine its resistance to antibiotics .we will also try to find new active natural alternative compounds found in some medicinal plants , mainly , *Atriplex halimus*, then test the antibacterial activity of the probiotics on this pathogenic agent by determining the effect of the combination of these later on the *Vibrio cholerae*. The first results reveal the presence of *Vibrio cholerae non O1* in the sampled water. These strains were multi-resistant to most antibiotics, especially ampicillin, tetracycline, amoxicillin, erythromycin and doxycycline. The contents of total phenols, flavonoids and condensed tannins are higher in the methanolic extract than in the aqueous extract. The results obtained confirm that the two extracts of *Atriplex halimus* have an antioxidant potential, the methanolic extract has an antioxidant power with,  $IC_{50} = 4.13 \pm 0.07$  mg / ml while the aqueous extract reveals an  $IC_{50} = 5.53 \pm 0.05$  mg/ml. Both plant extracts possess antibacterial activity against the *Vibrio cholerae*. The aqueous extract exerts an inhibitory effect with a MIC of 100 to 200  $\mu$ l/ml, whereas the methanolic extract is active with lower concentrations of the order of 25 to 100  $\mu$ l/ml. The study of the effect of *Lactobacillus sp* showed an inhibitory activity towards *V.cholerae*. Regarding the association between the extracts of *Atriplex halimus* and *Lactobacillus sp*. (probiotic), the results reveal inhibitory effects against the pathogen with diameters varying according to the extract. thus, it can be deduced that there is a broadening of the spectrum of activity due to the association used against *V.cholerae*. These results encourage the identification of bioactive substances capable of restoring the activity of several classes of synthetic antibiotics on these multiresistant strains.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*- *Atriplex halimus*, Phenolic compounds, *Lactobacillus sp*, antibacterial effect.

## الملخص

يعتبر بكتيريا *Vibrio* من البكتيريا الموجودة في كل مكان في المياه والمناطق الساحلية ، وهناك منها بعض الأنواع تسبب الأمراض للإنسان والحيوانات المائية. من بينها *Vibrio cholerae* المعروفة بتأثيرها السلبي الإكلينيكي الصحي والاقتصادي. يشكل انتشار البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة تهديداً للصحة العامة. نتيجة لذلك ، يبحث العديد من العلماء عن عوامل جديدة مضادة للميكروبات و بدؤوا في إيلاء اهتمام خاص للنباتات الطبية لأنها تحتوي على مواد كيميائية طبيعية تسمى المواد الكيميائية النباتية. في سياق آخر ، تشكل البر وبيوتيك ، من خلال آثارها المفيدة على الصحة ، استراتيجية أخرى لمكافحة الكائنات الدقيقة الضارة. في هذا العمل ، هدفنا هو تقييم مخاطر تلوث المياه في مواقع مختلفة من مدينة معسكر (الجزائر) ببكتيريا المسببة للكوليرا *Vibrio cholerae* ، تحديد مقاومة هذه السلالات للمضادات الحيوية والبحث عن مركبات طبيعية بديلة فعالة و جديدة من النبات الطبي *Atriplex halimus* ، واختبار مدى تأثير البروبيوتيك على هذا العامل الممرض ثم تأثير الجمع بين المستخلصات النباتية و البروبيوتيك ضد هذا الميكروب.

كشفت النتائج الأولى عن وجود *Vibrio cholerae non O1* في عينات المياه. كانت هذه السلالات متعددة المقاومة لمعظم المضادات الحيوية ، وخاصة الأميسيلين والتتراسيكلين والأموكسيسيلين والإريثروميسين والدوكسيسيكليين. محتويات الفينولات الكلية والفلافونويد عالية في المستخلص الميثانولي مقارنة بالمستخلص المائي. تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلصي *Atriplex halimus* لهما إمكانات مضادة للأكسدة ، والمستخلص الميثانولي له قوة مضادة للأكسدة ،  $IC_{50} = 4.13 \pm 0.07$  mg/ml بينما المستخلص المائي  $IC_{50} = 5.53 \pm 0.05$  mg/ml.

يملك كلا المستخلصين النباتيين نشاطاً مضاداً للبكتيريا *Vibrio cholerae non O1* . اثبت المستخلص المائي تأثيراً مثبتاً باستخدام CMI من  $100 \mu\text{l/ml}$  إلى 200 ، بينما ينشط المستخلص الميثانولي بتركيزات أقل من  $25 \mu\text{l/ml}$  إلى 100. أظهرت الدراسة تأثير *Lactobacillus sp* بنشاط مثبت لهذه البكتيريا. فيما يتعلق بالارتباط بين مستخلصات *Atriplex halimus* و *Lactobacillus sp*. (بروبيوتيك) ، كشفت النتائج عن تأثيرات مثبتة ضد العامل الممرض بأقطار متفاوتة وفقاً للمستخلص. من هذا ، يمكن استنتاج أن هناك اتساعاً في النشاط بسبب الارتباط ضد بكتيريا الكوليرا. تشجع هذه النتائج على تحديد المواد النشطة بيولوجياً القادرة على استبدال عمل المضادات الحيوية الاصطناعية.

**الكلمات المفتاحية:** مركبات فينولية- تأثير مضاد للجراثيم- *Atriplex - Lactobacillus sp*

*Vibrio cholerae - halimus*