

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par

M<sup>me</sup> MEKRI Meriem

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

SPECIALITE : SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : Micro-organismes producteurs de métabolites secondaires et enzymes.

Thème

**Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudolactiques et des huiles essentielles *d'Inula viscosa* contre les germes pathogènes.**

Soutenu le 25 Mai 2016

Devant le Jury composé de :

Président :

Mr. BENALI Mohamed

(Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès)

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar

(Professeur à l'Université de Mascara)

Mr. MEDDAH Boumèdiene

(Professeur à l'Université de Mascara)

Directeur de thèse :

Mr. ABBOUNI Bouziane

(Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès)

Co- directeur de thèse :

M<sup>me</sup> DOUMANDJI Amel

(MCA à l'Université de Blida)

Année universitaire 2015/2016



**Je dédie ce travail à ...**

**Mes parents,**

*En signe de ma profonde et affectueuse reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont bien voulu consentir pour moi, que ces pages soient pour eux en témoignage de mon grand amour.*

**Mes beaux parents,**

*Qui ont su m'accompagner Jusqu'à ici de la plus belle et la plus brillante des manières qui soit.*

**Wahid,**

*Pour sa patiente exclusive, ses encouragements interminables, sa compréhension au moment de l'élaboration de ce travail.*

**Mes étoiles,**

*Abderraouf et Inès qui me donnent le gout de ne pas flancher, je vous aime.*

**Assia et Imene,**

*Qui ont été toujours à mes cotés pour me soutenir et me donner le courage.*

**Je dédie ce travail à ceux qui oeuvrent pour la science**

## REMERCEMENTS

Arrivé au terme de cette thèse, louange à **DIEU** le tout puissant de m'avoir donné la force et le courage de terminer a bon point ce travail. Si le soulagement d'être parvenue à réaliser ce travail contribue à un sentiment doux et agréable, celui-ci provient sans doute de mon plaisir d'adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont entourée efficacement tout au long de cette aventure.

Je témoigne de toute ma reconnaissance au Professeur **ABBOUNI Bouziane** et au professeur **DOUMANDJI Amel** pour m'avoir communiqué avec autant de ferveur vos connaissances dans les différents domaines de ce projet. Votre engagement en tant que directeur et co-directeur de thèse à été très enrichissant grâce a un judicieux mélange entre liberté et soutien. Je vous suis particulièrement reconnaissante pour votre grande disponibilité à discuter mes résultats .Je vous remercie vivement d'avoir suivi et orienter ce travail.

Je remercie Monsieur **BENALI Mohamed**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université de Sidi Bel Abbes, de l'honneur qu'il ma fait en acceptant spontanément la lourde tâche de présider le jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de mes meilleures considérations.

Je suis sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur le Professeur **BELABID Lakhdar**, Professeur de l'université Mustapha Stambouli de Mascara en acceptant d'examiner ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de vos recommandations et je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre intérêt.

Je remercie aussi le Professeur **MEDDAH BOUMEDIENNE** de l'université de Mascara qui m'a accordé de son temps et a accepté de participer à cette commission d'examen. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Merci également pour vos commentaires scientifiques quant à ce travail.

Je remercie également l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de SAIDAL ANTIBIOTICAL de MEDEA, de m'avoir apporté toute L'aide possible pour arriver à ses résultats satisfaisants.

Evidemment, je tiens à remercier Monsieur **AZZOUT Abdelkader** ingénieur au Parc National de Chréa pour avoir contribué à la collecte de la matière végétale pour faire avancer ce travail de thèse. Je le remercie également pour sa bonne humeur, soyez rassuré de ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Madame **BELFADEL Ouahiba** chercheure au centre de recherche des analyses physico-chimiques de Bou-Ismaïl, ainsi que Monsieur

**ABOUMUSTAPHA Mohamed** et Monsieur **Boumechhour Abdennour** ingénieurs au centre de recherche des analyses physico-chimique de Bousmail, pour leurs contributions dans l'étude physico-chimique des huiles essentielles. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et de mon entière reconnaissance.

Je ne saurais passer sous silence la contribution de **mon mari** et **mes beaux parents** pour avoir participé activement à l'avancement de mes travaux. Je leur adresse une mention spéciale pour leur constant soutien moral, leur encouragement et surtout leur patience.

Enfin, alors que cette thèse parachève ma formation scolaire, je voudrais terminer en remerciant infiniment ceux qui sont là depuis le début et qui ont posé les bases de ce que je suis aujourd'hui : **mes parents** et tous **mes enseignants**. Grand merci à vous.

## RESUME

Dans ce présent travail, l'effet de synergie des bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre Algérien et les huiles essentielles *d'Inula viscosa* a été mis en évidence.

Les trois bactéries lactiques isolées appartiennent aux espèces suivantes : *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50). L'étude de l'activité antagoniste des trois bactéries lactiques sélectionnées antagonistes vis-à-vis de *B. cereus*, *St. aureus* ATCC 25932, *E. coli* et *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 a montré que *B. cereus* et *St. aureus* ATCC 25932 se manifestent sensibles aux bactériocines des bactéries lactiques. Cependant, *E. coli* et *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 ont manifesté une résistance contre les bactéries lactiques antagonistes. La caractérisation physico-chimique des substances responsables des activités antagonistes des trois souches a montré la présence d'une substance de nature protéique, caractérisée par sa thermorésistance et une valeur de pH optimale comprise entre 4-7, ce qui suggère que cette substance inhibitrice est de type « Bactériocine ». L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne et le mode d'action des bactériocines a montré la présence d'une corrélation entre la production de la biomasse bactérienne et la sécrétion de bactériocine dans le surnageant du milieu de culture MRS liquide. Les bactériocines produites par de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50) ont manifesté un effet bactériostatique et bactéricide sur *St. aureus* ATCC 25932 respectivement.

L'extraction des huiles essentielles *d'Inula viscosa* réalisée par hydrodistillation a donné un rendement de 0.2 %. Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'huile essentielle ont permis la caractérisation des principaux composés. Les (CMI) et (CMB) sont comprises entre 0.3-1.25 mg.ml<sup>-1</sup> et 0.6-5 mg.ml<sup>-1</sup> respectivement. L'étude de la dynamique d'action des huiles essentielles *d'Inula viscosa* a montré que l'effet bactéricide des huiles essentielles dépend du temps. L'effet de synergie entre les bactériocines des bactéries sélectionnées (BL16, BL20, et BL50) et les huiles essentielles *d'Inula viscosa* étudié selon le test en damier, a affiché une synergie (FICI <0.5) pour *St. aureus* ATCC 25932, *B. cereus* et *Ps. aeruginosa* ATCC 27853. En conclusion, la combinaison des bactériocines et les huiles essentielles *d'Inula viscosa* pourrait être considérée comme une alternative prometteuse dans l'industrie alimentaire capable d'empêcher la prolifération des bactéries à Gram (-) responsable d'altération des aliments.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, Lait de chèvre, Bactériocine, Huile essentielle, *Inula viscosa*, Effet de synergie.

## ABSTRACT

In this present study, the synergistic effect of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk and essential oils of *Inula viscosa* was highlighted.

The three isolated lactic acid bacteria belong to the following species: *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) and *Enterococcus faecium* (BL50).

The study of the antagonistic activity of the three selected lactic acid bacteria against *B. cereus*, *St. aureus* ATCC 25932, *E. coli* and *Ps. Aeruginosa* ATCC 27853 showed that *B. cereus* and *St. aureus* ATCC 25932 manifest sensitive to the bacteriocins of lactic acid bacteria. However, *E. coli* and *Ps. Aeruginosa* ATCC 27853 showed resistance against bacteriocins extracted from antagonists lactic acid bacteria. The physicochemical characterization of the substances responsible for the antagonistic activities of the three strains showed the presence of a proteinaceous substance characterized by heat resistance and an optimum pH value in the range of 4-7, suggesting that inhibiting substance is Type "Bacteriocin". The monitoring study of bacterial growth kinetics and the mechanism of action of bacteriocins showed the presence of a correlation between the production of the bacterial biomass and bacteriocin secretion in the supernatant of MRS culture medium. The bacteriocins produced by *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) and *Enterococcus faecium* (BL50) have shown a bacteriostatic and bactericidal effect on *St. aureus* ATCC 25932 respectively.

The extraction of essential oils from *Inula viscosa* produced by steam distillation gave a yield of 0.2%. The chemical components of EO were also analyzed by GC/MS. oxygenated monoterprns were the major compounds. The (MIC) and (CMB) were between 0.3-1.25 mg.ml-1 mg.ml-1 and 0.6-5 respectively. The study of the dynamics of action of essential oils of *Inula viscosa* showed that the bactericidal effect of essential oils depends on time. The synergistic effect between bacteriocins of selected bacteria (BL16, BL20, and BL50) and essential oils of *Inula viscosa* studied by the checkerboard test, showed synergy (FICI <0.5) for *St. aureus* ATCC 25932, *B. cereus* and *Ps. aerugenosa* ATCC 27853.

In conclusion, the combination of bacteriocins and essential oils of *Inula viscosa* could be considered as a promising alternative in the food industry capable of preventing the proliferation of Gram (-) responsible for food spoilage.

**keywords:** lactic acid bacteria, goat's milk, bacteriocins, essential oil, *Inula viscosa*, synergetic effect.

## ملخص

في هذا العمل تمت دراسة مفعول المبيدات الجرثومية التي تنتجها بكتيريا حمض اللبن المعزولة من حليب المعز الجزائري والزيوت الأساسية المستخلصة من نبات الماغرمان.

البكتيريا المعزولة من الحليب تنتمي للأنواع التالية : *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20), *Enterococcus faecium* (BL50)

وقد أظهرت دراسة النشاط الضد بكتيري لهذه الأنواع الثلاثة ضد: *B. cereus*, *St. aureus* ATCC 25932, *E. coli* و *Ps. Aeruginosa* ATCC 27853

ان *St. aureus* ATCC 25932 و *B. cereus* حساستان عكس *E. coli* , *Ps. Aeruginosa* ATCC 27853 اللتان أظهرتا مقاومة ضد المضادات الحيوية المستخلصة من بكتيريا حمض اللبن. أظهرت دراسة الخصائص الفيزيائية الكيميائية للمضادات الحيوية المستخلصة من بكتيريا حمض اللبن وجود مادة بروتينية مقاومة للحرارة وتتميز ب امثل يتراوح ما بين 4-7 مما يشير إلى أن المادة المستخلصة هي مبيد جرثومي.

وأظهرت دراسة حركية النمو البكتيري وآلية عمل المضادات الجرثومية وجود علاقة بين إنتاج الكتلة الحيوية البكتيرية و إفراز المبيد الجرثومي و ان للمبيدات الجرثومية المستخلصة من *Pediococcus acidilactici* (BL20) و *Enterococcus faecium* (BL50) مفعول مثبط أما المستخلصة من *Streptococcus thermophilus* (BL16) فلها مفعول قاتل .

تم استخلاص الزيوت الأساسية من نبات الماغرمان عن طريق التقطير بمرود 0.2% وقد سمحت نتائج التحليل GC/MS بتوصيف المكونات الأساسية وقد تراوحت مقادير CMI و CMB ما بين 1.25-0.3 مغ/مل و 5-0.63 مغ/مل على التوالي.

أظهرت دراسة آلية عمل الزيوت الأساسية أن المفعول القاتل يعتمد على الوقت.

وقد تمت دراسة مفعول المضادات الجرثومية مع الزيوت الأساسية المستخلصة من الماغرمان حسب طريقة الشطرنج وأظهرت نتائجها مفعول جمع ضد *St. aureus* ATCC 25932, *B. cereus* و *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 في الختام يمكن النظر في جمع المبيدات الجرثومية والزيوت الأساسية المستخلصة من الماغرمان كبديل واعد في صناعة الأغذية قادرة على منع انتشار البكتيريا (-)Gram المسؤولة عن تلف المواد الغذائية.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا حمض اللبن , حليب الماعز , المبيدات الجرثومية, الزيوت الاساسية , الماغرمان, مفعول الجمع



## **LISTE DES ABREVEATION**

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ATCC** : Américan type culture collection

**ATP** : Adénosine TriPhosphate

**BL** : Bactérie Lactique

**BN** : Bouillon Nutritif

**°C** : Degré Celsius

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CMB** : Concentration Minimale bactéricide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité Optique

**EFSA** : European Food Safety Authority

**FDA** : Food and Drug Agency

**GC/MS** : Chromatographique en phase Gazeuse couplée au Spectroscopie de Masse

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**H.E** : Huile Essentielle

**IPA** : Institut Pasteur Algerie

**ISO**: International Standard Organization

**MH** : Muller Hinton

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**MRS**: de Man Rogosa and Sharp

**N** : Normal

**ppm** : partie par million

**QPS** : Qualified Presumption of Safety

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**SE** : Erreur Standard

**UFC** : Unité Formant Colonie

**µl** : microlitre

## LISTE DES FIGURES

N°	Titre	page
1	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.....	25
2	Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> .....	27
3	Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.....	32
4	Structures des résidus modifiés communs aux lantibiotiques résultant de modifications post-traductionnelles .....	45
5a	Structures de lantibiotiques de type A I.....	46
5b	Structures de lantibiotiques de type A II.....	47
6	Structures de lantibiotiques de type B.....	48
7	Structure d'un lantibiotique « two-peptides » : la lacticine 3147.....	48
8	Structure d'un lantibiotique non classé possédant deux ponts disulfure : la sublancine 168.....	49
9	Structure du lipide II.....	51
10	Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II.....	52
11	Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.....	55
12	Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous- groupes 1/2 et 3 dans la membrane plasmique de la bactérie cible.....	56
13	Structure de la mannose perméase du système phosphotransférase EI chez les bactéries à Gram positif.....	59
14	Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe II d).....	59
15	Structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles.....	62
16	Modèle de la représentation structurale des deux peptides constituant la lactococcine G et de leur orientation dans la membrane des bactéries cibles.....	63
17	Structure secondaire de l'entéroccine AS-48.....	66
18	Structures tridimensionnelles de la carnocycline A et des formes monomérique et dimérique (FD-II) de l'entéroccine AS-48.....	67
19	Représentation schématique du mode d'action de l'entéroccine AS-48.....	68

<b>20</b>	Représentation schématique de la formation de pores toroïdes par la lacticine Q...	<b>73</b>
<b>21</b>	<i>Inula viscosa</i> du Parc National de Chréa, Blida.....	<b>84</b>
<b>22</b>	Structure chimique de l'acide 1,3-dicaffeoylquinique.....	<b>87</b>
<b>23</b>	<i>Inula viscosa</i> en période de floraison.....	<b>97</b>
<b>24</b>	La méthode de diffusion sur disque.....	<b>99</b>
<b>25</b>	Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.....	<b>101</b>
<b>26</b>	Détermination de la CMB en milieu de culture solide.....	<b>103</b>
<b>27</b>	Observation macroscopique des colonies isolées sélectionnées lactiques (BL16 (A) et de BL 20 (B) avec la loupe binoculaire.....	<b>107</b>
<b>28</b>	La coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées, sélectionnées lactiques (BL20(A), de BL16 (B) et BL50 (C).....	<b>108</b>
<b>29</b>	Illustration du type fermentaire des différentes souches isolées sur milieu de culture de MRS glucosé, muni d'une cloche de Durham, Les souches témoins utilisées <i>Lactobacillus sp</i> et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	<b>109</b>
<b>30</b>	Les diamètres de la zone d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 et de <i>Bacillus cereus</i> en présence des bactéries isolées, sélectionnées antagonistes.....	<b>110</b>
<b>31</b>	L'activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées lactiques (BL16, BL20 et BL50) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932.....	<b>111</b>
<b>32</b>	Effet de la température et de la trypsine sur l'activité antagoniste des surnageant de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL16), <i>Pediococcus acidilactici</i> (BL20) et <i>Enterococcus faecium</i> (BL50) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932.....	<b>118</b>
<b>33</b>	Les diamètres des zones d'ihibition formés par le surnageant de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL16), <i>Pediococcus acidilactici</i> (BL20) et <i>Enterococcus faecium</i> (BL50) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 à diférentes températures.....	<b>118</b>
<b>34</b>	Effet du pH sur l'activité antagoniste des surnageant de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL16), <i>Pediococcus acidilactici</i> (BL20) et <i>Enterococcus faecium</i> (BL50) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932.....	<b>119</b>
<b>35</b>	Les diamètres des zones d'ihibition formés par le surnageant de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL16), <i>Pediococcus acidilactici</i> (BL20) et <i>Enterococcus faecium</i> (BL50) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 à diférents	

	pH.....	120
36	Cinétique de croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL 16), et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.....	123
37	Cinétique de croissance de <i>Pediococcus acidilactici</i> (BL 20) et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.....	123
38	Cinétique de croissance de <i>Enterococcus faecium</i> (BL 50) et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.....	124
39	L'activité antagoniste des bactériocines extraites de <i>Streptococcus thermophilus</i> (BL 16) et de <i>Pediococcus acidilactici</i> BL 20 vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932, fractionnées avec le sulfate d'ammonium.....	125
40	La cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 en présence et en absence des bactériocines extraites de (BL16, BL20 et BL50).....	127
41	Profil GC/MS de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> .....	132
42	Aromatogramme des H.E d' <i>Inula viscosa</i> vis-à-vis des bactéries pathogènes, T+ : Gentamycine, T- : eau distillée.....	133
43	Courbes de mort des cellulaires de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932, traitées avec une concentration en H.E d' <i>Inula viscosa</i> égale à la CMI sur une période de 24 heures et la courbe de croissance d'une population non traitée (témoin).....	136
44	Courbes de mort cellulaire sur 2 heures de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 traités avec une concentration en H.E d' <i>Inula viscosa</i> égale à la CMI et courbe de croissance d'une population non traitée (témoin).....	136
45	Variations au cours du temps de l'absorbance à 620 nm de suspensions de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 non traitées et traitées avec des concentrations en huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> égales à la CMI et à huit fois la CMI.....	138
46	Effet des bactériocines de BL16 , BL20 et BL 50 en combinaison avec les H.E d' <i>Inula viscosa</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 durant la conservation de la viande de mouton crue à 4°C.....	141

## LISTE DES TABLEAUX

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.....	<b>36</b>
<b>2</b>	Origine et les conditions de culture des souches témoins de l'activité antagoniste.....	<b>91</b>
<b>3</b>	Illustration des critères morphologiques, la coloration de Gram et le test de la réaction à catalase des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre.....	<b>108</b>
<b>4</b>	Présentation des caractères biochimiques des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.....	<b>113</b>
<b>5</b>	Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes (BL16, BL20 et BL50) lors de l'utilisation de la galerie API CHL50.....	<b>115</b>
<b>6</b>	les CMI des bactériocines partiellement purifiées des souches sélectionnées.	<b>126</b>
<b>7</b>	Paramètres physico-chimiques de l'H.E d' <i>Inula viscosa</i> .....	<b>129</b>
<b>8</b>	Caractérisation des composés majoritaires de l'huile essentielle.....	<b>131</b>
<b>9</b>	Présentation des activités antibactériennes des huiles essentielles extraites d' <i>Inula viscosa</i> .....	<b>132</b>
<b>10</b>	Détermination des valeurs de la CMI et CMB) des huiles essentielles extraites d' <i>Inula viscosa</i> .....	<b>134</b>
<b>11</b>	Indices (FICI) des combinaisons d'H.E d' <i>Inula viscosa</i> et des bactériocines contre les microorganismes.....	<b>139</b>

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>20</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I. Les bactéries lactiques.....	<b>23</b>
I.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	<b>23</b>
I.2. Habitat.....	<b>23</b>
I.2.1. Culture des bactéries lactiques.....	<b>23</b>
I.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement.....	<b>23</b>
I.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte.....	<b>24</b>
I.3. Les fermentations.....	<b>24</b>
I.3.1. Définition des fermentations.....	<b>24</b>
I.3.2. Les fermentations lactiques.....	<b>26</b>
I.4. Diversité et taxonomie.....	<b>27</b>
I.4.1. Origine des bactéries lactiques.....	<b>27</b>
I.4.2. Diversité des bactéries lactiques.....	<b>27</b>
I.4.3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	<b>28</b>
I.5. Utilisation des bactéries lactiques.....	<b>28</b>
I.5.1. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s).....	<b>28</b>
I.5.2. Notion de probiotique.....	<b>30</b>
a. Définition d'un probiotique.....	<b>30</b>
b. Rôle du probiotique.....	<b>31</b>
c. Applications des probiotiques.....	<b>32</b>
I.5.3 Utilisation des bactéries lactiques pour la bioconservation des aliments.....	<b>34</b>
I.5.3.1 Aspects généraux de la bioconservation La technologie des barrières.....	<b>34</b>
a. La bioconservation.....	<b>34</b>
b. Les bactéries lactiques dans la bioconservation.....	<b>35</b>
I.6. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques.....	<b>36</b>
I.6.1. Choix de microorganismes.....	<b>36</b>
a. Résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif.....	<b>37</b>
b. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales.....	<b>37</b>
c. Activités antimicrobiennes.....	<b>37</b>
d. Viabilité et stabilité des microorganismes.....	<b>38</b>
I.6.2. Définition des interactions.....	<b>38</b>

a. Interactions positives: synergie.....	38
b. Interactions négatives : inhibition.....	39
b.1. Les acides organiques.....	39
b.2. Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	40
b.3. Le dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	41
b.4. Le diacetyl (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ).....	41
b.5. La reutérine.....	41
II. Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif.....	42
II.1. Définitions et généralités.....	42
II.2. Classification.....	43
II.2.1. Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques.....	44
II.2.2. Les bactériocines de classe II.....	53
a. La classe IIa.....	53
b. La classe IIb.....	60
c. La classe IIc : les bactériocines circulaires.....	64
d. La classe IId : les bactériocines linéaires, non modifiées, non « pediocin-like ».....	68
d.1. Les différentes bactériocines de classe IId.....	69
III. Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire.....	73
III.1. Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire.....	73
III.2. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire.....	73
III.2.1. L'application de la bactériocine.....	73
III.2.2. L'application de la bactérie productrice de bactériocines.....	74
III.3. Les facteurs influençant l'activité des bactériocines.....	75
III.4. La combinaison de différentes bactériocines.....	75
III.5. La combinaison des bactériocines avec d'autres agents.....	76
III.6. La production et le conditionnement des bactériocines.....	76
III.6.1. La production des bactériocines.....	76
III.6.2. Le conditionnement des bactériocines.....	77
IV. Les huiles essentielles.....	78
IV.1. Historique.....	78
IV.2. Définition.....	78
IV.3. Biosynthèse et composition chimique.....	79
IV.4. Caractéristiques et propriétés physiques.....	80

IV.5. Activités biologiques des huiles essentielles.....	80
IV.5.1. Essais de l'activité antioxydante dans les aliments.....	80
IV.5.2. Essais de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments.....	81
IV.6. Mode d'action des huiles essentielles.....	83
V. <i>Inula Viscosa</i> .....	84
V.1. Description botanique et habitat.....	84
V.2. Description du genre <i>Inula</i> .....	85
V.3. Description de la famille des Asteraceas.....	85
V.4. Appellation.....	85
V.5. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques.....	86
V.6.1. Les molécules Extraites d' <i>Inula viscosa</i> .....	86
a. Les huiles essentielles.....	86
b. Les terpenoïdes.....	87
c. Les composés phénoliques.....	87
V.6.2. Activités biologiques d' <i>Inula viscosa</i> .....	88
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
I. Bactéries et conditions de culture.....	91
I.1. Souches cibles.....	91
I.2. les bactéries lactiques.....	91
I.2.1. Collecte des échantillons.....	91
I.2.2. Isolement des souches de bactéries lactiques.....	92
I.2.3. Identification primaire du genre.....	93
I.2.3.1. Etude morphologique.....	93
I.2.3.2. Tests biochimiques.....	93
I.2.3.2.1. Recherche de la catalase.....	93
I.2.3.2.2. Type de fermentation.....	93
I.2.4. Identification des espèces.....	93
I.2.4.1. Effet de la température sur la croissance des souches antagonistes.....	94
I.2.4.2. Effet du pH sur la croissance des souches antagonistes.....	94
I.2.4.3. Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches antagonistes.....	94
I.2.4.4. Activité protéolytique.....	94
I.2.4.5. Identification de l'espèce par galerie API 50 CHL.....	94



II. Criblage des souches antagonistes.....	95
III. Caractérisation de l'agent antagoniste.....	95
III.1. Détermination de la thermorésistance.....	95
III.2. Détermination du pH optimum.....	95
III.3. Effets des enzymes protéolytiques.....	96
III.4. Purification partielle de la bactériocine.....	96
III.5. Détermination de la CMI des bactériocines.....	96
III.6. Mode d'action de la bactériocine.....	97
IV. Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles d' <i>Inula viscosa</i> .....	97
IV.1. Matériel végétale.....	97
IV.2. Extraction des huiles essentielles.....	98
IV.3. Le rendement .....	98
IV.4. Étude analytique de l'huile essentielle.....	98
IV.4.1. Mesure des indices chimiques.....	98
IV.4.1.1. Détermination de l'indice d'acide (I.A) (NF ISO 1242 :1999 (T 75-103)).....	98
IV.4.1.2. Détermination de l'indice d'ester (I.E) (AFNOR NF T 75-104 : 1994).....	99
IV.4.2. Mesure des grandeurs physiques.....	99
IV.4.2.1. Détermination de la densité relative à 20°C (d <sub>20</sub> ).....	99
IV.4.2.2. Détermination de l'indice de réfraction (I.R) (ISO 280 : 1999 (75-112)).....	100
IV.4.3.Elaboration du profil chromatographique (NF ISO 11024-1 : 1999).....	100
IV.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des HE par la méthode de diffusion par disque.....	100
IV.6. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	102
IV.7. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide...	102
IV.8. Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne.....	104
V. Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles et des bactériocines.....	105
VI. Application pour la bioconservation des viandes.....	105
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
I. Isolement des bactéries lactiques du lait cru de chèvre.....	107
II. Purification et identification des genres.....	107
II.1. Aspect macroscopique.....	107
II.2. Aspect microscopique.....	108

II.3. Type fermentaire.....	109
III. Criblage des souches antagonistes.....	109
IV. Identification des espèces des souches sélectionnées.....	112
IV.1. Caractéristiques biochimiques.....	112
IV.2. Identification par la galerie API CHL 50.....	114
V. Caractérisation de l'agent antagoniste.....	116
V.1. Détermination de la thermorésistance.....	116
V.2. Effet des enzymes protéolytiques.....	117
V.3. Détermination du pH optimum.....	119
V.4. Etude du suivi de la cinétique de croissance des bactéries lactiques et la production des bactériocines.....	120
V.4. Purification partielle de la bactériocine.....	124
V.5. Détermination de la CMI des bactériocines partiellement purifiées.....	125
V.6. Mode d'action des bactériocines.....	126
VI. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Inula viscosa</i> .....	128
VI.1. Extraction et rendement en huile essentielle.....	128
VI.2. Étude analytique de l'huile essentielle.....	129
VI.3. Elaboration du profil chromatographique.....	129
VI.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des H.E par la méthode de diffusion par disque.....	132
VI.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB).....	134
VI.6. Dynamique d'action des huiles essentielles d' <i>Inula viscosa</i> .....	135
VI.7. Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne.....	137
VII. Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles et des bactériocines.....	138
VIII. Application des bacteriocines et des huiles essentielles.....	140
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>143</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>153</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>155</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>202</b>

# **Introduction Générale**

## INTRODUCTION GENERALE

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût et même parfois à l'apparition de substances toxiques (**Pascal, 1979; Nessrien & Mohamed, 2007**). Des quantités substantielles de produits alimentaires stockés sont attaquées par des bactéries et des moisissures dans le monde entier. En particulier dans les pays en voie de développement, les aliments stockés subissent des dommages sérieux, menant aux pertes économiques et au risque sanitaire. (**Ownagh et al., 2010**).

Afin de faire face aux problèmes d'oxydation et de contamination des denrées alimentaires, l'essor de la chimie a permis l'apparition et l'application de nouvelles substances chimiques en tant que conservateurs alimentaires synthétiques (**Moll, 1998**). Ces derniers ont été employés couramment pour l'empêchement de la détérioration des aliments (**Nakahara et al., 2003**). En raison de leur action carcinogène, tératogène et allergogène et la forte toxicité résiduelle sur les consommateurs, l'utilisation de conservateurs chimiques pour contrôler la prolifération de pathogènes dans les aliments doit être réduite. La bioconservation des aliments est une méthode biologique utilisée depuis 40 ans. Elle permettrait une conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents chimiques ou de la chaleur (**Gálvez et al., 2007, Settanni et Corsetti, 2008**).

Grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'ils synthétisent tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl (**Atrih et Foster, 2001a**), les composés antifongiques (**Corsetti et al., 1998**), les acides phényl-lactiques (**Lavermicocca et al., 2000**), les antibiotiques comme la reutéricycline (**Höltzel et al., 2000**) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (**Abee et al., 1995, Klaenhammer, 1988**).

Dans ce contexte, les bactéries lactiques et leurs métabolites utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (**Ross et al., 2002**). L'industrie agroalimentaire s'intéresse aussi à l'utilisation des bactériocines comme bioconservateurs (**Robertson et al., 2004**).

Certains bactériocines présentent des propriétés qui les placent parmi les substances sans danger pour l'homme, comme en particulier l'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif (**Gálvez et al.,**

2011). Par ailleurs, leur résistance aux variations de pH comme la lacticine 3147 et aux traitements thermiques, leur activité antimicrobienne bactéricide contre des bactéries pathogènes colonisant les produits alimentaires et l'absence de résistance croisée avec les antibiotiques en font de bons candidats pour la bioconservation des aliments (**Gálvez et al., 2007**). Leur bioconservation, est procédé par supplémentation des aliments en bactéries productrices ou directement en bactériocines.

La principale limitation fonctionnelle pour l'application des bactériocines dans les aliments est leur spectre d'activité relativement étroit. En outre, ils ne sont généralement pas actifs contre les bactéries gram-négatives. Pour surmonter ces limitations, de plus en plus de chercheurs utilisent le concept de la technologie des obstacles (hurdle technology) pour améliorer la durée de conservation et améliorer la sécurité alimentaire (**Chen et Hoover, 2003**). Il est bien documenté que les bactéries gram-négatives deviennent sensibles aux bactériocines si les propriétés de barrière de perméabilité de leur membrane externe sont affaiblies. Par exemple, des agents chélateurs tels que l'EDTA, peuvent se lier aux ports de magnésium à partir de la couche de lipopolysaccharide et rompre la membrane externe des bactéries gram-négatives, ce qui permet à la nisine d'accéder à la membrane cytoplasmique (**Abi et al., 1995**).

Les plantes aromatiques ont été aussi employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (**Wang et al., 2010**). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (**Rashid et al., 2010**). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (**Dung et al., 2008**), d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances gras, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**Gachkar et al., 2007 ; Rasooli et al., 2008**).

L'objectif de cette étude consiste à l'étude de l'effet de synergie des bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre Algérien et les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*. La stratégie de cette étude est l'isolement d'une large gamme de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes type bactériocine et leur identification. Ensuite, les activités antimicrobiennes des huiles essentielles d'*Inula viscosa* vis-à-vis les germes pathogènes sont étudiés. Dans un dernier temps, l'étude synergétique des bactériocines produite par les bactéries lactiques et les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* est envisagée.

# **Synthèse Bibliographique**

## **I. Les bactéries lactiques**

### **I.1. Généralités sur les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif qui regroupent 12 genres dont *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* et se présentent sous formes de bâtonnets ou de coques, immobiles et non sporulantes.

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, rencontrées dans différentes niches écologiques telles que le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif et possèdent une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb avec un pourcentage de G + C entre de 30-60% (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Les bactéries lactiques sont capables de fermenter les sucres tels que le glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose, lactose en acide lactique et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (**Kandler et Weiss, 1986 ; Hardie, 1986**).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes gras (Generally Regarded As Safe) (**Adams et Marteau, 1995, Aguirre et Collins, 1993**). Cependant, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

### **I.2. Habitat**

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement et vivent même en association avec des hôtes, tels que l'homme, l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal et génital des mammifères (**Klein et al., 1998**).

#### **I.2.1. Culture des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques exigent pour leur croissance des milieux riches en nutriments tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras, les sels, les vitamines (**Hammes et Hertel, 2006**). Elles sont essentiellement cultivées sur le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) contenant de sources de carbone et d'azote telles que le peptone, le glucose et le Tween 80.

#### **I.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement**

Les bactéries lactiques sont souvent présentes dans le lait et ses dérivés tels que le lait fermenté, fromage. Les différentes espèces rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») dans l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Les bactéries lactiques telles que *Lactobacillus* et *Leuconostoc* sont capables de pousser dans des milieux très acides. Outre, l'acidification du

milieu de culture utilisé permet l'inhibition de la croissance de bactéries pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* (*Li. monocytogenes*) (Gálvez *et al.*, 2011).

### I.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec une hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose avec des hôtes. Le tractus gastro intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*. Les bactéries lactiques apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales telle que *Trichomonas vaginalis*, germe pathogène responsable de la trichomonase vaginale et de *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Björkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz *et al.*, 2009 ; Falagas *et al.*, 2006, Pirota *et al.*, 2004).

## I.3. Les fermentations

### I.3.1. Définition des fermentations

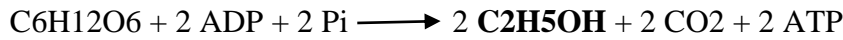
La fermentation est un processus de production de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement les glucides (un donneur d'électron), NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate (**Figure 1**). Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. La fermentation ne nécessitant pas l'absence totale d'oxygène, certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et certaines bactéries comme *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) utilisent la fermentation en présence d'oxygène pour dégrader les sucres (Prescott *et al.*, 2003, Weiss *et al.*, 1968).

Les sucres tels que le glucose, le fructose, le lactose ou le saccharose sont des substrats largement utilisés dans les fermentations, qui engendrent la production d'énergie et de métabolites secondaires tels que l'acide lactique et l'éthanol avec un dégagement de gaz (CO<sub>2</sub>). Cependant d'autres métabolites secondaires tels que l'acide butyrique et l'acétone sont produits au cours de la fermentation.

Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propionique. Les fermentations alcoolique et lactique sont largement utilisées chez les microorganismes. La fermentation alcoolique souvent utilisée pour la production de bières et de vins est réalisée principalement par les levures telles que *S. cerevisiae*, qui produise de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.



La réaction bilan de la fermentation alcoolique est :

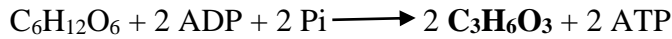


**Glucose**

**Ethanol**

La fermentation lactique est réalisée par les bactéries lactiques qui produisent de l'acide lactique et d'autres métabolites tels que l'éthanol et le CO<sub>2</sub> (**Figure 1a, 1b**).

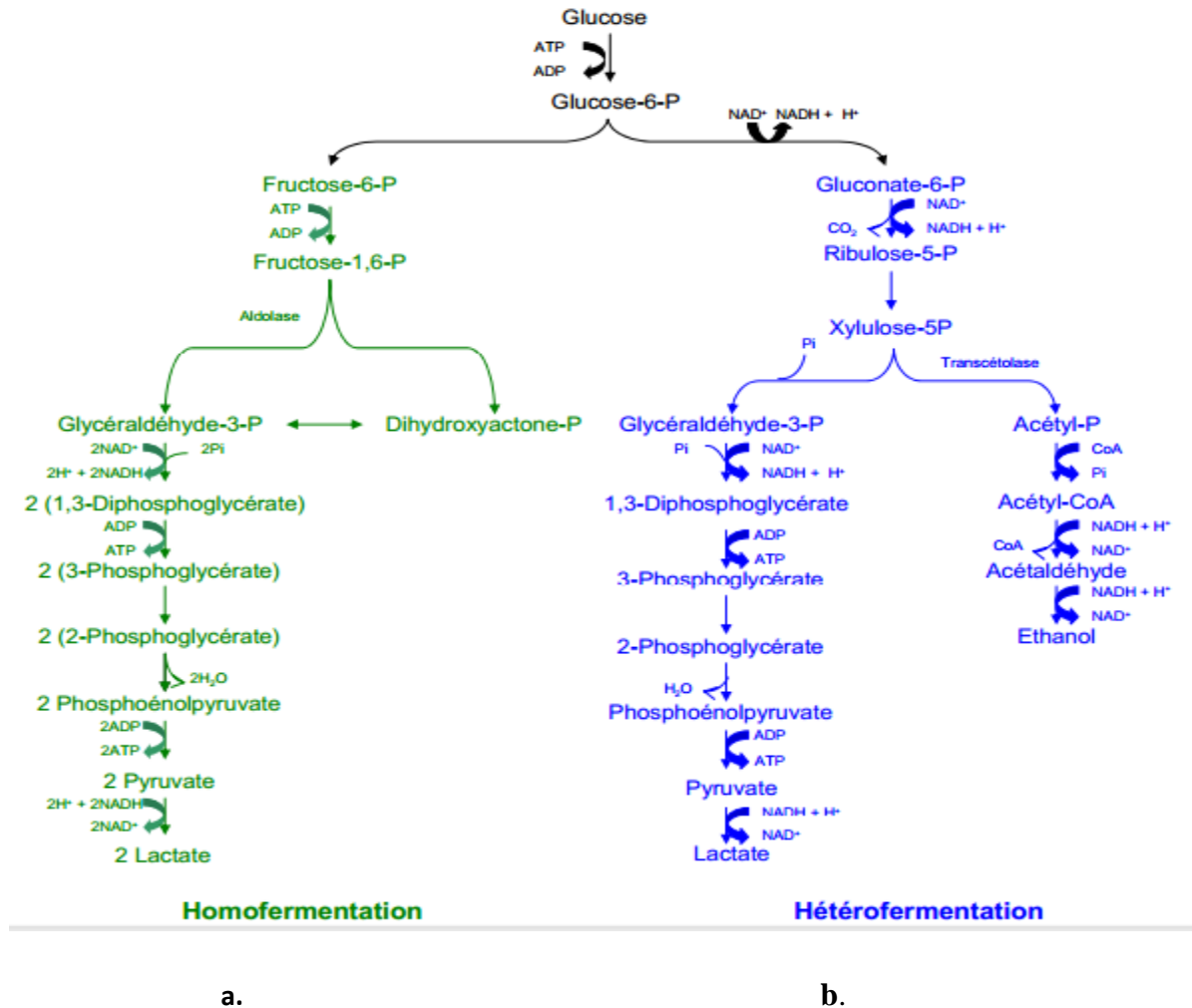
La réaction bilan de la fermentation lactique est :



**Glucose**

**Acide lactique**

Selon les microorganismes, l'isomère optique formé est soit l'acide lactique D, soit l'acide lactique L, soit la forme racémique (D + L). Par ailleurs, la proportion d'acide lactique formé augmente en fonction de l'acidité du milieu (87% à pH 5, 61% à pH 9).



**Figure 1 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

NAD<sup>+</sup>/ NADH, H<sup>+</sup> : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique.

### I.3.2. Les fermentations lactiques

Les bactéries lactiques utilisent la fermentation lactique pour la dégradation des glucides et la synthèse de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe deux voies principales de fermentation lactique. L'homofermentation regroupe la voie de la glycolyse, connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof (Parnas) (**Figure 1a**), suivie de la conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate. Elle est surtout utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*), *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus lactis* (*Lb. lactis*) et *Lb. plantarum* et de *Thermobacterium* comme *Thermobacterium yoghurti*. Au cours de cette voie de fermentation, ces bactéries dégradent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose ou le lactose. L'hétérofermentation (**Figure 1b**), communément appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) (**Kandler, 1983**), elle se produit chez des espèces appartenant à *Lactobacillus*, telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti* et à *Leuconostoc*, telles que *Leuconostoc mesenteroides* (*Ln. mesenteroides*) et *Leuconostoc pentosaceus*. Au cours de l'hétérofermentation, les bactéries dégradent les hexoses avec formation quasi stœchiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO<sub>2</sub> et d'une molécule d'éthanol (**Kandler, 1983**). Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol. Cependant, il existe d'autres types de fermentations telles que la fermentation malolactique, moins connue, qui est principalement utilisée par *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) pour la désacidification du vin. La fermentation malolactique commence après la fermentation alcoolique et consiste en la conversion de l'acide malique en acide lactique avec dégagement de CO<sub>2</sub>. Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat,... Cette hétérogénéité confère aux bactéries lactiques une diversité qui a permis de leur dresser une taxonomie.

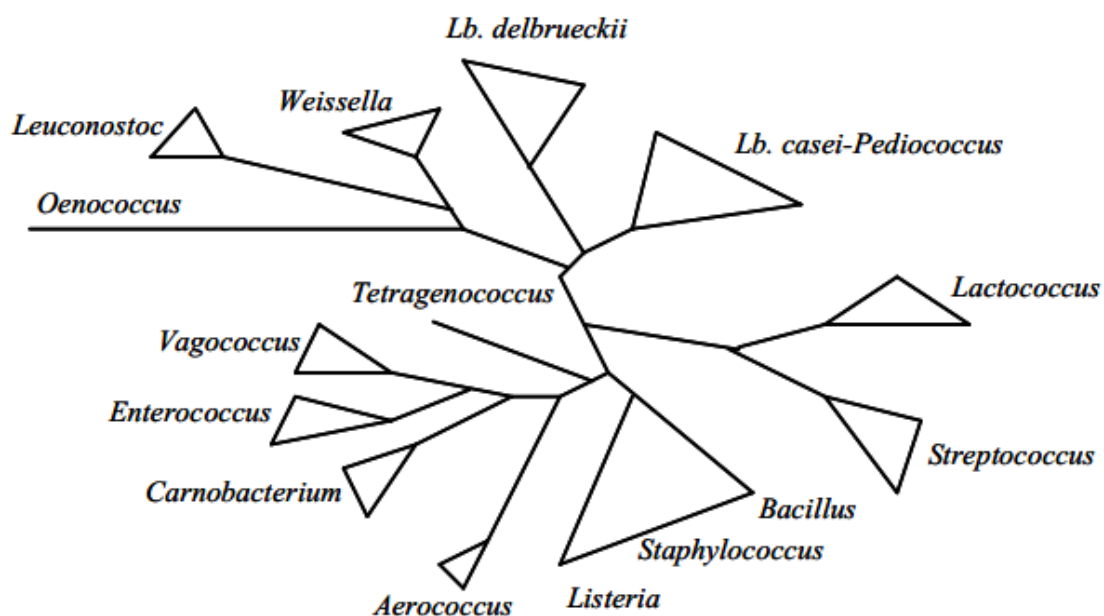
## I.4. Diversité et taxonomie

### I.4.1. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont rencontrées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni *et al.*, 2001). Des études antérieures sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni *et al.*, 2001). D'autres études ont montré que certaines bactéries lactiques, comme *Lb. lactis*, sont en voie d'acquiescer une chaîne respiratoire (Duwat *et al.*, 2001).

### I.4.2. Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*,... (Figure 2). L'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une évolution taxonomique (Vandamme *et al.*, 1996).



**Figure 2 :** Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

### I.4.3. Taxonomie des bactéries lactiques

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme défini par (Colwell, 1970) et se réfère à une taxonomie basée sur un ensemble de critères qui regroupent les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées, basées sur la composition de la paroi cellulaire bactérienne : la nature des acides gras tels que l'acide lactobacillique (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) (de Ambrosini *et al.*, 1996 ; Gilarová *et al.*, 1994). Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (McLeod *et al.*, 2008).

Le groupe I rassemble les bactéries homofermentaire et comporte majoritairement des *Lactobacillus*.

Le groupe II rassemble les bactéries l'hétérofermentaire et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

Le groupe III rassemble quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* et présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofermentation ou l'hétérofermentation (McLeod *et al.*, 2008).

Les études d'hybridations ADN ÷ ADN, les structures et les séquences d'ARN ribosomiaux sont devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et la classification taxonomique des bactéries lactiques (Mäkelä *et al.*, 1992, Stanckebrandt et Teuber, 1988, Vandamme *et al.*, 1996, Woese *et al.*, 1990).

Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei* *Pediococcus* (Rodrigues *et al.*, 2002).

## I.5. Utilisation des bactéries lactiques

### I.5.1. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s)

C'est durant le XIXe siècle, au Danemark, que la première boisson fermentée fabriquée à partir d'un mélange de souches bactériennes isolées à partir de lait cru a été commercialisée. Le concept de ferment a ensuite évolué au début du XXe siècle après l'identification de quelques souches impliquées dans la fermentation. Grâce à leur propriétés d'acidification et de production de polysaccharides, les bactéries lactiques ont souvent été

utilisées en co-cultures pour initier et améliorer la fermentation de nombreux aliments tels que la choucroute, les saucisses ou les olives vertes (**Settanni et Corsetti, 2008**). Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bio-conservateur est leur production de molécules antimicrobiennes (**Settanni et Corsetti, 2008**).

La production de bactériocine *in situ* offre de nombreux avantages comparée à la production de bactériocine *ex situ*, comme le coût ou l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente augmentant ainsi l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes. La diminution du coût de préparation pourrait généraliser la pratique permettant aux pays en voie de développement où la sécurité alimentaire est le plus souvent compromise de bénéficier de ces applications (**Holzappel, 2002**). D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dues à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini.

Grâce à leur activité protéolytique et leur acidification importante du milieu, les bactéries productrices de bactériocines sont utilisées soit pour initier la fermentation soit pour jouer le rôle d'adjuvant en présence d'une bactérie initiatrice de fermentation (**Gálvez et al., 2011**). Aussi, la croissance de la co-culture ne doit avoir aucun effet sur les propriétés physicochimiques et organoleptiques du produit fini, ni interférer avec celles-ci. De plus, la bactérie productrice doit être prédominante et capable de produire sa bactériocine à n'importe quelle température, pendant la réfrigération ou à température ambiante, afin d'empêcher la croissance et la prolifération des bactéries pathogènes dans les aliments (**Holzappel et al., 1995**).

Les bactéries productrices sont aussi utilisées comme cultures bio-protectrices dans les aliments non fermentés dans la mesure où elles ne présentent aucun effet négatif sur le produit fini. De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les viandes, les poissons ou les légumes. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées. La souche bactérienne productrice de la nisine, *Lc. lactis*, est souvent utilisée lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le Camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *Li. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) (**Gálvez et al., 2008**). Les souches productrices de nisine Z sont aussi utilisées dans l'imitation des gaz produits lors de

la fermentation, souvent dus à la surcroissance de spores de *Clostridium* et en particulier de *Cl. tyrobutyricum*. La souche productrice de lacticine 3147 est aussi utilisée dans le contrôle de la prolifération de *Li. monocytogenes* dans les aliments tels que les fromages fabriqués à partir du lait écrémé (O'Sullivan *et al.*, 2006).

L'optimisation de l'arôme du fromage pourrait être réalisée par l'utilisation des souches productrices de lacticine 3147 en combinaison avec des cultures bactériennes productrices d'aminotransférases et de décarboxylases (Fernández de Palencia *et al.*, 2004).

Du fait de leur robustesse, leur présence naturelle dans différents produits alimentaires et leur production de nombreuses bactériocines, *Enterococcus faecalis* (*En. faecalis*) et *En. faecium* productrices de bactériocines sont largement utilisées comme adjuvants (Franz *et al.*, 2007). Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni et Anastasiadou, 2009). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA-1/ AcH s'est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande par diminution des populations de *Li. monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodríguez *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques utilisées dans la production de produits alimentaires contribuent ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet l'inhibition de la prolifération des microorganismes pathogènes et l'assurance d'une bonne conservation des aliments (Pot, 2008).

## I.5.2. Notion de probiotique

### a. Définition d'un probiotique

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO, 2001). Les produits laitiers consommés depuis des centaines d'années ont toujours été considérés comme source de santé et de longévité, dans le Caucase et au Moyen-Orient. Ce n'est qu'à partir du XXe siècle, qu'Elie Metchnikoff évoqua une éventuelle relation entre la longévité de certaines populations et leur consommation de grandes quantités de lait fermenté. Plus tard, l'isolement de deux espèces bactériennes *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*) et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* auxquelles les bienfaits de « longue vie » ont été attribués. En 1954, le terme « probiotique » est introduit pour la première fois dans la littérature par Ferdinand Vergin (Vergin, 1954). Pour l'optimisation de leur croissance, les

bactéries probiotiques nécessitent la présence de fibres composées d'oligosaccharides comme l'inuline extraite de la racine de chicorée, appelées prébiotiques.

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Str. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Str. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes utilisées dans la fabrication de yaourt. La dénomination, yaourt ou yoghourt se réfère à un lait fermenté obtenu, selon des usages loyaux et constants, lors du développement des bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites *Str. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* qui doivent êtreensemencées et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins  $10^7$  bactéries/gr. D'autre part, les levures comme *S. boulardii* et *S. cerevisiae*, communément utilisées dans la fabrication du pain, de la bière et du kéfir, sont également reconnues pour leurs propriétés probiotiques. *S. boulardii* a été isolée pour la première fois à partir de fruits de litchis et de mangoustans par le scientifique Français **Henri Boulard en 1923**. Plus tard, *S. boulardii* permet la restauration de la flore du gros intestin après des diarrhées causées par *Vibrio cholerae* (**Dias et al., 1995**).

## b. Rôle du probiotique

Les bactéries probiotiques doivent être capables de moduler la réponse immunitaire (**Schiffirin et al., 1997**) et produire des substances antimicrobiennes. Ils doivent être aussi capables de survivre et de proliférer dans les milieux naturels occupés par des bactéries pathogènes.

Plusieurs études ont attribué de nombreuses propriétés aux bactéries probiotiques dans lesquels ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque (**Gourbeyre et al., 2011, Kalliomaki et al., 2001, Savilahti et al., 2008**). La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux bactéries probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité (**Grangette et al., 2002, Klaenhammer et Kullen, 1999**). Les lymphocytes sont présents à l'état isolé au niveau de l'épithélium et dans la *lamina propria*, mais ils sont aussi regroupés dans la sous-muqueuse dans des structures spécialisées appelées les plaques de Peyer. A chaque site de l'intestin, de l'épithélium, de la *lamina propria* et de la plaque de Peyer, les types et fonctions des lymphocytes diffèrent. Dans l'épithélium, il s'agit majoritairement de lymphocytes T CD8 et dans la *lamina propria* et à l'état isolé, il s'agit de populations mélangées comprenant des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes B. Les plaques de Peyer contiennent un cœur de lymphocytes B et un petit

nombre de lymphocytes T CD4. Aussi, les bactéries probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes natural killer, premières défense contre un agent exogène (Donnet-Hughes *et al.*, 1999, Haller *et al.*, 2002). Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » (Logan et Katzman, 2005, Penner et Fedorak, 2005b). L'« effet barrière », empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses (Kaila *et al.*, 1992).

### c. Applications des probiotiques

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les bactéries probiotiques sont parfois utilisées comme compléments dans des produits tels que les yaourts et dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis* (bifidus actif) utilisée dans la production des yaourts Activia® (Figure 3.a) (Picard *et al.*, 2005) ou *Lb. casei* retrouvé dans Actimel® (Figure 3.b).



a. Activia® Danone.

[www.activia.co.id/img3/bottles.jpg](http://www.activia.co.id/img3/bottles.jpg)

[media.telemarket.fr/.../00055875/00055875-t0.jpg](http://media.telemarket.fr/.../00055875/00055875-t0.jpg)



b. Actimel® Danone.

**Figure 3 :** Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.

En Europe, toute nouvelle souche introduite dans l'alimentation doit faire l'objet d'une évaluation selon le système QPS (Qualified Presumption of Safety, présomption de sécurité qualifiée) depuis novembre 2007. Le système européen QPS, est un outil d'évaluation de la



sécurité des cultures de microorganismes utilisé par l'EFSA (European Food Safety Authority) pour lesquelles une demande d'autorisation de mise sur le marché est nécessaire. Ce système s'appuie sur 4 piliers: l'identité précise de la souche (criblage), l'état des connaissances, le type d'application (matrice) et le rapport innocuité/ pathogénie (**EFFCA, 2011**).

Les probiotiques ne sont pas seulement utilisés comme additifs alimentaires mais aussi en association avec des traitements médicaux conventionnels dans quelques préparations pharmaceutiques du fait de leur reconnaissance en tant que GRAS aux Etats-Unis (**Saarela et al., 2000, Salminen et al., 1998**). L'agence Américaine du Médicament (Food and Drug Agency, FDA), estime que les produits contenant des probiotiques ne font pas objet des mêmes recommandations que les médicaments. En revanche, l'Agence Européenne des Médicaments (European Medicines Evaluation Agency, EMEA) n'a toujours pas autorisé cette utilisation.

- Traitement des diarrhées

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autres dans le lait fermenté Bio-K+®, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (**Kelleher et al., 2002, Penner et al., 2005a**). Des études ont montré l'action préventive des probiotiques lors de diarrhées infectieuses causées par un traitement antibiotique, par radiothérapie et après des rechutes de colite ulcéreuse (**Plummer et al., 2004, Reid et al., 2003b**). La colite ulcéreuse est une maladie inflammatoire chronique du côlon et du rectum de nature auto-immune qui s'apparente à la maladie de Crohn.

- Traitements gastriques

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (**Reid et al., 2003b**). Les probiotiques réduisent la récurrence des infections causées par des pathogènes au niveau des muqueuses. Des traitements probiotiques contre des vaginites causées par *T. vaginalis* présentant des résultats prometteurs sont toujours en cours d'études cliniques (**Jeavons, 2003, Pirotta et al., 2004, Reid et Bruce, 2003a, Sobel, 1999**).

### **I.5.3 Utilisation des bactéries lactiques pour la bioconservation des aliments**

#### **I.5.3.1 Aspects généraux de la bioconservation La technologie des barrières**

Certaines techniques de conservation suffisent à préserver un aliment pour une durée satisfaisante. Dans le cas de la pasteurisation ou de l'appertisation, la majorité des flores présentes sur le produit est détruite par la chaleur, et le conditionnement hermétique empêche une recontamination ultérieure. De même le salage ou le séchage modifient de façon radicale le produit (taux de sel supérieur à 15-20%, aw très basse...), ce qui retarde la croissance des flores susceptibles d'entraîner une altération. Cependant ces techniques s'accompagnent d'une transformation importante du produit. De plus en plus de consommateurs préfèrent aujourd'hui des produits moins fortement préservés, ce qui permet de retrouver des qualités organoleptiques plus proches du produit d'origine.

Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières (**Leistner, 2000**). Il s'agit d'appliquer successivement plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes. Chacun n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisant en soi pour obtenir une bonne conservation. C'est alors la succession de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée ; diminution : réfrigération), l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate...) et la biopréservation (**Leistner, 2000**).

##### **a. La bioconservation**

La bioconservation consiste à l'inoculation dans un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit (**Rodgers, 2001**). La biopréservation fait partie des techniques qui peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières. Elle peut être utilisée sur des produits légèrement préservés, sur des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou sur des produits ayant subis une cuisson rapide.

Différents mécanismes entrent en jeu lors de la bioconservation. L'inhibition des flores indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de bactériocines (**Helander et al., 1997**). L'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de bioconservation (**Stiles, 1996**) se

rapproche d'avantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

**b. Les bactéries lactiques dans la bioconservation**

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (**Tableau 1**). Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches (**Stiles, 1996 et Guinane et al., 2005**).

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines. Les acides organiques sont les produits directs de la fermentation. Leur libération dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne. Ainsi **Wilson et al. (2005)** ont démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* dans des produits végétaux par une souche de *Lb. plantarum* était due à la production d'acide lactique. Cependant dans certains produits une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est produit en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes telles que la NADH oxydase, la pyruvate oxydase ou la superoxyde dismutase. Les bactéries lactiques ne disposant pas de catalase pour le réduire, ce composé s'accumule dans le milieu. Son potentiel d'oxydation élevé lui permet d'altérer les acides nucléiques et d'oxyder les lipides, entraînant une inhibition des microorganismes. Le diacétyl est un produit de la fermentation du citrate. Il est produit principalement par les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action aromatique est recherchée dans certains fromages tels que le Gouda. Son activité inhibitrice est en général peu importante, due à la faible quantité présente dans les produits.

**Tableau 1** : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Espèce	Produit d'origine	Activité inhibitrice	Type d'activité	Essais	Référence
<i>Ec. Faecium</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Alvarado <i>et al.</i> , 2005
<i>Lc. Lactis</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	Fromage	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i>	Germes de luzerne	<i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> et <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
	Produits végétaux prêts à consommer		Acidification et bactériocine	In vitro	Wilderdyke <i>et al.</i> , 2004
<i>Ln.</i> <i>mesenteroides</i>	Salade de chou, maquereaux fumés	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. casei</i>	Légumes	<i>Ae. hydrophilia</i>	Bactériocine	Salade composée	Vescovo <i>et al.</i> , 1997
<i>Lb. plantarum</i>	Choucroute Bière	<i>Listeria</i> <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Acidification Bactériocine	Radis Salami	Wilson <i>et al.</i> , 2005 Todorov <i>et al.</i> , 2007
<i>Lb. sakei</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochotrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004
<i>Lb. curvatus</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> ,	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004

Les bactériocines sont des composés protéiques antimicrobiens produits par les bactéries. Ce sont des petits peptides qui sont produits par le ribosome sous forme mature ou sous forme d'un précurseur nécessitant une étape de maturation enzymatique ultérieure. On les distingue des antibiotiques, qui sont eux des produits secondaires du métabolisme assemblés par des réactions multi-enzymatiques. L'effet bactéricide est généralement dû à la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule cible (**Jack *et al.*, 1995**). Leur spectre d'action est souvent limité aux bactéries de genres ou d'espèces proches de celui de la bactérie productrice, mais leur efficacité contre les bactéries pathogènes susceptibles de se retrouver dans les aliments est incontestable, par exemple contre *L. monocytogenes* (**Jack *et al.*, 1996**) ou *Clostridium botulinum* (**Rodgers *et al.*, 2003**).

## I.6. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques

### I.6.1. Choix de microorganismes

La première étape essentielle réside dans le choix du microorganisme. Celui-ci doit être exempt de toute pathogénicité (**Suvarna et Boby, 2005**). Toutefois ce genre de risque est pratiquement inexistant du fait que les microorganismes probiotiques ont trouvé de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire (ces souches sont incorporées dans les yaourts, les dérivés lactés, les boissons, les fromages, les desserts réfrigérés et même dans le

lait non fermenté) et ne présentent aucun danger pour l'homme, les animaux ou l'environnement (**Bouziane et al., 2004**).

#### **a. Résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif :**

Les bactéries probiotiques, pour être efficaces doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il est nécessaire qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif (**Chafai, 2006**) : Elles doivent résister aux enzymes présents dans la cavité buccale dont la principale est le lysozyme, au pH acide de l'estomac dû à la présence de forte concentration d'acide chlorhydrique, aux sucs pancréatiques et aux concentrations de bile et de mucus présentes dans l'intestin grêle (**Malinen, 2002**). Les résultats des essais indiquent que diverses souches de lactobacilles, notamment : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* I 23 et *Lactobacillus fermentum* I 24 peuvent montrer une tolérance aux sucs gastriques et biliaires (**Pereira et al., 2003**).

#### **b. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales**

Il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, ceux-ci facilitant une bonne colonisation du tube digestif par les probiotique (**Crittenden et al., 2005**). D'après les travaux de **Sanna et al., (2002)**, les lactobacilles (*Lb. crispatus* ST1, A33 et 134mi , *Lb. reuteri* CT7 et *Lb. gasseri* CT5) présentent une meilleure affinité aux cellules du jabot **Gusils et al., (2002)**, ont confirmé l'existence de différents déterminants de surface qui pourraient être impliqués dans les interactions entre des lactobacilles (*Lb. animalis*, *Lb. fermentum* et *Lb. fermentum* subsp. *cellobiosus*) et les cellules épithéliales intestinales (**Chafai, 2006**).

#### **c. Activités antimicrobiennes**

Les probiotiques doivent essentiellement jouer deux rôles au niveau du tractus digestif : améliorer la digestibilité de la ration alimentaire et maintenir de bonnes conditions sanitaires. L'activité antimicrobienne des lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* et *Lb. brevis*) a été prouvé in vitro contre deux pathogènes entériques : *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (**El-Nagger, 2004**). L'effet inhibiteur de *Lactobacillus fermentum* sur *Escherichia coli*, sur *Salmonella typhimurium* et sur *Staphylococcus aureus* avait été démontré (**Reque et al., 2000**).

Il est donc important que ces bactéries soient capables d'inhiber le développement des germes indésirables :

- Soit par la production de substances antagonistes de types bactériocines ou autre tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (**Lima et al., 2005**).

- Soit en empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale; selon **Hariharan et al., (2004)** l'emploi des probiotiques réduit la colonisation du tractus digestif par *Campylobacter jejuni* (**Chafai, 2006**).

#### **d. Viabilité et stabilité des microorganismes**

C'est l'une des critères de sélection la plus importante. Pour que les probiotiques puissent exprimer ces diverses potentialités, il faut qu'elles atteignent leur site d'activité digestive dans les conditions les plus propices à leur efficacité, ce qui suppose qu'elles soient vivantes : cela induit des contraintes technologiques sévères au cours de concentration et de la dessiccation pour une présentation en poudre, et interdit le passage dans une presse à granuler (qui porte la température au-dessus de 80°C) à moins de faire appel à des enrobages thermorésistants (**Klaenhammer, 2000**).

#### **I.6.2. Définition des interactions**

Les produits laitiers, en général, comme le lait fermenté ou les fromages sont les supports d'écosystèmes dont la composition évolue avec le temps. Les facteurs de sélection qui gouvernent cette évolution sont générés par l'activité métabolique des micro-organismes eux-mêmes. Ceux-ci, à un instant donné, créent à la fois les conditions de leur déclin et celles favorisant l'installation d'autres groupes microbiens :

- ❖ par la production de substances inhibitrices ou au contraire celles de facteurs de croissance.
- ❖ par la modification de facteurs physico-chimiques, dont le pH (**Leyral et Vierling, 2007**).

##### **a. Interactions positives: synergie**

Le meilleur exemple en est l'effet coopératif entre deux espèces ; *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* qui jouent un rôle dans l'élaboration du yaourt. Au début de la fermentation, c'est le Streptocoque qui se développe le plus rapidement et produit différents acides (acide pyruvique, acide formique, acide lactique), l'adénine et une très faible quantité de CO<sub>2</sub>. L'abaissement progressif du pH et la présence de ces substances vont petit à petit activer la croissance du Lactobacille qui est plus acidophile. Celui-ci a une activité protéolytique plus importante que celle du Streptocoque et la libération d'acides aminés (valine, histidine, glycine, acide glutamique, leucine, méthionine) et des peptides vont les stimuler. Malheureusement pour le Streptocoque, ces interactions positives ne durent pas très

longtemps, dans la mesure où il est beaucoup plus sensible au pH que le Lactobacille, sa croissance va être progressivement inhibée par l'acidité du milieu (**Branger et al., 2007**).

## **b. Interactions négatives : inhibition**

L'un des avantages présentés par les bactéries lactiques est l'augmentation de la durée de conservation d'un produit alimentaire par la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

### **b.1. Les acides organiques**

La production de l'acide lactique et de l'acide acétique et la diminution consécutive du pH sont de loin les plus importants facteurs d'inhibition (**Adams et Moss, 2008**).

Dans une étude menée par **Jinet et al., (1996)**, il est suggéré que l'inhibition de *Lactobacillus* à l'égard des souches pathogènes de *Salmonella* et de *Escherichia coli* est due à la production d'acides organiques par *Lactobacillus*. **Gudkow (1987) et Taylor, (2005)** ont montrés qu'*Escherichia coli* est inhibé par l'acide lactique à pH de 5.1. L'inhibition d'*E. coli* par *Lactobacillus* est due à un fort effet bactéricide de l'acide lactique à pH bas. On admet que la première cause d'inhibition par l'acide lactique des bactéries lactiques est la réduction du pH qui inhibe la croissance de nombreuses bactéries, dont les organismes pathogènes Gram négatifs.

**Fayol et Messaoudi (2005)** ont rapporté qu'une complète inhibition de la croissance de *Salmonella Typhimurium* cultivée en association avec différentes souches de *Lactobacillus* (*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*), due principalement à une diminution du pH. Outre, une inhibition par le biais du pH de l'adhésion de *Salmonella* à l'intestin est observée. **Lehto et Salminen (1997)** ont suggéré que les effets anti-adhésion des *Lactobacilles* sur *Salmonella Typhimurium* sont dus principalement à la réduction du pH (**Pelaez et Martin-Orue, 2009**).

Bien que le pH soit un facteur d'inhibition, les basses valeurs du pH gouvernent l'activité des acides organiques car les formes indissociées sont plus bactéricides (**Acheson, 1999**). Les travaux de **Holtzapfel et al. (1998)** ont montré que l'acide indissocié est aisément diffusé à travers la paroi cellulaire bactérienne, réduisant ainsi le niveau du pH intracellulaire et ralentissant les activités métaboliques des bactéries (**Taylor, 2005**).

(**Salminen et al., (1998)**) ont rapporté que les acides faibles ont une activité antimicrobienne très importante à des valeurs de pH basse à un pH neutre. En effet, la force d'un acide dépend de son degré de dissociation. Quand le pH est égal au pKa d'un acide, la moitié

de l'acide est dissocié, si le pH augmente, la dissociation augmente de même (**Adams et Moss, 2008**). A cause de sa constante de dissociation plus élevée, l'acide acétique montre une inhibition plus forte que l'acide lactique à une concentration molaire et à une valeur de pH donnés (**Taylor, 2005**). La forte activité antimicrobienne des acides acétique et propionique s'explique en partie par le pKa élevé, comparativement à l'acide lactique, respectivement 4,87, 4,75 et 3,08. A pH 4, par exemple, seulement 11% de l'acide lactique est indissocié contre 85% d'acide acétique et 92% d'acide propionique. En présence d'un mélange d'acides, l'acide lactique contribue principalement à la réduction du pH, alors que les acides propionique et acétique devenus indissociés et jouent leur rôle antimicrobiens (**Salminen et al., 1998**).

Cependant, l'acide lactique a le pouvoir de perméabiliser les membranes, de ce fait, il renforce l'activité des autres substances antimicrobiennes. (**Salminen et al., 1998**).

**Alakoni et al., (2000)** ont étudié l'effet de l'acide lactique sur la perméabilité de la membrane externe de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* in vitro et ont observés qu'il perméabilise la membrane externe des Gram négatifs et ainsi, agit comme amplificateur des effets d'autres substances anti-microbiennes (**Pelaez et Martin-Orue, 2009**).

## **b.2. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

En présence d'oxygène, les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène par l'action des oxydases, de flavoprotéines et du superoxyde dismutase. Comme les bactéries lactiques ne produisent pas de catalase à cause de l'absence d'une source hème, cela permet l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, mais pas dans des quantités significatives. Son effet bactéricide a été attribué à son pouvoir oxydant (**Salminen et al., 1998**).

En effet, **Juven et Pierson (1996)** ont démontrés son effet cytotoxique sur la cellule bactérienne qui génère des espèces hautement toxiques, telles que le radical hydroxyle qui est à la base de l'oxydation des biomolécules (**Taylor, 2005**).

De plus certaines réactions produisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> font disparaître l'oxygène, créant un environnement anaérobie non favorable à certains micro-organismes (**Salminen et al., 1998**).

Le peroxyde d'hydrogène confère aux bactéries lactiques un avantage de compétition puisqu'il a été démontré qu'elles sont moins sensibles que d'autres bactéries à ses effets, mais l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène reste généralement faible (**Adams et Moss, 2008**). Le peroxyde d'hydrogène est une substance de préservation utilisée depuis longtemps pour le lait cru, dans des conditions où il peut être difficile de refroidir le lait rapidement. La



concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requise est de 300 à 800 ppm (**Guizani, 2007**).

### **b.3. Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)**

Le dioxyde de carbone est formé principalement durant la fermentation des hexoses par le processus d'hétérofermentation. Sa formation crée un environnement anaérobie et lui-même a une activité anti-microbienne, le mécanisme de cette activité est mal connu, mais il a été suggéré que les décarboxylations enzymatiques étaient inhibées et que l'accumulation du dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique causait un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (**Salminen et al., 1998**).

### **b.4. Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)**

Le diacétyl (2,3-butanédione) a été identifié par Van Niel et al, composant aromatique du beurre, il est produit par les espèces et les souches du genre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, de même que d'autres micro-organismes (**Jay, 1982**). Le diacétyl a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatives et les Gram positives non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (**El Ziney et al., 1998**). Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm et supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

### **b.5. La reutérine**

La reutérine est sécrétée spécifiquement par *Lactobacillus reuteri*, elle a un spectre très large d'activité anti-microbiennes (antibactérien, antifongique, antiviral) (**Axelsson et al., 1989**). Il a été démontré qu'elle inhibait les sous-unités de liaison des substrats de la ribonucléotide-réductase et de ce fait, qu'elle interférait avec la synthèse de l'ADN (**Salminen et al., 1998**). La reutérine est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol (**El Ziney et al., 1998**). La reutérine s'accumule dans le microorganisme producteur à haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (**Vollenweider, 2004**).

## II. Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif

### II.1. Définitions et généralités

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (**Klaenhammer, 1988**). Dans cette thèse, nous parlerons des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (**Jack et al., 1995, Tagg et al., 1976**) et plus particulièrement celles provenant des bactéries lactiques (**Cotter et al., 2005b**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (**Heng et al., 2007a**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (**Belguesmia et al., 2011, Cotter et al., 2005b**). Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (**Morency et al., 2001**). L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (**Cotter et al., 2005b**).

La biosynthèse des bactériocines implique le plus souvent des groupes de gènes ou clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription. Il existe une appellation génotypique spécifique pour chaque bactériocine, par exemple *nis* pour le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la nisine et *mrs* pour celui impliqué dans la biosynthèse de la mersacidine. Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines sont formés de trois groupes de gènes. Un groupe renfermant un gène de structure codant le peptide précurseur et un gène d'immunité codant une protéine d'immunité impliquée dans la protection de la souche productrice contre sa propre bactériocine. Le deuxième groupe de gènes rassemble un gène codant un transporteur ABC impliqué dans le transport de la bactériocine vers le milieu extracellulaire ainsi que chez quelques bactériocines, un gène codant une protéine accessoire impliquée dans le transport de la bactériocine, et enfin un gène codant une protéine de fonction inconnue. Le dernier groupe de gènes est impliqué dans la

régulation de la biosynthèse des bactériocines et regroupe un gène codant une protéine kinase membranaire et un gène codant un activateur transcriptionnel. Le transport du peptide précurseur sollicite un transporteur ABC chez de nombreuses bactéries productrices. D'autres souches productrices utilisent le système Sec pour l'export de leur peptide précurseur (**Dridier et al., 2006, Maqueda et al., 2008**). Une fois synthétisé, le peptide précurseur subit un clivage par une protéase spécifique chez quelques bactériocines, afin d'acquies sa forme mature qui est exportée vers le milieu extracellulaire via le transporteur ABC. La biosynthèse des bactériocines n'est pas constitutive et se trouve régulée soit par la bactériocine elle-même qui joue le rôle de phéromone soit par une phéromone spécifique (**Diñu et al., 2009**).

Une fois dans le milieu extracellulaire, la bactériocine interagit avec la membrane plasmique de la bactérie cible via des interactions électrostatiques. L'effet antimicrobien se traduit généralement par la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible. Différents mécanismes d'action sont connus, le plus courant consiste en une perméabilisation de la membrane de la bactérie cible. Ce phénomène se traduit par la formation de pores transitoires ou permanents provoquant la dissipation d'ATP, d'ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,... et la mort de la bactérie cible (**Nissen-Meyer et al., 2009, Nissen-Meyer et al., 2010**). La bactériocine peut également interagir soit directement avec la membrane plasmique ou bien via un récepteur membranaire comme c'est le cas de la nisine avec le lipide II et les bactériocines « pediocin-like » avec le système mannose perméase phosphotransférase impliqué dans le transport des sucres (**Hécharad et Sahl, 2002**). D'autres effets antimicrobiens moins fréquents sont également rencontrés comme l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques et de la synthèse de la paroi bactérienne, comme c'est le cas de la mersacidine (**Brogden, 2005**).

## II.2. Classification

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export et leur mécanisme d'action. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile et plusieurs classifications ont été successivement proposées. Se basant sur la structure primaire, le mode d'action et la structure tridimensionnelle, **Klaenhammer et al. (Klaenhammer, 1993)** ont proposé deux classes principales de bactériocines, la classe I regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement, les lantibiotiques et la classe II renfermant les bactériocines non modifiées et thermo-résistantes appelées « pediocin-like ». Ces deux classes ont été par la suite subdivisées en sous-classes. Se rajoute à ces deux classes une troisième classe (la

classe III) qui renferme les bactériolysines, des protéines thermosensibles pourvues d'activité enzymatique (**Klaenhammer, 1988**) ainsi qu'une dernière classe (la classe IV) regroupant des complexes protéiques liés à une partie lipidique ou glucidique (**Heng et al., 2007a**). Cette dernière classe n'étant pas clairement caractérisée, de nombreux auteurs ont préféré l'écarter de la classification. Considérant la classe IV comme inappropriée (**Diep et Nes, 2002**) ont proposé une classification des bactériocines en accord avec celle de Klaenhammer, mais sans la classe IV. Ensuite, différents auteurs ont proposé une nouvelle classe IV, composée des bactériocines circulaires et dans le même temps, soit l'abandon de la classe III (**Nes et al., 2007**), soit son maintien dans la classification (**Heng et al., 2007a**).

Parallèlement, **Cotter et al., (2005b)** ont proposé une classification regroupant les bactériocines en deux groupes principaux. La classe I, ou lantibiotiques, est subdivisée en plusieurs groupes en fonction de leur structure primaire tandis que la classe II est subdivisée en quatre sous-groupes : les classes IIa des « pediocin-like », IIb des « two-peptides », IIc des bactériocines circulaires et IId des bactériocines non modifiées et non « pediocin-like ». Pourvues d'activité enzymatique, les bactériocines de classes III sont plutôt considérées comme des enzymes que comme des peptides antimicrobiens et sont par conséquent écartées de la classification (**Cotter et al., 2005b**). En fait, seules les classes I et II sont communément admises par la plupart des auteurs. Cependant on peut remarquer que les bactériocines circulaires peuvent constituer soit la classe IV (**Heng et al., 2007a, Nes et al., 2007**), soit la classe IIc (**Cotter et al., 2005b, Nissen-Meyer et al., 2009**). **Zouhir** et ses collaborateurs (**2010**) ont proposé une nouvelle classification basée uniquement sur la structure primaire et propose 12 groupes distincts de bactériocines.

Dans notre étude, nous nous baserons sur le modèle de classification de Paul Cotter (**Cotter et al., 2005b**), qui propose deux classes principales de bactériocines : **la classe I** appelée la classe des lantibiotiques regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement et **la classe II** qui regroupe les bactériocines non modifiées. Les sous-divisions de chaque classe de bactériocines seront développées plus loin.

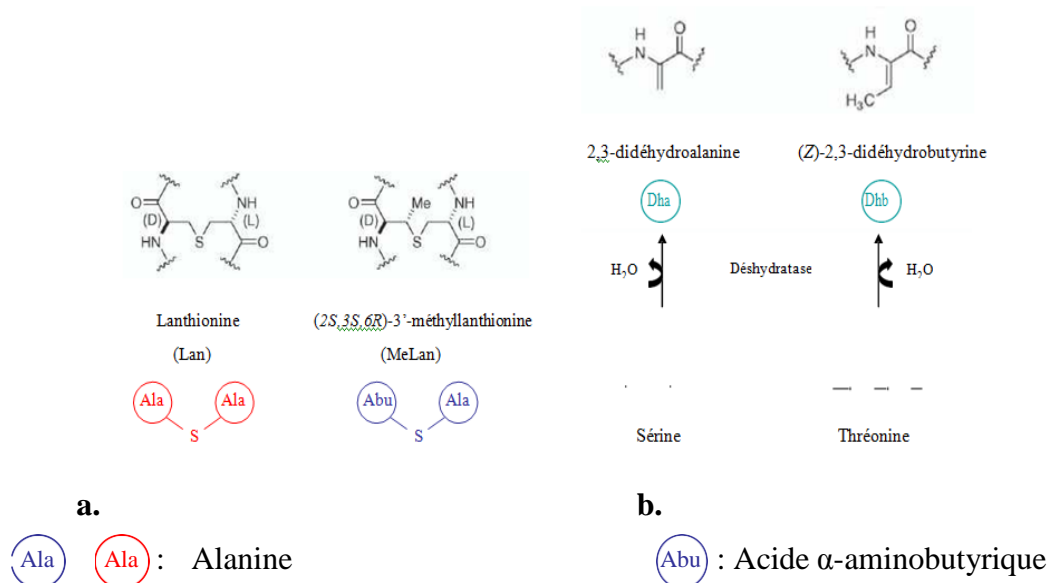
### II.2.1. Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et subissant des modifications post-traductionnelles importantes. Ils se distinguent des autres bactériocines, par la présence de résidus lanthionine et 3'-méthyllanthionine (**Figure 4a**). La lanthionine et la 3'-méthyllanthionine, résultent respectivement de la formation d'un pont thioéther entre une cystéine libre et un acide aminé déshydraté, la didéhydroalanine (Dha) et

la 2,3-didéhydrobutyrine (Dhb). La Dha et la Dhb sont respectivement formées par déshydratation de la sérine et de la thréonine (**Figure 4.b**).

Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (**Cotter et al., 2005b**).

Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est, le plus souvent, présent sous forme de groupes de gènes (clusters). Ces clusters ont été largement étudiés ces dernières années (**Bierbaum et Sahl, 2009, Jack et al., 1998, Sahl et Bierbaum, 1998**).



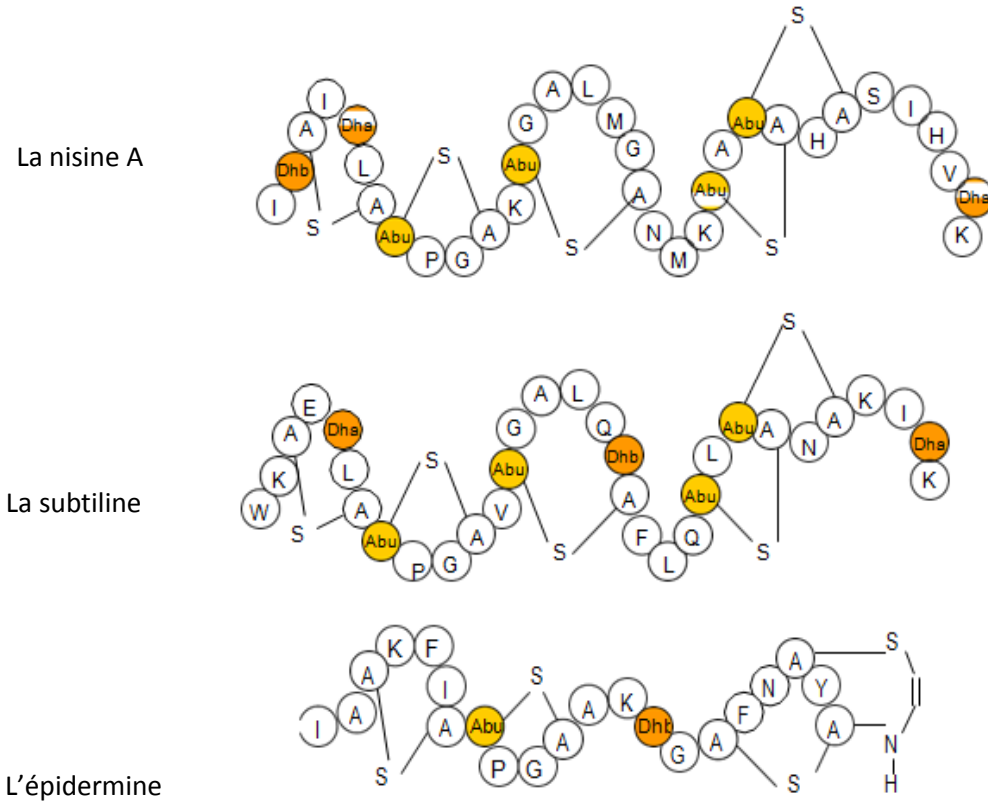
**Figure 4 :** Structures des résidus modifiés communs aux lantibiotiques résultant de modifications post-traductionnelles.

### a. Structure

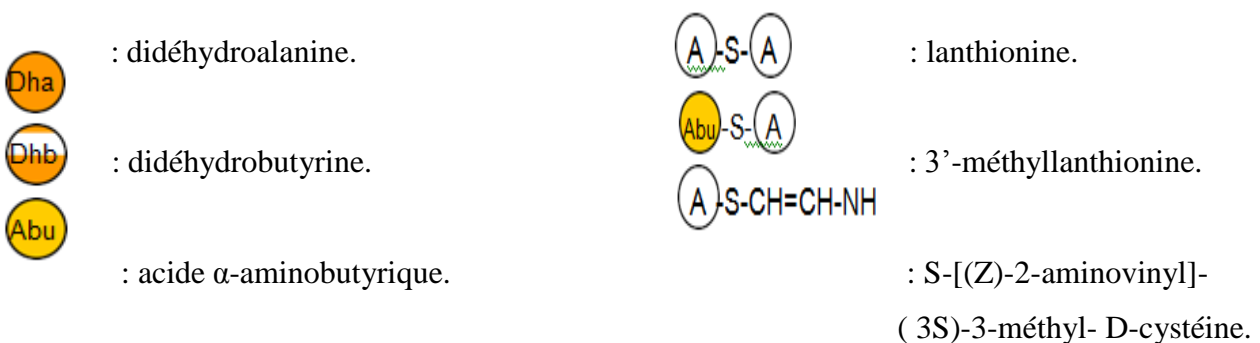
Les lantibiotiques sont classés en fonction de leur structure par Günther Jung (**Jung, 1991**) en deux types principaux : le type A (ex. nisine) et le type B (ex. mersacidine) (**Jung, 1991**). Depuis, d'autres groupes de lantibiotiques comme le type C ont été proposés (**Booth et al., 1996, Heng et al., 2007a**).

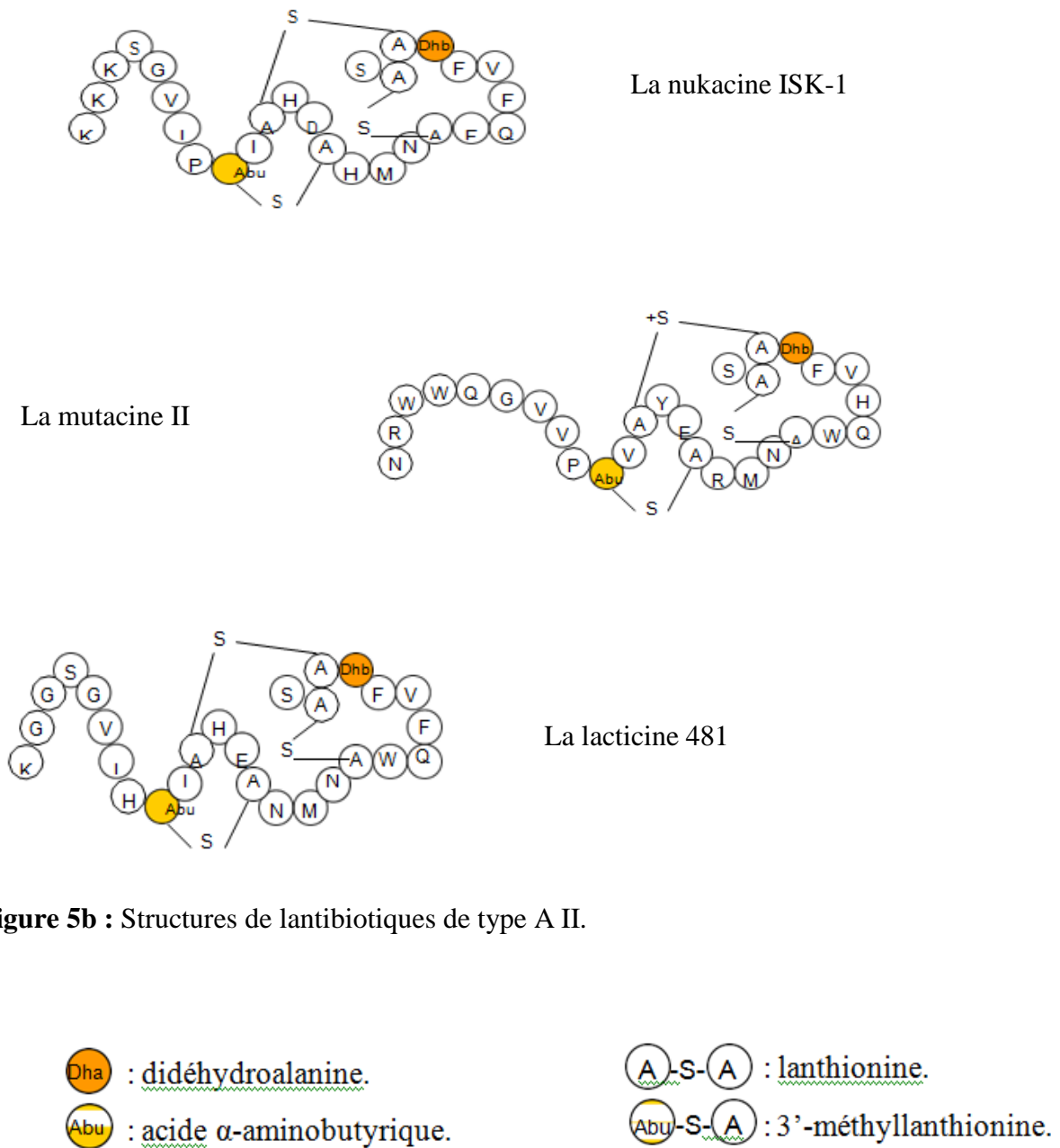
Le type A regroupe les lantibiotiques linéaires chargés positivement (**Twomey et al., 2002**). Les déshydratases catalysent la formation de la lantionine et de la 3'-méthyllantionine par la formation de ponts thioéthers. Cette réaction résulte de la réaction d'un groupement thiol de la cystéine avec un acide aminé insaturé la Dha ou la Dhb. Le type A est subdivisé en deux sous-groupes, A I et A II (**Figure 5**), en fonction de leur structure. Les lantibiotiques du groupe A I (nisine, subtiline, épidermine) possèdent uniquement une structure linéaire.

Le groupe A II (nukacine ISK-1, mutacine II, lacticine 481) regroupe les antibiotiques formés d'une région *N*-terminale linéaire et d'une région *C*-terminale globulaire renfermant les ponts lanthionines (Nagao *et al.*, 2006). Contrairement aux antibiotiques du groupe A I, ceux du groupe A II sollicitent une enzyme unique (LanM) pour catalyser la formation de la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine (Nagao *et al.*, 2006).



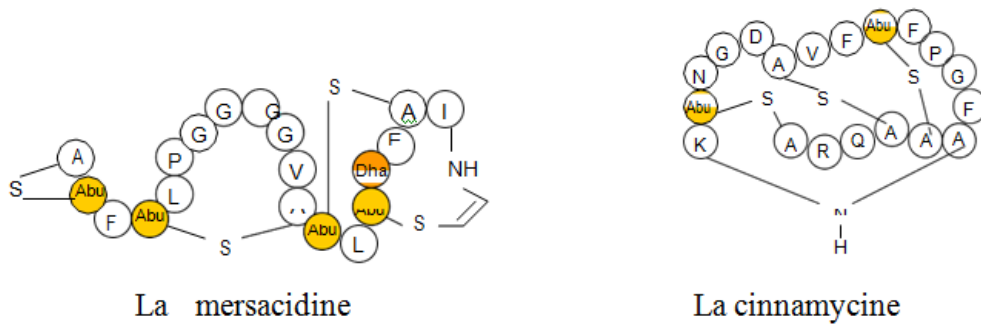
**Figure 5 a :** Structures de antibiotiques de type A I.



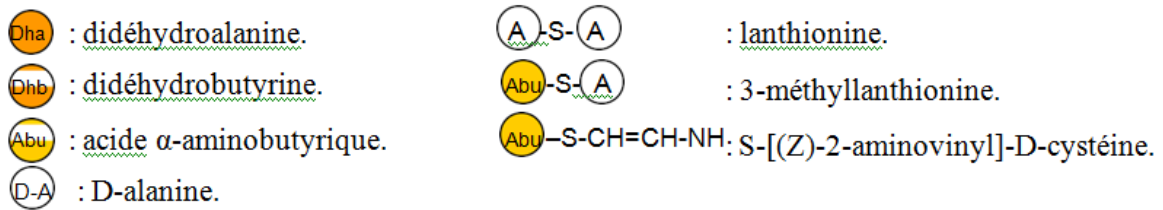


**Figure 5b** : Structures de lantibiotiques de type A II.

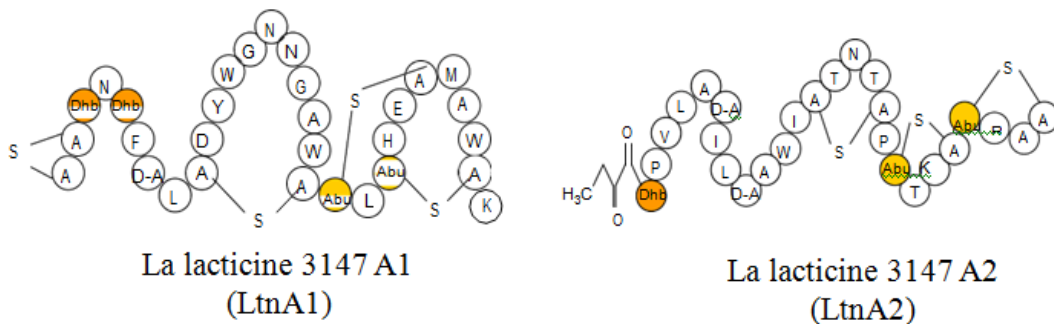
Les lantibiotiques de type B (**Figure 6**) ont une structure globulaire (**Twomey *et al.*, 2002**). Pour former la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine, le groupement thiol d'une cystéine réagit respectivement avec la Dha et la Dhb conférant une structure globulaire et compacte à ce groupe de lantibiotiques.



**Figure 6 :** Structures de lantibiotiques de type B.



Un troisième groupe renferme les lantibiotiques « two-peptides » formés de deux peptides agissant en synergie. Ce groupe renferme des lantibiotiques comme la lacticine 3147 (Martin *et al.*, 2004) (Figure 7), la staphylococcine C55 (Navaratna *et al.*, 1999) et l'haloduracine (Cooper *et al.*, 2008).



**Figure 7 :** Structure d'un lantibiotique « two-peptides » : la lacticine 3147.

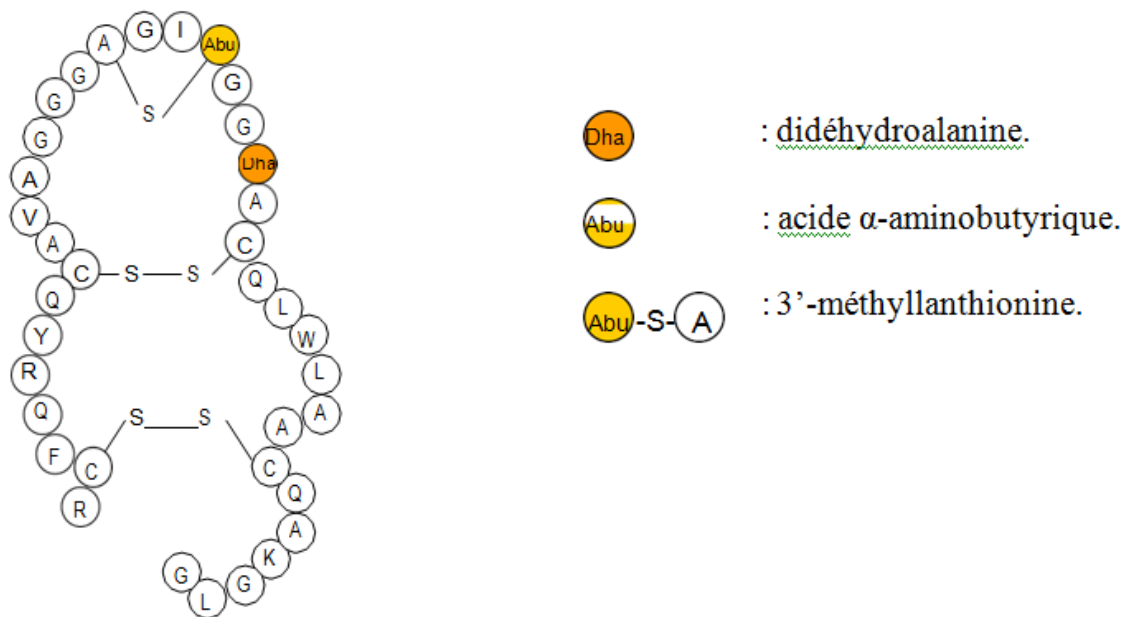


Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'action synergique de ces lantibiotiques est encore mal connu à ce jour (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009, McAuliffe *et al.*, 2000).

De nombreux nouveaux lantibiotiques ont plus récemment été découverts comme la nisine Q (Zendo *et al.*, 2003), la streptine (Wescombe et Tagg, 2003), la bovisine (Xiao *et al.*, 2004)



et la thermophiline 1277 (**Kabuki *et al.*, 2009**) qui est avec la sublancine 168 (**Dorenbos *et al.*, 2002, Paik *et al.*, 1998**) (**Figure 8**) un lantibiotique possédant un pont disulfure.



**Figure 8** : Structure d'un lantibiotique non classé possédant deux ponts disulfure : la sublancine 168.

### Mode d'action

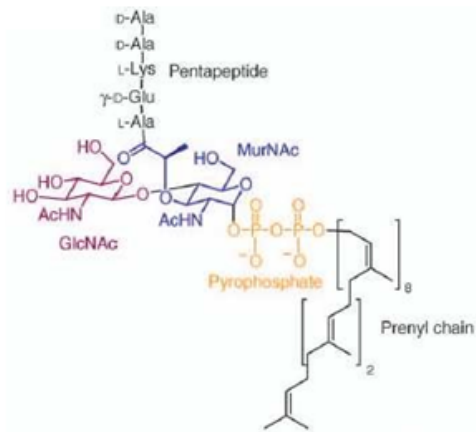
Les lantibiotiques ciblent principalement la membrane cytoplasmique de la bactérie. L'effet antimicrobien des lantibiotiques est le résultat de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne et même l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Chatterjee *et al.*, 2005a, Twomey *et al.*, 2002**). L'enveloppe des bactéries à Gram positif est composée d'une paroi, formée de peptidoglycanes (ou muréine), d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique et entre en contact direct avec le milieu extérieur. Le peptidoglycane est composé d'une partie glucidique formé d'un polymère d'unités disaccharidique d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) lié en  $\beta$  (1 4) à un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc). Les polysaccharides sont liés entre eux au niveau du MurNAc par des chaînes pentapeptidiques dont la séquence varie en fonction des bactéries (**Prescott *et al.*, 2003**). La séquence peptidique de ces chaînes de *Li. monocytogenes* est composé de : L-Ala, D-Glu, L-Lys, D-Ala, D-Ala. Contrairement aux bactéries à Gram positif, le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif est plus fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques : la membrane externe composée de phospholipides, de nombreuses protéines

intrinsèques, notamment les protéines de transport appelées porines et un composé non protéique appelé lipopolysaccharide (LPS). Les bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium* et *Serratia marcescens* sont résistantes aux lantibiotiques et en particulier à la nisine (**Chung et al., 1989, Linnett et Strominger, 1973**). Cette résistance est attribuée à la membrane externe riche en LPS qui empêche les bactériocines d'accéder à la pentapeptide du lipide II présent dans la membrane cytoplasmique (**Chatterjee et al., 2005a, Gänzle et al., 1999**). Cependant, *Pectinatus frisingensis*, un pathogène responsable de la contamination de la bière, est sensible à la nisine. La résistance de cette bactérie à la nisine apparaît après exposition répétée au lantibiotique. Contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, la résistance à la nisine résulte d'une modification de la nature des acides gras, et en particulier d'une augmentation de la proportion des acides gras saturés composant la membrane cytoplasmique de la bactérie (**Chihib et Tholozan, 1999**).

### **Le double mécanisme d'action**

La perméabilisation de la membrane cytoplasmique par formation de pores conduit à la mort de la bactérie cible après dissipation d'ions intracellulaires. L'exemple de mécanisme d'action le mieux connu est celui de la nisine et de différents lantibiotiques de type A I (subtiline et épidermine) et de type A II (lacticine 481, nukacine ISK-1) (**Figure 5**).

Un premier contact est initié entre la nisine et la membrane cytoplasmique de la bactérie cible via des interactions électrostatiques (**Ruhr et Sahl, 1985**). Chargée positivement, la région C-terminale de la nisine interagit (**Breukink et al., 1997, Giffard et al., 1997**) avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible fortement anionique (**Breukink et al., 1997**). Les boucles formant la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine situées au niveau de la région N-terminale interagissent avec le disaccharide-pyrophosphate du lipide II (**Figure 9**), précurseur de la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Asaduzzaman et al., 2006**).



GlcNAc : N-acétylglucosamine.

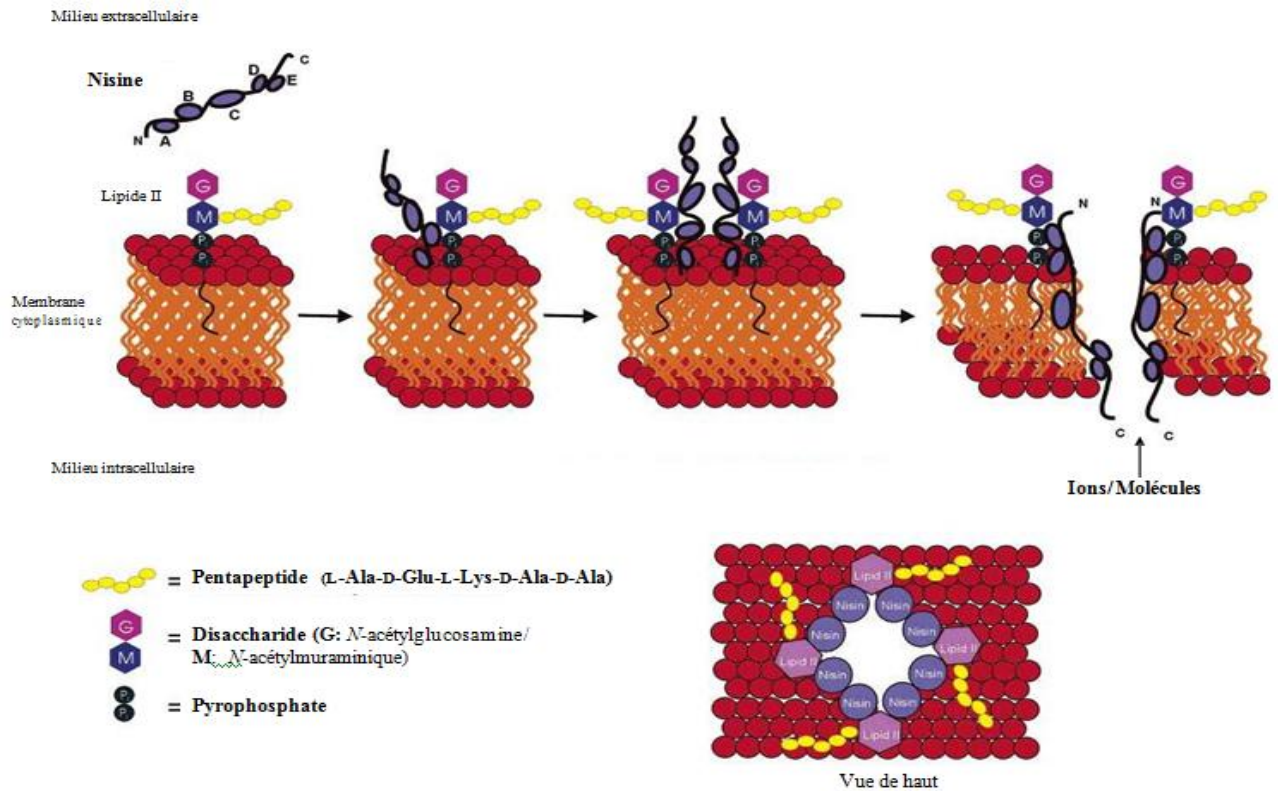
MurNAc : Acide N-acétylmuramique.

**Figure 9** : Structure du lipide II.

Il existe des mécanismes d'action engendrant la formation de pores transmembranaires, le modèle 'barrel-stave' (**Gao et al., 1991**) et le modèle 'wedge' (**Driessen et al., 1995**).

Dans le premier modèle, les monomères de nisine, cationiques interagissent avec la membrane cytoplasmique via des interactions électrostatiques. Se positionnant perpendiculairement à la membrane bactérienne, les monomères s'agrègent et forment ainsi des pores (**Gao et al., 1991**). Cependant ces pores sont instables et transitoires en raison de forces hydrophobes qui, via des réarrangements, reconduisent les lipides membranaires à leur position initiale. Dans le modèle 'wedge', la nisine adopte une position initiale parallèle à la membrane plasmique. L'interaction de la nisine avec le lipide II via des liaisons hydrogène aboutit à la formation d'un complexe nisine-lipide II (**Breukink et al., 1999**). Respectant la surface membranaire, le lipide II fait passer l'orientation de la nisine de parallèle à perpendiculaire à la membrane plasmique (**van Heusden et al., 2002**).

L'extrémité C-terminale, libre, s'insère dans la membrane plasmique formant ainsi un pore stable, unique et de structure uniforme dans la membrane plasmique (**Breukink et al., 2003**). Ce pore hétéromoléculaire est constitué de 8 molécules de nisine et 4 molécules de lipide II (**Chatterjee et al., 2005a**) (**Figure 10**). Ce modèle est retrouvé pour la subtiline et l'épidermine (**Bonelli et al., 2006, Breukink et de Kruijff, 2006**). En s'insérant dans la membrane cytoplasmique, le complexe nisine-lipide II engendre un encombrement stérique inhibant la synthèse des peptidoglycanes. La nisine possède ainsi une double action sur les bactéries cibles : formation de pores hétéromoléculaires nisine-lipide II et inhibition de la synthèse du peptidoglycane (**Brötz et al., 1998b, Chatterjee et al., 2005a**).



**Figure 10 :** Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II (**Chatterjee et al., 2005a**).

Les lantibiotiques « two-peptides » tels que la lacticine 3147 utilisent aussi le lipide II afin de former des pores dans la membrane des bactéries tests. Le mécanisme d'action de la nisine s'effectue en deux étapes. Le LtnA1 (peptide  $\alpha$ ) interagit d'abord avec le lipide II. Une fois le complexe LtnA1-lipide II formé, le LtnA2 (peptide  $\beta$ ) est recruté aboutissant ainsi à la formation de pores et à l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (**Breukink et de Kruijff, 2006, Morgan et al., 2005, Wiedemann et al., 2006**).

Les lantibiotiques de type A II (lacticine 481, nukacine ISK-1, mutacine II) interagissaient aussi avec le lipide II aboutissant à la formation de pores dans la membrane plasmique et l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Asaduzzaman et al., 2006, Wiedemann et al., 2001**).

### Inhibition de synthèse de la paroi bactérienne

Contrairement aux lantibiotiques de type A, les lantibiotiques de type B perturbent des réactions enzymatiques impliquées dans la croissance de la bactérie cible, compromettant ainsi sa survie (**Brötz et al., 1995, Brötz et al., 1997**). La mersacidine agit en se liant au lipide II et en inhibant la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne

**(Brötz *et al.*, 1998a, Brötz *et al.*, 1998b).**

La cinnamycine, inhibe la phospholipase A2 en séquestrant son substrat, la phosphatidyléthanolamine (PE) (Chatterjee *et al.*, 2005a, Märki *et al.*, 1991). Insérée dans la membrane cytoplasmique, la cinnamycine interagit avec le PE via des interactions d'abord électrostatiques puis hydrophobes séquestrant ainsi le substrat de la phospholipase A2 (Chatterjee *et al.*, 2005a, Kessler *et al.*, 1991).

## II.2.2. Les bactériocines de classe II

La classe II forme un groupe relativement hétérogène de peptides de masses moléculaires < 10 kDa. Contrairement aux lantibiotiques, les bactériocines de classe II ne présentent pas de modifications post-traductionnelles. La classe II peut être subdivisée en quatre sous-classes IIa à IId qui seront décrites ci-après.

### a. La classe IIa

Les bactériocines de classe IIa sont aussi communément appelées bactériocines « pediocin-like » en référence à la pédiocine, une des premières bactériocines de la classe IIa caractérisées. Ces bactériocines sont produites, pour la plupart, par des bactéries lactiques et représentent le groupe de bactériocines de classe II le mieux étudié (Dridier *et al.*, 2006, Fimland *et al.*, 2005). Les bactériocines de classe IIa ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur production par des bactéries isolées de l'alimentation et ce, combiné à une activité antimicrobienne dirigée contre des pathogènes majeurs responsables d'infections, tels que *Li. monocytogenes*. De façon générale, les bactériocines « pediocin-like » présentent un spectre d'activité étroit limité aux bactéries à Gram positif. Depuis la découverte de nombreuses bactériocines pendant les années 90, telles que la curvacine A (Tichaczek *et al.*, 1993)/ sakacine A (Axelsson et Holck, 1995, Holck *et al.*, 1992), la leucocine A (Hastings *et al.*, 1991), la mésentéricine Y105 (Fleury *et al.*, 1996, Héchard *et al.*, 1992), la pédiocine PA-1 (Henderson *et al.*, 1992) et la sakacine P (Hühne *et al.*, 1996, Tichaczek *et al.*, 1994), de nombreuses nouvelles bactériocines ont été découvertes et sont régulièrement découvertes, comme la mundtine L (Feng *et al.*, 2009) et l'avicine A (Birri *et al.*, 2010).

Les bactériocines de classe IIa sont des peptides antimicrobiens cationiques et partiellement amphipathiques et/ ou hydrophobes de masse moléculaire inférieure à 5500 Da. Elles sont constituées de 37 à 49 acides aminés. La structure primaire des bactériocines de classe IIa est formée d'une région N-terminale conservée portant une séquence consensus et d'une région C-terminale variable. La région N-terminale cationique renferme une séquence

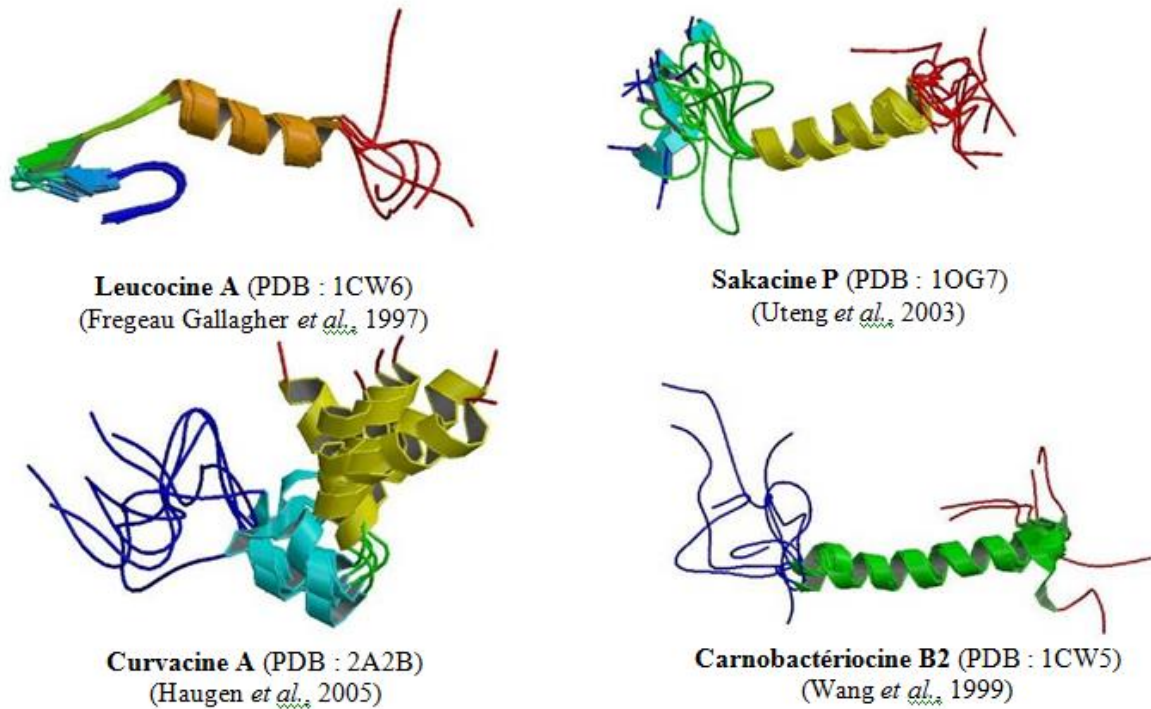
consensus YGNG[V/L] (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu) appelée la « pediocin- box » et deux cystéines formant un pont disulfure.

Cette séquence consensus est le plus souvent YGNGV, mais la découverte de bactériocines de classe IIa telles que la bactériocine 31 (Tomita *et al.*, 1996), la plantaricine C19 (Atrih *et al.*, 2001b) et la sakacine 5X (Vaughan *et al.*, 2001) a permis de montrer que cette séquence consensus pouvait varier avec la substitution de la valine par la leucine. Cette différence n'a *a priori* aucun impact majeur sur la structure globale du peptide, les deux acides aminés présentant le même degré d'hydrophobie. Néanmoins, la chaîne latérale  $\beta$ -méthyl de la valine perturberait la torsion du squelette peptidique en modifiant les angles  $\phi$  et  $\psi$ . La région C-terminale variable et hydrophobe renferme dans quelques cas un pont disulfure supplémentaire, comme c'est le cas de la divercine V41 et de la pédiocine PA-1. La présence d'un second pont disulfure dans la partie C-terminale conduirait à un spectre d'activité plus large et à une meilleure activité antimicrobienne (Eijsink *et al.*, 1998, Finland *et al.*, 2000, Richard *et al.*, 2004).

L'hétérogénéité de la région C-terminale a permis à Nissen-Meyer et coll. (Nissen-Meyer *et al.*, 2009) de sub-diviser les bactériocines de classe IIa en 4 sous-groupes. D'autres caractéristiques communes aux bactériocines de classe IIa sont la résistance aux hautes températures et l'effet antimicrobien associé à la présence d'au moins un pont disulfure. Des bactériocines ne possédant pas la séquence consensus typique et le pont disulfure de la région N-terminale ont néanmoins été classées dans la classe IIa par certains auteurs (Belguesmia *et al.*, 2011, Ennahar *et al.*, 2000) : c'est le cas de l'acidocine A (Kanatani *et al.*, 1995) et de la bactériocine OR-7 (Stern *et al.*, 2006).

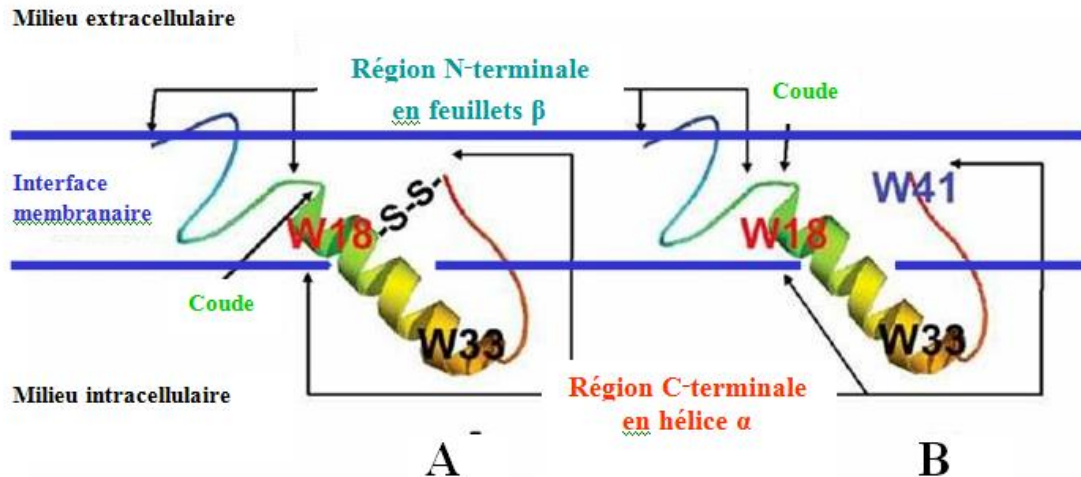
### Structures tridimensionnelles

Les structures tridimensionnelles en solution de quatre bactériocines de classe IIa (cinq avec le variant de la curvacine A), la carnobactériocine B2 (Wang *et al.*, 1999), la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005), la leucocine A (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997) et la sakacine P (Uteng *et al.*, 2003) ont été déterminées par RMN en présence de structures mimant les membranes (Figure 11).



**Figure 11** : Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.

Des études par dichroïsme circulaire et par RMN ont révélé que les bactériocines de cette classe, n'étaient pas structurées en milieu aqueux et qu'elles étaient capables d'adopter leur structure tridimensionnelle seulement lorsqu'elles se trouvent en contact avec des structures membranaires ou mimant les membranes (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997, Haugen *et al.*, 2005, Watson *et al.*, 2001). Les bactériocines de classe IIa se composent généralement d'une région *N*-terminale formant un feuillet  $\beta$  à trois brins stabilisé par le pont disulfure localisé en région *N*-terminale et d'une région *C*-terminale consistant en une ou deux hélices  $\alpha$  (Kazazic *et al.*, 2002) formant une structure repliée en « épingle à cheveux » (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Chez la leucocine A, la région *N*-terminale est structurée en un feuillet  $\beta$  antiparallèle à trois brins stabilisé par le pont disulfure localisé dans cette région et conservé chez toutes les bactériocines de classe IIa. Les régions centrale et *C*-terminale plus hydrophobes comprennent une hélice  $\alpha$  amphipathique (résidu 18 à 33) suivie d'une extension non structurée. L'hélice  $\alpha$  centrale est conservée chez la carnobactériocine B2, la sakacine P et la curvacine A. Un coude présent entre les deux hélices formant une structure hélice-coude-hélice (« helix-hinge-helix ») introduit de la flexibilité et induit la topologie en « épingle à cheveux » (Figure 11 et 12).



**Figure 12 :** Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous- groupes 1/ 2 et 3 dans la membrane plasmique de la bactérie cible (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

**A :** Structure des bactériocines dont la région C-terminale est stabilisée par un second pont disulfure.

**B :** Structure des bactériocines dont la région C-terminale est stabilisée par la présence de deux résidus Trp (W18 et W41) localisés à l'interface membrane-eau.

La structure hélice-coude-hélice adoptée par la région C-terminale est stabilisée dans le cas de la coaguline, la divercine V41, la divergicine M35, l'entéroïcine A, la pédiocine PA-1, la plantaricine 423 et la sakacine G par un second pont disulfure formé entre un résidu cystéine présent dans l'hélice  $\alpha$  et un autre situé à l'extrémité C-terminale. Cependant, la majorité des bactériocines de classe IIa ne possèdent pas de cystéine en région C-terminale. La stabilisation de ces bactériocines impliquerait alors un tryptophane en position 18, conservé chez la majorité des bactériocines, et un second proche de l'extrémité C-terminale en position 41, à l'exception des carnobactériocines B2 et BM1, de la curvacine A, et des entéroïcines P et SE-K4 (**Figure 11**).

Dans tous les cas, le coude situé entre les régions N- et C-terminales introduit une certaine flexibilité. Des études de mutagenèse ont révélé que les deux résidus tryptophane se positionneraient à l'interface membrane-eau et seraient impliqués dans la stabilisation de la structure hélice-coude-hélice (Fimland *et al.*, 2002b) (**Figure 12**).

D'autres études ont montré que la réduction du pont disulfure situé en région N-terminale perturbait la structure de la bactériocine. Ceci engendrerait une diminution de la thermostabilité de la bactériocine et la rendrait moins active à des températures élevées (Fimland *et al.*, 2000). Cependant, les carnobactériocines B2 et BM1, la curvacine A/



sakacine A et les entérocinés P et SE-K4, ne renferment ni un couple de cystéines impliquées dans la formation du second pont disulfure ni de tryptophanes impliqués dans la stabilisation de la structure hélice-coude-hélice de la région C-terminale. La détermination de la structure tridimensionnelle de la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005) (Figure 11) révèle que sa région C-terminale est structurée en deux hélices  $\alpha$  de six et onze résidus reliées entre elles par un coude, ce qui compenserait l'absence de pont disulfure et de tryptophane dans sa région C-terminale (Haugen *et al.*, 2005).

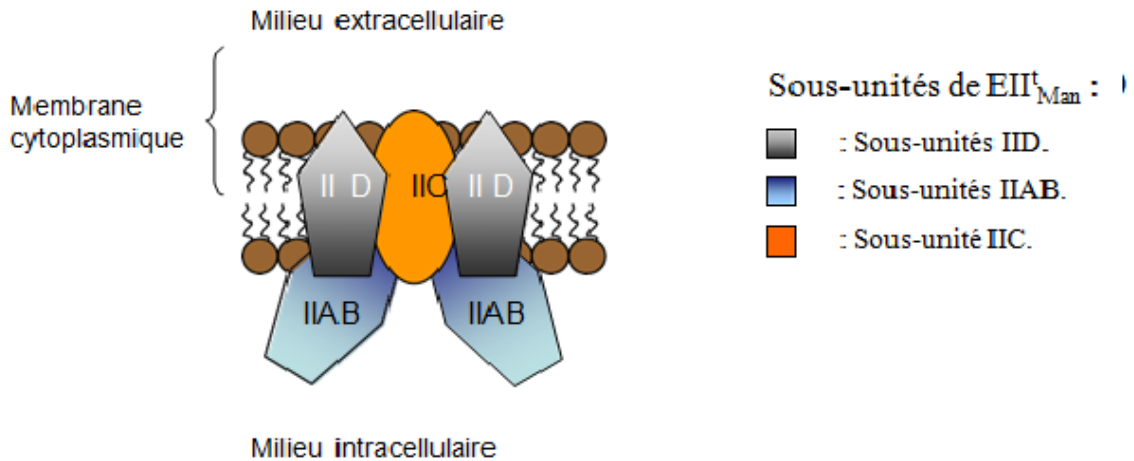
### Mode d'action

Les bactériocines de la classe IIa agissent sur les bactéries sensibles en perméabilisant la membrane cytoplasmique ce qui entraîne une dissipation de la force protomotrice et une perte de l'ATP cytoplasmique (Chikindas *et al.*, 1993, Herranz *et al.*, 2001a, Herranz *et al.*, 2001b). Le mécanisme exact de formation de ces pores demeure néanmoins mal connu (Diep *et al.*, 2007), mais il y aurait vraisemblablement une association de plusieurs molécules de bactériocines dans la bicouche membranaire (Ennahar *et al.*, 2000). Des études utilisant des bactériocines modifiées ont montré que c'est la région C-terminale qui s'insère dans la membrane cytoplasmique. L'une de ces études consistait à produire une bactériocine chimère formée par la région N-terminale de la pédiocine AcH avec la région C-terminale de la protéine de sécrétion du maltose (Maltose Binding Protein, MBP) (Miller *et al.*, 1998b). Produite chez *E. coli*, la pédiocine AcH fusionnée à la MBP emprunte la voie générale Sec pour être exportée et ne nécessite donc pas une co-expression de PapC et PapD, des protéines habituellement impliquées dans son export (Miller *et al.*, 1998a). Cette protéine chimère présente une activité antimicrobienne suggérant ainsi que la région N-terminale est impliquée dans la reconnaissance et le premier contact avec la membrane bactérienne cible (Chen *et al.*, 1997b, Fimland *et al.*, 2006, Kazazic *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 1998b), alors que la région C-terminale est la région de la bactériocine qui pénètre la membrane aboutissant à la formation des pores.

Une autre étude a porté sur le rôle des tryptophanes conservés dans la séquence des bactériocines de classe IIa. Chez la sakacine P, la substitution des résidus Trp localisés en position 18 et 41 par des résidus aromatiques n'a pas d'effet sur l'activité antimicrobienne de la bactériocine, mais celle-ci devient inactive lorsque ces deux Trp sont remplacés par des résidus hydrophobes, non aromatiques, ou hydrophiles (Fimland *et al.*, 2002b). La substitution du Trp33 par des résidus hydrophobes n'a aucun effet sur l'activité antimicrobienne du peptide mais ceci n'est pas le cas lorsqu'il est substitué par des résidus

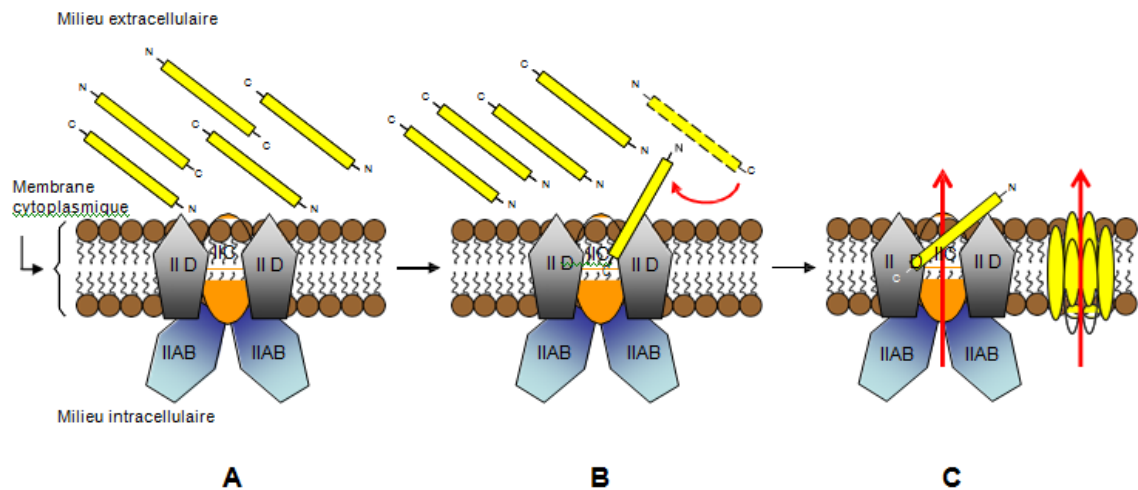
aromatiques ou hydrophiles (**Fimland et al., 2002b**). Ces résultats suggèrent que les Trp18 et Trp41 permettraient le positionnement de la bactériocine à l'interface membrane-eau et que le Trp33, se localiserait au niveau de la région qui pénètre dans la membrane plasmique (**Figure 11**) en apportant une stabilité à la structure tridimensionnelle du peptide lors de son contact avec la membrane de la bactérie cible. Ces études indiquent ainsi un modèle d'orientation des bactériocines de la classe IIa dans lequel la région *N*-terminale, cationique, portant la séquence consensus serait impliquée dans le premier contact avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique. La région *C*-terminale plus hydrophobe, stabilisée par un second pont disulfure pour quelques bactériocines ou par l'interaction des résidus Trp18/Trp41, adopterait alors une forme hélice-coude-hélice. Le résidu Trp33 présent en fin d'hélice dans la région *C*-terminale induirait un coude et se trouverait « enfoui » à l'intérieur de la membrane cytoplasmique (**Fimland et al., 2002b, Nissen-Meyer et al., 2009**). De nombreuses études ont montré que la région *C*-terminale était impliquée dans la reconnaissance de la cible et confère ainsi la spécificité de l'activité antimicrobienne à la bactérie productrice (**Fimland et al., 2000, Johnsen et al., 2005b**).

Des études ont montré que l'inactivation du gène *rpoN* codant la sous-unité  $\sigma^{54}$  de l'ARN polymérase chez *Li. monocytogenes* et *En. faecalis* conduisait à la résistance de ces deux bactéries à la mésentéricine Y105 (**Dalet et al., 2000, Robichon et al., 1997**).  $\sigma^{54}$  participe à l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans des voies d'export et métaboliques (**Merrick, 1993, Thöny et Hennecke, 1989**). Par ailleurs, l'inactivation des gènes *rpoN*, *manR* et *mptA* codant respectivement  $\sigma^{54}$  et deux sous-unités de la mannose perméase phosphotransférase  $EII^tMan$  (**Figure 13**) induit la résistance de *Li. monocytogenes* EGDe et *En. faecalis* à la mésentéricine Y105. Comme la mésentéricine Y105, d'autres bactériocines de classe IIa telles que la leucocine A ou la pédiocine AcH (**Xue et al., 2005**) sollicitent  $EII^tMan$  lors de leur interaction avec des bactéries cibles.  $EII^tMan$  est une mannose perméase phosphotransférase impliquée dans le transport des sucres (glucose et mannose) chez les bactéries à Gram positif. Elle est formée de trois types de sous-unités dans lesquelles MptAB est une protéine localisée à la surface de la membrane cytoplasmique et MptC et MptD sont deux protéines transmembranaires (**Figure 13**) (**Ramnath et al., 2000 ; Diep et al., 2007, Héchard et Sahl, 2002**).

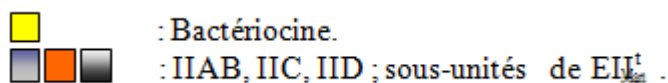


**Figure 13 :** Structure de la mannose perméase du système phosphotransférase  $EII^{t}_{Man}$  chez les bactéries à Gram positif (Diep *et al.*, 2007).

Les études menées par Karine Dalet *et al.* (Dalet *et al.*, 2001) ont indiqué que c'est la sous-unité MptD qui interagirait directement avec la mésentéricine Y105 du côté extracellulaire. Plus récemment, Dzung Diep *et al.* (Diep *et al.*, 2007) ont proposé un modèle d'interaction des bactériocines de classe IIa avec  $EII^{t}_{Man}$  (Figure 14).



**Figure 14 :** Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcins A et B (classe IId) (Diep *et al.*, 2007).



Ce modèle suggère que la bactériocine de classe IIa interagirait directement avec les deux sous-unités transmembranaires MptC et MptD lors du premier contact avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible (**Figure 14 A et B**). L'interaction entre la bactériocine et MptC/MptD perturberait la conformation de EII<sup>t</sup>Man, provoquant alors la fuite d'organites intracellulaires et la mort de la bactérie cible (**Figure 14 C**).

Ceci indique que les bactériocines de classe IIa utiliseraient ce récepteur pour perméabiliser la membrane plasmique bactérienne. Cependant, les bactériocines de classe IIa seraient capables de former des pores à la surface de liposomes en absence de EII<sup>t</sup>Man (**Chen et al., 1997a, Chen et al., 1997b**). En effet, présentes en concentration suffisante dans le milieu extracellulaire, les monomères de bactériocines s'assembleraient en oligomères et s'inséreraient dans la membrane de la bactérie cible pour former des pores (**Ennahar et al., 2000, Héchard et Sahl, 2002**) (**Figure 14 C**). Cependant, la nature exacte de ces pores est encore mal connue (**Diep et al., 2007**).

#### b. La classe IIb

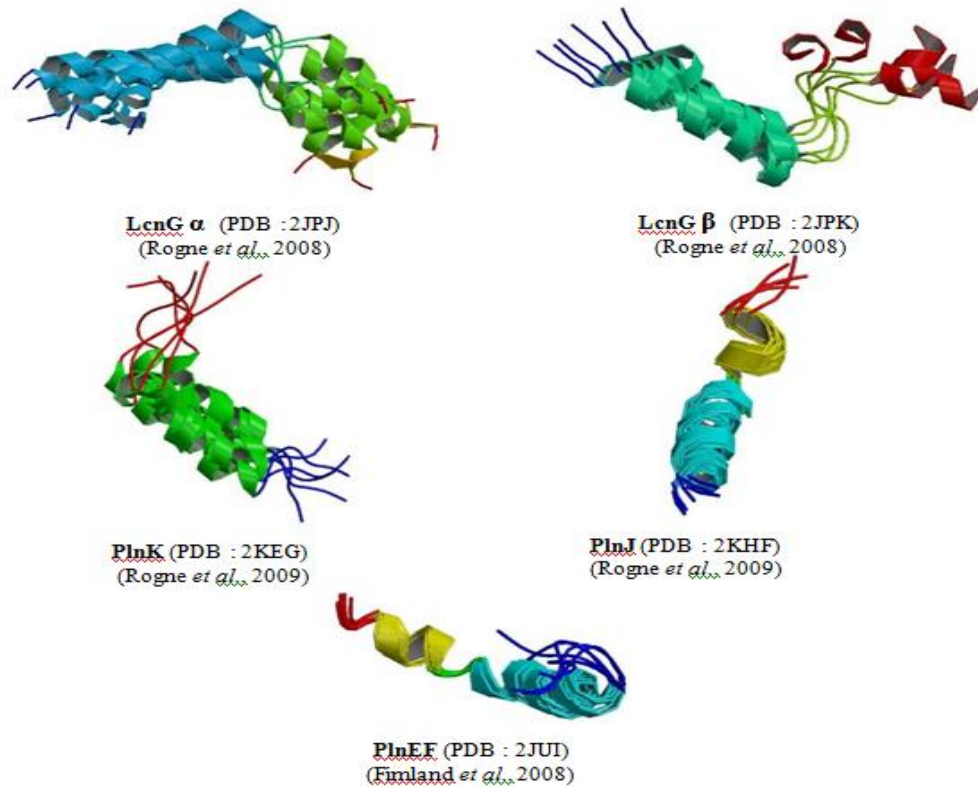
Les bactériocines, communément appelées « two-peptides », sont formées de deux peptides différents,  $\alpha$  et  $\beta$ , dont l'activité antimicrobienne optimale nécessite la présence des deux peptides complémentaires, le plus souvent en quantité équimolaire (**Garneau et al., 2002, Nissen-Meyer et al., 2009, Oppegård et al., 2007b**). Dans certains cas, ces peptides peuvent être actifs individuellement comme c'est le cas de la lactacine F (**Allison et al., 1994**) et des plantaricines EF et JK (**Anderssen et al., 1998**).

Depuis l'identification de la lactococcine G chez *Lb. lactis* (**Nissen-Meyer et al., 1992**), environ 15 bactériocines de la même classe ont été isolées et caractérisées. Ces bactériocines possèdent une taille très variable allant de 25 résidus (plantaricine J, PlnJ) à 62 résidus (thermophiline A, ThmA). Comme les autres bactériocines de classe II, les bactériocines de classe IIb possèdent un spectre d'activité incluant de nombreux genres de bactéries à Gram positif pathogènes telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* ou commensales comme *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Pediococcus* (**Garneau et al., 2002**). Les systèmes génétiques impliqués dans la biosynthèse et la régulation des « two-peptides » sont organisés en clusters de gènes comportant de un à six opérons (**Diep et al., 2009, Nissen-Meyer et al., 2010**).

## Structure

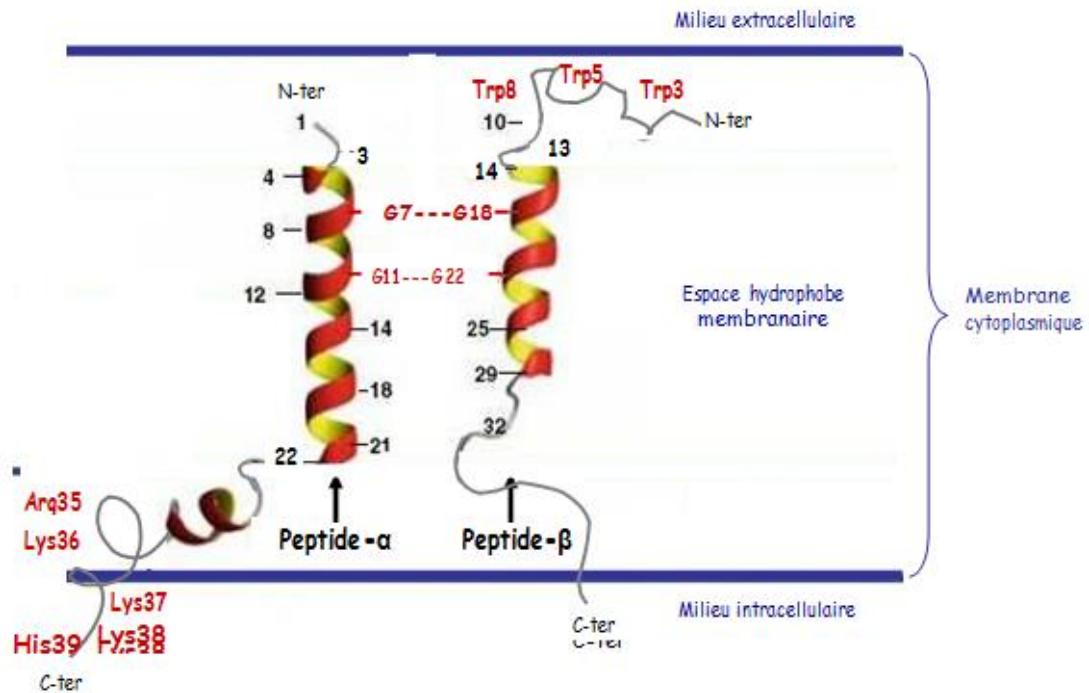
Des études de dichroïsme circulaire et de RMN ont été réalisées sur trois bactériocines de classe IIb : la lactococcine G et les plantaricines EF et JK (**Fimland et al., 2008, Hauge et al., 1998a, Hauge et al., 1999, Rogne et al., 2008, Rogne et al., 2009**). Ces bactériocines se sont révélées non structurées dans un environnement aqueux. En revanche, elles acquièrent des structures en hélice lors d'un contact avec un environnement plus hydrophobe, en présence de trifluoroéthanol (TFE) ou exposées à des structures mimant les membranes, telles que des micelles ou des liposomes (**Fimland et al., 2008, Hauge et al., 1998a, Hauge et al., 1999, Rogne et al., 2008, Rogne et al., 2009**). A l'exception de la plantaricine S  $\beta$  et de la plantaricine NC8  $\beta$  qui renferment respectivement des motifs AXXXA et SXXXS, les bactériocines de classe IIb présentent le motif conservé GXXXG impliqué dans les interactions inter-hélices transmembranaires (**Senes et al., 2000, Senes et al., 2004**).

La lactococcine G est la bactériocine la plus étudiée de cette classe (**Hauge et al., 1998a, Moll et al., 1996, Moll et al., 1998, Nissen-Meyer et al., 1992, Oppegård et al., 2007a, Oppegård et al., 2008, Rogne et al., 2008**). Elle est formée d'un peptide  $\alpha$  (LcnG  $\alpha$ ) de 39 acides aminés et d'un peptide  $\beta$  (LcnG  $\beta$ ) de 35 acides aminés. La lactococcine G renferme deux motifs GXXXG chez LcnG  $\alpha$  (Gly7-Gly11 et Gly18-Gly22) et un seul chez LcnG  $\beta$  (Gly18-Gly22). Les structures tridimensionnelles des deux peptides LcnG  $\alpha$  et LcnG  $\beta$  constituant la lactococcine G ont été déterminées par RMN en présence de micelles de DPC ou dans le TFE (**Rogne et al., 2008**) (**Figure 15**). En présence de micelles, LcnG  $\alpha$  présente une région *N*-terminale (résidus 3 à 21) et une région *C*-terminale (résidus 24 à 34) structurées en hélices  $\alpha$  avec une région intermédiaire (résidus 18 à 22) assez flexible. Comme pour LcnG  $\alpha$ , les régions *N*- et *C*-terminales de LcnG  $\beta$  forment des hélices  $\alpha$  en présence de TFE, mais une seule hélice est observée dans la région *N*-terminale en présence de micelles (**Rogne et al., 2008**). De plus, les hélices  $\alpha$  des régions *N*-terminales des deux peptides sont amphipathiques. La structure tridimensionnelle de la lactococcine G suggère que LcnG  $\alpha$  et LcnG  $\beta$  seraient orientées dans la même direction, générant des interactions inter-hélices transmembranaires via leurs motifs GXXXG, Gly7-Gly11 et Gly18-Gly22 (**Oppegård et al., 2008, Rogne et al., 2008**).



**Figure 15 :** Structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles.

L'extrémité *N*-terminale riche en résidus Trp (Trp3, Trp5, Trp8) se situerait à l'interface membranaire du côté extracellulaire, alors que l'extrémité *C*-terminale fortement cationique (Arg35, Lys36, Lys37, Lys38, His39) se retrouverait en contact avec les phospholipides membranaires à l'interface entre la membrane cytoplasmique et le milieu intracellulaire (Oppegård *et al.*, 2008, Oppegård *et al.*, 2010b) (Figure 16).



### Espace intracellulaire

**Figure 16 :** Modèle de la représentation structurale des deux peptides constituant la lactococcine G et de leur orientation dans la membrane des bactéries cibles (Oppegård *et al.*, 2010b).

Les liaisons hydrogènes et les interactions de van der Waals entre les glycines (G7 et G18/ G11 et G22) sont représentés par des traits rouges en pointillés.

Présentant des similarités de séquences avec la lactococcine G, la lactococcine Q et l'entéroccine 1071 pourraient partager la même structure tridimensionnelle. Les structures tridimensionnelles de la plantaricine EF et de la plantaricine JK ont également été déterminées par RMN (Figure 15). Les plantaricines EF et JK sont composées de 33 (PlnE), 34 (PlnF), 25 (PlnJ) et 32 résidus (PlnK) et renferment un (PlnF et PlnJ) ou deux (PlnE et PlnK) motifs GXXXG. Comme pour la lactococcine G, les plantaricines EF et JK sont structurées en hélice  $\alpha$ . De plus, les peptides complémentaires PlnE et PlnF d'une part, PlnJ et PlnK d'autre part, semblent interagir au niveau de leurs motifs GXXXG via leurs structures en hélice (Fimland *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2009).

## Mécanisme d'action

Toutes les bactériocines de classe IIb dont le mécanisme d'action a été étudié, comme la lactacine F (Abee *et al.*, 1994), la lactocine 705 (Castellano *et al.*, 2003), la lactococcine G (Moll *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 1998), la plantaricine EF (Moll *et al.*, 1999), la plantaricine JK (Moll *et al.*, 1999) et la thermophiline 13 (Marciset *et al.*, 1997) agissent en perméabilisant la membrane cytoplasmique de la bactérie cible, provoquant des mouvements d'influx et d'efflux d'ions et de petites molécules et conduisant à la mort de la bactérie. Les bactériocines de classe IIb sont actives à faible concentration contrairement à d'autres bactériocines. Des études ont montré que chaque bactériocine présentait des spécificités quant aux ions concernés (Oppegård *et al.*, 2007b).

Ainsi, la lactococcine G perméabilise la membrane aux ions monovalents tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  ainsi qu'à la choline mais pas à l'ion  $\text{H}^+$  ni aux cations divalents tels que  $\text{Mg}^{2+}$  ou les ions phosphate (Moll *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 1998). Les plantaricines EF et JK perméabilisent la membrane cytoplasmique aux mêmes molécules que la lactococcine G, mais contrairement à la lactococcine G, ces deux bactériocines présentent une spécificité pour l'ion  $\text{H}^+$  (Moll *et al.*, 1999). La lactacine F, quant à elle provoque la fuite des ions  $\text{K}^+$  et phosphate (Abee *et al.*, 1994). Cette capacité à différencier les ions passant à travers la membrane cytoplasmique serait due à la formation (ou à l'induction de la formation) de pores plus ou moins sophistiqués par ces bactériocines. Ces pores présenteraient une spécificité quant aux ions dont ils permettraient le passage à travers la membrane cytoplasmique. Par ailleurs, il a été montré que la thermophiline 13 produite par *Str. thermophilus* induisait la dissipation et la perturbation de l'ensemble du potentiel électrique transmembranaire ainsi que du gradient de pH.

La structure formée par les interactions entre les deux hélices transmembranaires des deux partenaires de bactériocines « two-peptides », déterminée pour la lactococcine G (Oppegård *et al.*, 2010b) (Figure 16), pourrait être impliquée dans l'interaction avec un récepteur membranaire (Diep *et al.*, 2009, Nissen-Meyer *et al.*, 2010), comme c'est le cas de la lactococcine A et des bactériocines de classe IIa (Diep *et al.*, 2007, Haugen *et al.*, 2011). Un tel récepteur n'a cependant pas encore été identifié.

### c. La classe IIc : les bactériocines circulaires

Les bactériocines circulaires se différencient des autres bactériocines par la présence d'un cycle liant d'une façon covalente leurs extrémités *N*- et *C*-terminales via un mécanisme



enzymatique encore mal connu à ce jour. La structure circulaire est responsable de la protection de ces bactériocines à l'égard de la protéolyse, en raison de l'absence de site de clivage aux exopeptidases (**Maqueda et al., 2008**), et joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité antimicrobienne due à une stabilité accrue de la molécule. Par ailleurs, le terme circulaire a été associé à ces bactériocines pour les distinguer des peptides cycliques comme les polymixines, la cyclosporine A et la gramicidine S synthétisées par la voie des peptide-synthétases appelées NRPS (nonribosomal peptides synthetase) (**Koglin et Walsh, 2009, Marahiel et Essen, 2009**). Comme les autres bactériocines, les bactériocines circulaires agissent par la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et la perturbation de la force protomotrice membranaire de la bactérie cible aboutissant à la mort cellulaire.

Il existe des divergences quant à la classification de ces bactériocines circulaires. Paul Cotter *et al.* (**Cotter et al., 2005b**) ont intégré ces bactériocines dans la classe II, alors que d'autres auteurs ont préféré créer une nouvelle classe pour ces bactériocines : la classe III (**Franz et al., 2007**), la classe IV (**Maqueda et al., 2008**) ou la classe V (**Kemperman et al., 2003**). Huit bactériocines circulaires ont été caractérisées à ce jour, parmi lesquelles cinq sont produites par des bactéries lactiques (carnocycline A, gasséricine A/ reutéricine 6, entérocin AS-48, lactocycline Q, ubérollysine), tandis que la butyriovibriocine AR10 et la circularine A sont produites respectivement par *Clostridium beijerinckii* (*Cl. beijerinckii*) et *Butyriovibrio fibrisolvens* (*By. fibrisolvens*). Quant à la subtilisine A produite par *B. subtilis*, sa séquence est atypique. En effet, elle ne contient que 35 résidus contre 58 à 70 résidus pour les autres bactériocines circulaires et de plus, elle possède des ponts thioéthers distincts de ceux présents chez les lantibiotiques (**Kawulka et al., 2003**).

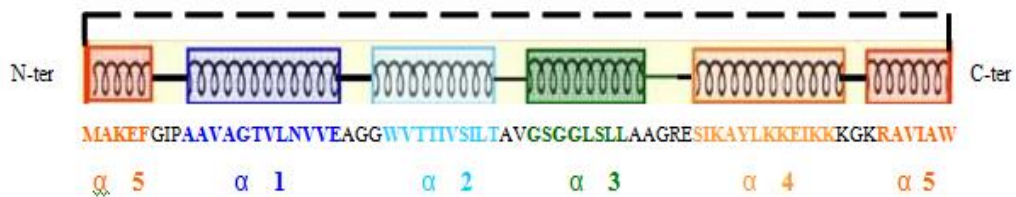
La gasséricine A isolée de *Lactobacillus gasseri* (*Lb. gasseri*) et la reutéricine 6 isolée de *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reuteri*) possèdent la même séquence en acides aminés (**Kawai et al., 2004**) et aucun des deux peptides ne possède de D-alanine (**Arakawa et al., 2010**). De plus, les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces deux bactériocines circulaires sont identiques (**Ito et al., 2009**). Ces deux peptides sont donc une seule et même bactériocine circulaire (**Arakawa et al., 2010**). Très récemment, une nouvelle bactériocine circulaire nommée garvicine ML a été isolée de *Lc. garvieae*. La garvicine ML est un peptide de 60 résidus caractérisé par un très court peptide leader de 3 résidus (**Borrero et al., 2011**).

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à l'entérocin AS-48, la bactériocine circulaire la mieux étudiée de nos jours, produite par différentes souches d'*En. faecalis* et *En. faecium* (**Folli et al., 2003, Joosten et al., 1996, Maqueda et al., 2004, Martinez-Bueno et al., 1994, Tomita et al., 1997**).

## Structure

Les bactériocines circulaires ont été divisées en deux sous-groupes en fonction de leurs homologues de séquences en acides aminés (Cotter *et al.*, 2005b, Martin-Visscher *et al.*, 2009). Le groupe IIc (i) regroupe la carnocycline A, la circularine A, l'entéroïne AS-48, la garvicine ML et l'ubérolisine, tandis que le groupe IIc comporte la butyriovibriocine AR10 et la gasséricine A/ reutéricine 6.

L'entéroïne AS-48 est une bactériocine circulaire cationique amphipathique composée de 77 acides aminés (Gálvez *et al.*, 1989). Des analyses par RMN (González *et al.*, 2000) et diffraction des rayons X (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) ont révélé que sa structure est constituée de cinq hélices  $\alpha$  : résidus 9-21 ( $\alpha 1$ ), 25-34 ( $\alpha 2$ ), 37-45 ( $\alpha 3$ ), 51-62 ( $\alpha 4$ ) et 64-5 ( $\alpha 5$ ) (Figure 17) (González *et al.*, 2000, Langdon *et al.*, 1998) formant une structure tridimensionnelle compacte et globulaire (González *et al.*, 2000) (Figure 17).



**Figure 17:** Structure secondaire de l'entéroïne AS-48 (González *et al.*, 2000, Langdon *et al.*, 1998).

Le trait en pointillés représente la liaison peptidique formée entre la méthionine (M) N-terminale et le tryptophane (W) C-terminal au cours de la cyclisation.

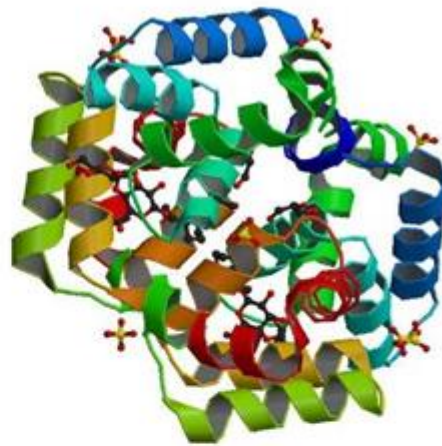
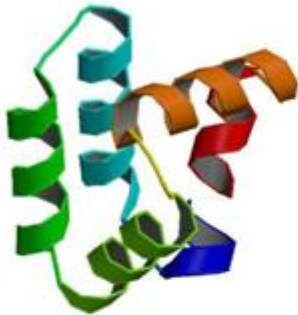
Bien que la carnocycline A ne présente que 30 % d'identité de séquence avec l'entéroïne AS-48, la structure tridimensionnelle de ces deux bactériocines est proche (Figure 18). Cependant, la carnocycline A ne possède que 4 régions en hélice  $\alpha$ .

La structure circulaire ainsi que l'oligomérisation confèrent à ces bactériocines une activité biologique décuplée en apportant une stabilité thermodynamique et une intégrité à leur structure protéique ainsi qu'une protection contre des protéases (Maqueda *et al.*, 2008).

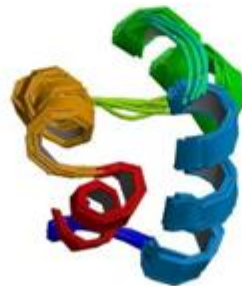
### Mécanisme d'action

Les bactériocines circulaires présentent un large spectre d'activité dirigé contre de nombreuses bactéries à Gram positif. L'activité contre des bactéries à Gram négatif n'interviendrait que lorsque la structure de leur membrane externe est altérée (Ananou *et al.*, 2005, Shelburne *et al.*, 2007) ou dans des conditions particulières (EDTA, sodium tripolyphosphate (STPP), pH 5, pH 8,6, chaleur) (Ananou *et al.*, 2005, Martin-Visscher *et al.*, 2011). Un modèle de mode d'action a été proposé pour l'entérotoxine AS-48 (Maqueda *et al.*, 2004, Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

Monomère d'AS-48 (PDB : 1O83)  
(Sánchez-Barrena *et al.*, 2003)



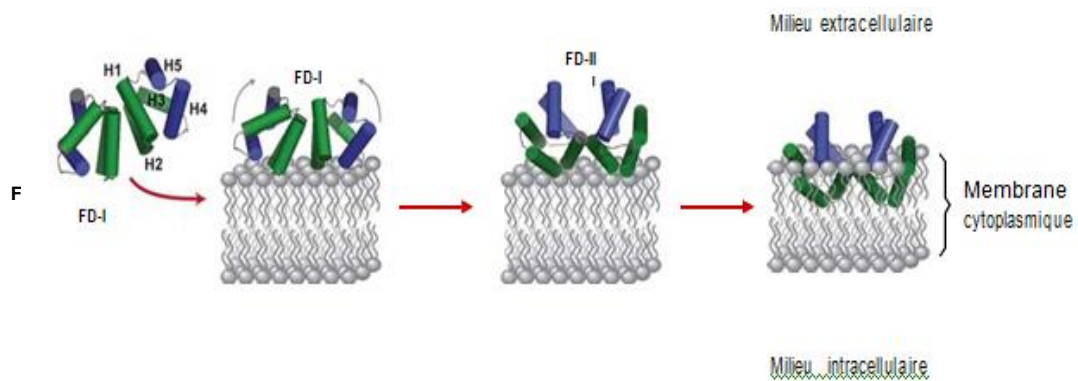
Dimère FD-II d'AS-48 (PDB : 1O84)  
(Sánchez-Barrena *et al.*, 2003)



Carnocycline A (PDB : 2KJF)  
(Martin-Visscher *et al.*, 2009)

**Figure 18** ; Structures tridimensionnelles de la carnocycline A (Martin-Visscher *et al.*, 2009) et des formes monomérique et dimérique (FD-II) de l'entérotoxine AS-48 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

L'entéroïcine AS-48 agirait sous forme d'homodimère en perméabilisant les membranes cytoplasmiques des bactéries cibles par la formation des pores. Au cours de son interaction avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible, l'entéroïcine AS-48 prendrait deux formes homodimériques différentes, la FD-I (forme dimérique-I) et la FD-II. Les deux monomères de l'entéroïcine AS-48 FD-I et FD-II seraient respectivement liés par des interactions hydrophobes via les hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  et par des interactions hydrophiles via les hélices  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) (Figure 19).



**Figure 19 :** Représentation schématique du mode d'action de l'entéroïcine AS-48 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

Les hélices (H) **hydrophobes** et **hydrophiles** sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les flèches grises indiquent le mouvement de rotation des deux monomères de l'entéroïcine AS-48 ; FD : forme dimérique.

Par sa forte charge cationique, localisée en particulier au niveau des hélices  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$ , la FD-I de l'entéroïcine AS-48 interagirait fortement avec la membrane plasmique chargée négativement (Maqueda *et al.*, 2004) (Figure 19). Les dimères de bactériocines ayant interagit avec la membrane se réorganiseraient ensuite pour former la FD-II afin de faciliter l'insertion dans la membrane et la formation des pores (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) (Figure 19).

#### **d.La classe IId : les bactériocines linéaires, non modifiées, non « pediocin-like »**

La classe IId regroupe des bactériocines produites par différentes bactéries lactiques ainsi que des *Enterococcus*. La classe IId forme un groupe hétérogène de bactériocines qui ne présentent pas de similarités avec les autres bactériocines de classe II (Cotter *et al.*, 2005b) et n'ont pas de caractéristiques communes.

### d.1. Les différentes bactériocines de classe IId

La diversité de caractéristiques de séquences et de modes d'export des bactériocines de classe IId permet leur division en trois sous-groupes :

- a- Bactériocines sécrétées via la voie de sécrétion Sec.
- b- Bactériocines dépourvues de peptide leader et de séquence signal.
- c- Autres bactériocines

#### Bactériocines sécrétées via le système Sec

Le système Sec est la voie d'export la plus empruntée chez les archées, les eubactéries et les eucaryotes. Ce système d'export permet la translocation des précurseurs portant une séquence signal *N*-terminale vers le milieu extracellulaire. Au cours de l'export, le précurseur est clivé pour acquérir sa forme mature. Parmi ces bactériocines, la divergicine A, produite par *Carnobacterium divergens* LV13, est la première bactériocine découverte produite par une bactérie lactique n'utilisant pas le transporteur ABC pour son export (**Worobo et al., 1995**). La propionicine T1 est produite par deux souches bactériennes différentes de *Propionibacterium thoenii* sous forme de précurseur contenant une séquence signal Sec (**Faye et al., 2000**). Comme la divergicine A et la propionicine T1, la lactococcine 972 est produite par *Lc. lactis* IPLA972 sous forme d'un précurseur renfermant une séquence signal Sec (**Martínez et al., 1999**). D'autre part, la lactococcine 972 présente une forme active homodimérique, ce qui pourrait jouer un rôle important dans son mode d'action (**Martínez et al., 2000, Martínez et al., 2007, Martínez et al., 2008**). Cependant, certaines bactériocines de classe IIa, comme les bactériocines T8/ 743A (**De Kwaadsteniet et al., 2006**) et l'hilaricine JM 79 (**Sánchez et al., 2008**), utilisent aussi la voie Sec pour leur export. En raison de la présence de la séquence consensus YGNGV/L et de la forte activité anti-*Listeria*, ces bactériocines ne sont pas placées dans la classe IId mais dans la classe IIa.

#### Bactériocines dépourvues de peptide leader et de séquence signal (« leaderless »)

##### Bactériocines produites par des bactéries du genre *Enterococcus*

Les bactériocines « leaderless » peuvent être produites seules (auréocine 53, entéroccine Q, lacticine Q, lacticine Z), ou bien sous forme de deux (entéroccine I/J, entéroccine L50, entéroccine MR10) ou quatre peptides proches (Auréocine A70). L'entéroccine L50, produite par *En. faecium* L50, est une bactériocine composée de deux peptides, l'entéroccine L50A (EntL50A) et l'entéroccine L50B (EntL50B) partageant 72% de similarité de séquence (**Cintas et al., 1998**). L'EntL50A et l'EntL50B sont co-transcrites à partir de deux gènes présents sur le plasmide pCIZ1 (**Cintas et al., 1998**). Chacun de ces deux

peptides présente une forte activité antimicrobienne seul ou en association (**Cintas et al., 1998**). L'absence du peptide leader, l'action synergique des deux peptides EntL50A et EntL50B pourrait permettre de placer l'entérocin L50 dans la classe IIb. L'entérocin L50 est également produite par d'autres souches d'*Enterococcus* telles qu'*En. faecium* 6T1a et *En. faecium* MRR10-3. Elles sont respectivement appelées entérocin I/ J (**Floriano et al., 1998**, **Ruiz-Barba et al., 2007**) et entérocin MR10R/ MR10B (**Martin-Platero et al., 2006**). Une autre bactériocine, l'entérocin RJ-11, est un peptide unique produit par *En. faecalis* RJ-11, similaire à l'EntL50A. Contrairement aux entérocin Ent50A et Ent50B, l'entérocin RJ-11 agirait probablement seule (**Yamamoto et al., 2003**). En plus de porter les gènes codant la bactériocines L50, le plasmide pC1Z2 renferme un gène codant une autre bactériocine de classe IId, l'entérocin Q (**Cintas et al., 2000**). Les gènes codant les précurseurs des deux bactériocines sont généralement co-exprimés (**Cintas et al., 2000**, **Criado et al., 2006**).

### **Bactériocines produites par des bactéries du genre *Staphylococcus***

Parmi ces bactériocines, l'auréocine A70 et l'auréocine A53 sont produites respectivement par *Sta. aureus* A70 et *Sta. aureus* A53 (**Netz et al., 2001**, **Netz et al., 2002**). L'auréocine A70 est composée de 4 peptides dépourvus de séquence signal : AurA, AurB, AurC et AurD (**de Oliveira et al., 1998**). AurA, AurB, AurC présentent une activité antimicrobienne lorsqu'ils sont présent seuls, mais aucune activité synergique entre ces trois peptides n'a été mise évidence. AurD ne peut pas être purifié séparément des autres peptides mais son homologie de séquence avec les autres peptides Aur suggère qu'AurD posséderait également une activité antimicrobienne (**de Oliveira et al., 1998**). L'auréocine A53 présente une charge globale cationique ainsi qu'une séquence riche en tryptophane (**Netz et al., 2002**). Elle est active contre un grand nombre de bactéries à Gram positif, telles qu'*En. faecium*, *Listeria innocua* (*Li. innocua*) ou *Sta. aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ordre du nanomolaire (**Netz et al., 2002**).

### **Bactériocines produites par des bactéries du genre *Lactobacillus***

D'autres bactériocines de la classe IId sont produites par des bactéries du genre *Lactobacillus* parmi lesquelles la lacticine Q (**Fujita et al., 2007**) et la lacticine Z (**Iwatani et al., 2007**) produites respectivement par *Lb. lactis* QU 5 et *Lb. lactis* QU14. Ces deux peptides présentent une homologie de séquence et leur méthionine N-terminale serait formylée. Par ailleurs, les lacticine Q et Z sont actives avec des CMI de l'ordre du nanomolaire contre des bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*, *Enterococcus*,

*Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Fujita *et al.*, 2007, Iwatani *et al.*, 2007). De plus, la séquence de la région N-terminale des lactococcines Q et Z est proche de celle de l'auréocine A53.

### Bactériocines « autres »

#### La lactococcine A et les bactériocines homologues

La lactococcine A, produite par quelques souches de *Lc. lactis*, est la première bactériocine de classe IId identifiée et la mieux caractérisée à ce jour (Holo *et al.*, 1991, Stoddard *et al.*, 1992). Le système génétique impliqué dans la biosynthèse de la lactococcine A est situé sur le plasmide p94B4-6 chez *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (van Belkum *et al.*, 1991a) à l'origine de la production de deux autres bactériocines, la lactococcine B (van Belkum *et al.*, 1992) et la lactococcine M (van Belkum *et al.*, 1991a, van Belkum *et al.*, 1992). La séquence des peptides leader des lactococcines A, B et M sont très similaires, ceci serait dû à un mécanisme de maturation et d'export identique. Des bactériocines produites par d'autres genre bactériens sont très similaires à la lactococcine A. Parmi elles, la bovicine 255 est produite par *Streptococcus gallolyticus* LRC0255 (Whitford *et al.*, 2001) tandis que la thermophiline A est produite par *Str. thermophilus* ST134 (Ward et Somkuti, 1995) . De plus, toutes les bactériocines de ce groupe sont produites sous forme d'un précurseur qui est clivé au niveau du motif Gly-Gly lors de l'export.

#### L'entéroccine B et les bactériocines homologues

L'entéroccine T136 (Casaus *et al.*, 1997, Håvarstein *et al.*, 1994). L'entéroccine B présente des similarités de séquence B est co-produite par *En. faecium* avec l'entéroccine A, une bactériocine de classe IIa avec les carnobactériocine A/ piscicoline 61 produites respectivement par *Carnobacterium piscicola* (*Cb. piscicola*) LV17A (Worobo *et al.*, 1994) et *Cb. piscicola* LV61 (Holck *et al.*, 1994). *Enterococcus durans* QU 49 produit la durancine TW-49M dont la région N-terminale est fortement semblable à celle de l'entéroccine B (Hu *et al.*, 2008) .

#### La lactococcine A

La lactococcine A est active contre des bactéries phylogénétiquement proches et présente un spectre d'activité étroit (Holo *et al.*, 1991, van Belkum *et al.*, 1991b). Comme les bactériocines de classe IIa, la lactococcine A perméabilise la membrane cytoplasmique et perturbe le potentiel membranaire des bactéries cibles (van Belkum *et al.*, 1991b) en se

fixant au récepteur mannose phosphotransférase  $EII^t_{Man}$  présent dans la membrane plasmique des bactéries cibles (**Diep et al., 2007**). La protéine d'immunité de la lactococcine A, LciA, s'associerait à la membrane cytoplasmique (**Nissen-Meyer et al., 1993a, Venema et al., 1994**) en se fixant au complexe lactococcine A/ $EII^t_{Man}$ . Elle empêcherait ainsi la perméabilisation membranaire des bactéries productrices (**Diep et al., 2007**). Il a été montré que les deux composants membranaires IIC et IID de  $EII^t_{Man}$  étaient impliqués dans l'interaction avec la LcnA et dans la formation du complexe avec la protéine d'immunité LciA (**Diep et al., 2007**). Malgré les différences de séquence peptidique, d'autres bactériocines de classe IId comme la lactococcine B partagent ce même mode d'action (**Diep et al., 2007**).

### La lactococcine 972

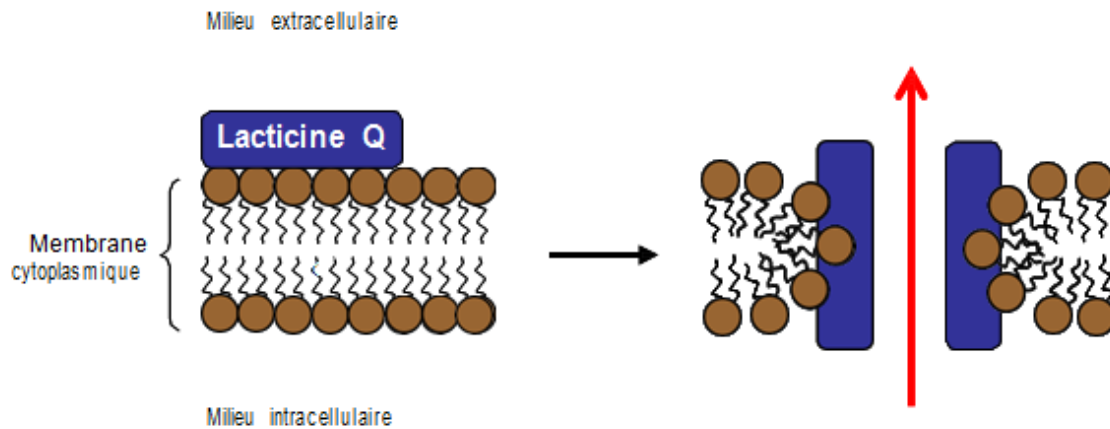
La lactococcine 972 est une bactériocine de 66 acides aminés chargée positivement produite par *Lc. lactis* OPLA972 (**Martínez et al., 1999**). Contrairement aux autres bactériocines de classe II, la lactococcine 972 n'agit pas sur la membrane cytoplasmique. En effet, elle agit sous forme d'homodimère et inhibe la biosynthèse du peptidoglycane, empêchant la formation des septa lors de la division cellulaire chez les bactéries du genre *Lactococcus* (**Martínez et al., 2000**). De plus, la lactococcine 972 active le système de régulation à deux composants CesSR (Cell Enveloppe Stress) chez les bactéries sensibles (**Martínez et al., 2007**). Le système CesSR, impliqué dans des voies de transduction de signal dépendantes des conditions extracellulaires, est très souvent activé lorsque le lipide II interagit avec un antibiotique (**Mascher et al., 2004**). Des études montrant l'inhibition de la polymérisation du lipide II par la lactococcine 972 *in vitro* confirment l'interaction de la bactériocine avec le lipide II (**Martínez et al., 2008**). La lactococcine 972 est ainsi la première bactériocine non antibiotique à interagir avec le lipide II.

### La lacticine Q

La lacticine Q est responsable de la perméabilisation des membranes plasmiques des bactéries sensibles par formation de pores sans nécessiter une interaction avec un récepteur membranaire, contrairement à la grande majorité des bactériocines de classe IIa (**Yoneyama et al., 2009a**). En interagissant avec les phospholipides membranaires (**Figure 20**), la lacticine Q induit la formation de pores toroïdes accompagnée d'un mouvement de « flip-flop » des phospholipides membranaires (**Yoneyama et al., 2009b**) (**Figure 20**). Ce type de pores est retrouvé pour des peptides antimicrobiens produits par des eucaryotes tels que la



magainine 2 (Yang *et al.*, 1998) et la mélittine (Lee *et al.*, 2004). La lacticine Q est, pour le moment, la seule bactériocine produite par des bactéries à Gram positif pour laquelle la formation de tels pores a été démontrée.



**Figure 20 :** Représentation schématique de la formation de pores toroïdes par la lacticine Q (Yoneyama *et al.*, 2009b).

La flèche rouge indique le flux d'ions et de molécules intracellulaires.

### III. Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire

#### III.1. Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire

Les bactériocines sont habituellement sensibles aux protéases digestives et manifestent aucune toxicité vis-à-vis les cellules eucaryotes. Elles tolèrent les variations de pH et les traitements thermiques. Leur spectre antibactérien varie considérablement. Les bactériocines manifestent un mode d'action bactéricide et inhibent selectivement les bactéries pathogènes, responsable d'altération sans nuire les bactéries indispensables. Les bactériocines constituent un moyen de préservation complémentaire (Galvez *et al.*, 2007 ; Deegan *et al.*, 2006).

#### III.2. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines sont utilisées sous différentes formes ; purifiée, semi-purifiée et concentré après la fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être appliquées directement dans la conservation des produits alimentaires.

##### III.2.1. L'application de la bactériocine

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après leur production dans un fermenteur. Leur purification ou semipurification et leur conditionnement s'effectuent par les techniques appropriées et adéquates.

D'un point de vue législatif, les bactériocines sont considérées comme des additifs alimentaires. La nisine reste le seul antibiotique autorisé d'être utilisé comme additif alimentaire (E234) (**Guinane et al., 2005**). Les bactériocines peuvent être aussi appliquées sous la forme concentrée, après la culture de souches productrices de bactériocine.

Cette préparation est un ingrédient fermenté qui contient la bactériocine et d'autres métabolites secondaires tels que l'acide lactique. La pédiocine est une bactériocine de classe IIa, commercialisée sous cette forme et porte le nom ALTA 2341. Des essais supplémentaires sur le antibiotique la lacticine 3147 ont été effectués (**Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste leur immobilisation sur les cellules productrices dans des gels, ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera par la suite libérée dans le produit alimentaire au cours de la conservation. Des emballages en polyéthylène et d'autres films en plastiques contiennent des bactériocines ont été développés.

Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes pouvant se développer sur leur surface durant la conservation des produits alimentaires (**Luchansky et al., 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**).

### **III.2.2. L'application de la bactérie productrice de bactériocines**

L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines est lucrative de point de vue législatif et économique. Les bactéries productrices de bactériocines sont ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice et doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans les produits alimentaires destinés pour la conservation. La composition du produit alimentaire destinés pour la commercialisation et leur conditions de stockage utilisées telles que la température, l'atmosphère, activité d'eau, doivent favoriser la croissance et la production de bactériocines. Cette production est souvent sous le contrôle d'un système de *Quorum Sensing*, la concentration des agents antibactériens doivent être présent en quantité suffisante et l'interaction avec la matrice alimentaire constitue un facteur limitant pour la prolifération des germes responsables d'altération.

Lorsque les bactéries productrices de bactériocines sont ajoutées en tant que starter dans des produits fermentés, elles doivent pouvoir conférer au produit les propriétés organoleptiques désirables avec la production des bactériocines. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées d'une manière combinée avec un autre starter, capable de conférer les propriétés organoleptiques désirables. Les bactéries productrices de bactériocines

doivent être dépourvues d'activité antibactérienne contre le Starter (**Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**).

L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines comme culture protectrice est conditionnée par la préservation des propriétés organoleptiques du produit alimentaire (**Rodgers, 2001**). A cet effet, la concentration maximale de la bioamasse bactérienne admise dans le produit alimentaire non fermentés doit être inférieure à  $10^6$  UFC/g.

### **III.3. Les facteurs influençant l'activité des bactériocines**

Lors d'une application alimentaire, la composition du produit peut constituer un facteur majeur de réduction ou d'inhibition de l'activité de la bactériocine, suite à son adsorption sur l'un des ingrédients du produit alimentaire. Les traitements appliqués aux produits alimentaires engendrent un second facteur intervenant dans la limitation de l'activité inhibitrice dans un produit alimentaire. A cet effet, les traitements thermiques trop élevés effectués dégradent la totalité des bactériocines présentes dans un produit alimentaire. D'une manière générale, la température du stockage d'un produit alimentaire réduit considérablement l'activité des bactériocines (**Galvez e et al., 2007**).

Le développement des nouvelles souches bactériennes résistantes aux bactériocines, la présence de microorganismes producteurs de protéases, capables de dégrader les bactériocines et l'état physiologique de cette flore, constituent un facteur limitant de l'activité des bactériocines. Par ailleurs, sur les produits alimentaires solides, les bactéries produisent des microcolonies et des biofilms manifestant des résistances aux bactériocines très élevées (**Schöbitz et al., 2003**).

### **III.4. La combinaison de différentes bactériocines**

La combinaison entre une large gamme de bactériocines appartenant aux différentes classes augmente l'activité antibactérienne et le spectre d'action. Cependant, une attention particulière devra être portée sur le problème du développement de la résistance de bactéries pathogènes traitées avec des bactériocines.

Le mécanisme de résistance des souches pathogènes aux bactériocines de classe IIa, est identique à celui de leur sous-classe. A cet effet, une bactérie manifestant une résistance vis-à-vis la bactériocine de classe IIa présente une résistance contre d'autres bactériocines de classe IIa. En outre, le phénomène d'apparition d'une résistance aux bactériocines de différentes classes chez une bactérie cible appelé « *cross-resistances* », peut être observé (**Deegan et al., 2006**).

### III.5. La combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La mise en œuvre d'une combinaison des bactériocines avec d'autres agents de conservation chimiques, physiques a donné des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. L'utilisation des agents chimiques tels que les acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles et leur impact sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires a été évaluée. L'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate sont des agents chélateurs qui séquestrent les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatives et favorisent la pénétration des bactériocines de la membrane externe, siège de leur activité. Les traitements physiques utilisés sont généralement la température, le stockage dans une atmosphère contrôlée et l'application de champs électrique avec une haute pression (**Rodgers, 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**).

Par ailleurs, l'utilisation des inhibiteurs de protéases, de protéines de soja empêche la dégradation des bactériocines présentes dans les produits destinés pour la conservation.

### III.6. La production et le conditionnement des bactériocines

#### III.6.1. La production des bactériocines

Les bactériocines produites généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance, sont ensuite dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique (**Savijoki et al., 2006**). La production de bactériocines peut être influencée par différents facteurs tels la performance de la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu de culture et la technologie de fermentation employée. Des études antérieures réalisées par **Moretro et ses collaborateurs (2000)** ont montré que la sakacin P produite chez *Lactobacillus sakei* est observée chez d'autres souches avec un potentiel de production variable.

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne stimule pas nécessairement l'optimisation de la production de bactériocines (**Parente et al., 1999**). **Verluyten et ses collaborateurs (2004)** ont suggéré que les conditions de croissance défavorables stimulent la production des bactériocines.

**Messens et ses collaborateurs (2003)** ont rapporté que la température et le pH optimal de production des bactériocines sont souvent inférieurs à celles de la croissance bactérienne observées. La composition du milieu de culture en sources carbone et azote et leur concentration affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques

productrices de bactériocines requièrent de nombreux nutriments tels que l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines, indispensables pour leur métabolisme. D'une manière générale, l'augmentation de la concentration d'extrait de levure, l'extrait de viande ou de peptone a favorisé la production de bactériocines (Aasen *et al.*, 2000 ; Nel *et al.*, 2001 ; Mataragas *et al.*, 2004 ; Todorov *et al.*, 2004 ; Verluyten *et al.*, 2004).

Par ailleurs, des études antérieures réalisées sur l'optimisation de la production de bactériocines ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration constituent un facteur de production très important (Leal-Sanchez *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007 ; Anastasiadou *et al.*, 2008).

Lors de l'ajout des nutriments dans une culture *fed-batch* a permet d'augmenter la production de bactériocine par rapport à une culture en *batch* (Callewaert *et al.*, 2000 ; Pérez Guerra *et al.*, 2005). La mise en œuvre de la technique des cellules immobilisées permet l'augmentation de la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules sont immobilisées dans des biofilms ou dans des billes d'alginate de calcium. L'utilisation de cette technique dans le processus de production de lacticine 3147 et la nisine a donné un excellent rendement (Scannell *et al.*, 2000 ; Pongtharangkul *et al.*, 2006).

### III.6.2. Le conditionnement des bactériocines

La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que les échanges d'ions, les interactions hydrophobes et l'affinité à haute performance de chromatographie liquide. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium.

Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple. La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (Parente *et al.*, 1999).

## **IV. Les huiles essentielles**

### **IV. 1. Historique**

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (**Baser & Buchbauer, 2010**). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc. L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (**Besombes, 2008**).

### **IV.2. Définition**

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ième</sup> siècle par le médecin Suisse Paracelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**Burt, 2004**). De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. D'après William Naves [1874-1936], aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme « des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau » (**Garnéro, 1996**). Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Pour certains auteurs comme **Carette (2000)**, il est important de distinguer huile essentielle et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée. Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (**Degryse et al., 2008**). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent, en particulier les Labiées, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées (**Benayad, 2008**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (**Bruneton, 1999; Hazzit, 2002; Boz et al., 2009**). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines (**Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005**).

### IV.3. Biosynthèse et composition chimique

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc. (**Garnéro, 1996**). Il en résulte que les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes de composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Lahlou, 2004**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (**Bruneton, 1999; Seguin, 2001; Rhayour, 2002; Bowles, 2003; Chami, 2005; Clarke, 2008; Baser & Buchbauer, 2010**) d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1993 ; Bruneton, 1999**).

#### **IV.4. Caractéristiques et propriétés physiques**

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**). Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de saffran, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (**Bruneton, 1999; Rhayour, 2002; Desmares et al., 2008**).

Elles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol ...) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (**Bernadet, 2000**).

Les huiles essentielles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille (**Rhayour, 2002; Benini, 2007; Benayad, 2008**). Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (**Bruneton, 1999**).

#### **IV.5. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

##### **IV.5.1. Essais de l'activité antioxydante dans les aliments**

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (**Hussain et al., 2008, 2010**). Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (**Hussain, 2009**).

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet,



fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

**Banias et al. (1992)** ont étudié les activités antioxydantes de combinaison des extraits de plantes de thym, origan, marjolaine et sauge avec l'acide citrique en saindoux stockés à 75°C. Ils ont trouvé une efficacité synergique de l'acide citrique avec les extraits de thym.

Une étude a été conçue pour comparer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Centella asiatica* et celle du BHA. Les teneurs en acide gras libre (FFA), les teneurs en peroxyde (PV), les teneurs en iode, les diènes conjugués (Cd) et les triènes conjugués (Ct) sont déterminés pour surveiller l'activité antioxydante de l'huile essentielle et du BHA dans l'huile de tournesol. L'huile essentielle a montré une activité antioxydante forte en interdisant l'augmentation des paramètres oxydants mentionnés ci-dessus (**Raza et al., 2009**). Récemment, une autre étude a été réalisée pour essayer la formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de Citrus limon, en vue de les exploiter et de les substituer à un additif synthétique : le Tocoblend. L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de Rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de Citrus limon étaient plus résistantes que celle au Tocoblend vis-à-vis de l'oxydation forcée (**Himed, 2011**).

#### **IV.5.2. Essais de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments**

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles ont été employées pendant des milléniums pour fournir des saveurs caractéristiques pour les aliments et les boissons (**Baydar et al., 2004**). En plus de la saveur contribué aux aliments, beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient empêcher la croissance des microorganismes d'altération et pathogènes, améliorant de ce fait la sécurité alimentaire (**Sacchetti et al., 2005 ; Hadizadeh et al., 2009; Piyo et al., 2009 ; Udomsilp et al., 2009**). La plupart des publications ont confirmé la possibilité d'employer les huiles essentielles dans les aliments pour prolonger la durée de conservation des aliments (**Bagamboula et al., 2004 ; Piyo et al., 2009 ; Hadizadeh et al., 2009; Souza et al., 2009 ; Foda et al., 2010; Ghasemi et al., 2010**). Par exemple l'origan, le romarin, la sauge et le thym sont les assaisonnements typiques particulièrement dans la région méditerranéenne. Ces herbes ont un statut de GRAS donné par Food and Drug Administration (2006), signifiant

qu'elles sont généralement sûres et sans danger pour la consommation humaine (**Rasooli et al., 2008**).

Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des huiles essentielles, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (**Fenaroli, 1995**). Il y est rajouté pour améliorer le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (**Rhayour, 2002**). Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (**Bilgrami et al., 1992 ; Beraoud, 1990 ; Nielsen & Rios, 2000**).

Dans certains cas, les concentrations des huiles essentielles nécessaires pour inhiber les micro-organismes dans un aliment dépassent celles in vitro. Quand un extrait est mélangé dans un aliment, l'effet antimicrobien est réduit par la réaction ou interaction avec les composants des aliments (**Pandit et Shelef, 1997; Karatzas et al., 2001**). Une disponibilité d'éléments nutritifs est plus élevée dans les aliments une fois comparée au bouillon ou à l'agar synthétique ce qui permet à quelques bactéries de devenir capables de réparer plus rapidement les dommages cellulaires provoqués par des composés d'huiles essentielles (**Souza et al., 2006b**).

Des huiles essentielles d'eugénol, de clou de girofle, d'origan et du thym se sont avérées efficaces à un niveau de 5-10µl/g pour *Listeria monocytogenes* dans des produits à base de viande (**Vrinda Menon et Garg, 2001**). La teneur en graisse semble réduire nettement l'action d'huiles essentielles dans des produits à base de viande. Par exemple, l'huile essentielle de la menthe n'était pas efficace dans les produits avec un taux élevé de graisse (**Tassou et al., 1995 ; Gill et al., 2002**).

Plusieurs huiles essentielles des plantes aromatiques ont totalement empêché le développement fongique sur des grains de maïs (**Montes-Belmont et Convajal, 1998**) et sur des grains de riz (**Piyo et al., 2009**).

L'application des huiles essentielles comme substances antimicrobiennes dans les aliments est souvent découragée en raison de la perte potentielle d'action antimicrobienne due à leur volatilité et lipophilicité. Une alternative serait d'examiner les aliments qui n'exigent pas l'incorporation directe d'huile essentielle, par exemple la décontamination des légumes frais (**Bagamboula et al., 2004 ; Hadizadeh et al., 2009**). **Foda et al., (2010)** ont proposé d'incorporer les huiles aux produits qui ont déjà une saveur forte, ou employer les composants

les plus actifs au lieu de l'huile essentielle entière. Ceci réduirait les changements des propriétés organoleptiques, tout en maintenant l'activité antimicrobienne.

Peu de conservateurs contenant des huiles essentielles sont déjà disponibles dans le commerce. Le « DMC Base Natural » est un conservateur produit par DOMCA S.A., AlhendIn, Granada, Spain et comporte 50% des huiles essentielles du romarin, de la sauge et du citron. Les « Protecta One » et « Protecta Two » sont des mélanges d'extraits d'herbes produits par Bavaria Corp. Apopka, FL, USA et sont classés comme des additifs alimentaires GRAS aux USA (**Burt, 2004**).

Il est recommandé d'appliquer les huiles essentielles ou leurs composés en tant qu'élément d'un système d'obstacle et de les employer comme composant antimicrobien avec d'autres techniques de conservation, par exemple en combinaison avec la température et le pH réduits; d'employer une combinaison synergique d'huiles essentielles et de leurs composés (**Koutsoumanis et al., 1999 ; Ultee et al., 1998 ; Bagamboula et al., 2004; Yen & Chang, 2008; Patrone et al., 2010**), de ce fait permettant de diminuer leurs concentrations et de réduire au minimum des effets sensoriels défavorables. À cet égard, beaucoup de combinaisons avec d'autres composés (antimicrobiens) ont été examinées. La nisine, un agent antimicrobien, qui n'a pas une activité contre des bactéries Gram-, combinée avec le carvacrol ou le thymol a montré un effet synergique sur la viabilité des cellules de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* (**Ettayebi et al., 2000; Periago et al., 2001**). D'ailleurs, des effets synergiques ont été rapportés entre l'HE de la cannelle et le benzoate de sodium ou le sorbate de potassium (**Ceylan et al., 2004**) et entre l'HE de *Origanum vulgare* L. et l'acide citrique dans de la viande contre *Staphylococcus aureus* (**Souza et al., 2009**).

#### **IV.6. Mode d'action des huiles essentielles**

Dans la bibliographie scientifique, il n'y pas un grand nombre d'auteurs ayant rapporté le mécanisme d'action des huiles essentielles et leurs composants, et jusqu'à maintenant ils n'ont pas totalement compris le mécanisme. Mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations.

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Souza et al., 2006b; Bajpai & Kang, 2010**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule

bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémoosmotique et une fuite d'ions (K<sup>+</sup>) (Souza *et al.*, 2006b). Des conclusions similaires sont obtenues par d'autres auteurs (Rhayour, 2002).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Pavel *et al.*, 2009). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides (Malecky, 2007). D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (Rhayour, 2002).

## V. *Inula viscosa*

### V.1. Description botanique et habitat

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Asterales

**Famille** : Astéracées (composées)

**Genre** : *Inula*

**Espèce** : *viscosa*

*Inula viscosa* (L) (Figure 21) est une plante annuelle, herbacée, visqueuse et glanduleuse, à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées (Composées). Elle peut atteindre 50 cm à 1 m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreuses au sommet de la tige.



**Figure 21** : *Inula viscosa* du Parc National de Chréa, Blida.

Les feuilles sont entières ou dentées, aiguës, sinuées, les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées avec capitules assez gros en longues grappes pyramidales (**Quezel et Santa , 1963**). Cette plante est largement répandue dans le nord de l'Algérie et dans le bassin méditerranéen. Elle est rencontrée dans les rocailles, les garrigues, les terrains argileux un peu humides et sur les bords des routes (**Benayache et al., 1991**).

Son histoire thérapeutique est très diversifiée, connue depuis longtemps dans les médications traditionnelles (**Susplugas et al., 1980**). L'*Inule visqueuse* est une plante toute glanduleuse-visqueuse, réputée être un "insecticide végétal" contre la mouche de l'Olivier.

## V.2. Description du genre *Inula*

*Inula* est une plante annuelle à tige entièrement herbacée, de 20-70 cm et contient des feuilles entières ou peu denticulées ; les inférieures linéaires-oblongues, obtuses, longuement atténuées à la base ; les caulinaires supérieures linéaires sessiles et aiguës, non amplexicaules. L'*Inula* est plante pubescente-glanduleuse, visqueuse, à odeur fétide, bractées externes de l'involucre herbacées, les intérieures scarieuses au bord.

Les capitules sont petits, pédonculés, terminaux et latéraux, groupés en panicule pyramidale lâche et pousse dans les lieux pierreux et incultes surtout dans le Tell. Les fleurs sont jaunes avec une circonférence souvent violacées (**Quezel et Santa, 1983**).

- **D'autres espèces** : *inula bifrons*, *inula britanica*, *inula conyza*, *inula ensifolia*, *inula graveolens*, *inula helenium*, *inula helvetica*, *inula hirta*, *inula montana*, *inula salicina*, *inula spiraeifolia*.

## V.3. Description de la famille des Asteraceas

La famille des Asteraceas est considérée comme la plus importante des phanérogames avec 20 000 espèces et très répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. Elles sont une des plus belles réussites de l'évolution.

Les *Astéraceas* sont caractérisées par :

- ✓ l'inflorescence en capitule ;
- ✓ les fleurs, très particulières, à anthères soudées (d'où le nom de Synanthérées également donné à la famille) ;
- ✓ Le fruit, un akène généralement surmonté d'un Pappus.

## V.4. Appellation

Nom arabe: el tibek, el tayoun, el rassen el dabik, et chez nous elle s'appelle megremen, safsak, mersit, hfina.

Nom kabyles : afjded, niret, tlirine. Elle n'était pas reconnue par les anciens herboristes.

Nom français : inule visqueuse, aunée visqueuse.

Nom anglais : *Rock Flea - bane*.

## V.5. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques

*Inula viscosa* (L.) Aiton (= *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), Asteraceae, est une plante herbacée vivace topique utilisée dans la médecine traditionnelle comme antigale, anti-inflammatoire (**Daino et al., 2009**), connue pour ses propriétés antiseptiques et son efficacité contre les inflammations de la peau (**Hernandez., 2007**), antilytique rénal, diurétique, Antihypertensive (**Fresquet et al., 1993**). L'*inule visqueuse* est un désinfectant, un cicatrisant, et un déodorant de premier ordre. Elle est également employée contre les affections pulmonaires et les maux de tête (**Djerrumi et Nacef, 2004**).

Chez l'*inula helenium* (elecampane, en anglais), l'alantolactone et son isomère, constituants majeurs de l'huile essentielle, ont des propriétés antibactériennes notamment contre mycobacterium tuberculosis, anti-protazoaires contre Entamoeba histolytica, qui cause des amibiases et antifongiques contre des pathogènes opportunistes comme certains dermatophytes (**Mohammedi, 2006**).

Les feuilles de l'*Inula visqueuse* secrètent un mélange de résines tout en long de la durée de vie des feuilles. Ces exsudats se composent de plusieurs flavonoïdes aglycones, ainsi que de nombreux terpenoïdes. Elles sont utilisées couramment pour prolonger la durée de conservation de nourriture et dans la médecine traditionnelle et possèdent une forte activité allélopathique et antimicrobienne ((**Adam et al., 1998 ; Stavrianakou et al., 2006**).

Les parties aériennes de la plante sont employées comme décoction dans le traitement du diabète, de l'hypertension et des maladies rénales, dans le secteur méditerranéen. Elle a été employée dans la médecine traditionnelle pour ses activités antipyrétiques, antiseptiques et anti-inflammatoires (**Zeggwagh et al., 2006**).

### V.6.1. Les molécules Extraites d'*Inula viscosa*

#### a. Les huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Inula viscosa*, est effectuée par chromatographie CG/MS. Parmi les 53 constituants identifiés qui représentent 60% de l'huile, les sesquiterpènes alcooliques fokienol(38.8%) et (E)-nerolidol(7.1%) sont les principaux composants (**Camacho et al., 2000**).

## b. Les terpenoïdes

Une étude phytochimique a été faite sur la racine et les parties aériennes d'*Inula Viscosa* Espagnole. Cette dernière a permis l'isolement de quelques nouveaux sesquiterpénoïdes tels que : 9-isobutyroxynerylol (1), 9-isovaleroyloxynerylol (2), 9-(2-méthylbutyroxyneryl) nerylol (3), 11-méthoxy-3, 7, 11-triméthyl-dodeca-1,6,9-trien-3-ol (4) et 2,5-peroxyeudesma-3,11(13)-dien-12-oïque acide(5) (Torres et Pera, 1992).

*L'Inula viscosa* d'origine Jordanienne a fait l'objet d'isolement de quatre nouveaux sesquiterpènes tels que : acide 11(13)-eudesmen-12-oïque, acide 3 $\alpha$ -hydroxyilicique (6), acide 3 $\alpha$ -hydroxy-epilicic(7), acide 2 $\alpha$ -hydroxyilicique(8) et acide 9 $\alpha$ -hydroxy-2-oxoisocostique(9) en plus des quatorze autres connus tels que : 3,3'-di-O-méthylquercétine, 3-O-acétylpadmatine, 3-O-méthylquercétine, hispiduline, nepétine, 2-desacétoxyxanthinine, inuviscolide, acide 2-oxoisocostique, acide ilicique, acide viscique,  $\alpha$ -sitosterol,  $\alpha$ -sitosteryl glucoside, 4'-triméthoxy-5, 3'-dihydroxyflavone, et 11 $\alpha$ ,13-dihydroinuviscolide (Abu Zargua *et al.*, 1998).

## c. Les composés phénoliques

Plusieurs composés polyphénoliques ont été isolés et identifiés à partir d'un extrait méthanolique des feuilles d'*Inula Viscosa*. Ainsi l'acide 1,3-dicaffeoylquinique (Figure 22) présente une activité antioxydante dans différentes cellules pathologiques (Danino *et al.*, 2009).

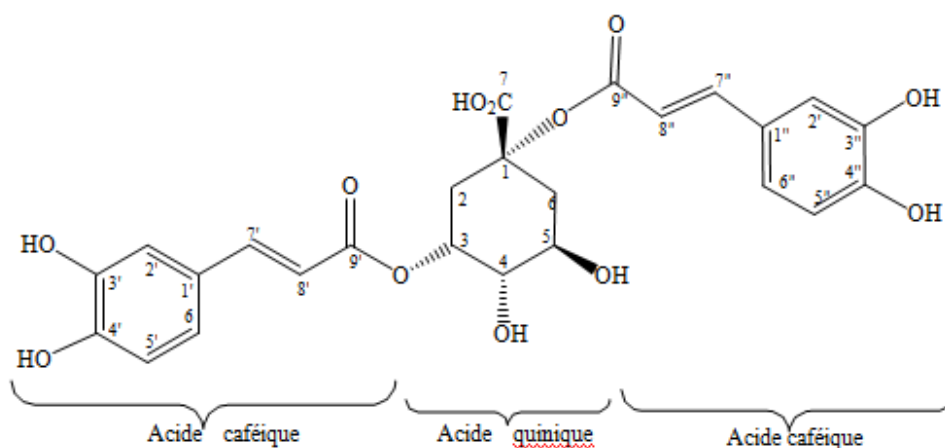


Figure 22 : Structure chimique de l'acide 1,3-dicaffeoylquinique.

En 2007 d'autres chercheurs espagnols ont pu isoler et caractériser trois flavonones à partir des parties aériennes de *Dittrichia Viscosa* d'origine Espagnole: sakuranetine (**10**), 7-O-méthylaromadendrine (**10a**) et 3-acétyl-7-O-méthylaromadendrine (**10b**), une activité anti-inflammatoire sur différents enzymes comme elastase, myeloperoxidase (MPO) et protéine kinase C (PKC)) a été montrée, le 7-O- méthylaromadendrine (ED50 = 8 mg/kg) et le sakuranetine (ED50 = 18 mg/kg) ont présenté une meilleure activité (**Hernandez et al., 2007**).

### V.6.2. Activités biologiques d'*Inula viscosa*

L'huile essentielle de la partie fleurie d'*Inula viscosa* de la région de Tlemcen possède un pouvoir antifongique puissant contre cinq moisissures étudiées. Cette efficacité est expliquée par la présence de fortes concentrations des sesquiterpènes et plus particulièrement les carboxydesmadienes. Cette caractéristique peut être exploitée dans l'industrie agro-alimentaire afin d'augmenter la durée de vie d'un grand nombre de produits alimentaires en particulier les corps gras dans l'industrie pharmaceutique et thérapeutiques pour prévenir et traiter diverses maladies humaines (maladies cancérigènes).

Une étude antérieure réalisée sur *Dittrichia viscosa* d'origine Marocaine a révélé une importante activité antibactérienne des différents extraits des feuilles et des fleurs vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Les résultats des activités antibactériennes est fortement liés à l'origine de l'extrait (feuille ou fleur), la nature du solvant et la souche testée. Les extraits méthanoliques se manifestent très actifs, suivis par extraits éthanoliques, de l'acétone. *E. coli* se manifeste sensible vis-à-vis les différents extraits (**Bssaibis et al., 2009**).

L'étude réalisée sur l'activité biocide de l'extrait méthanolique de l'*Inula Viscosa* de la flore espagnole contre les insectes a montré que la présence de métabolites secondaires, qui jouent un rôle principal dans la défense contre l'attaque d'insectes et leur croissance. Le tritriacontane est extrait et caractérisé comme composé majeur dans la plante. Cet hydrocarbure est caractérisé comme composant important des extraits cuticuleux de lipides de quelques espèces d'insectes (**Cunat et al., 1990**). Par ailleurs, les extraits d'éther de pétrole (EP) et méthanolique de neuf espèces des plantes Libanaises sauvages, ont été examinés in vitro contre huit mycètes phytopathogéniques.

L'*Inula Viscosa* se manifeste fortement efficace (> 88%) lors des essais réalisés sur la germination de spore contre cinq mycètes. **Abou-Jawdah** ses collaborateurs (**2002**) ont rapporté que l'*Inula viscosa* possède une meilleure activité antimycosique in vitro. La partie



aérienne de la plante a fait l'objet d'une autre recherche sur l'évaluation de l'activité hypoglycémique et hypolipidémique d'extrait aqueux d'*Inula viscosa* chez les rats normaux et diabétiques.

L'étude suggère que l'extrait aqueux d'*Inula viscosa*, à une dose de 20 mg/kg manifeste une activité hypoglycémique chez les rats normaux et diabétiques. Cependant, aucune activité hypolipidémique n'a été observée. Des administrations par voie orale simples et répétées ont été employées dans cette étude (**Zeggwagh et al., 2006**). Une étude antérieure effectuée sur l'exsudat epicuticulaire de feuille de *Dittrichia viscosa* des rudéral méditerranéen, hydrosoluble et facilement écoulé au sol par la pluie. Par conséquent, le sol enrichi avec ce matériel biologique bloque la germination de graine de la *Laitue*. Cependant, la germination du *Maritima* de *Malcolmia* (espèces souvent rencontrées avec le *Dittrichia Viscosa*) est considérablement retardée (**Levizou et al., 2002**).

# **Matériel et Méthodes**

## MATERIELS ET METHODES

### I. Bactéries et conditions de culture

#### I.1. Souches cibles

Afin d'explorer le spectre d'activité des espèces de bactéries lactiques sélectionnées et des huiles essentielles *d'Inula viscosa*, des tests de l'activité antagonistes vis-à-vis un certain nombre de germes pathogènes ont été effectués. Les souches témoins de l'activité antagoniste utilisées proviennent du groupe Saidal Antibiotical de Médéa et du CHU Frantz Fanon de Blida (**Tableau 2**). Des tests de caractérisation cultureux et morphologiques (Gram et catalase) ont été effectués au préalable.

**Tableau 2** : Origine et les conditions de culture des souches témoins de l'activité antagoniste.

<b>Germes cibles</b>	<b>Milieu d'incubation</b>	<b>Temps d'incubation</b>	<b>origine</b>
<b>Bactéries Gram positives</b>			
<i>Bacillus cereus</i>		30°C ,18-24 heures	SAIDAL-Médéa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose nutritif (liquide et solide)	30°C ,18-24 heures	CHU-Blida
<b>Bactéries Gram négatives</b>			
<i>Escherichia coli</i>		30°C ,18-24 heures	CHU-Blida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		30°C ,18-24 heures	SAIDAL-Médéa

#### I.2. les bactéries lactiques

##### I.2.1. Collecte des échantillons

Les échantillons du lait cru de chèvre (Arabia) proviennent des fermes d'élevage situées dans la ville de Blida,. Les prélèvements sont réalisés durant toute l'année 2013, dans des conditions aseptiques transportés le jour même au laboratoire afin d'effectuer les analyses microbiologiques. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée puis séchage avec une lingette stérile du pis (sans trayons) de la chèvre, le lait est recueilli dans des flacons stériles (100 ml/flacon).

## **I.2.2. Isolement des souches de bactéries lactiques**

### **Enrichissement et préparation des dilutions**

Dans un flacon stérile, un volume de 10 ml de lait cru est mélangé avec 90 ml du bouillon tryptone sel afin d'obtenir une population bactérienne d'une dilution décimale de  $10^{-1}$ . Après, l'incubation à une température de 45°C pendant 24 heures, des dilutions décimales préparées sont inoculés dans le bouillon Tryptone sel selon le protocole décrit par **Guiraud et ses collaborateurs (1998)**.

### **Ensemencement**

Un volume de 0.1 ml d'une solution mère et des dilutions décimales ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) sont étalés sur la surface de la gélose du MRS (Fluka). Les boîtes sont ensuite incubées en anaérobiose à une température de 30°C pendant 72h (**Ghazi et al., 2009**).

### **Purification**

Les colonies isolées sont repiquées d'une manière alternée sur MRS liquide et solide. Chaque colonie isolée est prélevée du MRS solide en boîte de Pétri et transférée sur MRS liquide (**Ghazi et al., 2009**).

### **Conservation des isolats**

#### **La conservation à court terme**

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur la surface de gélose inclinée. Après incubation à une température 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fait toutes les trois semaines (**Saidi et al., 2002**).

#### **La conservation à long terme**

A partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le milieu de culture de conservation est ajouté au culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à une température de -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé contenant à une concentration de 0,5% d'extrait de levure, (**Saidi et al., 2002**).

### **I.2.3. Identification primaire du genre**

#### **I.2.3.1. Etude morphologique**

##### **Observation macroscopique**

Les colonies isolées sont identifiées par la détermination de leur couleur, leur forme, leur contour, aspect de leur relief et leur texture (**Trotel-Aziz *et al.*, 2008**).

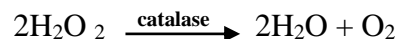
##### **Observation microscopique**

Les colonies sont observées à l'état frais entre lame et lamelle, afin de déterminer la morphologie, la forme et le mode de regroupement. La coloration de Gram et l'observation microscopique sont effectuées, afin de différencier entre les deux grands groupes bactériens, gram positif et gram négatif.

#### **I.2.3.2. Tests biochimiques**

##### **I.2.3.2.1. Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène, après inoculation d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes (**Marchal *et al.*, 1982**).

##### **I.2.3.2.2. Type de fermentation**

La mise en évidence de la production du CO<sub>2</sub> à partir du glucose s'effectue lors de l'inoculation d'un tube à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS glucosé dépourvu d'extrait de viande et de citrate et muni d'une cloche de Durham. Une réaction positive se traduit par la production de gaz dans la cloche de Durham, incubée à une température pendant 18-72h .

#### **I.2.4. Identification des espèces**

Les souches sélectionnées antagonistes sont repiquées sur bouillon de MRS, identifiées sur la base des données d'identification rapportés par **Johnson *et al.*, (1980)** ; **Schleifer *et al.*, (1985)** ; **Devoyod *et al.*, (1997)** et complétée par la galerie API system 50 CHL.

#### **I.2.4.1. Effet de la température sur la croissance des souches antagonistes**

Dans le but d'explorer l'effet de la température sur la croissance des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS sont ensemencés avec les souches tests antagonistes, incubés à différentes températures (37, 40, 50 °C). La production de la biomasse bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm à un intervalle de temps d'incubation de 24-72h (Ghazi *et al.*, 2009).

#### **I.2.4.2. Effet du pH sur la croissance des souches antagonistes**

Dans le but de tester effet de la valeur du pH sur la croissance des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS à différentes valeur de potentiel d'hydrogène (pH) (4.2, 6.5, 7,8), sont inoculés avec des souches sélectionnées antagonistes.

#### **I.2.4.3. Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches antagonistes**

Dans l'optique d'apprécier la croissance des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes à différentes concentration de NaCl, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS à différentes concentrations en NaCl (2, 4, 6.5, 10, 18%) sont inoculés avec les souches sélectionnées antagonistes, incubées à une température de 37°C, pendant 24h.

#### **I.2.4.4. Activité protéolytique**

Des cultures âgées de 24h des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes sont ensemencées par touche à la surface de la gélose du milieu de culture de PCA contenant une concentration de 4.5% de lait écrémé. Une lecture positive de l'activité protéolytique se traduit par la formation d'un halo clair autour de l'inoculation bactérienne après 18-24h d'incubation.

#### **I.2.4.5. Identification de l'espèce par galerie API 50 CHL**

Dans le but d'identifier l'espèce des souches lactiques sélectionnées antagonistes, l'étude du profil de la fermentation des hydrates de carbone sur une galerie API 50 CH est réalisée. La galerie API 50 CH (biomérieux) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Une suspension bactérienne est inoculée dans le milieu MRS-BCP (sans extrait de viande), réparti dans les 50 tubes de la galerie à l'aide d'une micropipette stérile, incubé à une

température de 30°C pendant 24 et 48 heures. Une lecture positive de la fermentation des hydrates de carbone se traduit par le virage de la couleur du milieu de culture, dû principalement à la production d'acide en anaérobiose. Les résultats sont traités selon les recommandations décrites par Carr *et al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006), comparés avec la banque de données de «Biomérieux».

## II. Criblage des souches antagonistes

Le criblage primaire des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes s'effectue par la technique indirecte décrite par Barefoot *et al.*, (1983), qui consiste à mettre en contact le surnageant de la souche lactique sélectionnée productrice de substance antimicrobienne avec le germe témoin. Les souches sont cultivées dans le milieu MRS liquide, incubées à une température de 30°C, pendant 18 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 15000 g pendant 10 min, température de 4°C, neutralisé avec une solution de 1N NaOH à une valeur de pH comprise entre 6,5-7, filtré à l'aide d'un filtre Millipore stériles de diamètre 0,22 µm et conservé.

La surface de la gélose MRS solide estensemencée avec le germe témoin de l'activité antagoniste et un volume de 100 µl du surnageant de la souche sélectionnée antagoniste est introduit dans les puits. Ensuite, les cultures sont incubées à une température de 30°C, pendant 24-48 heures. Une lecture positive de l'activité antagoniste se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition autour des puits avec un diamètre supérieur de 2 mm.

## III. Caractérisation de l'agent antagoniste

### III.1. Détermination de la thermorésistance

Dans le but de déterminer la thermorésistance de l'agent responsable de l'activité antagoniste, différentes fractions du surnageant sont soumises à des traitements thermiques à des températures de (60, 80, 100, 121°C) pendant 10 mn à une valeur de pH optimale de 5. Après refroidissement, l'activité antagoniste est mise en évidence vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC25932 et *Bacillus cereus*.

### III.2. Détermination du pH optimum

Dans le but d'explorer le pH optimum de l'agent responsable de l'activité antagoniste, le surnageant récupéré par centrifugation est ajusté avec une solution de 1N NaOH entre 4-7, filtré à l'aide d'un filtre Millipore stériles de diamètre 0,22 µm.

Ensuite, l'activité antagoniste des surnageants est mise en évidence vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et *Bacillus cereus*, incubées à une température de 37°C, pendant 1 heures par la méthode des disques (Anastasiadou *et al.*, 2008).

### III.3. Effets des enzymes protéolytiques

La détermination de la nature des agents responsables des activités antagonistes est effectuée par l'étude de l'effet de l'enzyme protéolytique la Trypsine (Merck from Bovine pancréas 40 UI/mg). Les surnageants des souches sélectionnées antagonistes (BL16, BL 20 et BL50) récupérés par centrifugation sont ajoutés à l'enzyme Trypsine à une concentration de 1mg/ml ajusté à une valeur de pH de 6,5, incubés à 37 °C pendant 1 heure. La réaction enzymatique est stoppée par un traitement thermique à 65°C pendant 10 mn (Ten Brik *et al.*, 1994).

### III.4. Purification partielle de la bactériocine

Les souches des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes sont cultivées dans un milieu de culture de MRS à une température de 37°C pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 5000 g pendant 10 min, température de 4°C. Différentes concentrations de sulfate d'ammonium sont ajoutées au surnageant, le mélange est soumis à une agitation pendant 30 min. Ensuite, les précipités sont récupérés par centrifugation à une vitesse de 10 000 g pendant 10 min, dissous dans une solution tampon de 20 mmole phosphate de sodium, ajustés à une valeur de pH 6,0 (Joshi *et al.*, 2006).

### III.5. Détermination de la CMI des bactériocines

Les CMI des bactériocines partiellement purifiées produites par les souches BL 16, BL20 et BL 50 sont déterminées comme décrit par Van Kuijk, Noll, et Chikindas (2011) avec quelques modifications. *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est cultivé dans du bouillon nutritif et incubées à 30 °C pendant 24 h, Des dilutions avec le bouillon nutritif à une concentration cellulaire finale de 10<sup>6</sup> UFC / ml sont préparées. Des dilutions des bactériocines partiellement purifiées dans de l'eau stérile sont aussi préparés pour obtenir des concentrations finales de 2,38, 2,04, 1,70, 1,36, 1,02, 0,68 et 0,34 µg / ml. La Nisine (Sigma, St Louis, MO, USA), est utilisé comme témoin positif, et une concentration de 10 mg / ml est préparée en utilisant 0,02 N HCl (pH 1,7), et 50 µl de cette solution est ajouté aux tubes contenant 150µl de la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932. Le bouillon nutritif non inoculés est utilisé comme témoin négatif. Le contrôle positif est préparé avec des tubes contenant 200 µl



de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 sans bactériocine. Les tubes sont incubés pendant 24 h à 30 °C et la densité optique de chaque tube est mesurée à 600 nm.

### III.6. Mode d'action de la bactériocine

Dans le but d'explorer l'effet des bactériocines partiellement purifiées sur la croissance du germe témoin de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, deux cultures de la souche témoin de l'activité antagoniste sont inoculées sur bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C avec agitation.

Un volume de 1 ml du surnageant des souches de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes est ajouté aux cultures des germes témoins de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, inoculée dans un milieu de culture, au début de la phase exponentielle. Des prélèvements stériles à des intervalles de temps réguliers sont effectués afin d'évaluer la croissance bactérienne.

## IV. Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles d'*Inula viscosa*

### IV.1. Matériel végétale

La matière végétale utilisée au cours de cette étude est *Inula viscosa*, récolté au mois d'Octobre 2014 dans le Parc National de CHREA BLIDA (**Figure 23**). La plante est séchée à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours, transformée en poudre puis soumise à l'extraction.



**Figure 23** : *Inula viscosa* en période de floraison.

## IV.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles (H.E) est procédée par hydrodistillation avec l'utilisation de l'appareil de type Clevenger. Une pesée de 150 g de matière végétale est transvasée dans un ballon de deux litres auquel un volume de 1500 ml d'eau distillée est ajouté. L'ensemble est porté à ébullition pendant 4 heures. L'H.E est entraînée par la vapeur d'eau, condensée par passage dans le condensateur. Le liquide recueilli en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface, séparée par la suite, après repos du liquide. Les huiles essentielles récupérées sont traitées avec quelques cristaux de sulfates de magnésium anhydre afin d'éliminer l'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres à l'abri de la lumière et de la chaleur.

## IV.3. Le rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en H.E (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'H.E obtenue après l'extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ). Le rendement est exprimé en pourcentage et donné par la formule suivante :

$$RHE (\%) = \frac{M'}{M} \times 100$$

## IV.4. Étude analytique de l'huile essentielle

### IV.4.1. Mesure des indices chimiques

#### IV.4.1.1. Détermination de l'indice d'acide (I.A) (NF ISO 1242 :1999 (T 75-103))

L'indice d'acide est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'H.E. Une pesée de 2 g d'H.E introduite dans un ballon est neutralisé à un volume de 5 ml d'éthanol à une concentration de 95°, additionnée de 5 gouttes de rouge de phénol. La titration est effectuée avec une solution de KOH de à une concentration de 0,02 mole/l (1,12 g/l) jusqu'à l'apparition du virage de coloration.

Le volume de la solution KOH utilisé est pris en considération. Le contenu du ballon est conservé pour les analyses ultérieures (indice d'ester). L'IA est donnée par l'équation suivante :

$$IA = \frac{V \times C \times 56.11}{m}$$

où

V : volume (ml) de KOH utilisé pour le titrage.

C : concentration (Mole/l) de KOH.

m : masse (g) de la prise d'essai.

#### IV.4.1.2. Détermination de l'indice d'ester (I.E) (AFNOR NF T 75-104 : 1994)

L'indice d'ester est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'H.E. Cette détermination est effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide. Une pesée de 25 ml de solution KOH (0,5 mol/l) est ajoutée dans le ballon. Un réfrigérant à reflux est adapté au ballon qui sera placé sur le manteau. Après 1 heure de chauffage, le ballon est laissé à refroidir. 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de rouge de phénol sont ajoutées. La titration de l'excès de KOH est effectuée avec une solution d'acide chlorhydrique (0,5 mol/l). En parallèle, un essai à blanc (eau distillée au lieu de l'HE) est effectué dans les mêmes conditions. 5 ml d'éthanol neutralisé sont ajoutés avant l'ajout des 25 ml de solution KOH. L'indice d'ester est calculé par l'équation suivante :

$$IE = 28.05(V0 - V1)$$

où

V0 : volume (ml) de solution d'HCl (essai à blanc).

V1 : volume (ml) de solution d'HCl (détermination de l'IE).

#### IV.4.2.. Mesure des grandeurs physiques

##### IV.4.2.1. Détermination de la densité relative à 20°C (d<sub>20</sub>)

La densité relative est le rapport de la masse d'un volume d'H.E à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Vu le manque d'une quantité suffisante d'H.E, une méthode non homologuée est adoptée, qui consiste à prélever à l'aide d'une micropipette un volume de 1 ml d'HE et de le peser avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température :

$$d_{20} = (m_{HE} / m_{H2O}) + (0,00073 \times (T^{\circ}\text{échant} - 20))$$

m : masse en gramme.

T : température en °C.

#### IV.4.2.2. Détermination de l'indice de réfraction (I.R) (ISO 280 : 1999 (75-112))

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée,. Le réfractomètre est réglé par mesure de l'indice de réfraction de l'eau distillée, qui doit être de 1,333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, Deux gouttes d'HE sont déposées sur la partie centrale du prisme principal. Enfin, le prisme secondaire est fermé délicatement. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

$$(IR) = nt' + 0,0004 (20 - T')$$

nt' : valeur de lecture obtenue à la température t'.

T' : température en °C de l'échantillon.

#### IV.4.3.Elaboration du profil chromatographique (NF ISO 11024-1 : 1999)

Un volume de 1 µl d'HE diluée dans le dichlorométhane est prélevé et injectée dans l'appareillage pour déclencher les procédures d'analyse. L'analyse chromatographique de l'H.E est effectuée sur un CPG type Hewlett Packard (6890) couplé avec un SM (HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm). La température de la colonne est programmée de 50-250°C à raison de 4 °C. min<sup>-1</sup>. Le gaz utilisé est l'hélium avec un débit 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse *NIST 98* et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* ».

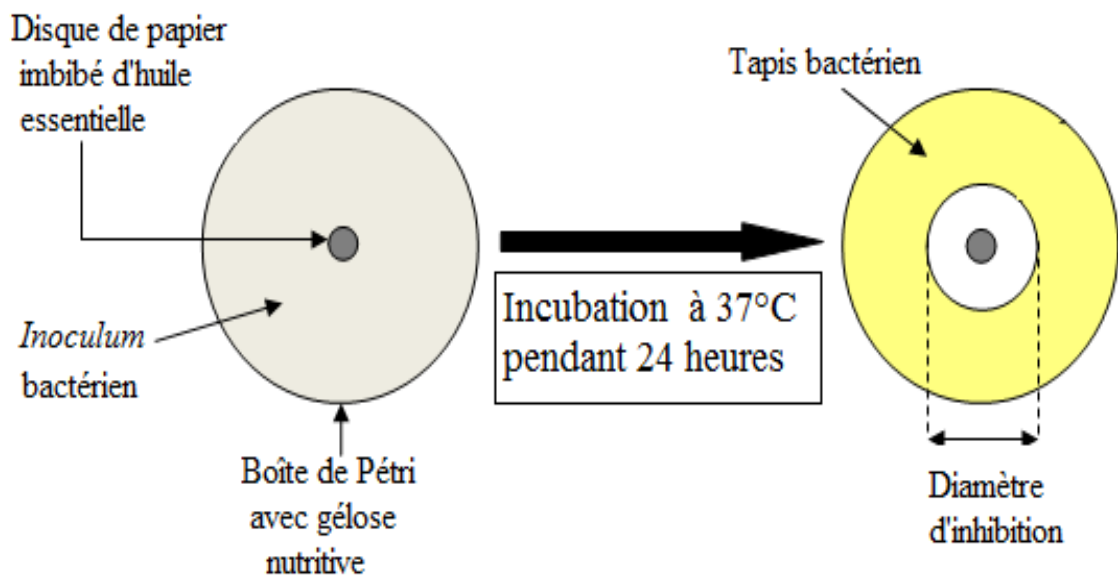
#### IV.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des H.E par la méthode de diffusion par disque

Cette méthode permet l'évaluation de l'activité antibactérienne d'une huile essentielle. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire dans des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une modification de la méthode de **Hayes et Markovic (2002)**, qui consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formées. (**Figure 24**).

Une suspension bactérienne d'une densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) est inoculée dans un volume de 20 mL de milieu de culture gélosé de Muller-Hinton Agar (MHA). Ensuite, un volume de 2 ml d'*inoculum* est étalé sur la surface de la gélose et l'excédent d'*inoculum* est éliminé par aspiration. Quatre disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (bioMérieux) sont déposés à la surface de la gélose. Deux essais sont réalisés : un disque imbibé avec un volume de 15 µL d'HE et un second avec 15 µL d'HE, supplémentée de 10% de DMSO.

Deux témoins sont réalisés en présence d'un volume de 15 µL d'eau distillée stérile, de 10 % de DMSO (témoin négatif) et un disque de gentamycine (témoin positif).

Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 37°C pendant 18-24 heures. Ensuite, les diamètres des zones d'inhibitions formés sont mesurés en millimètres.



**Figure 24** : La méthode de diffusion sur disque.

## IV.6. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

### Technique de macrodilution en milieu liquide

Un volume de 400  $\mu\text{L}$  de l'huile essentielle est introduit dans un tube stérile contenant un volume de 4,6 mL de milieu de culture de Muller-Hinton Bouillon (MHB), supplémenté avec un volume de Tween 80 (0,01 %, v/v). Une dilution en cascade est effectuée dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 80  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -0,3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Figure 25a**). Ensuite, un volume de 13  $\mu\text{L}$  d'*inoculum* bactérien avec une densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland ( $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), est introduit dans des tubes à essai de la gamme, incubé à une température de 37°C avec une agitation, pendant 24 heures (**Figure 25.b**). Un témoin de la croissance bactérienne est également réalisé. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 5 000g, pendant 5 minutes, à 20°C. La CMI (% v/v) de l'huile essentielle testée est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (**Figure 25.c**). Chaque expérience est répétée trois fois au cours de trois expériences successives.

## IV.7. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'*inoculum* bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle permet la définition de l'effet bactéricide d'une HE. Une gamme de concentration est préparée par la technique de macrodilution sur un milieu liquide, pour la détermination de la CMI et la CMB de l'huile essentielle (**Figure. 26**). Des prélèvements réguliers sont effectués dans le tube témoin et dans des tubes dépourvus de culot bactérien, ensemencés « en strie » sur la surface de la gélose MHA. Les boîtes ensemencées sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. La CMB (% v/v) de l'HE est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie.

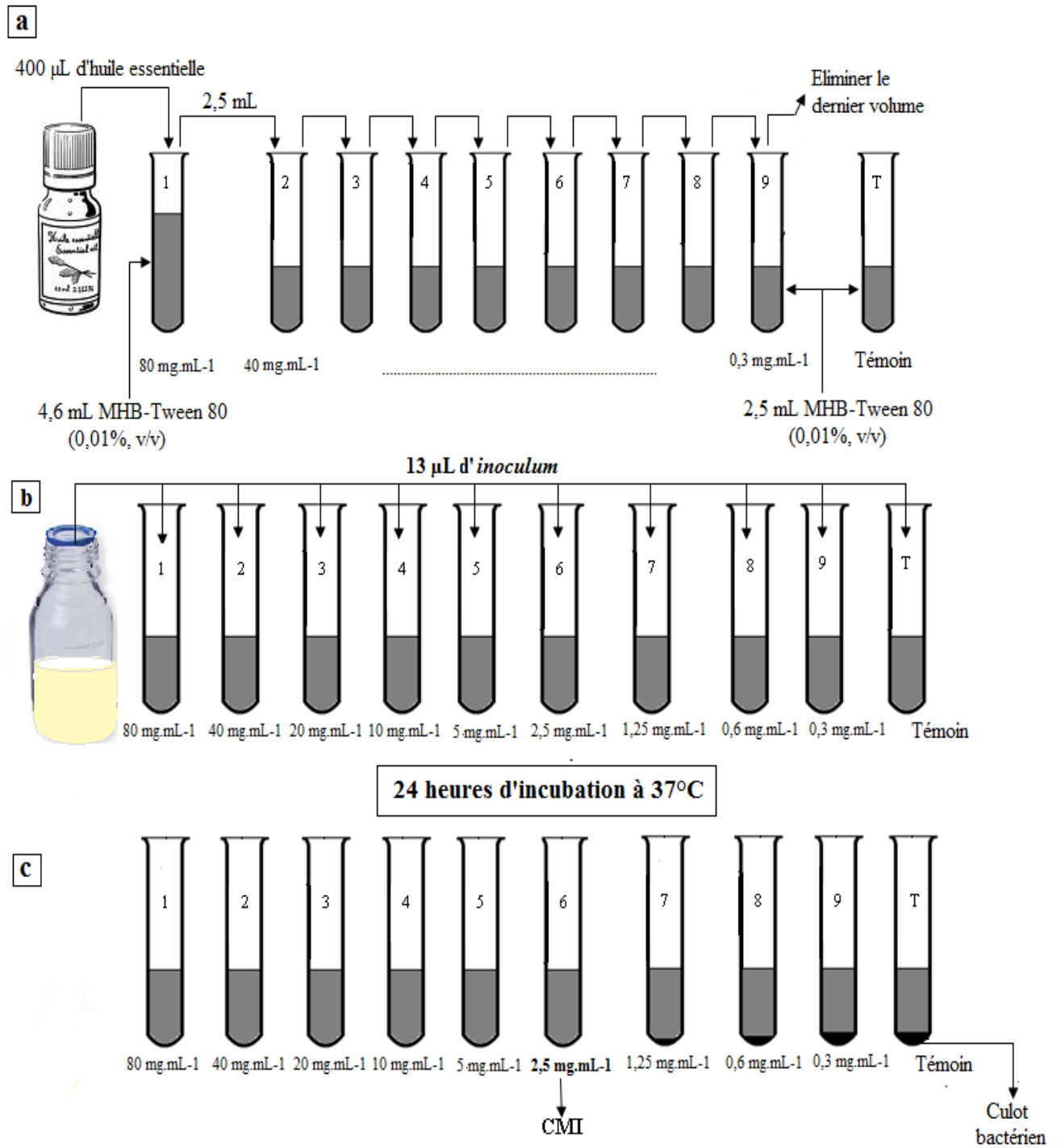
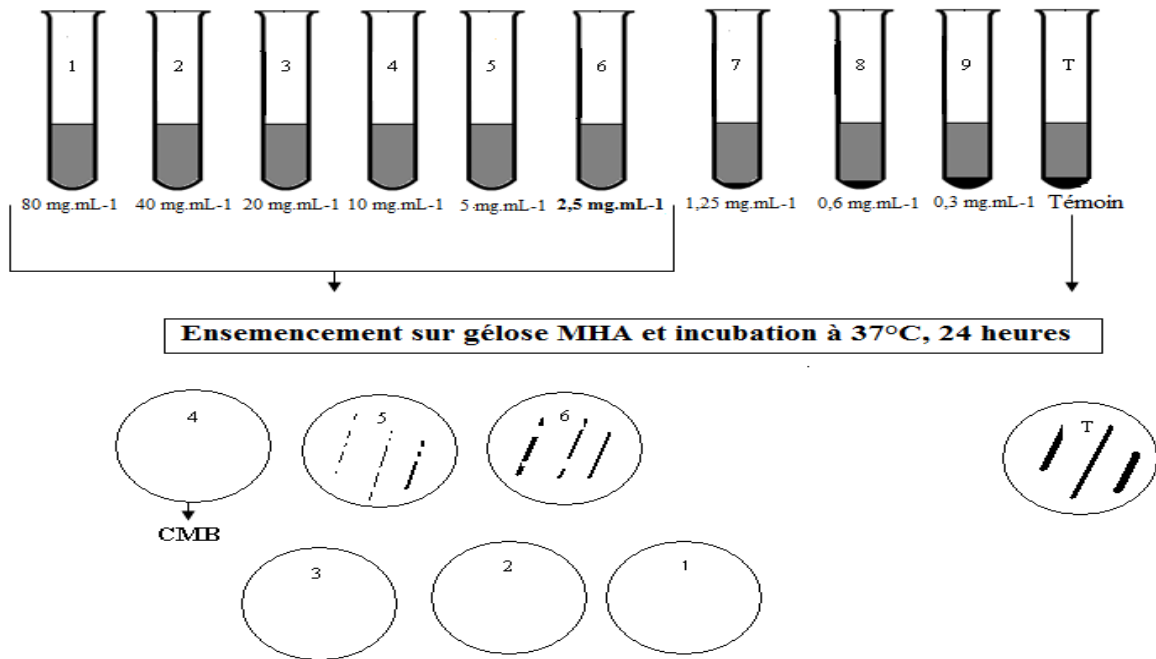


Figure 25 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide



**Figure 26:** Détermination de la CMB en milieu de culture solide.

#### IV.8. Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne (Time-kill assay)

Cette méthode permet de caractériser l'activité antibactérienne d'une huile essentielle au cours du temps. Elle évalue la décroissance des bactéries, qui sont soumises à une concentration donnée en huile essentielle, sur plusieurs heures (Viljoen *et al.*, 2003).

Trois à cinq colonies bactériennes, ensemencées la veille au soir sur une gélose au sang, sont prélevées à l'aide d'une boucle d'inoculation et déposées dans 2 mL de NaCl à 0,85 %.

La suspension obtenue est standardisée de manière à ce que sa concentration soit comprise entre  $10^6$  et  $5.10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Pour cela, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 620 nm, ajustée au standard 0,5 de Mac Farland et diluée au 1/20. Un mL de cet *inoculum* est déposé dans 9 mL de MHB-Tween 80 (0,01%, v/v) en absence (témoin de croissance) ou en présence d'une concentration en huile essentielle correspondant à la CMI en milieu liquide. Les suspensions ainsi obtenues contiennent environ  $5.10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> et sont maintenues sous agitation à 37°C. 100 µL de suspension sont prélevés à différents temps (0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures) afin de mesurer l'absorbance à 620 nm.

#### IV.9. expérience de la lyse cellulaire

Cette méthode permet la détermination d'une éventuelle action bactériolytique des huiles essentielles par mesure de l'absorbance à 620 nm. En effet, une bactérie non lysée



absorbe la lumière à une longueur d'onde de 620 nm, ce qui explique la présence de bactériolyse lors du diminution de l'absorbance à 620 nm au cours du temps (**Carson et al., 2002**).

Deux colonies bactériennes ensemencées sur une gélose au sang, sont inoculées dans un volume de 400 mL de milieu de culture MHB, incubée avec agitation à une température 37°C, pendant 18 heures. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse de 10000 g, pendant 12 minutes, à 4°C. Le culot bactérien obtenu est lavé deux fois avec une solution tampon de phosphate de sodium (PBS), dissous dans une solution de PBS-Tween 80 (0,01%, v/v). La suspension bactérienne obtenue est standardisée à  $3 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, introduite dans un tube stérile contenant les huiles essentielles à deux concentrations, correspondant à la CMI et à 8 CMI dans un milieu de culture liquide. Les suspensions obtenues sont soumises à agitation à des intervalles de temps 0 s, 30 s, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min respectivement, homogénéisées ensuite pendant 20 secondes, diluées au 1/100 et la croissance est mesurée à 620 nm.

## V. Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles et des bactériocines

La méthode de dilution de damier (**Fei et al., 2011**), est utilisée pour la détermination des effets antimicrobiens de combinaisons sélectionnées d'H.E et des bactériocines. La mise en évidence est effectuée par dilution des H.E et la bactériocine trois fois dans une orientation verticale, horizontale, respectivement. Les concentrations des H.E et la bactériocine sont préparées à 1/2, 1/4 et 1/8 correspondant aux valeurs de CMI, respectivement. Ensuite, un volume de 400 µl d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance contenant  $1 \times 10^8$  UFC/ml de la souche témoin de l'activité antagoniste est ajouté à chaque tube. Les tubes inoculés sont incubés à une température de 37°C pendant 24 heures, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique. Cette méthode est souvent mise en œuvre avec la combinaison du calcul des indices de fractions de concentration inhibitrice (FICI) pour l'évaluation des effets antimicrobiens (**Hemaiswarya, Kruthiventi, et Doble, 2008**). Le FICI est calculé par la formule suivante :

$$FICI = FICA + FICB$$

FICA = (MIC de la combinaison / MICA)

FICB = (MIC de la combinaison / MICB).

Les résultats sont interprétés comme synergie si ( $FICI \leq 0.5$ ), plus ( $0.5 \leq FICI \leq 1$ ), l'indifférence ( $1 \leq FICI \leq 4$ ) ou d'antagonisme ( $FICI > 4$ ).

## VI. Application pour la bioconservation de la viande

La viande fraîche du mouton est achetée dans une Boucherie à Blida. La viande est découpée en portions de 100 g. les souches BL 16, BL20 et BL 50 sont cultivées dans du bouillon MRS pendant 16 h à 30 ° C. une culture d'une nuit de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est cultivée dans du bouillon nutritif à 30 ° C. La surface de la viande estensemencée avec 20µl d'H.E, 20µl de bactériocine partiellement purifiée des souches BL16, BL20 et BL50 et 10<sup>3</sup> UFC/ml de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 après dilution de la culture dix fois dans l'eau peptonée. Les échantillons sont stockés à 4 ° C dans des sacs scellés. Des échantillons de 10 g sont pris de façon aseptique tous les 7 jours. Après ajout de 10 ml d'eau peptonée les échantillons sont homogénéisés pendant 180 s et des dilutions décimales de dix fois dans l'eau peptonée sont préparées. Les concentrations cellulaires de *S. aureus* ATCC 25932 et des bactéries lactiques sont déterminées après ensemencement de la gélose nutritive et la gélose MRS, respectivement. Les boîte de pétri sont incubées pendant 48 h à 37 ° C et 30 ° C, respectivement.

# Résultats et Discussion

## I. Isolement des bactéries lactiques du lait cru de chèvre

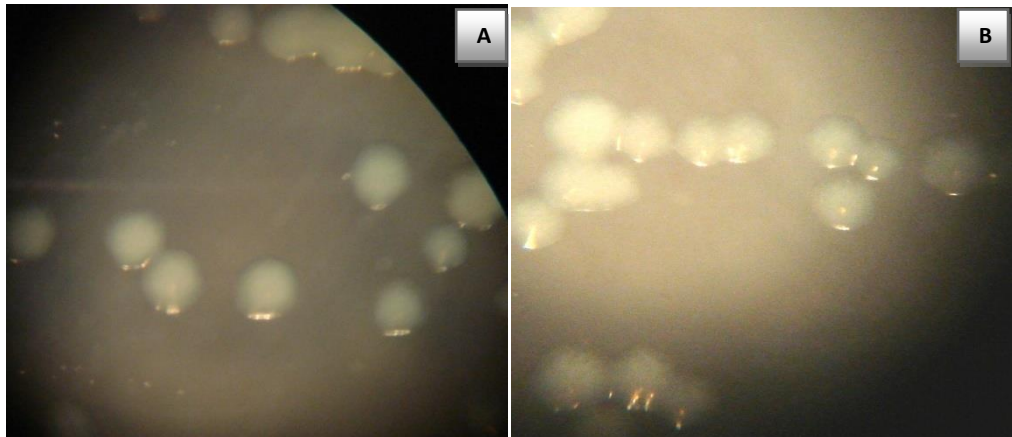
L'isolement des bactéries lactiques à partir des prélèvements effectués sur lait cru des chèvres sur des boîtes de Pétri, contenant milieu de culture, incubé à une température de 37°C pendant 72 heures a permis l'isolement de 820 souches lactiques.

Ensuite, la recherche de la coloration de Gram, l'observation morphologique macroscopique et microscopique, et la mise en évidence du test de la réaction du catalase ont permis la sélection de 30 isolats en forme de cocci de coloration de Gram positive avec une réaction négative du test catalase, répondant aux critères de la première sélection.

## II. Purification et identification des genres

### II.1. Aspect macroscopique

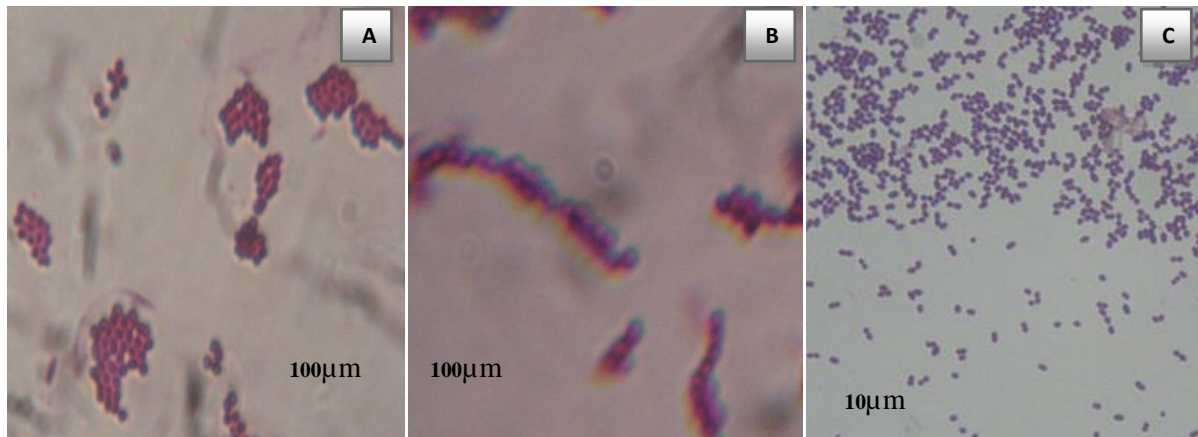
L'observation macroscopique des souches isolées sur le milieu de culture solide de MRS ajusté à une valeur de pH de 5,4, incubées à une température de 30°C pendant après 72 heures (Ana Belen florez *et al.*, 2006) et la détermination des critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques tels que la taille, la pigmentation, le contour, l'aspect et la viscosité ont montré l'aspect des souches isolées, sélectionnées lactiques purifiées BL16 et BL 20, observées avec une loupe binoculaire (**Figure 27**).



**Figure 27** : Observation macroscopique des colonies isolées sélectionnées lactiques (BL16 (A) et de BL 20 (B) avec la loupe binoculaire.

## II.2. Aspect microscopique

La coloration des Gram, l'observation microscopique et la réaction positive du test de catalase ont montré que les 30 souches isolées, sélectionnées lactiques sont des Gram positifs, non sporulées avec une forme cellulaire de cocci et une réaction négative à la catalase et présentent un mode d'association variable d'une souche à l'autre (**Figure 28**). Ce qui a permis de classer initialement les isolats selon la coloration de Gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).



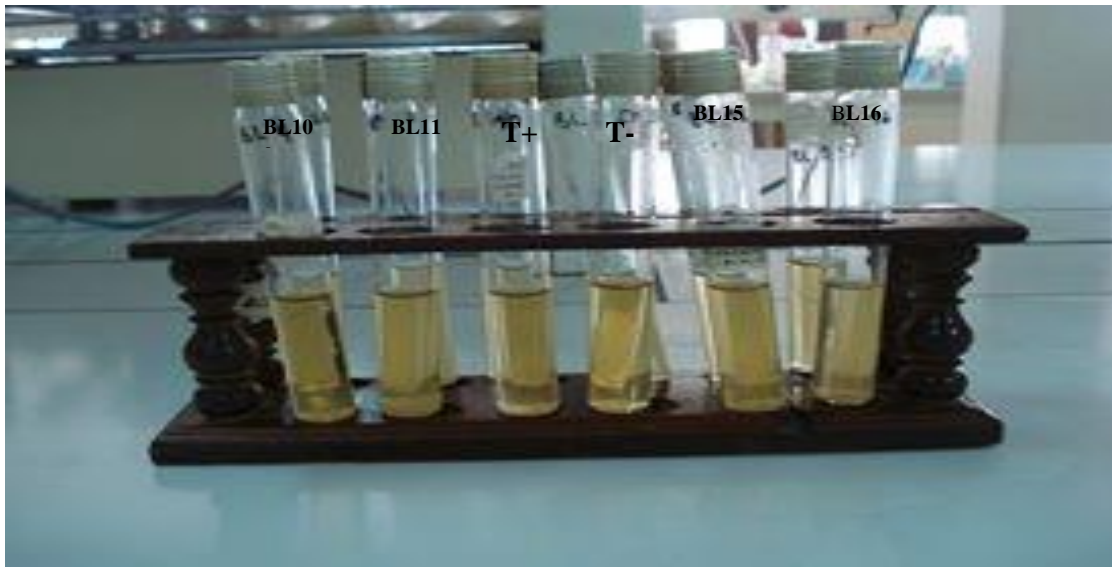
**Figure 28** : La coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées, sélectionnées lactiques (BL20(A), de BL16 (B) et BL50 (C).

**Tableau 3** : Illustration des critères morphologiques, la coloration de Gram et le test de la réaction à catalase des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre.

Forme	Mode d'association	Catalase	GRAM
Colonies blanches, rondes ou lenticulaire	Cocci diplocoques et en chainettes	-	+
Colonies lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres.	Cocci en tétrades.	-	+
Colonies blanches très petites, rondes	Cocci unique ou diplocoques, isolés ou en petites chainettes.	-	+

### II.3. Type fermentaire

Le type fermentaire réalisé sur milieu de culture glucosé stérile, contenant une cloche de Durham, permet la différenciation entre deux groupes bactériens, les homo-fermentaires et les hétéro-fermentaires. Les résultats obtenus ont montré l'absence de la production du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose. A cet effet, les trente souches isolées, sélectionnées lactiques ont manifesté un type homo-fermentaires (**Figure 29**).



**Figure 29:** Illustration du type fermentaire des différentes souches isolées sur milieu de culture de MRS glucosé, muni d'une cloche de Durham, Les souches témoins utilisées *Lactobacillus sp* et *Leuconostoc mesenteroides*.

### III. Criblage des souches antagonistes

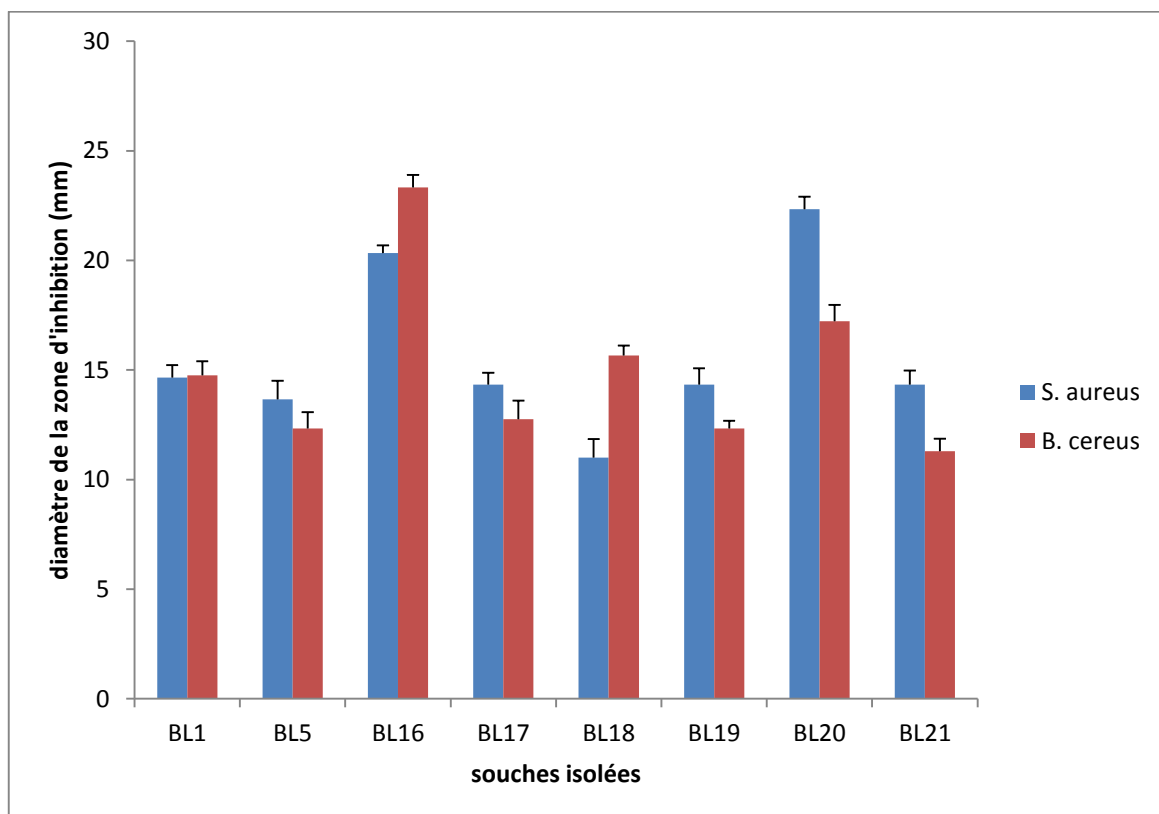
L'activité antagoniste des 30 souches isolées sélectionnées est mise en évidence vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les pré-cultures de bactéries lactiques isolées, sélectionnées et les souches témoins sont inoculées dans un milieu de culture liquide de MRS et dans un bouillon nutritif respectivement. Le test de l'activité antagoniste est effectué sur milieu de culture gélosé de Muller-Hinton selon la technique indirecte décrite par **Barefoot et al., (1983)**

Les résultats obtenus ont montré que 26.66 % des souches testées ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932. A l'opposé, 73.34 des souches testées ont présenté une faible activité antagoniste.

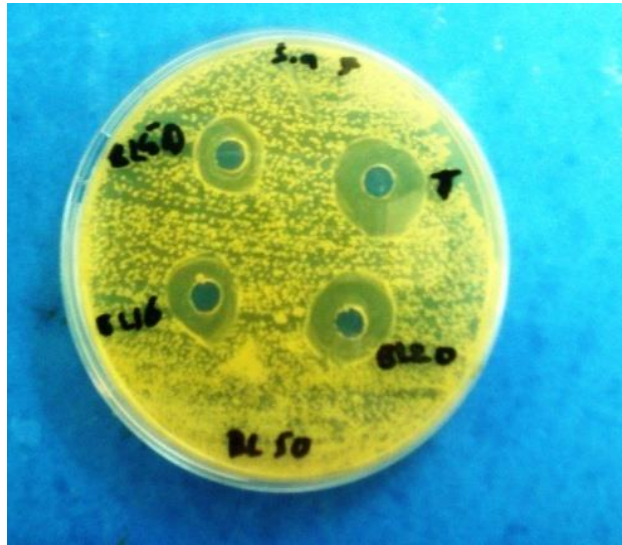
Les zones d'inhibition formées apparaissent claires avec des bordures bien distinctes avec des diamètres variables de  $11 \pm 0.83$  et  $23.33 \pm 0.57$  mm selon la bactérie lactique antagoniste

mise en cause (**Figure 30**). L'étude de l'activité antagoniste des souches isolées sélectionnées lactiques (BL1, BL5, BL16, BL17, BL18, BL 19, BL20, BL50) est mise en évidence vis-à-vis de certaines souches pathogènes. La mesure des diamètres des zones d'inhibitions formées autour des puits contenant les pré-cultures des souches testées a montré que les souches (BL 16, BL20, BL 50) ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, avec des diamètres des zones d'inhibitions de  $20.33 \pm 0.57$  mm,  $22.33 \pm 0.80$  mm et  $18.75 \pm 0.45$  mm respectivement.

Cependant, les diamètres des zones d'inhibitions formées des trois souches vis-à-vis de *Bacillus cereus* sont de  $23.33 \pm 0.66$  mm,  $17.22 \pm 0.75$  mm et  $16.75 \pm 0.35$  mm respectivement. A cet effet, les trois souches se présentent comme excellentes candidates antagonistes. Par ailleurs, ces trois souches lactiques n'ont manifesté aucune activité antagoniste vis-à-vis les bactéries Gram négative *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



**Figure 30** : Les diamètres de la zone d'inhibition de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et de *Bacillus cereus* en présence des bactéries isolées, sélectionnées antagonistes



**Figure 31** :L'activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées lactiques (BL16, BL20 et BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

Les bactéries lactiques ont manifesté une activité antagoniste vis-à-vis de germes pathogènes à Gram positif et agissent par le mécanisme de formation des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Biswas et al., 1991**).

**Song et Richard (1997)** ont rapporté que la résistance de *Listeria* aux bactériocines est due principalement à la composition chimique de la membrane. **Labioui et ses collaborateurs (2005)** ont montré l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* en présence des bactéries lactiques. **Mezaini et ses collaborateurs (2009)** ont rapporté la sélection de 6 bactéries lactiques inhibitrices de la croissance de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Des études antérieures réalisées par **Anastasiadou et ses collaborateurs (2008)** ont suggéré que les Pédicoques ont exercé une activité antagoniste vis-à-vis de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Par ailleurs, **Joshi et ses collaborateurs (2006)** ont rapporté que les *Lactobacilles* ont manifesté une activité antagoniste contre *Bacillus cereus*.

L'inoculation des souches témoins de l'activité antagoniste *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 en présence des huit souches de bactéries lactiques a révélé l'inhibition de la croissance des souches témoins avec des degrés très variables.

La réalisation d'une étude comparative sur le degré d'inhibition des deux souches témoins de l'activité antagoniste a montré que *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est très sensible par rapport à *Bacillus cereus*.



Cette sensibilité différentielle peut être due principalement à la production des spores chez *Bacillus cereus*, qui confère une importante protection contre l'action des agents antibactériens sécrétés par les bactéries lactiques. La culture d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en présence d'une bactérie lactique sélectionnée antagoniste, a révélé la croissance des souches témoins de l'activité antagoniste. Ces résultats se concordent avec les travaux réalisés par **Papagianni et ses collaborateurs (2008)**. La croissance des bactéries à Gram négatif en présence des bactéries lactiques antagonistes peut être due principalement à la présence d'une membrane externe qui constitue une véritable barrière et empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne (**Dortu et Thonart, 2008**).

#### **IV. Identification des espèces des souches sélectionnées**

##### **IV.1. Caractéristiques biochimiques**

Les tests rapportés par **Johnson et al., (1980)** ; **Schleifer et al., (1985)** ; **Devoyod et al., (1997)** ont permis l'identification des trois souches isolées sélectionnées fortement antagonistes (BL16, BL20 et BL 50). Les résultats des différents tests effectués sont récapitulés dans le (**tableau 4**).

**Tableau 4 :**Présentation des caractères biochimiques des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.

Caractères biochimiques	Souches isolées		
	BL16	BL20	BL50
Métabolisme fermentaire	Hf	HF	Hf
Croissance à : 37°C	+	+	+
40°C	+	+	+
50°C	+	+	+
Croissance a pH : 4.2	-	+	+
6.5	+	+	+
7	NT	+	+
8	NT	+	+
Croissance à différentes concentration de NaCl/			
2%	+	+	+
4%	-	+	+
6.5%	-	+	+
10%	-	-	-
18%	-	-	-
Activité protéolytique	+	+	+
VP	-	+	+
NO <sub>3</sub>	-	-	-
TRP	-	-	-
ADH	-	+	+
ESC	-	-	+

La mise en œuvre de ces tests a permis d'établir une pré-identification pour les genres suivants : *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus*.

#### IV.2. Identification par la galerie API CHL 50

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone lors de l'utilisation de la galerie API 50CHL, ont permis l'identification des espèces, le **Tableau 5**, indique les résultats du profil de fermentation des hydrates de carbones, Après la comparaison des résultats, avec les données de **Carr et al., (2002)**, **Axelsson (2004)** et **Hammes et Hertel (2006)**. Les souches sont classées dans les espèces suivantes :

La souche BL16 appartient à l'espèce *Streptococcus thermophilus*, BL20 appartient à l'espèce *Pediococcus acidilacticci* et BL 50 appartient à la souche *Enterococcus faecium* ces résultats sont identiques au profil fermentaire des bactéries lactiques, obtenu à partir de la base des données de Biomerieux, à qui le pourcentage de similitude était de 100% pour la souche BL 20 et de 98,75% pour la souche BL 50et 95,55 pour la souche BL16.

**Tableau 5 :** Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes (BL16, BL20 et BL50) lors de l'utilisation de la galerie API CHL50.

hydrates de carbone	BL16	BL20	BL50
Témoin	-	-	-
Glycérol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D- Arabinose	-	+	-
L- Arabinose	+	+	+
D- Ribose	+	+	+
D- Xylose	-	-	-
L- Xylose	-	-	-
D- Adonitol	-	-	-
MDX	-	+	-
D- Galactose	+	+	+
D- Glucose	+	+	+
D- Fructose	+	+	+
D- Mannose	+	-	+
L- Sorbose	-	+	-
L- Rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D- Mannitol	+	-	-
D- Sorbitol	+	-	-
MDM	+	-	-
MDG	-	+	-
NAG	+	-	+
Amygdaline	+	-	+
Arbutine	+	+	+
ESC	+	-	+
Salicine	+	+	+
D- Celiobiose	+	-	+
D- Maltose	+	-	+
D- Lactose <sup>1</sup>	+	-	+
D- Melibiose	+	-	-
D- Saccharose	+	+	+
D- Trehalose	+	-	+
Inuline	-	-	-
D- Mélézitose	+	-	+
D- Raffinose	+	-	-
Amidon	-	-	-
Glycogène	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	+	-	+
D- Turanose	+	-	-
D- Lyxose	-	-	-
D- Tagatose	-	+	-
D- Fucose	-	-	-
L- Fucose	-	-	-
D- Arabitol	-	-	-
L- Arabitol	-	-	-
GNT	+	-	-
2KG	-	-	-
5KG	-	-	-
<i>Identifiée comme</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Enterococcus faecium</i>

## V. Caractérisation de l'agent antagoniste

L'activité antagoniste des bactéries lactiques sélectionnées exercée vis-à-vis les germes tests n'est particulièrement due à la production des bactériocines. Par ailleurs, cette activité peut être expliquée par l'intervention de nombreux facteurs tels que la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines (**Moreno et al., 1999; Navarro et al., 2000; Rodriguez et al., 2002; Maldonado et al., 2003; Todorov et Dicks, 2005 et Boumehira et al., 2011**). Les bactériocines produites chez les bactéries à Gram négative et positive représentent un groupe de molécules antibactériennes très hétérogène par leurs poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leurs spectre d'activité et leur mode d'action (**Riley et Wertz, 2002; Aslim et al., 2005**).

### V.1. Détermination de la thermorésistance

L'activité antagoniste du surnageant de la pré-culture de *Streptococcus thermophilus* (BL16) traité thermiquement à une température 60°C pendant 10 mn, a manifesté une importante activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 avec un diamètre de la zone d'inhibition formé de 20.33±0.45 mm.

Ensuite, le traitement du surnageant à une température 80°C pendant 10 mn a diminué considérablement l'activité antagoniste, accompagnée avec la réduction du diamètre de la zone d'inhibition formé à (14 ±0.15 mm). Le chauffage du surnageant à une température de 100 °C pendant 10 mn a réduit le diamètre de la zone d'inhibition formé à (11.03± 0.57 mm). Cependant, l'utilisation d'un cycle d'autoclavage à une température de 121 °C pendant 20 minutes a éliminé totalement l'activité antagoniste du surnageant de la pré-culture de *Streptococcus thermophilus* (**Figure 32**).

Des études antérieures réalisées par **Aktypis et ses collaborateurs (1997)** ont rapporté que l'activité antagoniste de la thermophilin T, bactériocine produite chez *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, est stable après le traitement à une température de 100°C pendant 30 mn et éliminé totalement après l'autoclavage à une température de 121°C pendant 20 mn.

Par ailleurs, les travaux réalisés par **Anastasios et George (2003)** ont montré que la thermophilin ST 1, produite par *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001 a totalement perdu son activité antagoniste après le traitement à une température à 60°C pendant 30 mn.

**Nettles et ses collaborateurs (1993)** ont rapporté que l'activité antagoniste de la Thermophilin A est restée stable après un autoclavage à une température de 120°C pendant 15 mn.

L'activité antagoniste du surnageant de la pré-culture de *Pediococcus acidilactici* (BL20) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formés est illustré dans la **Figure 32**.

Des diamètres des zones d'inhibitions formés sont de l'ordre de 18.5±0.95 mm, 15±0.45mm, 12.4±0.57 mm après des traitements à des températures de 60, 80, 100, 121°C respectivement.

L'activité antagoniste de la pédiocine AcH est également stable après l'autoclavage à une température de 121°C pendant 20 mn. **Daeschel et ses collaborateurs (1985)** ont rapporté que la pédiocine produite de *Pediococcus P. CAPEA* est stable à différentes températures. La thermorésistance des bactériocines extraits de *Streptococcus thermophilus* et *Pediococcus acidilactici* a suggéré son utilisation dans les produits pasteurisés.

L'activité antagoniste du surnageant de la pré-culture d'*Eterococcus faecium* (BL50) testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 a diminué progressivement après le traitement thermique à une température 60°C, 80°C et 100°C pendant 10 mn et après un cycle d'autoclavage à une température de 121 °C pendant 20 minutes (**Figure 32**). Des travaux antérieurs réalisés par **Sonsa-Ard et ses collaborateurs (2015)** ont trouvé des résultats similaires quant à la bacteriocine produite chez *Enterococcus faecium* CN-25.

Dans une étude réalisé par **Hadji-Sfaxi et al.,(2011)**, l'activité de la bactériocine extraite de *E. faecium* PC4.1 a été stable après un traitement de 30 min a 100°C et meme après un autoclavage a 121°C pendant 15min. la meme stabilité a été observée pour la plupart des bactériocine produite par *Enterococcus faecium* (**Cocolin et al., 2007; Sabia et al.,2002**).

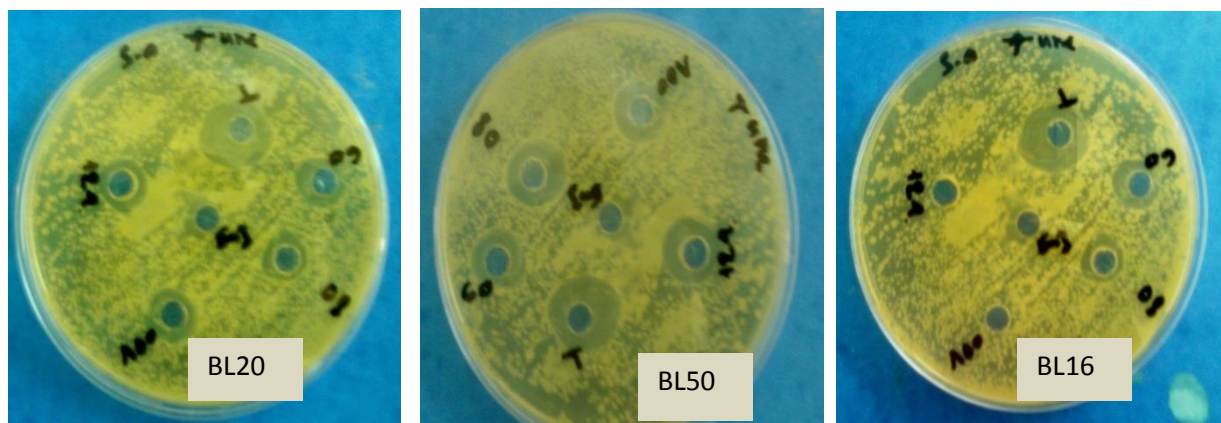
## V.2. Effet des enzymes protéolytiques

Les résultats obtenus de l'action des enzymes protéolytiques ont permis la caractérisation des substances antibactériennes comme étant des bactériocines.

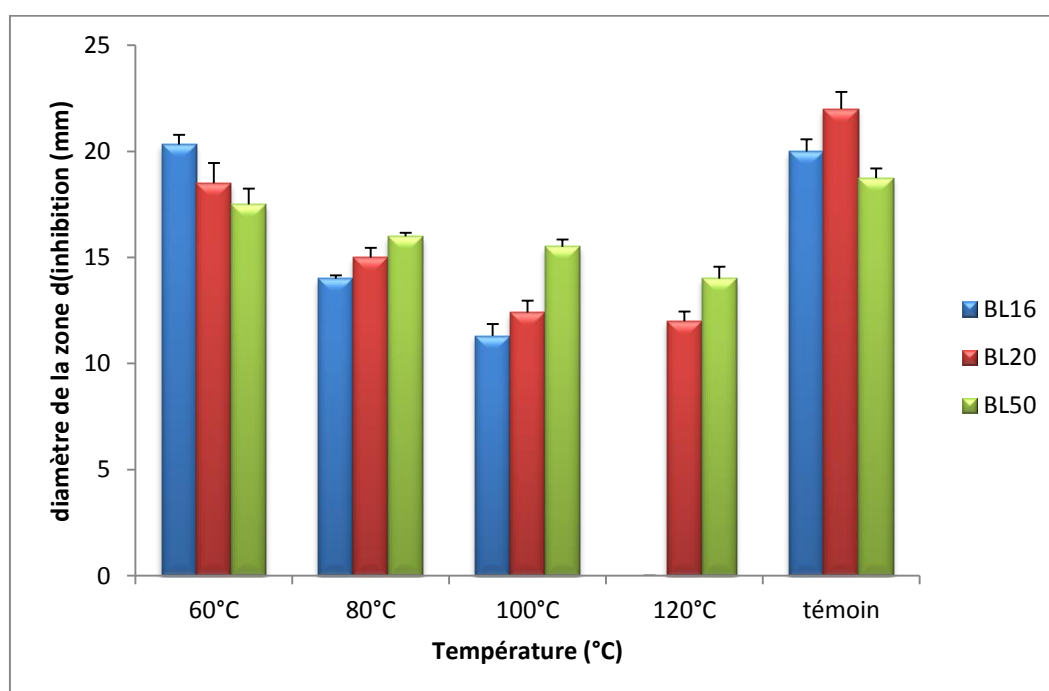
La disparition du halo d'inhibition formée en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, explique que l'agent responsable de l'activité antagoniste est de nature protéique (**Callewaert et de Vuyst, 2000 et Aslim et al, 2005**). A l'opposé, la présence d'un halo d'inhibition formé après l'action des enzymes utilisées, a indiqué une forte probabilité que l'agent responsable de l'agent antagoniste est d'une nature non protéique.

L'activité antagoniste du surnageant de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus*

*acidilactici* (BL20) et d'*Enterococcus faecium* (BL50), est complètement inhibée en présence de l'action de l'enzyme Trypsine, traduite par l'élimination des diamètres des zones d'inhibition formés contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 (Figure 32).



**Figure 32 :** Effet de la température et de la trypsine sur l'activité antagoniste des surnageant de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilacticii* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

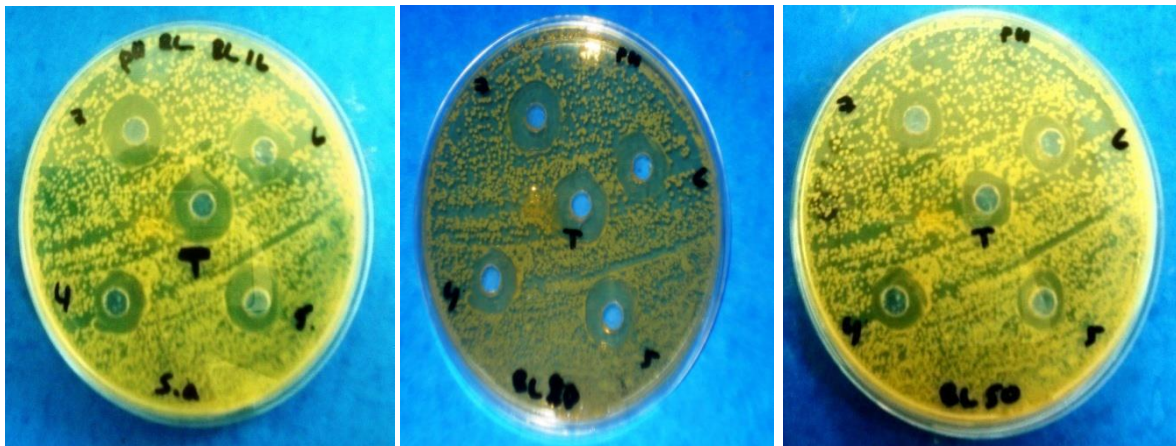


**Figure 33:** Les diamètres des zones d'ihibition formés par le surnageant de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilacticii* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 à différentes températures.

La disparition de l'activité antagoniste après le traitement avec les enzymes protéolytiques a indiqué la sensibilité des composés sécrétés par les souches sélectionnées antagonistes à l'action des enzymes protéolytiques. Les résultats obtenus ont permis de suggérer que l'activité antagoniste de ces souches est due principalement à la présence d'une substance de nature protéique ou peptidique. Des résultats similaires ont été rapportés par **Scheved *et al.*, (1993)** au cours de leurs recherches effectuées sur la caractérisation de la nature des agents inhibiteurs de type bactériocines.

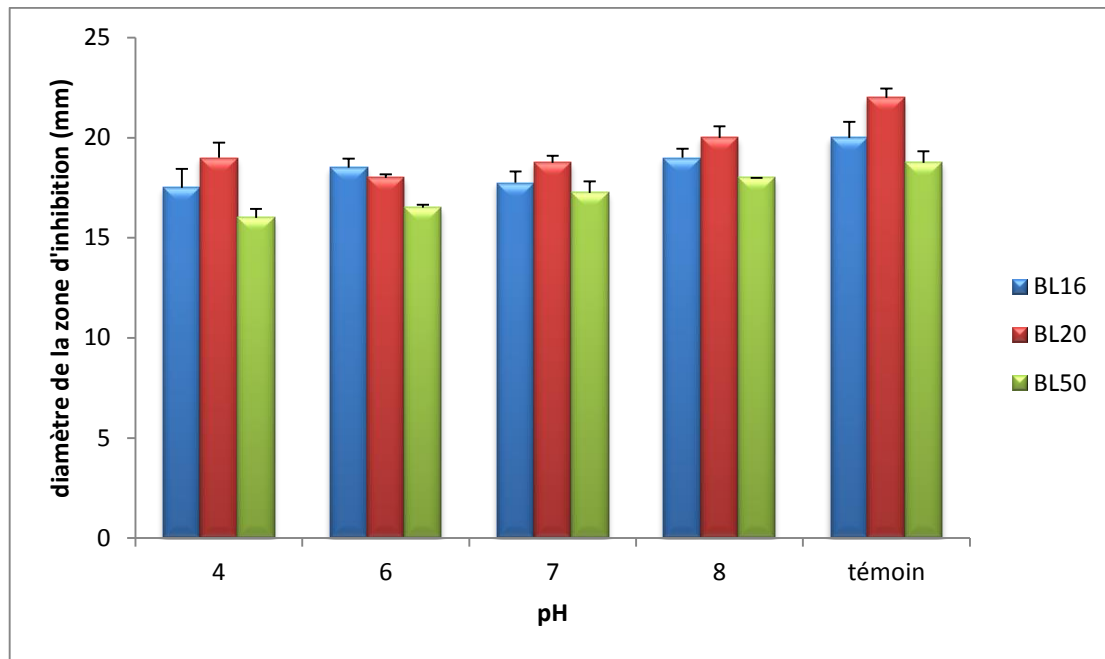
### V.3. Détermination du pH optimum

Dans le but d'explorer le pH optimum de l'activité antagoniste du surnageant des souches sélectionnées antagonistes performantes (BL 16, BL20 et BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, le surnageant récupéré par centrifugation est ajusté à différentes valeurs de pH et l'activité antagoniste est évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formés. Une réduction de l'activité antagoniste de la bactériocine de *Streptococcus thermophilus* (BL16) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est observée à des valeurs de pH comprises entre 4 et 7. Par ailleurs, la valeur optimale de l'activité antagoniste se situe entre 5 et 6 (**Figure 34**). l'effet du pH sur l'activité antagoniste du surnageant de *Pediococcus acidilactci* (BL20) et d'*Enterococcus faecium* (BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est évaluée par la variation des valeurs du pH. Les résultats obtenus ont montré que les diamètres des zones d'inhibitions sont stables à des valeurs de pH optimum de 5 (**Figure 34**).



**Figure 34 :** Effet du pH sur l'activité antagoniste des surnageant de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.





**Figure 35:** Les diamètres des zones d'inhibition formés par le surnageant de *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 à différents pH.

Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes sélectionnées antagonistes isolées à partir du lait cru de chèvre répondent aux critères retenus par **Klaenhammer (1988)**. Ce qui explique que l'agent responsable des activités antagonistes des souches sélectionnées antagonistes (BL16, BL20 et BL50) est de nature protéique et principalement la bactériocine.

Lors de la caractérisation des bactériocines, différents spectre d'activité antagonistes ont été constatées. La sensibilité des souches témoins de l'activité antagoniste aux bactériocines dépend fortement du genre et de l'espèce. Ce comportement est fortement lié aux caractéristiques des souches testées telles que la présence sites récepteurs au niveau de la membrane externe de la cellule qui induit des lésions occasionnées (**Kalchayanand et al., 1992**).

#### **V.4. Etude du suivi de la cinétique de croissance des bactéries lactiques et la production des bactériocines.**

L'étude de l'activité antagoniste des souches lactiques sélectionnées antagonistes isolées à partir du lait cru de chèvre requiert une bonne connaissance de la physiologie bactérienne, la synthèse protéique et la régulation de ces composés inhibiteurs.

Le suivi de la croissance des souches lactiques sélectionnées antagonistes (BL16, BL 20 et BL50) est effectué sur le milieu de culture de MRS, ajusté à une valeur de pH 6,8, inoculé

avec une biomasse bactérienne d'un volume de 1% (v/v) à partir d'une pré-culture âgée de 24 heures, incubée à une température de 37 °C pendant 72 heures. Des prélèvements stériles sont effectués à des intervalles de temps réguliers (2h) afin d'évaluer la croissance bactérienne par mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 660 nm.

Par ailleurs, l'étude de l'effet de la valeur du pH sur l'activité antagoniste des souches lactiques sélectionnées (BL16, BL 20 et BL50) au cours des différentes phases de la croissance bactérienne est mise en évidence par le suivi de l'évolution du potentiel d'hydrogène (pH).

Les courbes de croissance des souches lactiques antagonistes (BL16, BL20 et BL50) ont manifesté un comportement physiologique différent, par le fait que les phases exponentielles de croissance des souches (BL16, BL 20, BL50) sont atteintes après (4, 6, 2) heures d'incubation respectivement. Cependant, les phases stationnaires des souches (BL16, BL 20, BL50) sont apparues après (10, 12, 16) heures d'incubation respectivement.

La corrélation entre la courbe de la cinétique de croissance et de l'activité antagoniste de *Streptococcus thermophilus* (BL16) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 (**Figure 36**) a permis de constater que l'activité antagoniste a augmenté progressivement au début de la phase exponentielle et a atteint un maximum après 10 heures d'incubation et elle a stabilisé durant la phase stationnaire jusqu'à l'atteinte de la fin de fermentation. La sécrétion des molécules responsables de l'activité antagoniste a augmenté au fur et à mesure de la croissance bactérienne et a atteint son maximum de production à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire lors de l'acidification du milieu de culture.

**Cilano et ses collaborateurs (1990)** ont rapporté des résultats similaires suite à la caractérisation de la thermophilin ST10, bactériocine excrétée par *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. Par ailleurs, **Aktypis et ses collaborateurs (1998)** ont suggéré que la production de la Thermophiline ST-1 est directement liée à la phase exponentielle de croissance, accompagnée d'une excellente production au cours de la phase stationnaire précoce.

Des travaux antérieurs réalisés par **Villani et ses collaborateurs (1995)** ont rapporté qu'une activité antagoniste maximale de la thermophiline 347 est observée durant la phase exponentielle de la croissance, accompagnée avec une diminution rapide après quelques heures d'incubation.

La courbe de la cinétique de croissance et l'activité antagoniste de *Pediococcus acidilactici* (BL20) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 sont illustrées dans **la Figure 37**.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité antagoniste est initiée après 6 heures d'incubation et a augmenté considérablement lors de l'acidification du milieu de culture, au début de la phase exponentielle avec l'atteinte de son maximum à la fin de cette phase et au début de la phase stationnaire (10 h).

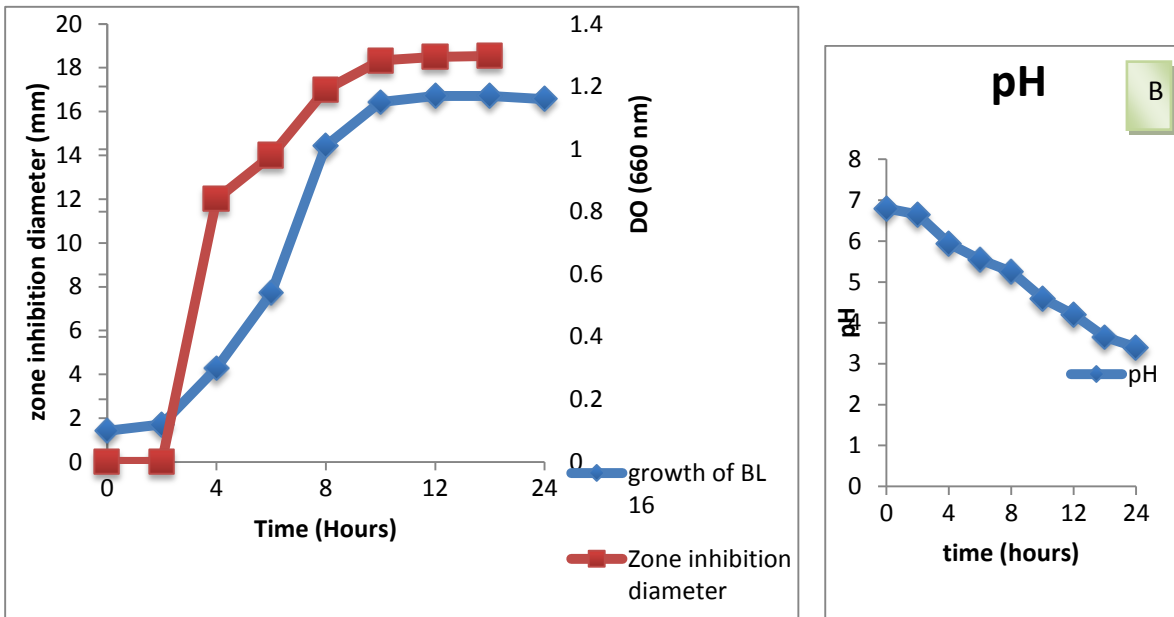
Des études préliminaires réalisées par **Anastasiadou et ses collaborateurs** ont rapporté que la production de la pédiocine chez *Pediococcus pentosaceus* est optimale durant la phase logarithmique et stationnaire de croissance. Ce comportement physiologique est due principalement à la production des bactériocines (pediocin ACCEL et nisine) (**Wu et al., 2004 ; Papagianni et al., 2006**).

A cet effet, l'activité antagoniste de *Streptococcus thermophilus* et *Pediococcus acidilactici* est observée durant le début de la phase exponentielle de croissance et atteint son maximum lors de l'acidification du milieu de culture.

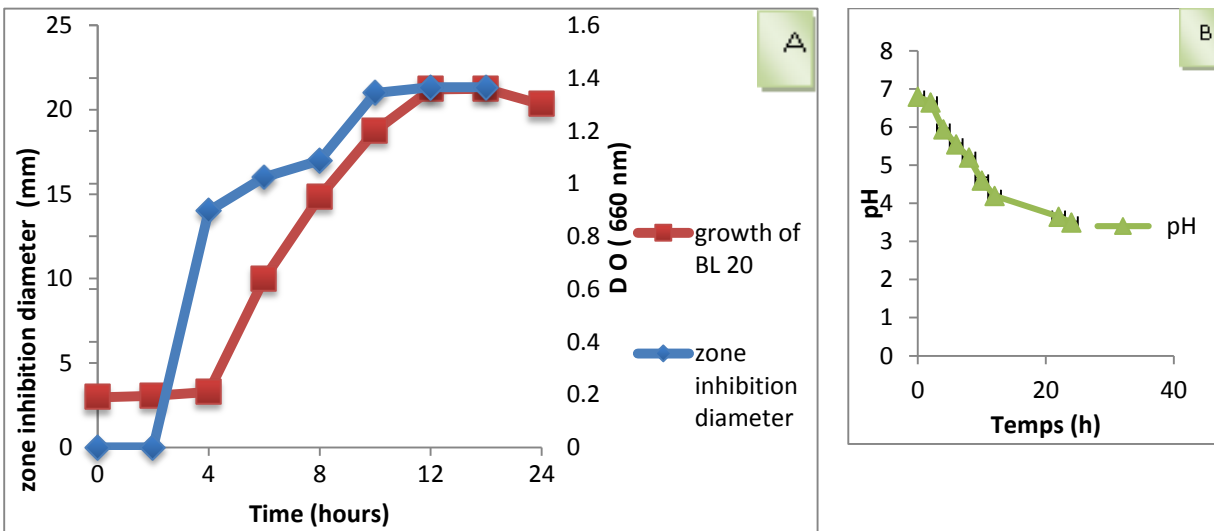
Les résultats obtenus ont montré que la production des bactériocines chez *Enterococcus faecium* est initiée après de 2 heures d'incubation, qui correspond à la phase logarithmique précoce de croissance et atteint son maximum au début de la phase stationnaire après 16 heures d'incubation, accompagnée avec une stabilité au cours de la phase stationnaire et une légère diminution (**Figure 38**).

(**Ahmadova et al., 2013 ; Hadji-Sfaxi et al., 2011 ; Rehaïem, Martínez, Manai, et Rodríguez, 2009**) ont rapporté des résultats similaires sur la production de bactériocine chez *E. faecium* AQ71, *E. faecium* PC4.1, *E. faecium* MMRA

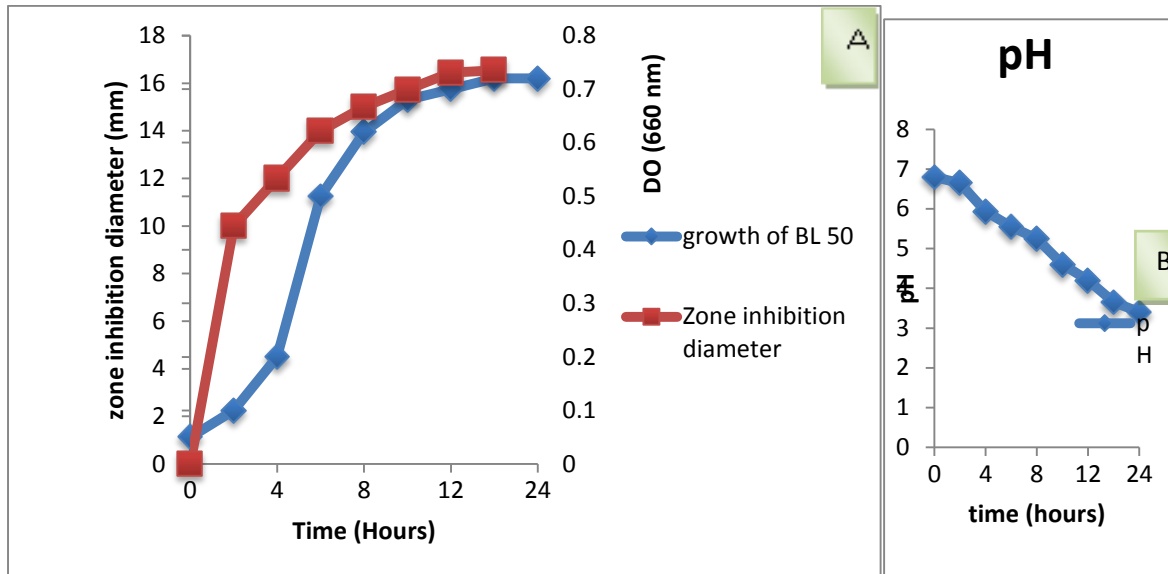
En conclusion, l'étude réalisée par **Yang et Ray (1992)**, a montré que la production de bactériocine chez les bactéries lactiques sélectionnées antagonistes dépend fortement de plusieurs facteurs tels que la performance des souches, la composition du milieu de culture, le pH du milieu de culture, le temps d'incubation et la température optimale de croissance.



**Figure 36:** Cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* (BL 16), et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.



**Figure 37 :** Cinétique de croissance de *Pediococcus acidilactici* (BL 20) et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.



**Figure 38 :** Cinétique de croissance de *Enterococcus faecium* (BL 50) et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B) ajusté à un pH initial de 6,8, incubée à une température de 37°C et en absence d'agitation.

#### V.4. Purification partielle de la bactériocine

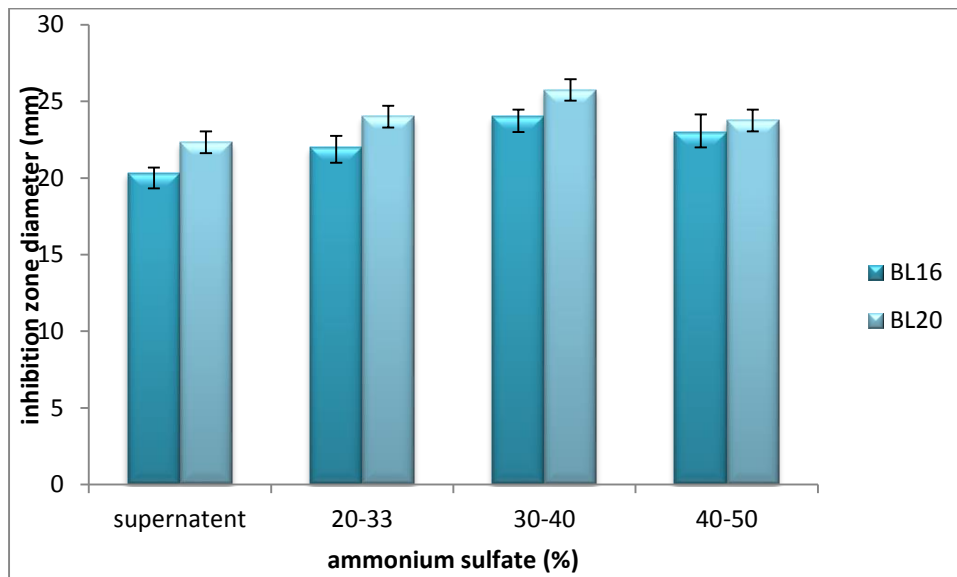
Dans le but de caractériser la molécule responsable de l'activité antagoniste, un fractionnement partiel est mis en œuvre. A cet effet, les souches sélectionnées antagonistes (BL 16, BL 20 et BL50) sont inoculées dans un bouillon de MRS, incubées à une température de 37 °C pendant 24 h. Le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation à une vitesse 5000 de g pendant 10 min.

Différentes concentrations de sulfate d'ammonium sont ajoutées au surnageant à des intervals de temps réguliers. Le mélange est soumis à une agitation pendant 30 min. Les précipitats formées sont recueillies par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min et dissous ensuite dans une solution tampon de 20 mmole de phosphate de sodium, ajustée à une valeur pH de 6,0. Les résultats obtenus ont montré que la purification des bactériocines par le fractionnement partiel du surnageant avec le sulfate d'ammonium a causé une augmentation considérable de l'activité antagoniste de *Streptococcus thermophilus* (BL 16) et *Pediococcus acidilactici* (BL 20) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932. La fraction (30-40 %) a manifesté une forte activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 (**Figure 39**).

Les résultats de l'activité antagoniste obtenus ont montré que l'utilisation de la bactériocine de *Streptococcus thermophilus* de *Pediococcus acicilactci* partiellement purifiée,

a augmenté les diamètres des zones d'inhibitions de  $3 \pm 0.57$  mm à  $4 \pm 0.45$  mm et de  $2.5 \pm 0.25$  mm à  $3.75 \pm 0.85$  mm respectivement.

**Vaughan et ses collaborateurs** ont rapporté que la fraction contenant l'activité inhibitrice des bactériocines extraites de bactéries lactiques isolées d'orge maltée est récupérée après le fractionnement du surnageant à une saturation de 40% de sulfate d'ammonium. Des études antérieures sur l'activité antagoniste des bactériocines extraites des bactéries lactiques isolées des légumes fermentés réalisées par **Joshi et ses collaborateurs (2006)** ont montré que l'activité antagoniste a augmenté considérablement après la purification partielle des bactériocines brutes par précipitation avec le sulfate d'ammonium. La fraction (30-40 %) a manifesté une forte activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.



**Figure 39** :L'activité antagoniste des bactériocines extraites de *Streptococcus thermophilus* (BL 16) et de *Pediococcus acidilactici* BL 20 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, fractionnées avec le sulfate d'ammonium.

### V.5. Détermination de la CMI des bactériocines partiellement purifiées

Les valeurs de CMI des bactériocines partiellement purifiées extraites de BL 16, BL 20 et BL 50 sont déterminées selon **van Kuijk, Noll, et Chikindas (2011)**, les résultats sont représentés dans le **tableau 6**. Il ressort que les bactériocines partiellement purifiées ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC25932 avec des faibles valeurs de CMI. Les CMI obtenues sont comprises entre 1,7 et 2,04 µg/ml.

**Noojaree et ses collaborateurs, 2015** ont rapporté que la valeur de CMI des bactériocines produites par *Enterococcus faecium* CN-25 été de 2,38 µg/ml , alors que la CMI de la nisine étudiée par **Razavi et al 2011**été de 12.5 IU/mL.

**Tableau 6** : les CMI des bactériocines partiellement purifiées des souches sélectionnées.

	bactériocines partiellement purifiées		
	BL16	BL20	BL50
CMI (µg/ml)	1,7	1,02	2,04

### V.6. Mode d'action des bactériocines

Afin d'explorer l'activité de la bactériocine partiellement purifiée des souches (BL 16, BL 20 et BL50) vis-à-vis de la souche témoin de l'activité antagoniste, des cultures de *Staphylococcus aureus* sont inoculées dans un bouillon nutritif, incubées avec agitation à une température de 30°C. un volume de 1 ml de la bactériocine partiellement purifiée de (BL 16, BL 20 et BL50) est ajouté à la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC25932 après la 6<sup>ème</sup> heures d'incubation. Des prélèvements stériles sont effectués à des intervalles de temps réguliers afin d'évaluer la production de la biomasse bactérienne, mesurée à une longueur d'onde de 600 nm.

**La Figure 40** illustre la cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25932 en présence et en absence de la bactériocine partiellement purifiée des souches BL 16, BL 20 et BL50. La croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est amorcée après 6 heures d'incubation. Ensuite, la phase stationnaire de croissance est atteinte après 14 h d'incubation en présence de la bactériocine extraite de *Streptococcus thermophilus*, accompagnée d'une biomasse bactérienne constante ; ce qui explique l'absence du phénomène de la lyse bactérienne.

Des travaux réalisés par **Aktypis et ces collaboraeur (1997)** ont montré que Thermophilin T a manifesté une forte action bactéricide contre les souches ssensibles de *L. cremoris* CNRZ 117. **Tagg et al. (1976) et Davey (1981)** ont démontré que l'action de la bactériocine sur les cellules sensibles exige une adsorption sur des récepteurs spécifiques ou non spécifiques des enveloppes cellulaires des bactéries sensibles. Ce processus décrit chez les bactéries à Gram positif n'est pas applicable à des bactériocines de bactéries lactiques.

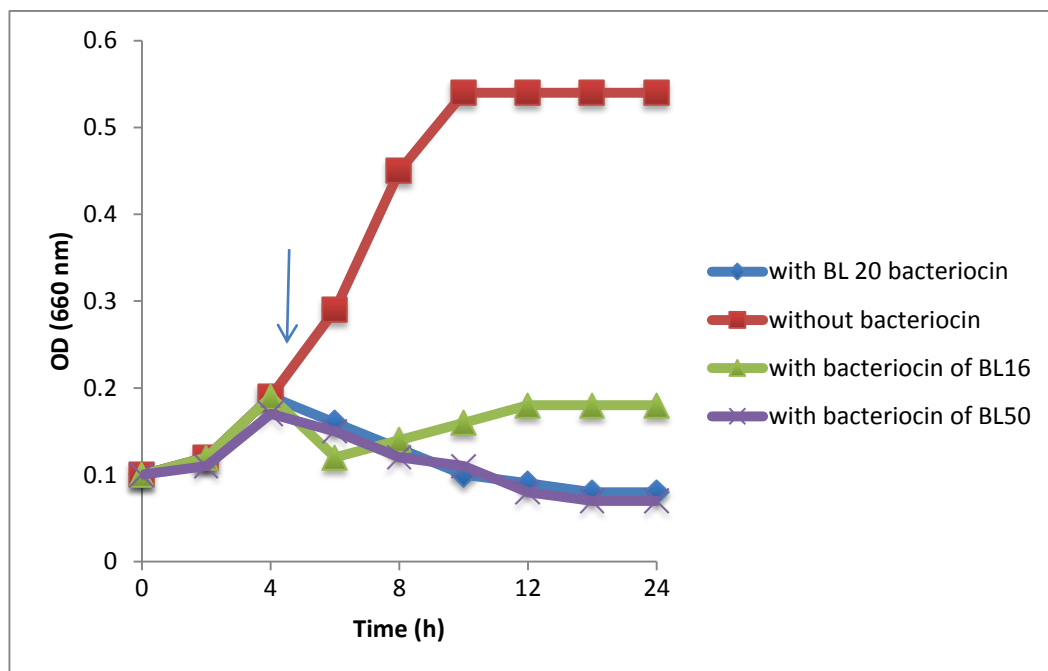
Par ailleurs, l'activité des bactériocines extraites de *Pediococcus acidilactici* (BL20) et d'*Enterococcus faecium* (BL50) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932,

ont montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines, ce qui est expliqué par la lyse bactérienne (**Figures 40**).

**Anderson et ses collaborateurs (1988)** ont rapporté que les bactériocines ont provoqué la lyse des cellules sensibles, observées chez plusieurs espèces de bactéries lactiques.

Des études antérieures réalisées par **Bhunia et ses collaborateurs (1991)** sur le mode d'action de la pédiocine AcH de *Pediococcus acidilactici* H vis-à-vis de *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ont montré une réduction considérable de la biomasse bactérienne après l'ajout de la bactériocine purifiée.

Le même phénomène de lyse bactérienne est rapporté par **Rehaïem et ses collaborateurs (2009)**, lors de l'étude du mode d'action de l'Enterocine, produite chez *Enterococcus faecium* MMRA. Le même mode d'action a été aussi décrit pour Ent L50A et L50B (**Cintas et al., 1998**) et Enterocin 012 (**Jennes et al., 2000**).



**Figure 40** : La cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 en présence et en absence des bactériocines extraites de (BL16, BL20 et BL50).



## VI. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*

### VI.1. Extraction et rendement en huile essentielle

L'hydro-distillation de la partie aérienne de plante est réalisée par l'utilisation du dispositif de Clevenger. Le rendement moyen obtenu en huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* est de l'ordre de 0,2%. Un volume de 0,22 ml d'huiles essentielles est récupéré lors de l'extraction d'une quantité de 100 g de matière végétale. Les rendements en huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*, récoltée de différentes régions de l'Algérie sont variables et dépendent fortement des facteurs pédoclimatiques.

**Mahmoud et ses collaborateurs (2010)** ont rapporté sur un rendement de 0,05% en huiles essentielles extraites des plantes cultivées en Jordanie. Cette valeur est considérablement inférieure par rapport aux rendements d'extractions des huiles essentielles extraites obtenus dans ce présent travail, Ceci est expliqué par l'influence des facteurs pédologiques tels que la texture, la composition, la porosité et la valeur de pH du sol.

Par ailleurs, **Nicolino et al., 2002, Silva et al., 2005** ont trouvé des rendements d'extractions des huiles essentielles légèrement supérieurs par rapports à nos résultats, ceci peut être éventuellement attribué à un déficit en minéraux, qui contribuent à l'augmentation de la masse végétale et à la quantité d'H.E extraite.

Autres facteurs tels que la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents influencent le rendement en huiles essentielles et agissent d'une manière directe chez les espèces qui possèdent des structures histologiques superficielles de stockage.

**Lalli et ses collaborateurs (2005)** ont rapporté sur l'incrimination les facteurs de changement des pratiques culturales tels que espacements entre plants, désherbage, installation d'une culture intercalaire, apport des engrais organiques et/ou minéraux) et aux méthodes d'extraction.

En conclusion, de nombreuses études réalisées ont suggéré que les fluctuations observées dans les rendements en huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à l'imbrication d'une multitude de facteurs biotique et abiotique (**Saxenaa et al., 2008 ; Rodolfo et al., 2006**).

## VI.2. Étude analytique de l'huile essentielle

Les constantes physico-chimiques de l'H.E sont déterminées selon des méthodes normalisées. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7** : Paramètres physico-chimiques de l'H.E d'*Inula viscosa*.

Paramètres physico-chimiques				
	Indice d'Acide	Indice d'Ester	Densité à 20°C	Indice de Réfraction
Résultats obtenus	6,54	24,31	0,632	1,5061

Les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles analysés se concordent avec les normes internationales. L'indice d'acide (IA) des huiles essentielles obtenu lors des mesures est relativement élevé, ceci peut être dû principalement à la dégradation de la structure chimique des huiles essentielles (hydrolyse des esters) durant la période de conservation. A l'opposé, un indice d'acide (IA) avec une valeur inférieure à 2 présente la bonne conservation des huiles essentielles. L'indice de réfraction varie essentiellement en fonction de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (**Koba et al., 2003**). Une forte teneur en monoterpènes a donné un indice élevé ce qui concorde avec les résultats obtenus dans ce présent.

Plusieurs études ont démontré que les paramètres physico-chimiques des H.E sont considérablement influencés par les conditions édaphiques et climatiques (**Lis-balchin et al., 2002 ; Gilly, 1997**). Par ailleurs, la détermination des propriétés physico-chimiques est nécessaire mais insuffisante pour la caractérisation des huiles essentielles. L'étude du profil chromatographique des huiles essentielles demeure une étape indispensable.

## VI.3. Elaboration du profil chromatographique

L'identification des constituants des huiles essentielles est basée sur une comparaison de leurs indices de rétention par rapport à la série de n-alcanes (C10-C24) et avec ceux de la littérature. En outre, l'identification est réalisée par comparaison de leurs spectres de masse enregistrés avec ceux stockés dans la bibliothèque spectrale de masse NIST de la base de données GC-MS (**Adams, 2007**). Les résultats de l'analyse obtenus par CG/SM des huiles essentielles sont présentés dans le **tableau 8**.

L'examen préliminaire des huiles essentielles a permis l'identification de 43 composés. Les principaux composés sont des sesquiterpènes oxygéné (78,15%). Seuls cinq des composants ont atteint des pourcentages plus de 5%: Caryophylladienne (21,18%), fokienol (14,19%), Caryophyllene oxide (6,25%), eudesmène (5,64%), $\beta$ -Selinene (5,30%). Certains autres constituants importants identifiés étaient  $\beta$ -guaiene (4,52%), Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (2,18%),  $\alpha$ -Eudesmol (2,68%), E-Nerolidol (2%) et Cedren-14-ol-acteate (2%).

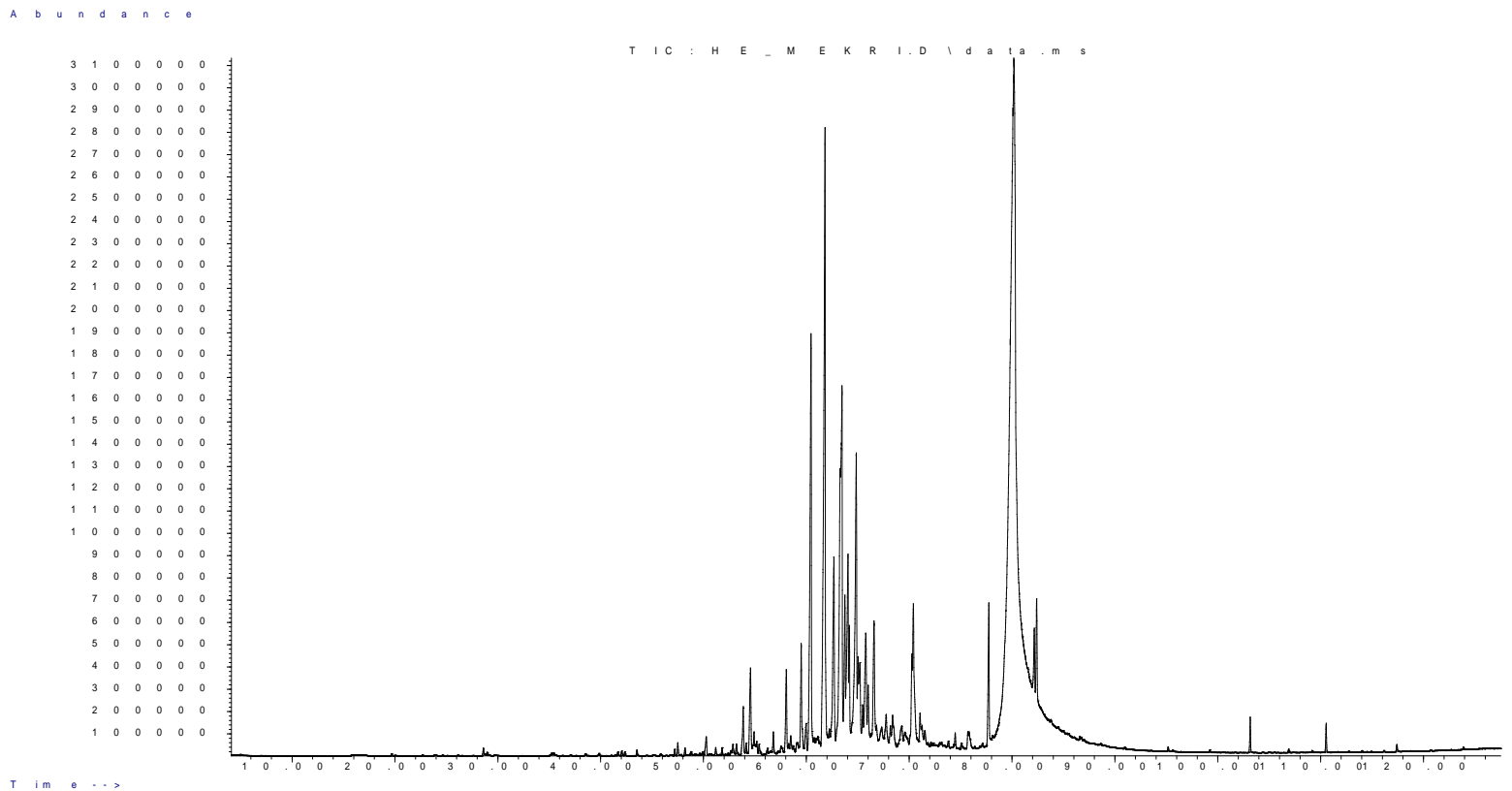
La présente composition est différente de celle rapportée de l'huile essentielle extraite par deux méthodes (hydrodistillation et entraînement à la vapeur) à partir des feuilles des espèces algériennes récoltée du village Sidi Rezine (sud d'Alger) et qui a été principalement représentés par : 12-carboxyeudesma-3,11(13)-diene (28.9 et 56.8%, respectivement) (**Haoui et al.,2012**) .

**Kabouche et ses collaborateurs (2012)** ont rapporté que la composition de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation à partir d'*Inula viscosa* récolté à Ain El- Bey (sud de Constantine) est caractérisé par 34 composés , représenté par les composés majeurs suivants : nerolidol (25.3%), isocostic acid (10.1%), costic acid (8.0%), *neo-intermedeol* (6.4%) et caryophyllene oxide (5.5%) . alors que l'H.E d'*Inula viscosa* récolté à Hamma-Bouziane (Nord de Constantine) est caractérisé par 23 composés représenté par isocostic Acid (25.1%), costic acid (15.2%), nerolidol (9.6%), linoleic acid (9.1%), *neo-intermedeol* (7.5%) et fokienol (7.2%).

La composition de l'échantillon testé se rapproche avec les résultats précédemment rapportés pour l'huile obtenue à partir de plantes de la France (**Blanc et al., 2006**), où le Fokienol a atteint (21,1%) ,le (E) -nerolidol (8,5% ) et le Caryophyllene oxide (2,5%). D'autre part, la composition de l'échantillon testé est nettement différente de l'huile de Turquie (**Pérez-Alonso et al., 1996**), dans lequel le bornéol (25,2%), l'acétate d'isobornyle (22,5%) et l'acétate de bornyle (19,5%) ont été les principaux composants.

**Tableau 8:** Caractérisation des composés majoritaires de l'huile essentielle.

pic	Composé	RI	%
1	<i>p</i> -Mentha-1(5),2-dien-8-ol	1175	1.27
2	$\alpha$ -Terpineol	1190	1.06
3	Myrtenol	1199	0.93
4	Thymol	1296	0.58
5	Eugenol	1358	0.71
6	$\alpha$ -Copaene	1379	1.15
7	Sativene	1387	0.81
8	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1403	1.52
9	Drima-7,9(11)-diene	1462	0.75
10	Curcumene	1473	0.44
11	$\gamma$ -Curcumene	1460	0.59
12	<b><math>\beta</math>-guaiene</b>	1490	<b>4.52</b>
13	<b><math>\beta</math>-Selinene</b>	1491	<b>5.30</b>
14	(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	1514	0.89
15	$\delta$ -Cadinene	1524	0.49
16	$\beta$ -Silphiperfol-5-en-3-ol	1535	0.55
17	<b>E-Nerolidol</b>	1563	<b>2.00</b>
18	<b>Caryophyllene oxide</b>	1581	<b>6.25</b>
19	Globulol	1586	1.79
20	<b>Fokienol</b>	1599	<b>14.19</b>
21	<b><math>\beta</math>-Eudesm-6-en-4<math>\alpha</math>-ol</b>	1610	<b>5.64</b>
22	Cubenol(1,10)	1615	0.54
23	(+)-Longicamphenylone	1618	0.75
24	$\alpha$ -Acorenol	1624	0.60
25	Gossonorol	1630	0.64
26	$\alpha$ -Cadinol	1638	0.43
27	<b>Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-<math>\alpha</math>-ol</b>	1640	<b>21.18</b>
28	Alloaromadendrene	1641	1.30
29	$\beta$ -Eudesmol	1643	0.51
30	Cedr-8(15)-en-10-ol	1654	0.52
31	<b>Selin-11-en-4-<math>\alpha</math>-ol</b>	1660	<b>2.18</b>
32	<b><math>\alpha</math>-Eudesmol</b>	1664	<b>2.68</b>
33	Porosadien-7-one	1670	0.79
34	$\alpha$ -Bisabolol	1674	1.10
35	Caryophyllene acetate	1690	1.35
36	Germacrone	1698	0.96
37	(Z)-5-(2,6-Dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-yl)-2-methyl-2-penten-1-ol	1703	0.48
38	Nootkatol	1717	0.98
39	Khusimol	1744	1.80
40	<b>Cedren-14-ol-actate</b>	1775	<b>2.00</b>
41	4-Hydroxy- $\delta$ -cadinene	1804	0.44
42	Nondecane	1899	0.57
43	Heneicosane	2095	0.48
	<b>Total %</b>		<b>93.71</b>
	<b>monoterpenes Oxygénés</b>		<b>5.32</b>
	<b>Sesquiterpene hydrocarbonné</b>		<b>9.18</b>
	<b>Sesquiterpene Oxygéné</b>		<b>78.15</b>
	<b>Autres</b>		<b>1.05</b>



**Figure 41** : Profil GC/MS de l’huile essentielle d’*Inula viscosa*.

**VI.4. Evaluation de l’activité antibactérienne des H.E par la méthode de diffusion par disque**

Les résultats de l’activité antibactérienne des huiles essentielles extraites d’*Inula viscosa* par la méthode de diffusion par disque sont présentés dans le **tableau 9**.

**Tableau 9:**Présentation des activités antibactériennes des huiles essentielles extraites d’*Inula viscosa*.

Souche bactérienne	Diamètre de la zone d’inhibition (mm)		
	H.E	H.E+ 10% DMSO	Témoin (Gentamycine)
<i>Bacillus cereus</i>	38±0.75	35±0.20	28±0.57
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	22±0.45	18±0.35	24±0.35
<i>Escherichia coli</i>	19±0.35	15±0.75	22±0.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	27,5±0.15	25±0.45	21±0.65

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* est mise en œuvre par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formés. Les résultats obtenus montrent une excellente activité antibactérienne des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, avec des diamètres de zones d'inhibitions supérieurs à 20 mm (**Figure 42**). A l'opposé, une faible activité antibactérienne des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* vis-à-vis d'*Escherichia coli* (19 mm) est observée.

Des travaux antérieurs réalisés par **Wamith et ses collaborateurs (2010)** ont suggéré que les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* ont montré une importante activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positifs et négatifs.

Par ailleurs, **Kabouche et ses collaborateurs (2012)** ont rapporté que les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*, récoltée à la région d'Ain El-Bey ont réduit considérablement la croissance de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC, *E. coli* avec des diamètres de zones d'inhibitions de (24, 21, 20 mm) respectivement.



**Figure 42** : Aromatogramme des H.E d'*Inula viscosa* vis-à-vis des bactéries pathogènes, T+ : Gentamycine, T- : eau distillée.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* et leur mode d'action sont directement liées à la nature et la proportion de leurs constituants, entrant dans leur composition. Les composés majoritaires des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* sont souvent responsables de l'activité antibactérienne (**Dormans et Deans, 2000 ; Kalembe et Kunicka, 2003**).

La composition chimique des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* utilisée dans ce présent est dominée par la présence des sesquiterpènes oxygénés. Les principaux constituants sont : Caryophylladienne et fokienol qui appartiennent à la classe des sesquiterpènes oxygénés, qui exercent une haute activité contre une large gamme de bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs. Les huiles essentielles, riches en alcools, possèdent généralement un fort pouvoir antibactérien.

Les alcools sont d'ailleurs reconnus d'avoir exercé un effet plutôt bactéricide que bactériostatique (Dorman et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003), La forte teneur en sesquiterpène oxygéné de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* pourrait expliquer l'effet antibactérien généré sur les germes pathogènes.

#### VI.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB)

Les valeurs de CMI et CMB des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* déterminées lors de l'utilisation de la technique de macro-dilution sur milieu de culture liquide sont illustrées dans le **tableau 10**. Il ressort que les des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis les quatre souches bactériennes testées avec des faibles valeurs de CMI et CMB. Les CMI obtenues sont comprises entre 0.3 et 1.25 mg/ml.

Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* ont présenté des faibles valeurs de CMI vis-à-vis des souches témoins testées. *E. coli* et *Bacillus cereus* ont manifesté les valeurs de la CMI de (1.25, 0.3 mg/ml) respectivement.

**Tableau 10** : Détermination des valeurs de la CMI et CMB des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*.

Souches bactériennes	CMI (mg.ml <sup>-1</sup> )	CMB (mg.ml <sup>-1</sup> )	CMB/CMI
<i>Bacillus cereus</i>	0.3	0.6	2
<i>E. coli</i>	1.25	5	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.6	1.25	2.08
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	0.6	1.25	2.08

Le rapport CMB/CMI a permis la détermination du caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égale à 4, l'huile est

considérée comme bactéricide. Les rapports CMB/CMI de l'H.E d'*Inula viscosa* sont respectivement égaux à 2,4 et 2.08. Les huiles essentielles d'*Inula viscosa* étudiées semblent donc exercer une action bactéricide contre toutes les souches testées. Les résultats obtenus se concordent avec ceux rapportés par **Wamith et al. (2010)**, **Kabouche et al. (2012)**, et **Kheyar et al. (2014)**, qui ont trouvé une activité antibactérienne considérable. En revanche, ils s'opposent aux résultats de **Blanc et al. (2005)**, qui ont démontré une faible activité antimicrobienne des H.E d'*Inula viscosa*. Des études antérieures réalisées sur les huiles essentielles extraites des tiges et des feuilles d'*Inula viscosa* par **Benyahia (2014)** ont montré une faible activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 avec une CMI de 6 et 4 mg/ml respectivement. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 ; *Escherichia coli* ATCC 25922 et les Gram positives ont manifesté une résistance vis-à-vis les huiles essentielles extraites des tiges et des feuilles d'*Inula viscosa*, traduite par l'absence des diamètres des zones d'inhibitions.

#### VI.6. Dynamique d'action des huiles essentielles d'*Inula viscosa* (time kill assay)

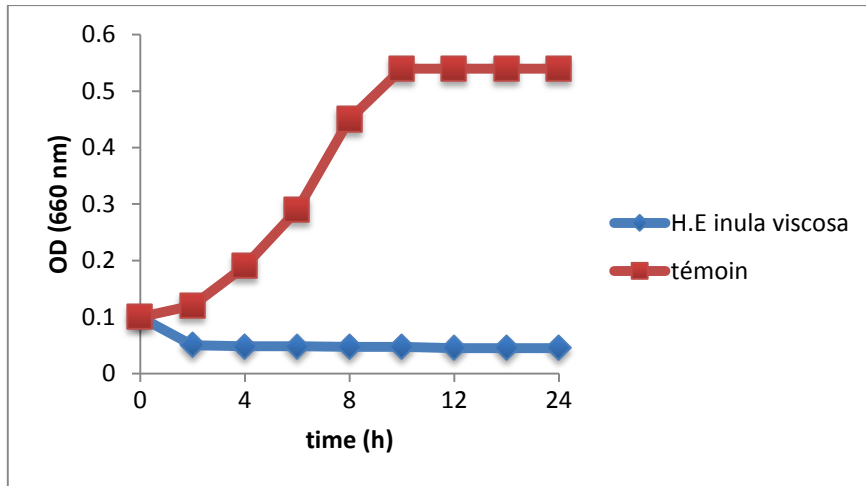
L'étude de la croissance bactérienne de *S. aureus* ATCC 25932 , en absence des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* est mesurée sur une période de 24 heures. Les effets générés sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, en présence des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*, sont déterminés par mesure de la décroissance bactérienne au cours de la même période.

La courbe de la mort cellulaire, obtenue en présence des concentrations en huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* égale à la CMI et la courbe de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 en absence des huiles essentielles est illustrée dans la **Figure 43**. La population témoin présente une phase exponentielle, débutant dans les deux premières heures et une phase stationnaire et de déclin de 10-24 heures. Le traitement d'une population bactérienne de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 avec une concentration en H.E d'*Inula viscosa* égale à la CMI ( $0.3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) a réduit considérablement la biomasse bactérienne à une Densité optique de 0,05.

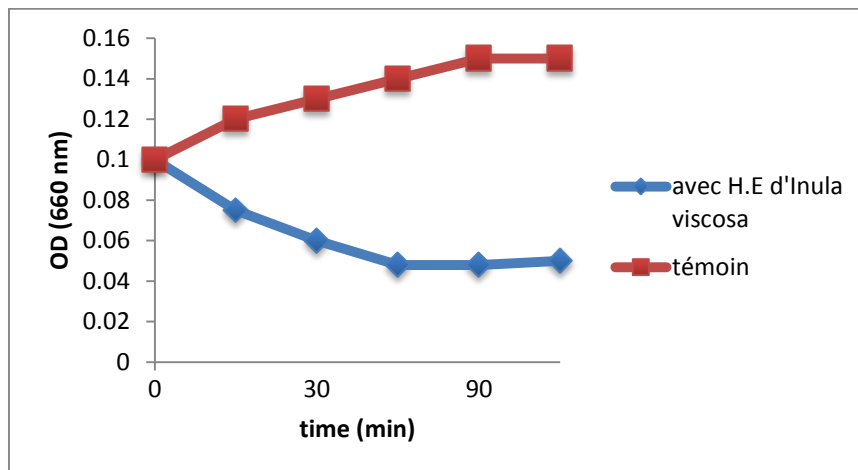
Dans l'optique d'évaluer les effets des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* durant les deux premières heures d'action, la décroissance bactérienne est mesurée à des intervalles de temps plus restreints (0 s, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min) sur une durée totale de 120 minutes (**Figure 44**). Durant les dix premières minutes, en utilisant des concentrations minimales bactéricides proches des concentrations minimales inhibitrices, les huiles



essentielles extraites d'*Inula viscosa* ont inhibé la croissance des souches témoins de l'activité antibactérienne par une action bactéricide (Prescott *et al.*, 1995 ; Hammer *et al.*,1996). L'effet bactéricide des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* dépend du temps. La CMI des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* a réduit considérablement la viabilité cellulaire avec un effet létal obtenu au bout de deux heures d'action.



**Figure 43:** Courbes de la lyse cellulaire de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, traitées avec une concentration en H.E d'*Inula viscosa* égale à la CMI sur une période de 24 heures et la courbe de croissance d'une population non traitée (témoin).



**Figure 44 :** Courbes de la lyse cellulaire sur 2 heures de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 traités avec une concentration en H.E d'*Inula viscosa* égale à la CMI et courbe de croissance d'une population non traitée (témoin).

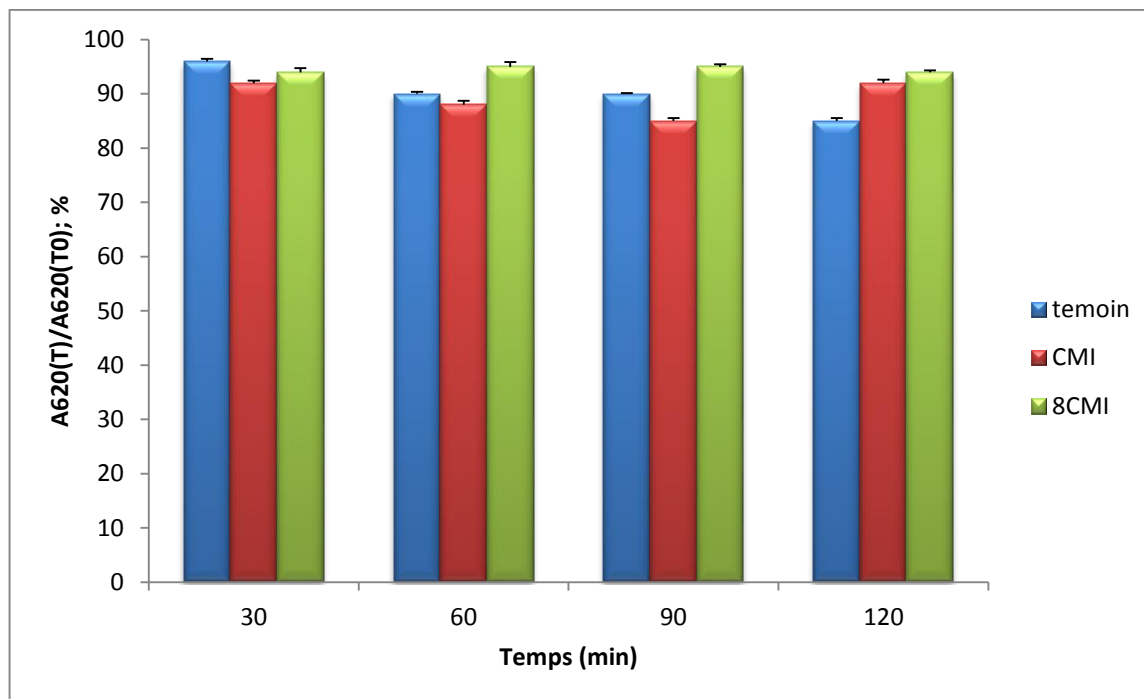
## VI.7. Expérience de la lyse cellulaire

La recherche de l'effet bactériolytique est basée sur la mesure de l'absorbance d'une suspension bactérienne de la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, traitée avec des concentrations croissantes des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, à une longueur d'onde de 620 nm (**Figure 45**). L'évaluation de la perte d'absorbance est estimée en fonction de l'absorbance initiale. Les résultats sont exprimés comme étant le rapport de l'absorbance mesurée au temps T sur l'absorbance à 620 nm mesurée au temps zéro ( $A_{620}(T) / A_{620}(T_0)$ , en pourcentages). Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique d'une manière irréversible et conduisent à la mort de la cellule bactérienne par un processus lytique (**Denyer et Hugo, 1991 ; Hamouda et Baker, 2000**).

Les huiles essentielles extraites d'origan, de bois de rose et de thym ont généré des effets similaires sur *Streptococcus pneumoniae* (**Horne et al., 2001**). Le traitement des cultures de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 avec huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* à des concentrations égales à la CMI, a réduit la biomasse bactérienne. A cet effet, les huiles essentielles d'*Inula viscosa* n'ont exercé aucun effet lytique sur la croissance de cultures de *S. aureus*. Des observations similaires sur la croissance de *S. aureus* en présence des huiles essentielles extraites de *Melaleuca alternifolia* ont été décrites par **Carson et al. (2002)**, qui ont suggéré que les huiles essentielles extraites de *Melaleuca alternifolia* compromettent l'intégrité structurale de la membrane plasmique et induisent une perte du matériel cytoplasmique (**Carson et al., 2002 ; Reichling et al., 2002**).

D'une manière générale, la première cible de l'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique, expliqué par l'hydrophobicité des molécules, entrant dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (**Sikkema et al., 1994; Cox et al., 2000 ; Carson et al., 2006**). Outre, les altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieure des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (**Cristani et al., 2007**).

En tenant compte sur la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles d'*Inula viscosa* semblent agir simultanément sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique.



**Figure 45** : Variations au cours du temps de l'absorbance à 620 nm de suspensions de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 non traitées et traitées avec des concentrations en huile essentielle d'*Inula viscosa* égales à la CMI et à huit fois la CMI.

## VII. Etude de l'effet de synergie des huiles essentielles et des bactériocines

Dans le but d'explorer le spectre d'activité antibactérienne des bactériocines produites chez les bactéries lactiques vis-à-vis certaines bactéries à Gram négatif, une étude synergie entre les bactériocines des bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes (BL16, BL20, BL50) et les huiles essentielles d'*Inula viscosa* est lancée.

Les résultats obtenus sur les indices de FICI des combinaisons entre les bactériocines et les huiles essentielles selon le test de Damier, sont illustrés dans le **Tableau 11**. En se référant à l'échelle des FICI, les combinaisons testées ont affiché une synergie de (FICI < 0.5) chez *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La combinaison entre les huiles essentielles et les bactériocines ont montré un effet additif utile avec une FICI ( $0.5 \leq \text{FICI} \leq 1$ ) contre *Escherichia coli*.

**Tableau 11** : Indices (FICI) des combinaisons d’H.E d’*Inula viscosa* et des bactériocines contre les microorganismes.

Combinaison	FICI			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932
1. H.E- Bactériocine de BL16	0.45 <sup>S</sup>	0.75 <sup>A</sup>	0,4 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>
2. H.E- Bactériocine de BL20	0.37 <sup>S</sup>	0.68 <sup>A</sup>	0,42 <sup>S</sup>	0.125 <sup>S</sup>
3. H.E- Bactériocine de BL50	0.5 <sup>A</sup>	0.72 <sup>A</sup>	0,37 <sup>S</sup>	0.27 <sup>S</sup>

Les resultants sont interprétés comme: synergie (S, FICI<0.5), addition (A, 0.5≤FICI≤1), indifférence (I, 1<FICI≤4) ou antagonisme (AN, FICI>4).

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

**Turgis et ses collaborateurs (2012)** ont rapporté que la combinaison de la pédiocine avec les huiles essentielles de *Satureja Montagna* ont manifesté une excellente activité synergique contre *E. coli* O157: H7 et un effet additif contre *Bacillus cereus*. Par ailleurs, la combinaison de la pédiocine avec les huiles essentielles d’*Origanum vulgare* a révélé un effet additif contre *L. monocytogenes* et un effet antagoniste contre *B. cereus*, *E. coli* O157: H7 et *L. sakei*. les résultats de l’effet de synergie de la bactériocine MT104b produite par *Enterococcus faecium* et les H.E de Cinnamon cassia ont montré que cette combinaison avait un effet de synergie contre *L. sakei*, et un effet additif contre *L.monocytogenes* et *S.aureus*, la combinaison avait un effet antagoniste contre *E. coli* O157: H7.

**Solomakos et al. (2008)** ont rapporté que la combinaison entre les huiles essentielles du thym (0,6%) avec la nisine (1000 UI/g) ont manifesté un pouvoir potentiel d’inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* sur la viande hachée, traduite par une réduction de la population bactérienne pathogène à un seuil inférieur de la limite officielle de l’Union européenne, fixée récemment à 2 logs UFC/g au cours du stockage à une température 4°C.

**Ghafi et ses collaborateurs (2006)** ont rapporté que l'utilisation combinée des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* et les bactériocines produites par *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 a augmenté la durée de conservation de la viande.

Par ailleurs, **Periago et Moezelaar (2001)** ont montré que la valeur du pH et la température ont influencé considérablement l'activité antimicrobienne de la nisine et du carvacrol contre *Bacillus cereus* et ont constaté que l'effet combiné de la nisine avec le carvacrol a manifesté une importante activité antibactérienne à différentes valeurs de pH et à des basses températures.

Le mécanisme réel de la synergie entre les huiles essentielles et les bactériocine n'est pas parfaitement éclairci. Cependant, les huiles essentielles utilisées peuvent contribuer à la stimulation de l'action des bactériocines par l'augmentation du nombre des pores élaborés au niveau de la des membranes cytoplasmiques et le développement de leur taille, ce qui conduit à une réduction considérable des cellules viables (**Pol & Smid 1999**).

### **VIII. Application des bactériocines et des huiles essentielles**

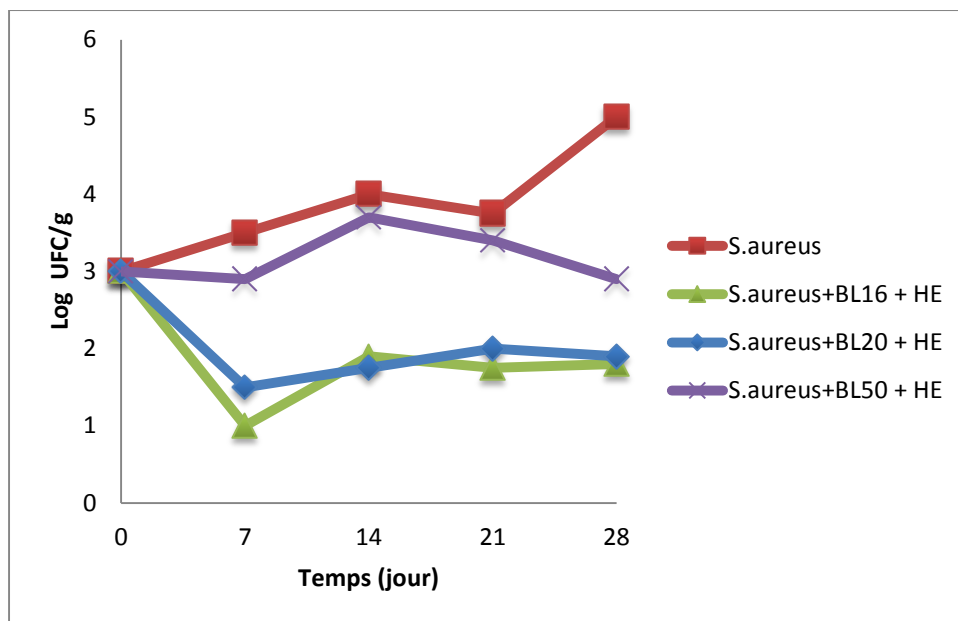
Les concentrations de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 en présence des surnageants des souches BL 16, BL20 et BL50 et des H.E d'*Inula viscosa* sont évaluées dans la viande de mouton conservé à 4 ° C pendant 28 jours (**Figure 46**).

La concentration de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 dans la viande de mouton sans l'ajout des surnageants et des H.E a légèrement augmenté au cours de la conservation de au bout de 21 jours. L'ajout des surnageants des souches de BL 16, BL 20 et des H.E a conduit à une réduction de la concentration de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 de 2 log UFC/g après 7 jours de conservation, et enfin en dessous de la limite de détection ( $2 \times 10^1$  UFC/g) à la fin de la période de conservation. L'ajout de BL 50 et des H.E a conduit à une réduction plus faible du nombre de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, les concentrations sont inférieure de 0,7log à celles du témoin au bout de 7 jours, et 0,2 et 0,5 log après 14 et 21 jours, respectivement. L'ajout des surnageants des bactéries lactiques et des H.E ensemble a entraîné une meilleure inhibition de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 dans la viande du mouton.

L'application des surnageants des bactéries lactiques en combinaison avec les H.E d'*Inula viscosa* dans la viande du mouton crue conduit à l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et à une réduction au-dessous des limites de détection. Il semble que cet effet est dû à l'interaction synergique entre les bactériocines produites par les souches BL 16, BL 20 et BL50 et les H.E d'*Inula viscosa*. Cette augmentation de l'effet

sur des souches de contamination alimentaire lorsque différentes bactériocines sont appliqués ensemble a déjà été démontrée pour la nisine et curvaticin 13 (Bouttefroy et al., 2000) , lactocin 705, nisine et enterocin CRL35 (Vignolo et al., 2000).

À notre connaissance, ceci est le premier exemple d'un effet de synergie entre les bactériocines des bactéries lactiques et des H.E *d'Inula viscosa*. Cette étude a démontré que les bactériocines produites par *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* et *Enterococcus faecium*, peuvent être appliquées dans la viande crue pour éviter la contamination de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 .



**Figure 46 :** Effet des bactériocines de BL16 , BL20 et BL 50 en combinaison avec les H.E *d'Inula viscosa* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 durant la conservation de la viande de mouton crue à 4°C.

# **Discussion Générale**

## DISCUSSION GENERALE

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans la fermentation pour la production des produits alimentaires par différentes populations.

Outre, leurs caractéristiques de fermentation, leur stabilité aux variations des valeurs de pH et aux températures élevées, la propriété de bioconservation est leur attribuée.

Les métabolites responsables d'activités antimicrobiennes dirigées contre des germes pathogènes de l'alimentation tels que *Listeria*, *Staphylococcus* et *Salmonella* s'avèrent être à l'origine de cette propriété de bioconservation. L'acide lactique et des peptides antimicrobiens appelés bactériocines constituent les éléments impliqués dans cette bioconservation.

La nisine est utilisée depuis 40 ans comme conservateur alimentaire dans plus de 80 pays, la pédiocine est également commercialisée comme conservateur alimentaire. Les études portées sur des bactériocines sont toujours en cours afin de mieux comprendre leur structure et leurs modes d'actions pour élargir leurs applications. Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières, qui consiste en application de plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes pathogènes sans altération des qualités organoleptiques du produit. Parmi les techniques couramment utilisées, l'association des bactériocines avec des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques.

L'étude l'effet de synergie des bactériocines produites chez les bactéries lactiques isolées du lait de chèvre Algérien et les huiles essentielles d'*Inula viscosa* sont mises en évidence.

L'isolement des bactéries lactiques à partir du lait cru de chèvre et leur identification par l'utilisation des tests d'identification biochimiques a montré leur appartenance aux genres : *Streptococcus* (BL16), *Pediococcus* (BL20), et *Enterococcus* (BL50) avec un caractère Homo-fermentaires. L'identification des bactéries lactiques isolées est réalisée selon les recommandations décrites par Carr *et al.*, (2002); Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006). Des travaux réalisés par (Badis *et al.*, 2004a, 2004 b, 2005) ont montré l'isolement des espèces de *Pediococcus* dominants *P. damnosus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, et *Streptococcus thermophilus*, à partir du lait de chèvre d'Algérie. Par ailleurs, Coccolin *et al.*, (2007) ont rapporté l'isolement de deux espèces d'*Enterococcus faecium* M241 et M249 à partir du lait de chèvre de l'Italie.

L'utilisation du profil biochimique de la fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL, a indiqué l'appartenance des souches aux espèces *Streptococcus*



*thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50). Avec un pourcentage de similitude de 100% chez la souche BL 20 et de 98,75% 95,55 chez les souches (BL 50 et BL16) respectivement.

**Guessas et Kihal., 2004; Laouabdia Sellami et al., 2007; Mami et al., 2008 et Bendimerad et al., 2012 ; Badis et al., 2004, 2005)** ont rapporté sur l'isolement des souches appartenant aux espèces *Streptococcus thermophilus*, et *Pediococcus acidilactici* à partir du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie.

Les souches isolées ont manifesté une activité antagoniste contre les bactéries Gram positif. Cette activité est exploré in vitro sur milieu de culture solide par la neutralisation de l'effet de l'acide lactique avec une solution tampon phosphate, ce qui facilite la révélation de l'effet d'une autre molécule.

L'activité antagoniste des trois bactéries lactiques sélectionnées (BL16, BL20, et BL50) est mise en évidence vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *St. aureus* ATCC 25932, *E.coli* et *Ps. aeruginosa* ATCC 27853.

la résistance des bactéries à Gram négatif en présence des bactéries lactiques antagonistes peut être due principalement à la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, qui constitue une véritable barrière et empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, le siège de leur activité antagoniste (**Dortu et Thonart, 2008**).

L'étude du suivi de la cinétique de croissance des germes témoins de l'activité antagonistes (BL16, BL 20 et BL 50) est effectuée sur le milieu de culture de MRS, ajusté à une valeur pH 6.8, inoculé avec un volume de 1% (v/v) d'une biomasse de la pré-culture de souche lactique antagoniste, incubée à une température de 37°C.

Les courbes de croissance des souches lactiques sélectionnées antagonistes (BL16, BL20 et BL50) ont manifesté un comportement physiologique différent, la phase exponentielle est atteinte après (4, 6, 2) heures d'incubation, chez les souches (BL16, BL 20, BL 50) respectivement. Cependant, la phase stationnaire apparait après (10, 12, 16) heures d'incubation chez les souches (BL16, BL 20, BL 50) respectivement. L'acidité est étroitement liée à la croissance bactérienne, ce qui explique l'augmentation de l'acidité et par conséquent une diminution de pH.

Une augmentation progressive de l'activité antagoniste est observée au début de la phase exponentielle avec un maximum après 10 heures d'incubation et une stabilisation durant la phase stationnaire, ce qui explique que la sécrétion des molécules responsables de l'activité antagoniste dans le surnageant du milieu de culture a augmenté au fur et à mesure de la

croissance bactérienne et a atteint son maximum de production à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire de croissance.

**Yang et ses collaborateurs (1992)** ont rapporté que la production de bactériocine chez les bactéries lactiques est fortement liée de plusieurs facteurs tels que la performance des souches, la composition du milieu de culture le pH final du milieu de culture, le temps d'incubation et la température optimale de croissance.

Des travaux antérieurs réalisés par (**Moreno et al., 1999; Navarro et al., 2000; Rodriguez et al., 2002; Maldonado et al., 2003; Todorov et Dicks, 2005 et Boumehira et al., 2011**) ont suggéré que l'activité antagoniste peuvent avoir plusieurs origines tels que la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des substances responsables de l'activité antibactérienne ont révélé que ces substances sont thermo-résistante, avec des activités antagonistes importantes à des températures très élevées. La plupart des bactériocines sont connus pour être tolérant à la chaleur, en particulier à un pH faible (**Kwaadsteniet et al., 2005**).

L'activité antagoniste de ces substances est stable à des valeurs de pH comprises entre 4-7 et totalement inhibée de présence de l'action de certaines enzymes protéolytiques.

La perte de l'activité antagoniste après les traitements effectués en présence de certaines enzymes protéolytiques a indiqué la sensibilité des molécules responsables de cette activité à l'action des enzymes protéolytiques, ce qui suggère que cette substance est de nature de nature protéique ou peptidique. **Scheved et al., (1993)** ont rapporté sur la nature des agents inhibiteurs de types bactériocines.

Les infections à *S. aureus* fréquemment rencontrées apparaissent sous des aspects cliniques très variés ; les toxi-infections alimentaires, dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre.

*S. aureus* peut causer des entérocolites aiguës, qui surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S. aureus* antibio-résistant et producteur d'entérotoxines (**Avril et al., 1992**).

L'étude de la capacité des trois souches sélectionnées antagonistes (BL16, BL20 et BL50) à inhiber la prolifération de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, cultivée sur bouillon nutritif, ajusté à une valeur de pH de 6,2, incubée à une température de 30°C a montré que la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 est amorcée après 6 heures d'incubation et la phase stationnaire de croissance est atteinte après 14 h d'incubation, après l'ajout de la

bactériocine extraite de *Streptococcus thermophilus*, accompagnée d'une production de la biomasse bactérienne constante ; ce qui explique l'absence du phénomène de la lyse bactérienne.

Des travaux antérieurs réalisés par **Aktypis et ses collaborateurs (1997)** ont rapporté que la ThermophilinT a manifesté une forte action bactéricide contre les souches de *L. cremoris* CNRZ 117. De nombreux nouveaux lantibiotiques ont plus récemment été découverts comme la thermophiline 1277 (**Kabuki et al., 2009**).

Les lantibiotiques ciblent principalement la membrane cytoplasmique de la bactérie. L'effet antimicrobien des lantibiotiques est le résultat de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne et même l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Chatterjee et al., 2005a, Twomey et al., 2002**).

Par ailleurs, l'action des bactériocines extraites de *Pediococcus acidilactici* (BL20) et d'*Enterococcus faecium* (BL50) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, a montré que la production de la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines, ce qui explique que les cellules traitées ont subi la lyse bactérienne.

**Anderson et ses collaborateurs (1988)** ont rapporté que les bactériocines induisant la lyse des germes témoins de l'activité antagoniste sont observées chez plusieurs espèces de bactéries lactiques.

Des études antérieures réalisées par **Bhunia et ses collaborateurs (1991)** sur le mode d'action de la pédiocine Ach de *Pediococcus acidilactici* H vis-à-vis de *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 ont montré une réduction considérable de la biomasse bactérienne après l'ajout de la bactériocine purifiée.

Les bactériocines de la classe IIa « pediocin-like » agissent sur les bactéries sensibles en perméabilisant la membrane cytoplasmique ce qui entraîne une dissipation de la force protomotrice et une perte de l'ATP cytoplasmique (**Chikindas et al., 1993, Herranz et al., 2001a, Herranz et al., 2001b**). Le mécanisme exact de formation de ces pores demeure néanmoins mal connu (**Diep et al., 2007**), mais il y aurait vraisemblablement une association de plusieurs molécules de bactériocines dans la bicouche membranaire (**Ennahar et al., 2000**).

**Rehaim et ses collaborateurs (2009)** ont suggéré que le même phénomène de la lyse bactérienne, a été lors de l'étude du mode d'action de l'Enterocin produite par *Enterococcus faecium* MMRA.

La réduction des cas des intoxications alimentaires due aux germes nuisibles peut se réaliser par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques, capables de produire des

substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne. **Topisirovic et al., (2006)** ont souligné une approche de l'exploitation des potentialités inhibitrices naturelles de *Lactobacillus helveticus* dans la biopréservation des aliments et la réduction des germes de contamination.

Dans le but d'explorer la possibilité d'élargir le spectre d'activité antibactérienne des bactériocines des bactéries lactiques vis-à-vis de certaines bactéries à Gram négatif, la synergie entre les bactériocines des bactéries lactiques isolées les plus performantes BL16, BL20, et BL50 ; et les H.E d'*Inula viscosa* est mise en évidence.

L'extraction des huiles essentielles d'*Inula viscosa* réalisée par hydrodistillation a donné un rendement de 0.2 %. En Algérie, le rendement en H.E varie considérablement d'une région à l'autre selon les facteurs pédoclimatiques.

Des études récentes réalisées par (**Mahmoud et al., 2010**) ont rapporté sur un taux de 0,05% en huiles essentielles extraites des plantes cultivées en Jordanie, un taux très faibles par rapport aux rendements obtenus de nos extractions, ce qui explique l'influence de facteurs pédologiques tels que la texture, la composition, la porosité et la valeur du pH de sol.

Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles dans ce présent sont déterminées selon des méthodes normalisées, mais elles demeurent insuffisantes. L'utilisation du profil chromatographique a permis l'identification de 43 composés.

Les principaux composés sont sesquiterpènes. Seuls cinq composants ont atteint des pourcentages plus de 5%: Caryophylladienne (21,18%), fokienol (14,19%), Caryophyllène oxide (6,25%), eudesmène (5,64%), $\beta$ -Selinène (5,30%). Certains autres constituants importants identifiés étaient  $\beta$ -guaïène (4,52%), Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (2,18%),  $\alpha$ -Eudesmol (2,68%), E-Nerolidol (2%) et Cedren-14-ol-actéate (2%).

Des travaux antérieurs réalisés sur les huiles essentielles obtenue à partir de plantes, cultivées en France par (**Blanc et al., 2006**) ont montré que une similitude des composés des deux plantes, avec la présence du Fokienol (21,1%), le (E)-nerolidol (8,5%) et le Caryophyllène oxide (2,5%). Par ailleurs, la composition des huiles essentielles par rapport à l'échantillon de de Turquie est nettement différente, avec la présence de bornéol (25,2%), l'acétate d'isobornyle (22,5%) et de l'acétate de bornyle (19,5%) (**Pérez-Alonso et al., 1996**).

Les huiles essentielles ont manifesté *in vitro* une bonne activité antagoniste vis-à-vis de certains germes témoins. L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a montré une excellente inhibition de la croissance *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*, avec des diamètres des zones d'inhibition formées (20.20.20.19 mm) respectivement.

Des études antérieures rapportées par **Wamith et ses collaborateurs (2010)** sur l'étude de l'activité antibactérienne de 14 huiles essentielles vis-à-vis de certaines souches ont montré que les huiles essentielles d'*Inula viscosa* ont manifesté une excellente activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif et négatifs.

Par ailleurs, l'étude réalisée par **Kabouche et ses collaborateurs (2012)** a montré que Les huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa*, récoltées de la région d'Ain El-Bey a inhibé considérablement la croissance de *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* ATCC, *E. coli* ATCC, avec des diamètres des zones d'inhibition de (24, 21, (20 mm) respectivement.

Les valeurs de CMI et CMB des huiles essentielles extraites d'*Inula viscosa* déterminées par la technique de macrodilution sur milieu de culture liquide sur les quatre souches bactériennes sont comprises entre 0.3 et 1.25 mg/ml. Le rapport CMB/CMI a permis de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. L'huile a effet bactéricide, lorsque ce rapport est inférieur ou égale à 4. Les rapports CMB/CMI obtenus des huiles essentielles d'*Inula viscosa* sont de 2,4 et 2.08 respectivement. A cet effet, les huiles essentielles d'*Inula viscosa* semble avoir une action bactéricide contre la totalité des souches testées.

Dans travaux antérieurs réalisée par **Benyahia (2014)** ont rapporté que les huiles essentielles extraites à partir des tiges et des feuilles d'*Inula viscosa* ont montré une faible activité inhibitrice de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 avec une CMI de 6 et 4 mg/ml respectivement. Cependant, Les bactéries à Gram négatif elles que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 ; *Escherichia coli* ATCC 25922, et deux souches Gram positive *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 se manifestent très résistantes contre les huiles essentielles d'*Inula viscosa*.

La Dynamique d'action des huiles essentielles d'*Inula viscosa* est étudiée a révélé que l'effet bactéricide dépend du temps. Les huiles essentielles d'*Inula viscosa* ont réduit considérablement la viabilité cellulaire avec un effet létal obtenu au bout de deux heures d'action. L'action des huiles essentielles d'*Inula viscosa* utilisée à la CMI, est immédiate durant les 10 premières minutes.

Les interactions avec les structures hydrophobes des bactéries jouent un rôle clé dans les actions antimicrobiennes des sesquitérènes (**Sikkema et al.,1995**). Par conséquent, les hypothèses concernant le mécanisme d'action des H.E d'*Inula viscosa* sont basées sur la nature de ses composants. Dans la présente étude, des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 dans la phase stationnaire de croissance ont été tués par les H.E d'*Inula viscosa*

et ses composants. Les bactéries dans cette phase de croissance sont généralement moins sensibles aux **chocs** que celles de la phase exponentielle (**Corre et al., 1990**), et ceci a été démontré pour *Escherichia coli* traitées avec des H.E d'*Origan* (**Gustafon et al., 1998**). Puisque les agents antimicrobiens qui affectent les processus de la synthèse de la paroi ont souvent peu d'effet sur les bactéries dans la phase stationnaire de croissance (**Gilbert, 1984, Russell et al., 1973**), ces résultats suggèrent que l'objectif principal des H.E d'*Inula viscosa* n'est pas le procédé de la synthèse macromoléculaire.

Certains agents antimicrobiens causent des dommages à la membrane et provoquent la lyse des cellules entières (**Denyer et Hugo , 1991 ; Russell et al., 1973**); ce qui a été rapporté précédemment pour les huiles essentielles d'origan, de bois de rose, et le thym (**Horne et al., 2001**). Cependant, les principaux composants de ces huiles, y compris le carvacrol, le citronellol, le géraniol, le thymol (**Windholz, 1983**) ne se trouvent pas dans les H.E d'*Inula viscosa*. L'échec des composants des H.E d'*Inula viscosa* ou de ses composants à lyser les cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 suggère que le site principal de leur mécanisme d'action n'est pas uniquement la paroi cellulaire.

En tenant compte sur la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles d'*Inula viscosa* semblent agir simultanément sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

D'une manière générale, le site d'action ciblé des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique, lié directement à l'hydrophobicité des molécules qui entrant dans la composition des huiles essentielles, ce qui facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Et par conséquent, la déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et la modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (**Sikkema et al., 1994; Cox et al., 2000 ; Carson et al., 2006**).

Outre, les altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieure des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (**Cristani et al., 2007**).

Plusieurs études ont montré que les facteurs affectant l'efficacité des bactériocines dans un produit alimentaire sont complexes. Certains de ces facteurs sont la composition du produit, la température de stockage, le processus de transformation, le pH, la concentration en sel, l'adsorption de la bactériocine au constituant alimentaire, la microflore endogène, la protéase présente dans le produit et, si la souche productrice est utilisé, la production de la bactériocine

à l'intérieur du produit alimentaire (Galvez et al., 2007). L'utilisateur peut alors se demander: «Comment pouvons-nous augmenter la probabilité d'une application réussie de bactériocines ou les bactéries productrices pour inhiber les souches d'altération dans un produit alimentaire spécifique? ».

Le premier paramètre à prendre en considération pour l'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine est de choisir les souches qui appartiennent à des espèces qui sont bien adaptées au produit et à la température de stockage. Étant donné que les applications alimentaires de LAB sont bien étudiés, beaucoup d'informations sont présentes dans la littérature scientifique. La composition du produit (pH, sel, teneur en matières grasses, conservateur ...) et le processus de production (traitement thermique ...) auront également un impact fort. L'évaluation in vitro de l'impact de ces facteurs (à savoir pH ou de température) sur l'activité bactériocine permettra l'élimination de la LAB et / ou les bactériocines qui ne sont pas bien adaptées (Ghalfi et al., 2006; Kouakou et al., 2008).

La mise en œuvre d'une combinaison des bactériocines avec d'autres agents de conservation chimiques ou physiques a donné des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. L'utilisation des agents chimiques tels que les acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles et leur impact sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires a été évaluée. L'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate sont des agents chélateurs qui séquestrent les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatives et favorisent la pénétration des bactériocines de la membrane externe, siège de leur activité. Les traitements physiques utilisés sont généralement la température, le stockage dans une atmosphère contrôlée et l'application de champs électrique avec une haute pression (Rodgers, 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

L'étude de la synergie entre les bactériocines des bactéries lactiques isolées sélectionnées performantes (BL16, BL20, et BL50) ; et les huiles essentielles d'*Inula viscosa* étudiée montre que toutes les combinaisons testées ont affiché une synergie pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, les combinaisons de l'H.E et des bactériocines ont montré un effet additif utile avec une FICI ( $0.5 \leq \text{FICI} \leq 1$ ) contre *Escherichia coli*. Turgis et al. (2012) ont démontré que l'action combinée de la pédiocine avec les huiles essentielles extraites de *Satureja Montagna* ont manifesté une activité synergique contre *E. coli* O157: H7 et un effet additif contre *Bacillus cereus*. Cependant, la combinaison de la pédiocine avec les huiles essentielles extraites d'*Origanum vulgare* a manifesté un effet additif contre *L. monocytogenes*, et un effet

antagoniste contre *B. cereus*, *E. coli* O157: H7 et *L. sakei*. La combinaison des huiles essentielles extraites de *Cinnamomum. cassia*, avec la pédiocine a manifesté un effet additif contre *Pseudomonas putida* et un effet antagoniste contre *B. cereus* et *E. coli* O157: H7.

Le mécanisme réel de la synergie entre les huiles essentielles et les bactériocine n'est pas parfaitement éclairci. Cependant, les huiles essentielles utilisées peuvent contribuer à stimulation de l'action des bactériocines par l'augmentation du nombre des pores élaborés au niveau de la des membranes cytoplasmiques et le développement de leur taille des, ce qui conduit à une réduction considérable des cellules viables (**Pol & Smid 1999**).

Depuis que des concentrations plus élevées des H.E sont généralement nécessaires pour assurer leur activité antimicrobienne pour la conservation des aliments, leur application est limitée en raison des changements dans la qualité organoleptique et la texture des aliments ou des interactions des H.E avec des composants alimentaires (**Gutierrez et al., 2008**).

Jusqu'à aujourd'hui, les produits carnés sont souvent contaminés par des agents pathogènes alimentaires. Les techniques actuelles utilisent les additifs synthétiques pour assurer la sécurité alimentaire. Étant donné que la sécurité des additifs synthétiques a été remise en question au cours des dernières années, et que les consommateurs exigent de plus en plus l'utilisation de produits naturels et d'autres conservateurs dans les aliments, l'utilisation combinée des H.E et des bactériocines semble être une alternative naturelle prometteuse. A cet égard, les combinaisons des H.E et des bactériocines peuvent être une alternative naturelle très prometteuse.

L'application des surnageants des bactéries lactiques en combinaison avec les H.E d'*Inula viscosa* dans la viande du mouton crue conduit à l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et à une réduction au-dessous des limites de détection. Il semble que cet effet est dû à l'interaction synergique entre les bactériocines produites par les souches BL 16, BL 20 et BL50 et les H.E d'*Inula viscosa*.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour la lutte contre les intoxications alimentaires en utilisant des potentialités biologiques des produits naturels et les interactions entre les microorganismes afin de réduire ainsi l'effet secondaire indésirable des produits chimiques appelés conservateurs. Les bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre synthétisant des substances antimicrobiennes et les huiles essentielles d'*Inula viscosa*, seront probablement utilisées dans la bio-préservation des aliments dans l'avenir.



# **Conclusion Générale**

## CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail, l'isolement, le criblage et la sélection d'une large gamme de bactéries lactiques productrices de bactériocines à partir du lait cru de chèvre d'origine algérienne ont été mise en évidence. Les résultats obtenus ont permis la sélection de trois bactéries lactiques antagonistes appartenant aux espèces suivantes : *Streptococcus thermophilus* (BL16), *Pediococcus acidilactici* (BL20) et *Enterococcus faecium* (BL50).

Dans le but d'améliorer le processus de production des bactériocines chez les trois bactéries lactiques sélectionnées antagonistes, les paramètres suivants : la performance des souches, le pH final du milieu de culture, le temps d'incubation, la température optimale de croissance et la réduction de l'effet d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène ont été étudiés.

L'activité antagoniste des trois bactéries lactiques sélectionnées antagonistes est mise en évidence vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats obtenus ont montré que *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 étaient sensibles aux bactériocines produites chez les trois bactéries lactiques sélectionnées. Cependant les germes témoins de l'activité antagoniste (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ont manifesté une résistance contre les bactériocines extraites des bactéries lactiques antagonistes.

L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne et de la production des bactériocines a montré une corrélation entre la production de la biomasse bactérienne et la sécrétion de bactériocine dans le surnageant du milieu de culture MRS liquide.

La caractérisation physico-chimique des bactériocines a montré leur thermo-résistance, avec des activités antagonistes importantes à des températures très élevées. L'activité inhibitrice des bactériocines est constante à des valeurs de pH comprises entre 4-7 et entièrement inhibée sous l'action de certaines enzymes protéolytiques.

L'étude du mode d'action de la bactériocine partiellement purifiée de *Pediococcus acidilactici* et d'*Enterococcus faecium* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, a entraîné la lyse des cellules traitées. Par ailleurs, la bactériocine partiellement purifiée de *Streptococcus thermophilus* a manifesté une activité bactériostatique sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

Cependant, les bactériocines utilisées dans la préservation des aliments sont soumises aux nombreuses contraintes liées principalement: à la résistance des bactéries Gram négatif, L'association des bactériocines avec des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques

constitue une technique couramment utilisée. L'extraction de l'huile essentielle *d'Inula viscosa* réalisée par hydrodistillation a donné un rendement de 0.2%.

Les résultats de l'analyse des huiles essentielles par CG/SM ont permis la caractérisation des composés majoritaires tels que Caryophylladiène (21,18%), fokienol (14,19%), Caryophyllène oxide (6,25%), eudesmène (5,64%), $\beta$ -Selinène (5,30%). Certains autres constituants importants identifiés étaient  $\beta$ -guaiène (4,52%), Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (2,18%),  $\alpha$ -Eudesmol (2,68%), E-Nerolidol (2%) et Cedren-14-ol-actéate (2%).

La CMI obtenue est comprise entre 0.3 et 1.25 mg.ml<sup>-1</sup> et la CMB entre 0.6 et 5 mg.ml<sup>-1</sup>. La Dynamique d'action des huiles essentielles *d'Inula viscosa* étudiée par le suivi de la mort cellulaire, a révélé l'effet bactéricide des huiles essentielles.

L'effet de synergie entre les bactériocines des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes (BL16, BL20, et BL50) et les huiles essentielles *d'Inula viscosa* mis en évidence selon le test en damier a affiché une synergie (FICI <0.5) pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

L'application des surnageants des bactéries lactiques en combinaison avec les H.E *d'Inula viscosa* dans la viande du mouton crue conduit à l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et à une réduction au-dessous des limites de détection. Il semble que cet effet est dû à l'interaction synergique entre les bactériocines produites par les souches BL 16, BL 20 et BL50 et les H.E *d'Inula viscosa*.

A l'essor de cette étude, la combinaison des bactériocines des bactéries lactique et les huiles essentielles extraites *d'Inula viscosa* pourrait être considérée comme une alternative très prometteuse pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher la croissance des bactéries Gram positives et négatives responsable d'altération des aliments.

En perspectives, des études in vitro sont nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de ces combinaisons dans différents systèmes alimentaires.

# Références Bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Aasen I. M., Moreto T., Katla T., Axelsson L., Storro I. (2000).** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sake* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:159-166.
- Abdelguerfi A. et Laouar M. (2003).** Espèces fourragères et pastorales, leurs utilisations au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Editions FAO, 136.
- Abee T., Krockel L., Hill, C. (1995).** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol.*28: 169-185.
- Abee T., Klaenhammer T. R., Letellier L. (1994).** Kinetic studies of the action of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1006-13.
- Abriouel H. E., Valdivia A., Galvez A., Maqueda M. (2001).** Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocins AS-48. *Curr. Microbiol.* 42: 89-95.
- Abu Zarga M. H., Hamed E.M., Sabri S.S., Voelter W., Zeller K. (1998).** *J. Nat. Prod.* Vol.61:798-800,
- Acheson L. (1999).** Independent inquiry into inequalities in health report. The Stationery Office.London.
- Adams, M. R., and Marteau, P. (1995).** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol.*27: 263-264.
- Adams M. R., Hall C. J. (1988).** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- Adams M. R., Moss M. (2008).** Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:4.
- Aeschlimann A., Von Stockar U. (1990).** The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Loctobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 32:398.
- Afnor. (2000).** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse ». AFNOR, Paris. 440 .
- Aguirre M., Collins M. D. (1993).**Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.*75: 95-107.
- Ahmadova A., Dimitrov Todorov S., Choiset Y., Rabesona H., Zadi., Kuliyevev A., Gombossy B .D., Franco D. M. ,Chobert J.M., Haertlé T. (2013).**Evaluation of

antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30 :631-641.

**Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A., Molin G. (1998).** The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. App. Microbiol.* 85:88-94.

**Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis in't Veld J H J., ten Brink B. (1998).** Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *J. Appl. Microbiol.* **84** : 568–576.

**Allison G. E., Fremaux C., Klaenhammer T. R. (1994).** Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J Bacteriol.* 176: 2235-2241.

**Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I., Koidis P. (2008).** Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresource Technol.* 14 :6646-6650.

**Anastasiadou S., Papagianni M., Filiuosis G., Ambrosiadis I., Koids P. (2008)** .Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. *Enzyme and microbial technology.* 43: 448-454.

**Ana Belen F., López-Díaz M.C., Álvarez-Martin P., Mayo B. (2006).** Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pâte persillée fromage de Cabrales: identification des dominantes des bactéries lactiques. *Eur. Res. Technol. Aliment.* 223, 503-508.

**Ananou, S., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2005).** Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 99: 1364-1372.

**Ananou, S., Munoz, A., Martinez-Bueno, M., Gonzalez-Tello, P., Galvez, A., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2010).** Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol.* 27: 58-63.

**Anderssen E. L., Diep B. D., Nes I. F., Eijsink V. G. H., Nissen-Meyer J. (1998).** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.

**Andersson R. (1986).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 3:149-160.

- Anton R., Lobstein A., (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. *Tec. & Doc.*, Paris, 522.
- Arakawa K., Kawai Y., Ito Y., Nakamura K., Chujo T., Nishimura J., Kitazawa H., Saito, T. (2010).** HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reuterin 6. *Lett Appl Microbiol.*50: 406-411.
- Asaduzzaman S. M., Nagao J., Aso Y., Nakayama J., Sonomoto K. (2006).** Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Appl Environ Microbiol.*72: 6012-6017.
- Asaduzzaman S. M., Sonomoto K. (2009).** Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng.*107: 475-487.
- Aslim B., Yuksekdogan Z. N., Sarikaya E., Beyatli Y. (2005).** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT.* 38: 691-694.
- Atrih A., Foster S. J. (2001a).** Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol.*91: 364-372.
- Atrih A., Rekhif N., Moir A. J., Lebrihi A., Lefebvre G. (2001b).** Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int J Food Microbiol.*68: 93-104.
- Avril D., Denis M. (1992).** Biopréservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70: 331-345.
- 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.
- Axelsson L. T. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects*. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D. E., Tornadijo M. E., Kihal M. (2004).** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D. E., Tornadijo M. E., Kihal M. (2004a).** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.

- Badis A., Guetrani D., Moussa-Boudjema B., Henni D. E., Kihal M. (2004 b).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21: 579- 588.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales “Arabia et Kabyle”. *Sci et Technol.* 23: 30-37.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2006).** Caractérisation phenotipique des bacteries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux population caprines locale « Arabia et Kabyle ». *Sci. Tech.* 23 : 30-37.
- Bagamboula C. F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21:33-42.
- 
- Bajpai V. K., Kang .C. (2010).** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87:327-336.
- Bajpai V. K., Shukla S., Kang S. C.(2008).** Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology* 99:8903- 8908.
- Banias C., Oreopoulou V., Thomopoulos C. D. (1992).** *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69, 520-524.
- In* Kulevanova S. and Panovska T.K., 2001. Antioxidant activity of essential oils of different Wild *thymus* L. Species. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 20:61-66.
- Barefoot S. F., Klaenhammer T. R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
- Barefoot S. F., Klaenhammer T. R. (1984).** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother. Pub Med.* 26(3):328–334.
- Baser K. H. C., Buchbauer G.(2010).** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America.994.
- Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., and Karadogan T.( 2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15:169-172.
- Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N. E., Drider D. (2011)** .Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Nantes, France.1-41.
- Benayache S., Benayach F., Dendougui H., Jay M. (1991).***Plantes médicinales et phytothérapie. Tome xxv.N°4.*170- 176,



- Benayad N., (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63.
- Bendimerad N., Kihal M., Berthier F.( 2012).** Isolation, Identification, and Technological Characterization of Wild *Leuconostocs* and *Lactococci* for Traditional Raib Type Milk Fermentation. Dairy Sci. Technol. 92: 249-264.
- Benini C. (2007).** Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. *Mémoire d'ingénieur*. Université Gembloux, 109.
- Benyahia A., Merad M.(2014).** CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE DEUX PLANTES MÉDICINALE *Inula viscosa* et *Inula Montana*. Mémoire de Master. Université de Tlemcen.
- Beraoud L. (1990).** Effet de certains épices et plantes aromatiques et leurs extraits sur la croissance et la toxino-génèse d'*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Thèse 3<sup>e</sup> cycle*. Faculté des sciences de Rabat. Maroc.
- Bernadet M. (2000).** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Ed. Dangles. **In Benzeggouta N. (2005).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. *Mémoire de magister*, Université de Constantine, 110.
- Besombes C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289.
- Bhunja A. K., Johnson M. C., Ray B., Kalchayanand N. (1991).** Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25–30.
- Bierbaum G., Sahl H. G. (2009).** Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.10*: 2-18.
- Bilgrami K. S., Sinha K. K., Sinha A. K. (1992).** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96:171- 175.
- Birri D. J., Brede D. A., Forberg T., Holo H., Nes I. F. (2010).** Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol.76*: 483-492.

- Biswas S. R., Ray P., Johnson M. C., Ray B. (1991)** . Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57(4)** : 1265-1267.
- Björkroth J., Holzapfel W. (2003)**. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York, Springer-Verlag. *Epub March*. 28.
- Björkroth J. et Holzapfel W. 2006** : Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. Chap. 1.2. 9. In *prokaryotes*. 4:267-319.
- Blanc M.C., Bradesi P.,Gonçalves M.J., Salgueiro L.(2006)**. Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*:analysis by <sup>13</sup>C-NMR and antimicrobial activity. *ET AL.Flavour Fragr. J.* **21**: 324–332
- Bonelli R. R., Schneider T., Sahl H. G., Wiedemann I. (2006)**. Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrob Agents Chemother.***50**: 1449-1457.
- Booth M. C., Bogie C. P., Sahl H. G., Siezen R. J., Hatter K. L.,Gilmore M. S. (1996)**. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol.***21**: 1175-1184.
- Borrero J., Brede D. A., Skaugen M., Diep D. B., Herranz C., Nes I. F., Cintas L. M.,Hernandez P. E. (2011)**. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl Environ Microbiol.***77**: 369-373.
- Boumehira A. Z., Mami A., Hamedi A. R., Henni J. E., Kihal M. (2011)**. Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria. *J. Pure. Appl. Microbiol.* Vol. **5(2)** ,553-566.
- Bouttefroy A., Millière J.B. (2000)**. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L. monocytogenes* ATCC15313. *Int. J. Food Microbiol.* **62**, 65-75.
- Bouziane T., Elmajdoub T., Thonart P.H., Hamdi M. (2004)**. Sélection de bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. *Microbiol. Hyg. Alim.* Vol **16**. n°46.
- Bowles E. J. (2003)**. The chemistry of aromatherapeutic oils. 3<sup>rd</sup> Ed. *Allen & Unwin*, Australia.257.

- Boz I., Burzo I., Zamfirache M. M., Toma C., Padurariu C., (2009).** Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 36-39.
- Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., Laurans G., Arlet G., Thien H. V., Gouriou S., Picard B., Denamur E. (2005).** Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase type. *Emerg. Infect. Dis.* 11(1):54-61.
- Breukink E., van Kraaij C., Demel R. A., Siezen R. J., Kuipers O. P., de Kruijff, B. (1997).** The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*.36: 6968-6976.
- Breukink E., van Kraaij C., van Dalen A., Demel R. A., Siezen R. J., de Kruijff B., Kuiper O.P.(1998).** The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*. 36: 8153-8162.
- Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H., de Kruijff, B. (1999).** Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*.286: 2361-2364.
- Breukink E., van Heusden H. E., Vollmerhaus P. J., Swiezewska E., Brunner L., Walker S., Heck A. J., and de Kruijff B. (2003).** Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem*.278: 19898-19903.
- Breukink E., and de Kruijff B. (2006).** Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*.5: 321-332.
- Brogden K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria, *Nat Rev Microbiol*.3: 238-250.
- Brötz H., Bierbaum G., Markus A., Molitor E., Sahl, H. G. (1995).** Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob Agents Chemother*.39: 714-719.
- Brötz H., Bierbaum G., Reynolds P. E., Sahl, H. G. (1997)** .The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem*.246: 193-199.
- Brötz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl, H. G. (1998a).** The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother*.42: 154-160.
- Brötz H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Gotz F., Bierbaum G., Sahl H. G. (1998b).** Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol*.30: 317-327.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc*.

Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition, Paris. 915.

**Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* Lavoisier 3<sup>ème</sup> édition, Paris.

**Bssaibis F., Gmira N., Meziane M. (2009).** *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol.3, N°1. 44-55.

**Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94:223-253.

**Cabo M.L., Braber A. F., Koenraad P. (2002).** Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* 65: 1309-1316.

**Caillet S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*).1- 8.

**Callewaert R., De Vuyst L. (2000).** Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 66: 606–613.

**Callewaert R., De Vuyst L., Remedios M., Moreno F. (2002).** Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium. *Bioseparation.* 10(1-3):45-50.

**Camacho L., Fernández A., Fernández C., Altarejos J., Laurent R. (2000).** *J.Rivista Italiana Eppos.* Vol.29. 3-8.

**Caplice E., Fitzgerald G. F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.

**Carr F. J., Chill D., Maida N. (2002)** . The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology.* 28(4): 281-370.

**Carette A.S., (2000).** La lavande et son huile essentielle. *Thèse de doctorat.* Université de La Rochelle, 289.

**Carson C. F, Hammer K. A, Riley T. V .(2006).** *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 50-62.

**Casaus P., Nilsen T., Cintas L. M., Nes I. F., Hernandez P. E., Holo, H. (1997).** Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.*143 (Pt 7): 2287-2294.

**Castellano P., Raya R.,Vignolo G. (2003).** Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int J Food Microbiol.*85: 35-43.

- Cintas L. M., Casaus P., Holo H., Hernandez P. E., Nes I. F., Havarstein L. S. (1998).** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180, 1988-1994.
- Ceylan E., Fung D. Y. C., Sabah J. R. (2004).** Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Sci.* 69:102-106.
- Chafai S. (2006).** Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet de chair, Mémoire de magister en sciences vétérinaires. *Université El-hadj-Lakhdar de Batna*.
- Chami F. (2005).** Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266.
- Chang J. Y., Lee H. J., Chang H. C. (2007).** Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J Appl Microbiol.*103: 2504-2515.
- Chatterjee S., Chatterjee D. K., Jani R. H., Blumbach J., Ganguli B. N., Klesel N., Limbert M., Seibert, G. (1992).** Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus* *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo).*45: 839-845.
- Chatterjee C., Paul M., Xie L., van der Donk W. A. (2005a).** Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev.*105: 633-684.
- Chatterjee C., Miller L. M., Leung Y. L., Xie L., Yi M., Kelleher N. L., van der Donk, W. A. (2005b).** Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J Am Chem Soc.*127: 15332-15333.
- Chen H., Hoover D.V. (2003).** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety.*2: 82-100.
- Chen Y., Shapira R., Eisenstein M., Montville T. J. (1997a).** Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol.*63: 524-531.
- Chen Y., Ludescher R. D., Montville, T. J. (1997b).** Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol.*63: 4770-4777.

- Chihib N. E., Tholozan J. L. (1999).** Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Int J Food Microbiol.*48: 191-202.
- Chikindas M. L., García-Garcerá M. J., Driessen A. J., Ledebøer A. M., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Abee T., Konings W. N., Venema, G. (1993).** Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl Environ Microbiol.*59: 3577-3584.
- Cilano L., Bossi MG., Carini S. (1990)** . Produzione di batteriocine da parte di *Streptococcus thermophilus*. *Microbiol. Alim. Nutr.* 8 : 21–30.
- Cintas L. M., Casaus P., Holo H., Hernandez P. E., Nes I. F. et Havarstein L. S. (1998).** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
- Cintas L. M., Herranz C., Hernández P. E., Casaus M. P., Nes I. F., Hernández P.E. (2001).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 4, 281-305.
- Clarke S. (2008).** Chemistry of essential oil. 1<sup>st</sup> edition *ELSEVIER*. British, 302.
- Cocolin L., Foschino R., Comi G., Grazia Fortina M. (2007).** Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*, 24, 752-758.
- Colwell R. R. (1970)** .Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.*104: 410-433.
- Corre J., Lucchini J. J., Mercier G. M., Cremieux A. (1990).** Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res. Microbiol.* 141:483–497.
- Corsetti A., Gobetti M., Rossi J., Damiani P. (1998).** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol.*: 253-256.
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005a).** Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept Sci.*6: 61-75.
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005b).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.*3: 777-788.
- Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R., Wyllie S. G. (2000)** .The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170-175

- Criado R., Diep D. B., Aakra A., Gutierrez J., Nes I. F., Hernandez P. E., Cintas L. M. (2006).** Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol.*72: 6653-6666.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M. G, Micieli D, Venuti V., Bisignano G, Saija A, Trombetta D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6300-6308.
- Crittenden R., Bird A. R., Gopal P., Lee Y. K., Playn M. J. (2005).** Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Curr. Pharm. Design.* 11: 37-53.
- Crow V. L., Coolbear T., Holland R., Pritchard G. G., Martley F. G. (1993).** Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.* 3: 423-460.
- Cunat P., Primo E., Sanz I., Garcera M.D., March M .C., Bowers et R.Martinez-Pardo W. S. (1990).** *J. Agric. Food Chem.* Vol 38.N°2 :497-500.
- Curk D., MacPhail A. (1996).** Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Étude de référence avec *Lactococcus lactis*. *Lait.* 1989. 69: 433-447.
- Daeschel M. A. (1989)** . Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology.* 43: 164-167.
- Daeschel M. A., Klaenhammer T. R. (1985)** .Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl Environ Microbiol.* 50:1538–41.
- Danino O., Gottlieb H. E., Grossman S., Bergman M. (2009).** *Food Research Inter.*
- Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y., Héchard Y. (2000).** The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr Microbiol.*41: 441-443.
- Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P., Héchard Y. (2001)** .A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology.*147: 3263-3269.
- Davey G. P. (1981).** Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. *New Zealand Journal of Science and Technology.* 16: 187–190.
- De Ambrosini V. M., Gonzalez S., Perdigon G., de Ruiz Holgado A. P., Oliver G. (1996).** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* 44: 2263-2267.
- De Kwaadsteniet M., Fraser T., Van Reenen C. A., Dicks L. M. (2006).** Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated

- from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl Environ Microbiol.*72: 4761-4766.
- De Man J.C., Rogosa M. et Sharpe M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- Denyer, S. P., and W. B. Hugo. (1991).** Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane, *In* S. P. Denyer and W. B. Hugo (ed.), *Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 171–187.
- De Oliveira S. S., Nascimento J. S., Pova D. C., de Araujo S. A., Gamon M. R., Bastos M. C. (1998).** Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. *J Appl Microbiol.*85: 972-984.
- Degryse A. C., Delpla I., Voinier M. A. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87.
- Desmares C., Laurent A., Delerme C. (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS.* Anatole, France, 18.
- Devoyod J. J., Poullain F. (1988).** Les *leuconostocs* propriétés : leurs rôles en technologie laitière. **68** : 249-280.
- Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Denyer S.P., Hugo W. B. (1991).** *Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom ;171-187 ;
- Desmazeaud M. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *Le Lait.* 63, 286-310.
- Desmazeaud M. J., De Roissard H. (1992).** Métabolisme général des bactéries lactiques, Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage.* 1, 169-207.
- Desmazeaud M., Cogan T. M. (1996).** Role of cultures in cheese ripening. *In:* Cogan T.M., Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures.* *VCH Publishers, Inc.,* New York.207-231.
- Dias R. S., Bambirra E. A., Silva M. E., Nicoli J. R. (1995).** Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. *Braz J Med Biol Res.*28: 323-325.
- Diep D. B., Havarstein L. S., Nissen-Meyer J., Nes I. F. (1994).** The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl Environ Microbiol.*60: 160- 166.



- Diep D. B., Håvarstein L. S., Nes I. F. (1995)** .A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol.*18: 631-639.
- Diep D. B., Håvarstein L. S., Nes I. F. (1996)**. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol.*178: 4472- 4483.
- Diep D. B., Johnsborg O., Risøen P. A., Nes I. F. (2001)**. Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Mol Microbiol.*41: 633-644.
- Diep D. B., Nes, I. F. (2002)**. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets.*3: 107-122.
- Diep D. B., Myhre R., Johnsborg O., Aakra A., Nes I. F. (2003)**. Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Mol Microbiol.*47: 483-494.
- Diep D. B., Godager L., Brede D., Nes, I. F. (2006)**. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology.*152: 1649-1659.
- Diep D. B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I. F. (2007)**. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*104: 2384-2389.
- Diep D. B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. F. (2009)**. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides.*30: 1562-1574.
- Dițu L. M., Chifiriuc C., Lazăr V., Mihăescu G. (2009)**. Implication of quorum sensing phenomenon in the expression of genes that code for bacteriocines in lactic bacteria. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.*54: 147-166.
- Djerroumi A., Nacef M. (2004)**. *100 plantes medicinale d'Algérie* .Edd Palais du livre. 83.
- Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J. M., Schiffrin E. J. (1999)**. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci.*82: 863-869.
- Dorenbos R., Stein T., Kabel J., Bruand C., Bolhuis A., Bron S., Quax W. J., Van Dijk J. M. (2002)** .Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *J Biol Chem.*277: 16682-16688.
- Dortu C., Thonart P. (2009)**. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotech. Agro. Société et*

*Environnement*. 13 (1): 1-5.

**Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L. M., Prevost H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*.70: 564-582.

**Driessen A. J. M., Van den Hooven H. W., Kuiper W., Van de Kamp M., Sahl H.G., Konings R. N. H. et Konings W.N. (1995).** Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochem*. 34: 1606-1614.

**Dung N. T., Kim J. M., Kang S.C. (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3632-3639.

**Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P.,Gruss, A. (2001).** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol*.183: 4509-4516.

**EFFCA. (2011)** .European Food and Feed Cultures Association.

**Eijsink V. G., Skeie M., Middelhoven P. H., Brurberg M. B.,Nes I. F. (1998).** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*.64: 3275-3281.

**Eijsink V. G., Axelsson L., Diep D. B., Håvarstein L. S., Holo H.,Nes I. F. (2002).** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*.81: 639-654.

**El-Naggar M. Y. M. (2004).** Comparative of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnol*.3 (2): 173-180.

**El-Soda M., Farkye N., Vuillemarad J., Simard R., Olson N., El Kholly W., Dako E., Medrano E., Gaber M. et Lim L. (1995).** Autolysis of lactic acid bacteria. Impact on flavour development in cheese. Charalambous G. (Ed.), Food Flavour: Generation Analysis and Process Influence. *Elsevier Science B.V.*, Amsterdam, The Netherlands, 2205-2223.

**El-Ziney M. G., Jakobsen M., Debevere J. M. (1998).** Reuterin. *Nat.Food Antimicrobial.Systems*. 24: 17-25.

**Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A. (1999).** Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng*. 87: 705-716.

**Ettayebi K., Yamani J. E., Rossi-Hassani B. D. (2000).** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183 (1):191-195.

**FAO T. W. H. O. (2001).** Probiotic definition.

**Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. (2006).** Probiotics for prevention of recurrent

vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.*58: 266-272.

**Faye T., Langsrud T., Nes I. F., Holo H. (2000).** Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Appl Environ Microbiol.*66: 4230-4236.

**Fayol-Messaoudi D., Berger C. N., Coconnier-Polter M. H., Liévin-Le Moal V., Servin A. L. (2005).** pH, lactic acid and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* Oct; 71(10):6008-13.

**Fei L.V., Hao L., Qipeng Y., Chunfang L. (2011).** In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International* 44 :3057–3064.

**Fenaroli G. (1995).** Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Inc., BocaRaton, Fla. 87.

**Feng G., Guron G. K., Churey J. J., Worobo R. W. (2009).** Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol.*75: 5708-5713.

**Fernández de Palencia P., de la Plaza M., Mohedano M. L., Martínez-Cuesta M. C., Requena T., Lopez P., Pelaez C. (2004).** Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. *Int J Food Microbiol.*93: 335-347.

**Fernández M., Sánchez-Hidalgo M., García-Quintáns N., Martínez-Bueno M., Valdivia E., López P., and Maqueda, M. (2008).** Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.*190: 240-250.

**Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M. B., Nes I. F., Eijsink V. G., Nissen-Meyer J. (2000).** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J Bacteriol.*182: 2643-2648.

**Fimland G., Sletten K., Nissen-Meyer J. (2002a).** The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C. *Biochem Biophys Res Commun.*295: 826-827.

**Fimland G., Eijsink V. G., Nissen-Meyer J. (2002b).** Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry.*41: 9508-9515.

**Fimland G., Eijsink V. G., Nissen-Meyer J. (2002c).** Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology.*148: 3661-3670.

- Fimland G., Johnsen L., Dalhus B., Nissen-Meyer J. (2005).** Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci.*11: 688-696.
- Fimland G., Pirneskoski J., Kaewsrichan J., Jutila, A., Kristiansen P. E., Kinnunen P. K., Nissen-Meyer J. (2006)** .Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacinP. *Biochim Biophys Acta.*1764: 1132-1140.
- Fimland N., Rogne P., Fimland G., Nissen-Meyer J., Kristiansen, P. E. (2008).** Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochim Biophys Acta.*1784: 1711-1719.
- Fleury Y., Dayem M. A., Montagne J. J., Chaboisseau E., Le Caer J. P., Nicolas P., Delfour A. (1996).** Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem.*271: 14421-14429.
- Floriano B., Ruiz-Barba J. L., Jiménez-Díaz R. (1998).** Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.*64: 4883-4890.
- Foda M. I., El-Sayed M. A., Hassan A. A., Rasmy N. M., El-Moghazy M. M. (2010).** Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science* ; 6 (5) : pp. 272-280.
- Franz C. M., van Belkum M. J., Holzapfel W. H., Abriouel H., and Gálvez A. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.*31: 293-310.
- Fregeau Gallagher N. L., Sailer M., Niemczura W. P., Nakashima T. T., Stiles M. E., Vederas J. C. (1997).** Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry.*36: 15062- 15072.
- Fresquet J. L., Aguirre C., Baguena M. J., Lopez M. L., Tronchoni J. A.(1993).***Médicaments et Aliments : L'approche Ethnopharmacologique.* 207-214.
- Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007).** Structural analysis and characterization of lactacin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.*73: 2871-2877.

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- Gaillard B., Breton A., Bernalier A. (1989).** *Curr Microbiol.* 19: 103-107.
- Gálvez A., Gimenez-Gallego G., Maqueda M., Valdivia E. (1989).** Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 437-441.
- Gálvez A., Abriouel H., Lopez R. L., Ben Omar, N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 120: 51-70.
- Gálvez A., Lopez, R. L., Abriouel H., Valdivia E., Omar N. B. (2008).** Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol.* 28: 125-152.
- Gänzle M. G., Hertel C., Hammes W. P. (1999).** Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *Int J Food Microbiol.* 48: 37-50.
- Garneau S., Martin N. I., Vederas J. C. (2002).** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 84: 577-592.
- Gao F. H., Abee T., Konings W. N. (1991).** Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl Environ Microbiol.* 57: 2164-2170.
- Garnéro J. (1991).** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France. 2-20.
- Garnéro J. (1996).** Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, traité Constantes physico-chimiques ; K 345-1.39.
- Ghasemi P. A., Rahimi E. Moosavi S. A. (2010).** Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95-3.219-223.
- Ghazi F., Henni D., Ben mchernene Z., et Kihal M. (2009).** Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *World journal of dairy and food sciences.* 4 (1): 78-87
- Giffard C. J., Dodd, H. M., Horn N., Ladha S., Mackie A. R., Parr A., Gasson M. J., and Sanders, D. (1997).** Structure-function relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems. *Biochemistry.* 36: 3802-3810.
- Gill A.O., Delaquis P., Russo P. and Holley R.A. (2002).** Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.* 73. 83-92.

- Gill A.O., Halley R.A. (2003).** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.
- Gilarová R., Voldrich M., Demnerová K., Cerovský M., and Dobiás, J. (1994)** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.*24: 315-319.
- Gilbert, P.** 1984. The revival of microorganisms sublethally injured by chemical inhibitors., *In* M. H. E. Andrews and A. D. Russell (ed.), The revival of injured microbes. Academic Press, London, United Kingdom. 175–197.
- Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. (2011).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol.*85: 685-695.
- Grangette C., Muller-Alouf H., Geoffroy M., Goudercourt D., Turneer M., Mercenier A. (2002)** .Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine.*20: 3304-3309.
- Gudkow A.V. (1987).** Starters as mean controlling contaminating organisms. *Milk- the vital force.* 83-93.
- Guessas B. (2007).** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. 148.
- Guessas B., Kihal M. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goats' milk in Algerian arid zone. *Afr. J. biotechnol.* 3: (6),339-342.
- Guessas B., Kihal M. (2005).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 6, 339-342.
- Guessas B., Hadadji M., Saidi N.,Kihal M. ( 2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.
- Guiraud J. P. (1998).** Technique et ingenieurie. Serie Agro-Alimentaire. Paris. 652.
- Guinane C. M., Cotter P. D., Hill C.,Ross R. P. (2005)** .Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.*98: 1316-1325.
- Guizani T., Nizar T., Triki S. (2007).** Microbiology of Starter Cultures. *In* Dairy Microbiology Handbook. *Inc. Publication.* 261-347.
- Gusils C., Cuozzo S., Sesma F., Gonzalez S. (2002).** Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can. J. Microbiol.* 48: 34-42.

- Gustafson J. E., Y. Liew C., Chew S., Markham J., Bell H. C., Wyllie S. G., Warmington J. R. (1998).** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:194–198.
- Hadizadeh I., Peivastegan B., Hamzehzarghani H. (2009).** Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences* 6 (5):857-861.
- Hadji-Sfaxi I., El-Ghaish S., Ahmadova A. , Batdorj B., Le Blay-Laliberté G ., Barbier G ., Haertlé T., Chober J.M. (2011).**Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* 22 :2020-2027.
- Haller D., Serrant P., Granato D., Schiffrin E. J.,Blum S. (2002).** Activation of human NK cells by *staphylococci* and *lactobacilli* requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.*9: 649-657.
- Hammes W. P., Hertel C. (2003).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York. Springer-Verlag. Epub December 15<sup>th</sup>.
- Hammes W. P., Hertel C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In *prokaryotes*. 4: 320-403.
- Hamouda T., Baker J. R. (2000).** Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J. Applied Microbiol.* 89: 397-403.
- Haoui I. E., Derriche R., Madani L., Oukali Z. (2012).** Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, in press, online.
- Hariharan H., Murphy G.A., Kempf I. (2004).** *Campylobacter jejuni*: Public health hazards and potential control methods in poultry. *Vet. Med.* 49 (11): 441-446.
- Hastings J. W., Sailer M., Johnson K., Roy K. L., Vederas J. C. Stiles, M. E. (1991).** Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum. gelidum*. *J Bacteriol.*173: 7491-7500.
- Hauge H. H., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Eijsink V. G. (1998a).** Amphiphilic alpha- helices are important structural motifs in the alpha and beta peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G--enhancement of helix formation upon alpha-beta interaction. *Eur J Biochem.*251: 565-572.
- Hauge H. H., Mantzilas D., Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J., Eijsink V. G., Nissen-Meyer J. (1998b).** Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin- like

pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*.37: 16026-16032.

**Hauge H. H., Mantzilas D., Eijsink, V. G., Nissen-Meyer J. (1999).** Membrane- mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J Bacteriol*.181: 740-747.

**Haugen H. S., Fimland G., Nissen-Meyer J., and Kristiansen P. E. (2005).** Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry*.44: 16149-16157.

**Haugen H. S., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2011)** .Mutational Analysis of Residues in the Helical Region of the Class IIa Bacteriocin Pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol*.77: 1966-1972.

**Håvarstein L. S., Holo H., Nes I. F. (1994).** The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*.140 ( Pt 9): 2383- 2389.

**Håvarstein L. S., Diep D. B., Nes, I. F. (1995).** A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*.16: 229-240.

**Hayes A. J, Markovic B. (2002).** Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 40: 535-543

**Hazzit M. (2002).** Arômes alimentaires. *Thèse magister, USTHB, Alger*.96.

**Hécharde Y., Derijard B., Letellier F., Cenatiempo Y. (1992).** Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol*.138: 2725-2731.

**Hécharde Y., Berjeaud J. M., Cenatiempo Y. (1999).** Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Curr Microbiol*.39: 265-269.

**Hécharde Y., Pelletier C., Cenatiempo Y., Frère, J. (2001).** Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*.147: 1575- 1580.

**Hécharde Y., Sahl H. G. (2002).** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*.84: 545-557.

**Helander I. M., Von Wright A., Mattila-Sandholm T. M. (1997).** Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends. Food. Sci. Technol*. 8(5):146-50.



- Hemaiswarya S., Kruthiventi A. K., Doble M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639–652.
- Henderson J. T., Chopko A. L., van Wassenaar P. D. (1992).** Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch Biochem Biophys*.295: 5-12.
- Heng N. C., Burtenshaw G. A., Jack R. W., Tagg, J. R. (2007b).** Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol*.73: 7763-7766.
- Heng N. C. K., Wescombe P. A., Burton J. P., Jack R. W., Tagg, J. R. (2007a)** .The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M.A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. 45-92.
- Hernandez V., Recio M., Manez S., Giner R., Rios J. (2007).***Sci.dir*.Vol.81(6). 480-488,
- Hernandez L. H. H., Teshima S., Ishikawa M., Alam S., Koshio S.,Tanaka Y. (2005).** Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr*. 11: 3-9.
- Herranz C., Cintas L. M., Hernández P. E., Moll G. N., Driessen A. J. (2001a).** Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother*.45: 901-904.
- Herranz C., Chen Y., Chung H. J., Cintas L. M., Hernández P. E., Montville T. J., Chikindas M. L. (2001b).** Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol*.67: 1689-1692.
- Himed M. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 91.
- Holck A., Axelsson L., Birkeland S. E., Aukrust T., Blom H. (1992).** Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Gen Microbiol*.138: 2715-2720.
- Holck A. L., Axelsson L., and Schillinger U. (1994).** Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr Microbiol*.29: 63-68.
- Holo H., Nilssen O., Nes, I. F. (1991).** Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol*.173: 3879-3887.
- Höltzel A., Gänzle M. G., Nicholson G. J., Hammes W. P., Jung, G. (2000).** The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl*.39: 2766-2768.

- Holzappel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. (1998).** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.
- Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl): 365-373.
- Hoover D. G., Dishart K. J., Hermes M.A. (1989).** Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* 3: 183-96.
- Horne D. S., Holm M., Oberg C., Chao S., Young D. G. (2001).** Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res.* 13: 387-392.
- Hu C. B., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K. (2008).** Description of durancin TW- 49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. *J Appl Microbiol.* 105: 681-690.
- Hühne K., Axelsson L., Holck A., Kröcke, L. (1996).** Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology.* 142 ( Pt 6): 1437-1448.
- Hussain A. I., Anwar F., T. H.S. Sherazi J., Przybylski R. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry.* 108:986-995.
- Hussain A. I. (2009).** Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. *Doctorale thesis*, Pakistan ; 257.
- Hussain A. I., Anwar F., Chatha S. A. S., Jabbar A., Mahboob S. Nigam P.S.(2010).** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:1070-1078.
- Ito Y., Kawai Y., Arakawa K., Honme Y., Sasaki T., Saito T. (2009).** Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasserii* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. *Appl Environ Microbiol.* 75: 6340- 6351.
- Iwatani S., Zendo T., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007).** Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 1984-1992.
- Jack R. W., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B. E., Hillier A. J., Wettenhall R. E., Hickey M. W., Coventry, M. J. (1996).** Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2897-2903.

- Jack R. W., Tagg J. R., Ray B. (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.*59: 171-200.
- Jack R. W., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B. E., Hillier A. J., Wettenhall R. E., Hickey, M. W., Coventry, M. J. (1996).** Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol.*62: 2897-2903.
- Jay M. J. (1982).** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525–532.
- Jay M. J. (1986).** Modern Food Microbiology, *Fermented Foods And Related Products Of Fermentation*, 3<sup>th</sup> ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, New York. 239-255 and 362-406.
- Jay M. J. (1992).** Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th ed., New York. 371-409.
- Jay M. J. (1996).** Modern Food Microbiology, 5th Edition, Chapman and Hall, New York.
- Jeannes, R. (1980).** Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* 63: 1605-1630.
- Jeavons H. S. (2003).** Prevention and treatment of vulvovaginal candidiasis using exogenous *Lactobacillus*. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.*32: 287-296.
- Jennes W., Dicks L. M. T., Verwoerd D. J. (2000).** Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from intestinal tract of ostrich. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 349-357.
- Jinet A., Champagne C.P, Girard F. et Morin N. 1996.** Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.*10:463.
- Joffin J. N., Leyral G. (1996).** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France. 219-223.
- Johansen E., Kibenich A. (1992).** Isolation and characterization of IS1165, an insertion sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and other lactic acid bacteria. *Plasmid.*27: 200-206.
- Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J., Graser F. (1980).** Taxonomy of the *Acidophilus* Group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 53-68.
- Johnsen L., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J. (2004).** Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.*70: 2647-2652.
- Johnsen L., Dalhus B., Leiros I., Nissen-Meyer J. (2005a).** 1.6-Angstroms crystal structure

of EntA-im. A bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J Biol Chem.*280: 19045-19050.

**Johnsen L., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2005b).** The C-terminal domain of pediocin- like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition. *J Biol Chem.*280: 19045-19050.

**Joshi V. K., Sharma S., Rana N. S. (2004)** .Bacteriocin from lactic acid fermented vegetables. *Food technol. Biotechnol.* 44(3): 435-439.

**Jung, G. (1991).** Lantibiotics, a survey. In: Jung, G., and Sahl, H.-G. (Eds). *Nisin and Novel Lantibiotics*. Escom. Leiden The Netherlands. 1-34.

**Juven Benjamin J., Pierson Merle D. (1996).** Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. *J. Food Protection*. Volume 59, Number 11, November.1233-1241(9).

**Kabouche Z.,Berhail Boudouda H., Benmerache A., Chibani S., Kabouche A., Abuhamdah S., Semra Z..(2012).** Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils of *Inula viscosa* (L.) Ait. (Asteraceae) from Constantine, Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 2012, 4 (6):1878-1882.

**Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine, S., Arvilommi H. (1992).** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res.*32: 141-144.

**Kabuki T., Uenishi H., Seto Y., Yoshioka T., Nakajima H. (2009).** A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges. *J Appl Microbiol.*106: 853-862.

**kalchayanand N., Hanilin M. B. Ray B. (1992).** Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239-243.

**Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001).** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*357: 1076-1079.

**Kanatani K., Oshimura M., Sano K. (1995).** Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.*61: 1061-1067.

**Kandler O., Weiss N. (1986).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* . 1209-1234. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe et J. G. Holt. Baltimore: Williams et Wilkins.

- Karatzas A. K., Kets E. P. W., Smid E. J., Bennik M. H. J. (2001).** The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* 90:463–469.
- Kawai Y., Ishii Y., Arakawa K., Uemura K., Saitoh B., Nishimura J., Kitazawa H., Yamazaki Y., Tateno Y., Itoh T., Saito T. (2004).** Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.*70: 2906-2911.
- Kawai Y., Kusnadi J., Kemperman R., Kok J., Ito Y., Endo M., Arakawa K., Uchida H., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T. (2009).** DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericin A, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Appl Environ Microbiol.*75: 1324-1330.
- Kawulka K., Sprules T., McKay R. T., Mercier P., Diaper C. M., Zuber P., Vederas J.C. (2003).** Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc.*125: 4726-4727.
- Kazacic M., Nissen-Meyer J., Fimland G. (2002).** Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology.*148: 2019-2027.
- Kelleher S. L., Casas I., Carbajal N., Lönnnerdal B. (2002).** Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*35: 162-168.
- Kellner, R., Jung G., Horner T., Zahner H., Schnell N., Entian K. D., Gotz F. (1988).** Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem.*177: 53-59.
- Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J. (2003).** Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol.*69: 1589-1597.
- Kempler G. M., Mc Kay L. L. (1980).** Genetic evidence for plasmid linked metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1041-1043.
- Kessler H., Seip S., Wein T., Steuernagel S., Will M. (1991).** Structure of cinnamycin (Ro 09-0198) in solution In: Jung, G., and Sahl, H.-G. (Eds). *Nisin and Novel Lantibiotics*. Escom. Leiden, The Netherlands. 76-90.
- Kihal M., Chekroun A., Bensoltane A., Kheroua O., Saidi D. (1999).** Characterization of Algeria raw camel's milk: proteins content and native lactic acid bacteria, 1ères Journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla.

- Kihal M., Prevost H., Lhotte M. E., Huang D. Q., Divies C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22: 219-223.
- Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-49.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- Klaenhammer T. R., Fremaux C. et Hechard Y. (1993).** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques, tome 1. De Roissart. Ed Lavoisier.
- Klaenhammer T. R. (2000).** Probiotic bacteria : Today and tomorrow. *J. Nutr.*130: 415-416.
- Klein G. (2001).** International Committee of Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and Related Organisms. Minutes of the Meeting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 259-261.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103-125.
- Klein S. et Kush G. (2004).** Diffusion in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 38:1041.
- Koba K., sanda K., raynaud C., mandin D., millet J., chaumont J. P. (2003).** « Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L, *C. nardus* L et *C. schoenanthus* ». Journal de Mycologie Médicale, Vol 13, N° 4 – décembre. 175-180.
- Koglin A., Walsh C. T. (2009).** Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep.*26: 987-1000.
- Koutsoumanis K., Lambropoulou K., Nychas G. J. E. (1999).** A predictive model for the non- thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *Int. J. Food Microbiol.* 49. 63-74.
- Labioui H., Elmonaldi L., El Yachioui M., Ouhssine M. (2005).** Sélection des souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. soc. Pharm. Bordeaux. 144 (3-4) : 237-250.
- Lahlou M. (2004).** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448.
- Langdon G. M., Bruix M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Rico M. (1998).** Sequence-specific 1H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J Biomol NMR.*12: 173-175.
- Laouabdia-Sellami N., Ouzrout R., Guetarni D. (2007).** Study of the leucocytic formula of milk in the ewes of race ouled-djellal in the east of Algeria. *Afr. J. Agr. Res.* 2(10), pp. 505-511.
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000).**

Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.*66: 4084- 4090.

**Leal-Sanchez M. V. (2002)** .Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *L. plantarum* LPCO10. *Appl. Environ.Microbiol.* 68 : 4465-4471.

**Lee J. H., Karamychev V. N., Kozyavkin S. A., Mills D., Pavlov A. R., Pavlova N. V., Polouchine N. N., Richardson P. M., Shakhova V. V., Slesarev A. I., Weimer, B., O'Sullivan, D. J. (2008)**. Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics.*9: 247.

**Lee M. T., Chen F. Y., Huang H. W. (2004)**. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry.*43: 3590-3599.

**Lehto E.M., Salminen S. (1997)**. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one Propionibacterium strains to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora.* 16: 15-17.

**Leroy F. et al., (2006)** Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *Int. J.Food Microbiol.* 12 : 102-111.

**Levizou E., Karageorgou P., Psaras G.K., Manetas Y.( 2002)**. *J Flora.*Vol. 197. 152–157.

**Leyral G., Vierling É. (2007)**. Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. *Wolters Kluwer France.* 287.

**Lima E. T et Andreatti Filho R. L. (2005)**. Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *J. Food. Agri. Enviro.* 3 (2): 62-66.

**Linnett, P. E., Strominger, J. L. (1973)**. Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.*4: 231-236.

**Lis-balchin M., deans S. G. (1996)**. « Antimicrobial effects of hydrophylic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae) ». *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 205-7.

**Liu W., Hansen J. N. (1993)**. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 648-651.

**Logan A. C., Katzman, M. (2005)**. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses.*64: 533-538.

**Luchansky J. B. (1999)**. Overview on applications for bacteriocin producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 335-348.

- Mäkelä P., Schillinger U., Korkeala H., Holzapfel W. H. (1992).** Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*.16: 167-172.
- Maldonado A., Ruiz-Barba J. L., Jiménez-Díaz R. (2003).** Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1, 383-389.
- Malecky M. (2007).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris.30-35.
- Malinen E. (2002).** Molecular methods for detection of probiotics in intestinal microbiota and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct. University of Helsinki.
- Mami A., Boumehira A.Z., Hamedi A.R., Henni J.E., Kihal M. (2012).** Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Biotechnol.* 11(20), 4595-4607.
- Mami A., Henni J. E., Kihal M. (2008).** Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy and Food Sci.* 3 (2): 39-49.
- Marchal N., Bourdon J., Richard C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries. Ed. Doin Paris. 480 .
- Marciset O., Jeronimus-Stratingh M. C., Mollet B., Poolman B. (1997).** Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem.*272: 14277-14284.
- Marahiel M. A., Essen L. O. (2009).** Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods Enzymol.*458: 337- 351.
- Martin-Platero A. M., Valdivia E., Ruiz-Rodriguez M., Soler J. J., Martin-Vivaldi M., Maqueda M., Martinez-Bueno M. (2006).** Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol.*72: 4245-4249.
- Martin-Visscher L. A., Sprules T., Gursky L. J., Vederas J. C. (2008a).** Nuclear magnetic resonance solution structure of PisI, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin piscicolin 126, PisA. *Biochemistry.*47: 6427-6436.
- Martin-Visscher L. A., van Belkum M. J., Garneau-Tsodikova S., Whittall R. M., Zheng**



- J., McMullen L. M., and Vederas J. C. (2008b).** Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol.*74: 4756-4763.
- Martin-Visscher L. A., Gong X., Duszyk M., Vederas J. C. (2009).** The three- dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J Biol Chem.*284: 28674-28681.
- Martin-Visscher L. A., Yoganathan S., Sit C. S., Lohans C. T.,Vederas J. C. (2011).** The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett.*317: 152-159.
- Martin N. I., Sprules T., Carpenter M. R., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., Vederas J.C. (2004).** Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry.*43: 3049-3056.
- Martinez-Bueno M., Maqueda M., Galvez A., Samyn B., Van Beeumen J., Coyette J.,Valdivia E. (1994).** Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol.*176: 6334-6339.
- Martinez-Bueno M., Valdivia E., Gálvez A., Coyette J., Maqueda M. (1998).** Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS- 48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol.*27: 347-358.
- Märki F., Hänni E., Fredenhagen A., van Oostrum J. (1991).** Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2. *Biochem Pharmacol.*42: 2027- 2035.
- Marteau P. (2001).** Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr.* 45: 8-12.
- Martin N. I., Sprules T., Carpenter M. R., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., Vederas J. C. (2004).** Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry.*43: 3049-3056.
- Martin-Platero A. M., Valdivia E., Ruiz-Rodriguez M., Soler J. J., Martin-Vivaldi M., Maqueda M., Martinez-Bueno, M. (2006).** Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol.*72: 4245-4249.
- Martin-Visscher L. A., Sprules T., Gursky L. J., Vederas J. C. (2008a).** Nuclear magnetic resonance solution structure of PisI, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin piscicolin 126, PisA. *Biochemistry.*47: 6427-6436.
- Martin-Visscher L. A., van Belkum M. J., Garneau-Tsodikova S., Whittal R. M., Zheng J., McMullen L. M., Vederas J. C. (2008b).** Isolation and characterization of carnocyclin a,

a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol.*74: 4756-4763.

**Martin-Visscher L. A., Gong X., Duszyk M., Vederas J. C. (2009).** The three- dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J Biol Chem.*284: 28674-28681.

**Martin-Visscher L. A., Yoganathan S., Sit, C. S., Lohans C. T., Vederas J. C. (2011).** The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett.*317: 152-159.

**Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. et Drosinos E.H. (2003).** Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci.* 64: 265-271.

**Mathara J. M., Schillinger U., Kutima P. M., Mbugua S. K. et Holzapfel W. H. (2004).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kule naoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 3, 269-278.

**McLeod A., Nyquist O. L., Snipen L., Naterstad K., and Axelsson L. (2008).** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol.*31: 393-403.

**Messens W., Verluyten J., Leroy F., De Vuyst L. (2003).** Modelling growth and bacteriocin production by *L. curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41-52.

**Meziaini A., Chihib N., Dihimi Bouras A., Nedjar-Arroune N., Hornez J.P. (2009) .** Antimicrobial activity of some lactic bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of environmental and public health.*9.

**Mohammedi Z. (2006).** *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*, Université de Tlemcen. Faculté des sciences. Département de Biologie. Laboratoire produits Naturels.

**Moll G.N., Roberts G.C.K., Konings W.N., Driessen A.J.M. (1996).** Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69: 185-191.

**Moll G., Hildeng-Hauge H., Nissen-Meyer J., Nes, I. F., Konings W. N., Driessen, A. J. (1998).** Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J Bacteriol.*180: 96-99.

**Moll G. N., van den Akker E., Hauge H. H., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Konings W. N., Driessen A. J. (1999).** Complementary and overlapping selectivity of the two- peptide

bacteriocins plantaricin EF and JK. *J Bacteriol.*181: 4848-4852.

**Montel M.C., Talon R., Fournaud J., Champomier M.C. (2005).** A Simplified Key for Identifying Homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 469-472.

**Montes-Belmont R., Convajal M. (1998).** Control of *Aspergillus flavus* in Maize with plant essential oils and their components. *J. Food Prot.* 61 (5): 616-619.

**Morency H., Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C., Lavoie M. C. (2001).** Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol.*47: 322-331.

**Moreno I., Lerayer A.L.S., de Freitas Leitão M.F. (1999).** Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev. Microbiol.* 30: 2-19.

**Moretro T., Aasen I. M., Storro I., Axelsson L. (2000)** Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88(3) : 536-545.

**Morgan S. M., Galvin M., Ross R. P., Hill C. (2001).** Evaluation of a spray-dried lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett Appl Microbiol.*33: 387-391.

**Morgan S. M., O'connor P. M., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2005).** Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.*49: 2606-2611.

**Navaratna M. A., Sahl H. G., Tagg J. R. (1999).** Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. *Infect Immun.*67: 4268-4271.

**Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. et Torres C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44-51.

**Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. & Dicks L.M. (2001)** .Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.* 91 :1131-1138.

**Nes I.F., Holo H. (2000).** Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55:50-61.

**Nes I. F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V.G.H., Holo H. (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 70: 113-128.

- Nessrien M. N. Y., Mohamed A. T. (2007).** Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1):01-09.
- Nettles C. G., Barefoot S.F. (1993).** Biochemid and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bactena. *J. Food Prot.* 56: 338-356.
- Netz D. J., Sahl H. G., Marcelino R., dos Santos Nascimento J., de Oliveira S. S., SoaresM. B., do Carmo de Freire Bastos M. (2001).** Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol.***311**: 939-949.
- Netz D. J., Pohl R., Beck-Sickinger A. G., Selmer T., Pierik A. J., Bastos Mdo C., Sahl H. G. (2002).** Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol.***319**: 745-756.
- Nielsen P.V., Rios R. (2000).** Inhibition of fungal growt on bread by volatile components from spices and herbs and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60:219-229.
- Nissen-Meyer J., Holo H., Håvarstein L. S., Sletten K., Nes I. F. (1992).** A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol.***174**: 5686-5692.
- Nissen-Meyer J., Håvarstein L. S., Holo H., Sletten K., Nes I. F. (1993a).** Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol.***139**: 1503-1509.
- Nissen-Meyer J., Larsen A. G., Sletten, K., Daeschel M., Nes, I. F. (1993b).** Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J Gen Microbiol.***139**: 1973-1978.
- Nissen-Meyer J., Nes, I. F. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol.***167**: 67-77.
- Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegård C., Haugen H. S., Kristiansen P. E. (2009).** Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.***10**: 19-37.
- Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne, P., Haugen H. S., Kristiansen P. E. (2010).** Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.***2**: 52-60.

- Noojaree S. A., Sureelak R., Michael L. C., Jirawat Y. (2015).** Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. *Food Control* .54 : 308-316.
- Oppegård C., Fimland G., Thorbaek L., Nissen-Meyer J. (2007a).** Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol.*73: 2931-2938.
- Oppegård C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P. E., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2007b).** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol.*13: 210-219.
- Oppegård C., Schmidt J., Kristiansen P. E., Nissen-Meyer, J. (2008).** Mutational analysis of putative helix-helix interacting GxxxG-motifs and tryptophan residues in the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochemistry.*47: 5242-5249.
- O'Sullivan L., Ross R. P., Hill, C. (2002).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.*84: 593-604.
- O'Sullivan L., O'Connor E. B., Ross R. P., Hill, C. (2006).** Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol.*100: 135-143.
- Ownagh A., Hasani A., Mardani K., Ebrahimzadeh S. (2010).** Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum.* 2 : 99-105.
- Pandit V. A., Shelef L. A. (1994).** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.* 11: pp.57-63.
- Papagianni M., Anastasiadou S. (2009).** Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact.*8: 3.
- Parente E., Ricciardi A., Addario G. (1994).** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 388-394.
- Parente E., Ricciardi A. (1999).** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 : 628-638.
- Pascal G., (1979).** Les antioxygènes alimentaires. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, №14.271-290.
- Patrone V., Campana R., Vittoria E. and Baffone W. (2010).** *In Vitro* synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 60: 237-241.

- Pavel M., Ristić M., Stević T., (2009).** Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (1) : 27-34.
- Peláez S.M., Martín O. (2009).** Bacteriocin production and sensitivity. *Folia Microbiol.* 49: 172–174.
- Penner R., Fedorak R. N., Madsen K. L. (2005a).** Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.*5: 596-603.
- Penner R. M., Fedorak R. N. (2005b).** Probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *MedGenMed.*7: 19.
- Pereira D.I.A., Mc Cartney A.L. et Gibson G.R. (2003).** An invitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing of *Lactobacillus fermentum* strains, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8): 4743-4752.
- Perez-Alonso M. J.; Velasco-Negueruela A.; Emin Duru M.; Harmandar M.; GarciaVallejo M. C. (1996).** *Flavour Fragr. J.*, 11, 349.
- Pèrez Guerra N. et al., (2005)** .Fed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42: 17-23.
- Periago P.M., Palop A., Fernandez P.S. (2001).** Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science Technology International*, Vol. 7 (6)487-492.
- Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. (2005).** Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.*22: 495-512.
- Pirotta M., Gunn, J., Chondros P., Grover S., O'Malley P., Hurley S., Garland S. (2004).** Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ.*329: 548.
- Piyo A., Udomsilp J., Khang-Khun P. and Thobunluepop P. (2009).** Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *As. J. Food Ag- Ind. Special Issue*, S2-S9.
- Plummer S., Weaver M. A., Harris J. C., Dee P., Hunter J. (2004).** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol.*7: 59-62.
- Pol I. E., Smid, E. J. (1999).** Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166-170.

- Pongtharangkul T., Demirci A. (2006).** Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.* **22**: 217-
- Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, France. 1-152.
- Prescott C.E., Hope G.D., Blevins L.L. (2003).** Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae.* **55**: 64-72.
- Quezel P., Santa S. (1963).** *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Tome II. 940.
- Quiberoni A., Rezaiki L., El Karoui M., Biswas I., Tailliez P., Gruss A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.* **152**: 131-139.
- Rashid ch. A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M. (2010).** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie (serie nouă)*, vol. 19 №1. 23-30.
- Rasooli I. and Abyaneh M.R. (2004).** Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, **15**. 479-483.
- Raza S. A., Rehman A., Adnan A., Qureshi F., (2009).** Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. *Biharean Biol.* **3**, Vol. 3, N°1, 71-75.
- Razavi Rohani S.M., Moradi M., Mehdizadeh T., Siavash Saei-Dehkordi S., Griffiths M. W. (2011).** The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Technology* **44** : 2260-2265.
- Rehaïem A., Martí'nez B., Manai M., Rodri'guez A. (2009).** Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. *Journal of Applied Microbiology.* **108** : 1685–1693
- Reichling J., Weseler A., Landvatter U., Saller R. (2002)** .Bioactive essential oils used in phytomedicine as antiinfective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Act. Pythoter.* **1**: 26-32.
- Reid G., Bruce A. W. (2001).** Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis.* **183 Suppl 1**: S77-80.
- Reid G., Bruce A. W. (2003a).** Urogenital infections in women: can probiotics help, *Postgrad Med J.* **79**: 428-432.

- Reid G., Jass J., Sebulsky M. T., McCormick J. K. (2003b).** Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.*16: 658-672.
- Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170.
- Reque E.F., Pandey A., Franco S.G., Socol C.R. (2000).** Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb fot use as probiotic in chickens. *Braz. J. Microbiol.* Vol. 31, N° 4.
- Riley M.A., Wertz J.E. (2002).** Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* 84: 357-364.
- Robertson A., Tirado C., Lobstein T., Jermini M., Knai C., Jensen J. H., Ferro-Luzzi A., James W. P. (2004).** Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Reg Publ Eur Ser:* i-xvi, 1-385, back cover.
- Robichon D., Gouin E., Debarbouille M., Cossart P., Cenatiempo Y., Héchard Y. (1997).** The *rpoN* ( $\sigma^{54}$ ) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol.*179: 7591-7594.
- Rodgers S. (2001).** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 276-284.
- Rodriguez E., Calzada J., Arquès J.L., Rodrigues J.M., Nunez M., Medina M. (2005).** Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 :H7 in cheese. *Int. Dairy Jl.* 15: 51-57.
- Rodriguez J.M., Martínez M.I et Kok J. 2002.** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 91-121.
- Rogne P., Fimland G., Nissen-Meyer J., Kristiansen P. E. (2008).** Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochim Biophys Acta.*1784: 543-554.
- Rogne P., Haugen C., Fimland G., Nissen-Meyer J., Kristiansen P. E. (2009).** Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides.*30: 1613-1621.
- Rogosa M., Wiseman R.F., Mitchel J.A., Disraely M.N., Beaman A.J. (1953).** Species Differentiation of Oral Lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius nov. spec.* and *L. cellobiosus nov spec.* *J. Bacteriol.* 65: 681-699.
- Ross R. P., Morgan S., Hill, C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.*79: 3-16.



- Ruiz F. O., Gerbaldo G., Asurmendi P., Pascual L. M., Giordano W., Barberis I. L. (2009).** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.*59: 497-501.
- Ruiz-Barba J. L., Floriano B., Maldonado-Barragan A., Jiménez-Díaz R. (2007).** Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid.*57: 175-181.
- Ruhr E., Sahl H. G. (1985).** Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother.*27: 841-845.
- Russell A. D., Morris A., Allwood M. C. (1973).** Methods for assessing damage to bacteria induced by chemical and physical agents. *Methods Microbiol.* 8:95–182.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm, T. (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.*84: 197-215.
- Sabia C., Manicardi G., Messi P., de Niederhausern S., Bondi M. (2002).** Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 163-170.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R., (2005).** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91:621-632.
- Sahl H.G., Bierbaum G. (1998).** Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:41-79.
- Sahl H.G., Jack R.W. et Bierbaum G. (1995).** Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique posttranslational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230: 827-53.
- Sahl H.G., Bierbaum G. (1998).** Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H., Kihal M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11.
- Saidi N. 2007.** La microflore lactique du lait cru de chèvre local : études, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt bio-préservateur Thèse de Doctorat. Université d'Oran. 216.
- Saidi N., Hadadji I., Guessas B. (2011).** Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk. *Global J. Biotechnol. Bioch.* 6 (3): 154-16.

- Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I. (1998).** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr. Suppl.* 1: 147–171.
- Salminen S., Ouwehand A. et von Wright A. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3rd ed. *Marcel Dekker*. New York. 375-395.
- Sambrook J., Fritsh E.F. et Maniatis T. (1986).** Molecular Cloning : A Laboratory Manual .Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>ème</sup> Edition, New York. 96.
- Sánchez-Barrena M. J., Martínez-Ripoll M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Cruz V., Albert A. (2003).** Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J Mol Biol.*334: 541-549.
- Sánchez J., Diep D. B., Herranz C., Nes I. F., Cintas L. M., Hernández P. E. (2007).** Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol Lett.*270: 227- 236.
- Sánchez J., Borrero J., Gomez-Sala B., Basanta A., Herranz C., Cintas L. M., Hernandez P. E. (2008).** Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.*74: 2471-2479.
- Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394-406.
- Savilahti E., Kuitunen M., Vaarala O. (2008).** Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*8: 243-248.
- Scannell A.G. et al., (2000) .** Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *J. Appl. Microbiol.* 89 : 573-579.
- Schiffrin E. J., Brassart D., Servin A. L., Rochat F., Donnet-Hughes A. (1997).** Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr.*66: 515S-520S.
- Schillinger U., Lücke F.K. (1987).** Identification of Lactobacilli from meat and meat products. *J. Food Microbiol.* 4: 199-208.
- Schillinger U., LückeK. (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

- Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W.H. (1996).** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-64.
- Schleifer K. H., Kilpper-Balz R. (1987).** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.
- Schleifer K.H., Ludwig W. (1995).** Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In *The genera of lactic acid bacteria*, Edited by B.J.B. Wood & W. H. Holzapfel. London: *Blackie Academic and Professional*. 7-18.
- Schöbitz R., Suazo V., Costa M., Ciampi L. (2003)** .Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*84: 237-244.
- Schved F.M., Lalazar A., Henis Y., Juven B.J. (1993).** Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin S J- 1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 1, 67-77.
- Schved F., Lalazar A., Lindner P., Juven B.J. (1994).** Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 281-283.
- Seguin E. (2001).** Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie - Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. 208 .
- Senes A., Gerstein M., Engelman D. M. (2000).** Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol.*296: 921- 936.
- Senes A., Engel D. E., DeGrado W. F. (2004).** Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol.*14: 465-479.
- Settanni L., Corsetti A. (2008).** Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol.*121: 123-138.
- Shelburne C. E., An, F. Y., Dholpe V., Ramamoorthy A., Lopatin D. E., Lantz M. S. (2007)** .The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *J Antimicrob Chemother.*59: 297-300.
- Sikkema J., de Bont J.A.M., Poolman B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 8022-8028
- Sobel J. D. (1999).** Limitations of antifungal agents in the treatment of *Candida vaginitis*: future challenges. *Drug Resist Updat.*2: 148-152.

- Solomakos, N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. (2008).** The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25(1), 120-127.
- Song H. J., Richard J. (1997).** Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* 36(2): 155-161.
- Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O. (2006a).** Sensitivity of spoiling and pathogen food- related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:527-532.
- Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O. (2006b).** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1):22-25.
- Souza E.L., Barros C.J., Conceição M.L., Neto N.J.G. and Costa A.C.V. (2009).** Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology* ; 40:387-393.
- Stanckebrandt E., Teuber M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria *Biochimie*.70: 317-324.
- Stavrianakou S., Liakopoulos G. et Karabourniotis G. (2006).** *Environmental and Experimental Botany*. Vol.56. 293–300.
- Stern N. J., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Pokhilenko V. D., Levchuk V. P., Svetoch O. E., Seal B. S. (2006).** Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother*.50: 3111-3116.
- Stiles M.E. (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Stoddard G. W., Petzel J. P., van Belkum M. J., Kok J., McKay L. L. (1992).** Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetyllactis WM4. *Appl Environ Microbiol*.58: 1952-1961.
- Susplugas C., Balansard G., Julien J. (1980).** *J. Herba Hung.* Vol 19:19-33.
- Suvarna V., Bobby V.U. (2005).** Probiotics in human health: A current assessment. *Current. Sci.*88, 10, 11.

- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Tassou C., Drosinos E.H., Nychas G.J.E. (1996).** Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano and lemon juice under modified atmosphere or air. *J. Food Prot.* 59: 31-34.
- Taylor M.J., Bandi C., Hoerauf A. (2005).** Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol.* 60: 245-284.
- Ten Brink B., Minekus M., Vander Vosen J. M. B. M., Leer R J., Huis In't Veld J.H .J. (1994).** Antimicrobial activity of Lactobacilli: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 140–148.
- Tichaczek P. S., Vogel R. F., Hammes W. P. (1993).** Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch Microbiol.* 160: 279-283.
- Tichaczek P. S., Vogel R. F., Hammes W. P. (1994).** Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology.* 140 ( Pt 2): 361-367.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T. (2005).** Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1585-1590.
- Todorov S.D., van Reenen C.A., Dicks L.M. (2004).** Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 149-157.
- Tomita H., Fujimoto S., Tanimoto K., Ike Y. (1996).** Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone- responsive conjugative plasmid pYI17. *J Bacteriol.* 178: 3585-3593.
- Tomita H., Fujimoto S., Tanimoto K., Ike, Y. (1997).** Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J Bacteriol.* 179: 7843-7855.
- Topisirovic L., Milan k., Djordje f., Natasa G., Ivana S., jelena L. (2006).** Potentil of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food production and preservation. *Int. J. food Microbiol.* 112: 230-235.
- Trotel-Aziz P., Couderchet M., Biagianti S., Aziz A. (2008).** Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas spp*, mediating

grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. Environmental and experimental botany. 64 : 21-32.

**Torres P., Pera F. (1992)** .*J.Nat.Prod.* Vol. 55.1074-1079.

**Turgis M., Dang Vu K., Dupont C., Lacroix M.(2012)**. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International. (48) : 2 : 696–702.

**Twomey D., Ross R. P., Ryan M., Meaney B., Hill C. (2002)**. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*.**82**: 165-185.

**Udomsilp J., Piyo A., Khang-Khun P.,Thobunluepop P. (2009)**. Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, 24-30.

**Ultee A., Gorris L.G.M. and Smid E.J. (1998)**. Bactericidal activity of carvacrol towards the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85:2111–2218.

**Uteng M., Hauge H. H., Markwick P. R., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J., Muhle-Goll C. (2003)** .Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin- like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry*.**42**: 11417-11426.

**Van Belkum M. J., Hayema B. J., Jeeninga R. E., Kok J., Venema G. (1991a)** .Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol*.**57**: 492-498.

**Van Belkum M. J., Kok J., Venema G., Holo H., Nes I. F., Konings W. N., Abee T. (1991b)**. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J Bacteriol*.**173**: 7934-7941.

**Van Belkum M. J., Kok J., Venema G. (1992)**. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl Environ Microbiol*.**58**: 572-577.

**Van Belkum M. J.,Stiles M. E. (1995)**. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl Environ Microbiol*.**61**: 3573-3579.

**Van Heusden H. E., de Kruijff B., Breukink E. (2002)**. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*.**41**: 12171- 12178.

- Van Kuijk S., Noll K. S., Chikindas M. L. (2011).** The species-specific mode of action of the antimicrobial peptide subtilisin against *Listeria monocytogenes* Scott A. *Letters in Applied Microbiology*, 54: 52-58.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings, J. (1996)** .Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.*60: 407-438.
- Vaughan A., Eijsink V. G., O'Sullivan T. F., O'Hanlon K., van Sinderen, D. (2001).** An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol.*91: 131-138.
- Venema K., Haverkort R. E., Abee T., Haandrikman A. J., Leenhouts K. J., de Leij L., Venema G., and Kok J. (1994).** Mode of action of LciA, the lactococcal A immunity protein. *Mol Microbiol.*14: 521-532.
- Vergin F. (1954).** Antibiotics and probiotics. *Hippokrates.*25: 116-119.
- Verluyten J., Leroy F. & De Vuyst L. (2004).** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 5081-5088.
- Vescovo K., Javorský P., Nemcová R., Kopečný J., Boda K. (1982).** Occurrence of conjugative amyolytic activity in rumen *Lactobacilli*. Elsevier. 144, Issue 1: 53–57.
- Villani F., Pepe O., Mauriello G., Salzano G., Moschetti G., Coppola S. (1995).** Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 25 : 179–190.
- Vignolo G., Palacios J., Farias M., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G. (2000)** .Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41, 410-416.
- Vollenweider L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. et Torres C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid isolated from rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 21: 305-314.
- Vrinda Menon K., Garg S.R., (2001).** Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 18:647-650.
- Walsh M.C., Gardiner G.E., Hart O.M., Lawlor P.G., Daly M., Lynch B., Richert B.T., Radcliffe S., Giblin L., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C. et Ross P. (2008).** Predominance of bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a faecal strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype, *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 317–327.
- Wamidh H., Talib Adel M., Mahasneh M. (2010).**Antimicrobial, Cytotoxicity and Phytochemical Screening of Jordanian Plants Used in Traditional Medicine. *Molecules*, 15, 1811-1824.

- Wang Y., Henz, M. E., Gallagher N. L., Chai S., Gibbs A. C., Yan L. Z., Stiles M. E., Wishart D. S., Vederas J. C. (1999).** Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*.38: 15438-15447.
- Watson R. M., Woody R. W., Lewis R. V., Bohle D. S., Andreotti A. H., Ray B., Miller, K. W. (2001).** Conformational changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry*.40: 14037-14046.
- Ward D. J., Somkuti G. A. (1995).** Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl Microbiol Biotechnol*.43: 330-335.
- Wendakoon C. N., Sakaguchi M., (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58: 280-283.
- Whitford M. F., McPherson M. A., Forster R. J., Teather R. M. (2001).** Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl Environ Microbiol*.67: 569-574.
- Wiedemann I., Bottiger T., Bonelli R. R., Wiese A., Hagge S. O., Gutsmann T., Seydel U., Deegan L., Hill, C., Ross P., and Sahl H. G. (2006).** The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147--a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol Microbiol*.61: 285-296.
- Weiss N., Busse M., Kandler O. (1968)** .The origin of fermentation by-products in the lactic acid fermentation of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch Mikrobiol*.62: 85-93.
- Wescombe P. A., Tagg J. R. (2003).** Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. *Appl Environ Microbiol*.69: 2737-2747.
- Wilson A.R., Sigee D., Epton H.A.S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol*. 99: 1516-1522.
- Windholz, M., S. Budavari, R. F. Blumetti, and E. S. Otterbein (ed.). (1983).** The Merck index, 10th ed. Merck & Co., Inc., Rahway, N.J.
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*.87: 4576-4579.
- Worobo R. W., Henkel T., Sailer M., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E. (1994).** Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin,



carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*.140 ( Pt 3): 517-526.

**Worobo R. W., Van Belkum M. J., Sailer M., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E. (1995).** A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol*.177: 3143-3149.

**Xiao H., Chen X., Chen M., Tang S., Zhao X., Huan L. (2004).** Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*.150: 103-108.

**Xie L., van der Donk W. A. (2004)** .Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*.8: 498-507.

**Xue J., Hunter I., Steinmetz T., Peters A., Ray B., and Miller K. W. (2005).** Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl Environ Microbiol*.71: 1283-1290.

**Yamamoto Y., Togawa Y., Shimosaka M., Okazaki M. (2003).** Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol*.69: 5746-5753.

**Yen T.B., Chang S. T. (2008).** Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: 232-236.

**Yoneyama F., Imura Y., Ichimasa S., Fujita K., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K. (2009a).** Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl Environ Microbiol*.75: 538-541.

**Yoneyama F., Imura Y., Ohno K., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K. (2009b).** Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother*.53: 3211-3217.

**Zeggwagh N. A., Ouahidi M. L., Lemhadri A., Eddouks M. (2006).***J. Ethno*.Vol.108. 223–227.

**Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto, K. (2003).** Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*.67: 1616-1619.

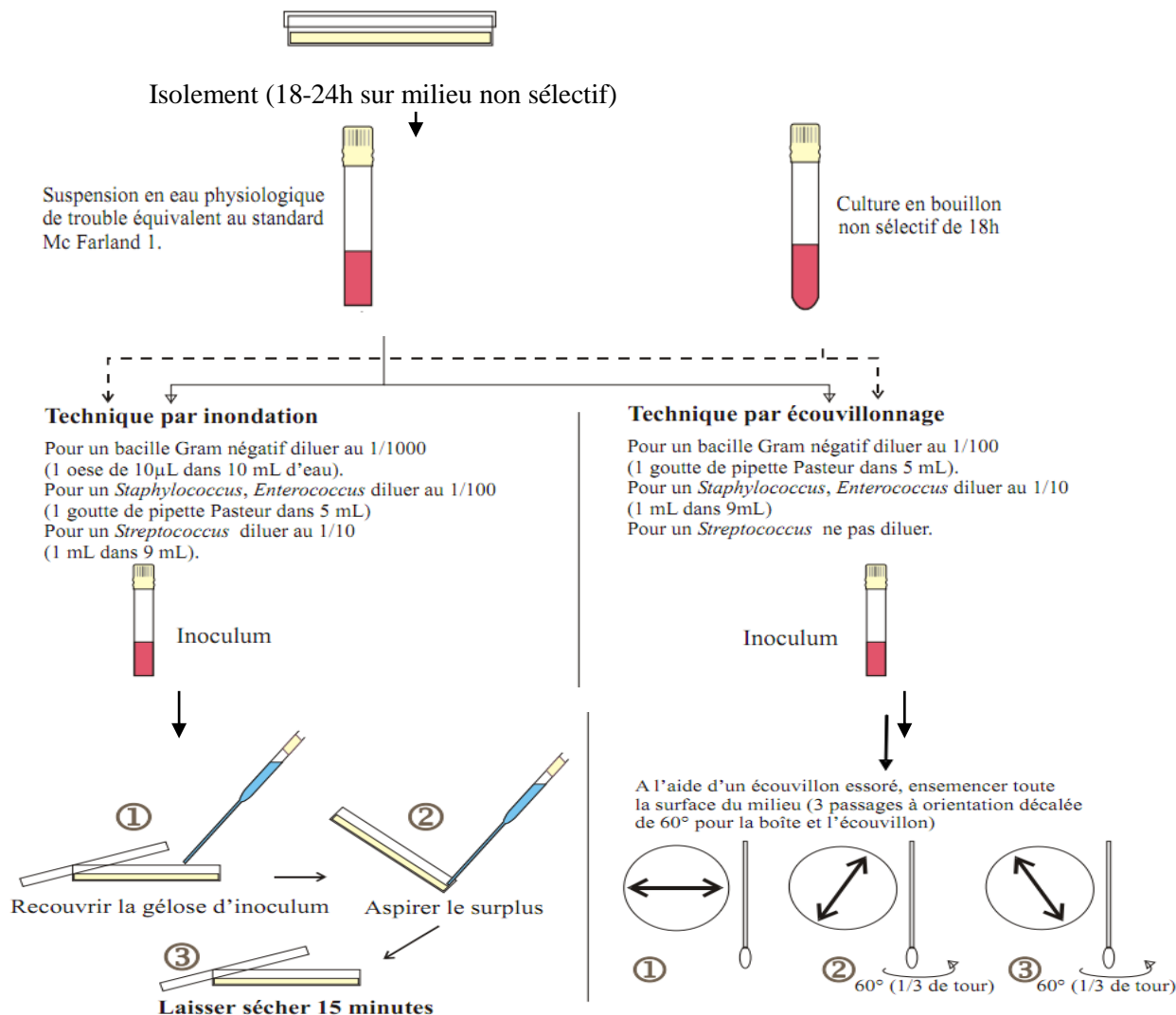
**Zendo T., Koga S., Shigeri Y., Nakayama J., Sonomoto K. (2006).** Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl Environ Microbiol*.72: 3383-3389.

**Zouhir A., Hammami R., Fliss I., Hamida J. B. (2010)** .A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J*.29: 432-439.

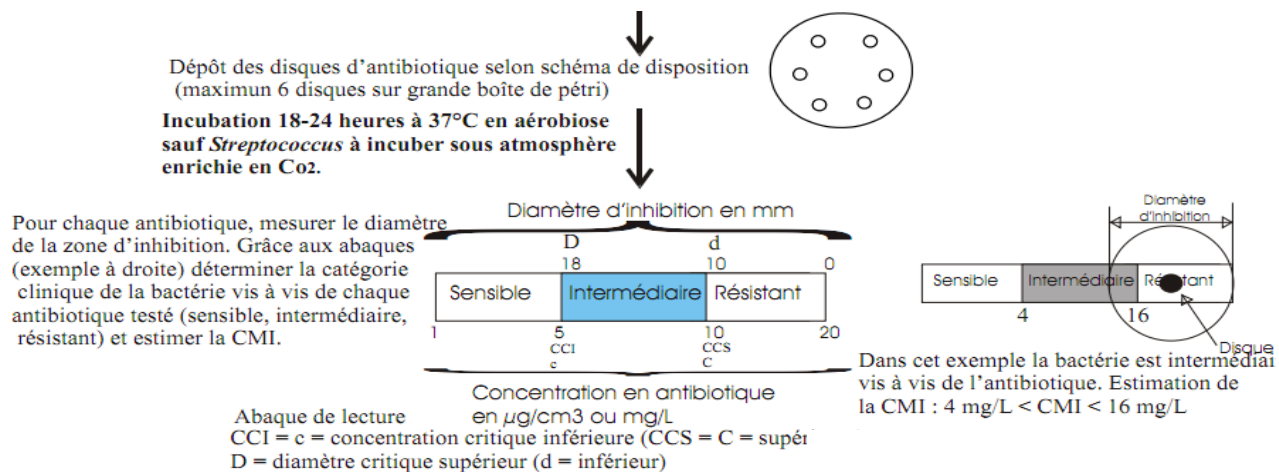
# **ANNEXES**

# ANNEXE 1

## Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.



Le milieu utilisé est la gélose Mueller-Hinton (4mm d'épaisseur) pour les bacilles Gram négatif, les *Staphylococcus*, les *Enterococcus*. Pour les *Streptococcus* on utilise le milieu Mueller-Hinton+sang



## ANNEXE 2

### Composition des milieux de culture

#### Bouillon nutritif (BN)

Peptone	15g
Extrait de levure	05g
NaCl	05g
eau distillée	1000ml
pH	7.4

#### Bouillon MRS

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
pH	6.2

**Gélose Mueller-Hinton**

Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0 g
pH	7,4