

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum*
LB01 et *Lactobacillus acidophilus* LB02 en culture pure et mixte.**

Présenté par :
Laouti nourhane
Touati fatima zahra

Devant le jury :

Président : Boukerouis Djoudi Maitre Assistant A

Encadreur : Krantar Kamel Maitre Assistant A

Examineur : Zerrouki mohamed Hocine Maitre Assistant B

Soutenu publiquement le : 16 Juin 2019.

Remerciements

Avant tout nous remercions « **Allah** » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, la santé, et la force pour accomplir ce modeste travail dans de meilleures conditions, merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous remercions **Mr. Krantar Kamel** pour avoir encadrer ce travail, pour son aide, ses conseils scientifiques et sa patience et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles, merci de nous avoir éclairer par votre savoir, votre générosité.

Nos remerciements et notre sincère gratitude s'adressent aux membres de jury qui ont accepté de nous honorer par leur présence en tant qu'examineurs de ce modeste travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à tous nos **professeurs** qui ont contribué à notre formation tout au long de ces cinq ans.

Nous remercions beaucoup **nos familles** pour leurs aides durant nes études et leurs soutiens moral, encouragements et surtout leur patience.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué pour mener à bien ce travail.

Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum* LB01 et *Lactobacillus acidophilus* LB02 en culture pure et mixte.

Résumé

Les moisissures sont connues depuis longtemps par leurs effets nuisibles provoquant des altérations et des détériorations sur une large gamme de produits alimentaires. L'objectif de ce travail a été de tester l'activité antifongique de deux souches de bactéries lactiques provenant d'un complément alimentaire probiotique contre trois souches mycotoxinogènes de références. Pour ce faire deux méthodes ont été appliquées afin de mettre en évidence l'activité antifongique à savoir la méthode des spots et la méthode d'inhibition de la croissance radiale. Les résultats obtenus, ont montrés qu'il y a une activité inhibitrice chez les deux souches lactiques vis à vis de toutes les souches fongiques testées. Les souches *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) ainsi que la culture mixte ces deux souches ont données des zones d'inhibitions représentant respectivement 18%, 15% et 22 % de la surface totale de la boîte inoculée par la souche *Fusarium graminearum*. Les résultats de l'inhibition de la croissance radiale du mycélium des souches fongiques par les surnageants des souches lactiques testées ont montrés que *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) retardent respectivement, la croissance radiale de la souche *Fusarium graminearum* (FG) de 67,82% et de 45,63%. Le meilleur résultat a été obtenu par le surnageant de la culture mixte 97,82% d'inhibition de la croissance radiale de *Fusarium graminearum*. Cette étude nous a permis de découvrir les potentialités des bactéries lactiques dans le domaine de la biopréservation des produits alimentaires en général et particulièrement les produits laitiers altérables par moisissures.

Les mots clés : bactéries lactiques, activité antifongique, biopréservation, antagonisme, fibre.

Contribution to the study of the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* LB01 and *Lactobacillus acidophilus* LB02 in pure and mixed culture.

Abstract

Fungi are known since long time by their deleterious effect causing alteration and deterioration over a wide range of food products. The objective of this work was to test the antifungal activity of two lactic acid bacteria strains from a probiotic dietary supplement against tree mycotoxinogenics referenced strains. Three methods were applied to bring out the antifungal activity: the spots method and inhibition of the radial growth method. The obtained results have shown that there is an inhibitory activity in all lactic strains against all fungal strains tested. *Lactobacillus plantarum* (LB01) and *Lactobacillus acidophilus* (LB02) have an inhibition area respectively representing 18%, 15% and 22 % of the total surface of the inoculated petri dish by *Fusarium graminearum* (FG). The results of the radial growth inhibition method on the tested fungal strains by the supernatants of lactic acid bacteria strains have shown that *Lactobacillus plantarum* (LB01) and *Lactobacillus acidophilus* (LB02) delay respectively, the radial growth of *Fusarium graminearum* (FG) by 67,82% and de 45,63%. The best result was obtained by the mixed culture supernatant 97,82% inhibition of radial growth of *Fusarium graminearum*. This study allowed us to discover the potential of acid lactic bacteria in the field of biopreservation food in general and particularly the dairy products alterable by fungi.

Key words: lactic acid bacteria, antifungal activity, biopreservation, antagonism ,fiber.

المساهمة في دراسة النشاط المضاد للفطريات لـ *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus plantarum* LB01 في الزراعة النقية والمختلطة.
LB02

ملخص:

تعرف الفطريات منذ زمن بتأثيرها السلبي من حيث التغيرات وتعفن الأطعمة. الهدف من هذه الدراسة هو اختبار النشاط المضاد للفطريات من طرف سلالتين من البكتيريا اللبنية على ثلاث سلالات فطرية مصنفة مرجعيا. من اجل هذا طبقت طريقتين هما طريقة البكتيريا الحية، وطريقة تثبيط النمو الشعاعي. النتائج بينت وجود نشاط مثبت عند سلالتين من البكتيريا اللبنية ضد جميع السلالات ال سلالات الفطرية المدروسة السلالات *Lactobacillus plantarum* (LB01) و *Lactobacillus acidophilus* (LB02) أعطت مساحة حيز تثبيط يصل 22%، 15% و 18% للمساحة الكلية للعبة المزروعة بسلالة *Fusarium graminearum* (FG). اما نتائج التثبيط الشعاعي اثبتت تأخير النمو الشعاعي ل *Lactobacillus plantarum* (LB01) بنسبة 67.82% من طرف السلالة *Fusarium graminearum* (FG) وبنسبة 45.63% من طرف السلالة *Lactobacillus acidophilus* (LB02) وأفضل نتيجة للتثبيط الشعاعي اثبتت تأخير النمو الشعاعي ل *Fusarium graminearum* (FG) بنسبة 97.82% من طرف الوسط المختلط. هذه الدراسة مكنت من اكتشاف قدرة البكتيريا اللبنية في مجال المحافظة الحيوية لجميع المنتجات الغذائية بصفة عامة وخصوصا المنتجات اللبنية القابلة للتلف بواسطة الفطريات المجهرية

كلمات مفتاحية: بكتيريا لبنية، نشاط مضاد للفطريات، المحافظة الحيوية، التضاد الحيوي، الالياف.

Liste des Abréviations

ADN Acide désoxynucleique

AFLs Aflatoxines

ARN Acide ribonucléique

ATP Adénosine triphosphate

a_w Activite d'eau

CBS Centraal bureau voor Schimmel cultures

CECT Colección Española de Cultivos Tipo

kDa Kilodalton

Lb Lactobacillus

NRRL Northern Regional Research Laboratory

OTA Ochratoxine A

ppm Partie par million

Liste des figures

	Les titres des figures	N° de la page
Figures 01	Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactiques	10
Figures 02	Utilisation des sources d'azotes du lait par <i>Lactococcus lactis</i>	12
Figures 03	Voie métabolique du citrate des <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i> citrate positif	13
Figures 04	Principales classes des moisissures	22
Figures 05	Schéma représente les étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des stries (test qualitatif)	36
Figures 06	Schéma représente les étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode d'inhibition de croissance radiale (test qualitatif)	38
Figures 07	Photo d'observation microscopique des cellules des bactéries lactiques après coloration de Gram (l'objectif x 100 à immersion)	38
Figures 08	Photo d'observation macroscopique de l'aspect des cultures pures des souches fongiques sur milieu PDA	39
Figures 09	Photo d'observation microscopique des souches fongiques sous microscope optique (l'objectif x40)	39
Figures 10	Résultat de l'activité antifongique des souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (LB01) et <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LB02) sur la croissance radiale du mycélium des souches <i>Fusarium graminearum</i> (FG) ; <i>Aspergillus ochraceus</i> (AO) ; <i>Aspergillus parasiticus</i> (AP)	41
Figures 11	Résultat de l'activité antifongique des souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (LB01) et <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LB02) en culture mixte sur la croissance radiale des mycélium des souches <i>Fusarium graminearum</i> (FG) ; <i>Aspergillus ochraceus</i> (AO) ; <i>Aspergillus parasiticus</i> (AP) .	41

Listes des tableaux

	Les titres des tableaux	N° de la page
Tableaux 01	Principale des caractéristiques physiologique des bactéries lactique	5
Tableaux 02	Caractéristique et origines des souches de bactéries lactiques utilisées dans ce travail	33
Tableaux 03	Les différentes souches fongiques utilisées dans se travail	33
Tableaux 04	Résultats de l'estimation de l'activité antifongique des bactéries lactique par la méthode qualitative des spots	40

Table de matières

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

Chapitre I

Les bactéries lactiques et leurs substances antimicrobiennes

I.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques.....	03
I.2. Taxonomie et classification.....	04
I.3. Principaux genres des bactéries lactiques.....	05
I.3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	05
I.3.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	06
I.3.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	06
I.3.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	07
I.3.5. Le genre <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	07
I.3.6. Le genre <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	07
I.3.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	08
I.4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	08
I.4.1. Le métabolisme des sucres.....	08
I.4.2. Le métabolisme des protéines.....	10
I.4.3. Métabolisme du citrate.....	11

Chapitre II

Les moisissures et les mycotoxines

II.1. Généralités sur les moisissures.....	18
II.2. Identification des champignons.....	18

II.2.1. Caractères morphologiques	19
II.2.2. caractères moléculaires.....	19
II.3. Mode de reproduction.....	19
II.4. Classification	19
II.5. Mycotoxinogénèses.....	22
II.5.1. Les facteurs intrinsèques.....	22
II.5.2. Les facteurs extrinsèques.....	23
II.5.2.1. Température.....	23
II.5.2.2. Activité en eau (a_w).....	23
II.5.2.3. Le PH.....	23
II.5.2.4 .Composition gazeuse.....	24
II.5.2.5.Nature de substrat.....	24
II.5.2.6. facteurs biologiques.....	24
II.6. Les mycotoxines.....	25
II.6.1. Principales mycotoxines.....	25

Chapitre III

Substances antifongiques

III.1.Définition des antifongiques.....	28
III.2.classification des antifongiques.....	28
III.3. Les substances antifongiques chez les bactéries lactiques.....	28
III.3.1 Acide organique	29
III.3..2 . Peroxyde d'hydrogène.....	29
III.3.3.3 Les bactériocine.....	29
III.3.4 Les dipeptides cyclique.....	29
III.3.5..Réutérine.....	30
III .3.6. Le diacétyle.....	30
III.4. Les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines	30

III.5. Facteurs affectant la production et l'activité des substances antifongiques.....	31
---	----

Chapitre VI

Matériels et Méthodes

IV.1 objectif du travail	32
IV.2 Matériels biologiques.....	32
IV.2.1 Les souches bactériennes.....	32
IV.2.2.- Les souches fongiques	32
IV.3. Milieux de cultures.....	33
IV.4. Méthodes	33
IV.4.1. Revivification des souches et vérification de la pureté.....	33
IV.A. Souches lactiques	33
IV.B. Souches fongiques.....	33
IV.4.2. La mise en évidence de l'activité antifongique.....	34
IV.4.2.1- Test qualitatif : méthodes en spots	34
IV.4.2.2. Mesure de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires	36
IV.A. Méthodes de l'inhibition des croissance radiale : test quantitatif.....	36

Chapitre V

V- Résultats et discussion

V.1. Résultats et interprétation	38
V.1.1 Authenticité et pureté des souches.....	38
V.A. Souches lactiques.....	38
V.B. Souches fongiques-	38
V.1.2. La mise en évidence de l'activité antifongique	39

V1.2.1. Test qualitatif : méthode des spots.....	39
V.1.2.2. Mésure de l'activité antifongique des métabolites extracellulaire.....	40
V.A. La méthodes de l'inhibition de croissance radiale : test quantitatif.....	40
V.2. Disucssion.....	43
Conclusion et Perspectives.....	46
Références Bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, les bactéries lactiques sont utilisées pour fabriquer divers produits alimentaires fermentés, y compris des produits laitiers. Les produits fermentés renferment plusieurs souches, de genres et d'espèces différents, ayant pour point commun la production d'acide lactique. De part leur métabolisme, les bactéries lactiques permettent d'allonger la durée de conservation des denrées alimentaires, et leur confèrent une saveur et une texture différentes. Elles peuvent aussi apporter des bienfaits au niveau santé et nutrition elles ont une fonction probiotique **(Desmazeaud, 1992)**

Elles représentent un groupe hétérogène de microorganismes. Elles colonisent les produits carnés, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale **(Stiles et al., 1997)**. Elles sont reconnues comme GRAS (Generally Recognized As Safe) **(Klaenhammer et al., 2005)**. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines **(Rodgers, 2003 ; Vermeiren et al., 2004)**.

La présence de certaines moisissures sur plusieurs produits d'origine animale ou végétale peut avoir un impact négatif sur la qualité de l'alimentation ainsi que sur la santé humaine et animale. Ils sont destructeurs, ravageurs des cultures et/ou producteurs de substances toxiques.

La sécrétion des métabolites secondaires hautement toxiques par les champignons toxigènes au cours de leur prolifération sur les céréales stockées, constitue un danger réel pour la sécurité sanitaire de l'Homme et de l'animal. En Angleterre, en 1960, l'ingestion d'une farine importée du Brésil, contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de volailles. Cet événement a donné le départ d'une série d'études et de recherches sur les substances actives élaborées par les moisissures. D'ailleurs, dans la même année (1960), le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle toxine **(Tantaoui, 1977)**.

D'après **(Steyn (1998)**, les aflatoxines sont sécrétées par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*, alors que pour les ochratoxines,

elles sont élaborées par *Aspergillus ochraceus*. Ces mycotoxines sont caractérisées par leur fluorescence sous les rayons UV et par leur thermorésistante (**Kurtzman et al., 1987**). La toxicité chronique des aflatoxines et des ochratoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles de ces mycotoxines. Des résultats *in vivo* ont montré que l'aflatoxine B1 provoque très fréquemment des mutations. Les aflatoxines et les ochratoxines provoquent un ensemble de pathologies animales surtout chez les animaux qui se nourrissent des céréales contaminées (**Aguillar et al., 1993**).

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays (**Kurtzman et al., 1987**)

Malgré les études multiples sur l'utilisation des agents chimique de conservation, peu de travaux ont été réalisé sur l'effet antifongique des ferments lactiques. L'utilisation des bactéries lactiques dans la lutte contre les moisissures est a l'origine du choix de notre thème qui consiste a évalué l'activité antifongique de ces ferments lactiques par deux méthodes de spots et la méthode de croissance radiale.

Pour se faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur les bactéries lactiques et les éventuelles moisissures toxiques. Dans la seconde partie de notre étude, la méthodologie est représentée par les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail suivie des principaux résultats et leurs discussions. L'étude est achevée par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I
**Bactéries lactiques et leurs substances
antimicrobiennes**

Les bactéries lactiques sont des bactéries très ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles à l'homme. Celui-ci les a regroupées dans un ensemble dont le nom lui-même est évocateur de leur caractéristique métabolique principale : la production d'acide lactique. Leur habitat est extrêmement varié : lait, végétaux, peaux des animaux, eau de mer, eau douce, poisson, viande, excréments et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Lee et al., 2008**)

I.1. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes à Gram positif, se présentent sous forme de coques, de bacilles ou de coccobacilles, non pigmentées, catalase-négatives, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Larpen et al., 1997 ; Bourgeois et al., 1996**). Elles sont caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques partagent les caractéristiques suivantes : elles sont asporulées, généralement immobiles, anaérobies mais aérotolérantes, ne possèdent ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine (**Guiraud, 2003**).

Les bactéries lactiques sont pour la plupart mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à des pH compris entre 4 et 6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou à pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel. Du point de vue nutritionnel, ces micro-organismes utilisent comme source d'énergie les sucres mais ont surtout une exigence marquée en acides aminés et en vitamine B (**Hammes et Hertel, 1998**).

Les bactéries lactiques peuvent être classées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les bactéries lactiques homofermentaires utilisent la voie de la glycolyse pour produire à partir du glucose deux molécules d'acide lactique. Les souches hétérofermentaires, en utilisant la voie de 6-phosphogluconate, fermentent les hexoses pour former l'acide lactique, le dioxyde d'oxygène et l'éthanol (ou l'acide l'acétique) comme produits finaux (**Ström et al., 2005**).

Le tableau 01 résume les caractéristiques de principaux genres des bactéries lactiques.

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques des bactéries lactiques (*in* Ammor, 2004).

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Paralactobacillus</i>
<i>Morphologie</i>	Bacilles	Bacilles	Coques ovales	Coques /Bacilles	Coques	Coques	Coques	Coques	Bacilles
<i>Gaz à partir de glucose</i>	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
<i>Croissance à 10°C</i>	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
<i>45°C</i>	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+	+
<i>Isomère d'acide lactique</i>	D, L, DL	L	D	DL, D	L	L	L, DL	L	DL
<i>Hydrolyse d'arginine</i>	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
<i>mDAP</i>	+/-	+	-	-	-	-	-	-	ND
<i>Croissance sur gélose Rogosa SL</i>	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-

I.2. Taxonomie et Classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (**Stiles et Holzapfel, 1997**). Les méthodes phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries, et la classification des bactéries lactiques va être profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (**Penaud, 2006**). .

Selon **Stiles et Holzapfel (1997)** et **Axelsson (1998)**, les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*,

Vagococcus et *Weisella*. Néanmoins, c'est surtout *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella* et à grande échelle *Lactobacillus*, qui ont une certaine importance dans les aliments (**Vandamme et al., 1996**).

L'approche consistant à prendre en compte les méthodes phénotypiques et génotypiques s'appelle la taxonomie polyphasique (**Vandamme et al., 1996**). La technique de MLST (pour Multi Locus Sequence Typing), basée sur la divergence nucléique de gènes de ménage, est utilisée pour la classification des bactéries lactiques pathogènes notamment les streptocoques. Cependant cette technique n'a pas été utilisée pour d'autres bactéries lactiques.

I.3. Principaux genres des bactéries lactiques

I.3.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Leclerc et al., 1994 ; Khalid et Marth, 1990**).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Tamime, 2002**).

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

I.3.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot, 2008 ; Pot et al., 1996).

I.4.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzappel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Pilet et al., 2005 ; Haddie, 1986).

I.3.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D, ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement

différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

I.3.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho et al., 2007 ; Pilet et al., 1998).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Guiraud, 2003 ; Hassan et Frank, 2001). Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

I.3.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004).

I.3.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa

présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V et/ou Y mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C. (Ho et al., 2007 ; Pilet et al., 2005 ; Axelsson et al., 1998).

I.4. Métabolisme des bactéries lactiques

I.4.1. Le métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait est un disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%. La Figure 1 présente les principales voies de la glycolyse chez ces bactéries.

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoenol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule, les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies ; la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (**Desmazeaud, 1992**).

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres (**Schmitt et al., 1990**).

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages.

Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (**Zhennai, 2000**).

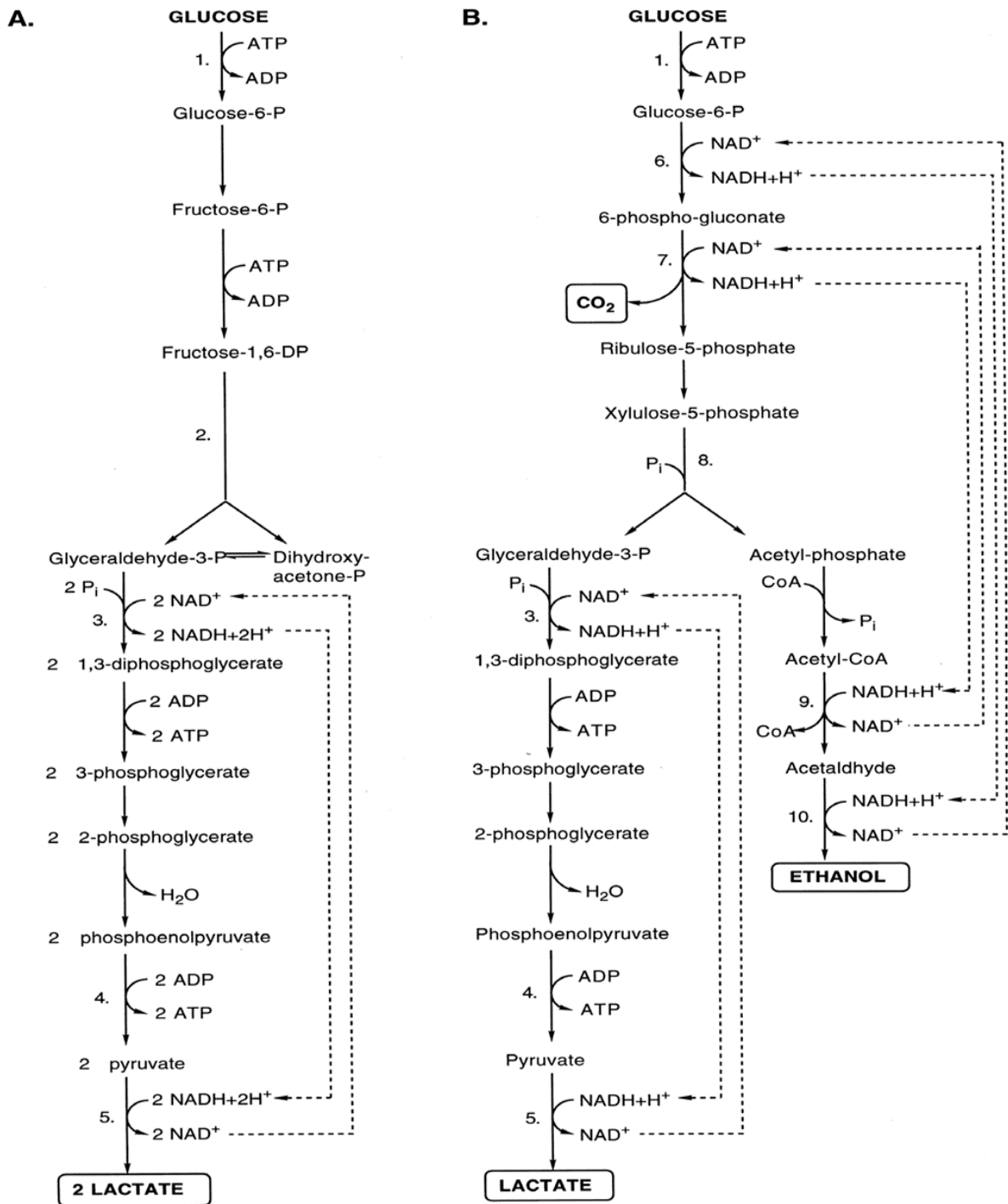


Figure 1 : Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactiques. (A) voie homofermentaire (B) voie hétérofermentaire (Thompson et Collins, 1989).

I.4.2. Le métabolisme des protéines

Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, les protéases indigènes du lait (la plasmine) et les enzymes du ferment et de la flore secondaire (**Lane et Fox, 1996**). La protéolyse est considérée comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère.

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (**Law et Haandrikman, 1997**). Ces systèmes sont complexes de part le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de part leur localisation cellulaire (**Juillard et al., 1996**).

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (**Law et Haandrikman, 1997**).

Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (**Lane et Fox, 1996**). Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés, caractéristique variable selon les souches. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (**Topisirovic et al., 2006**).

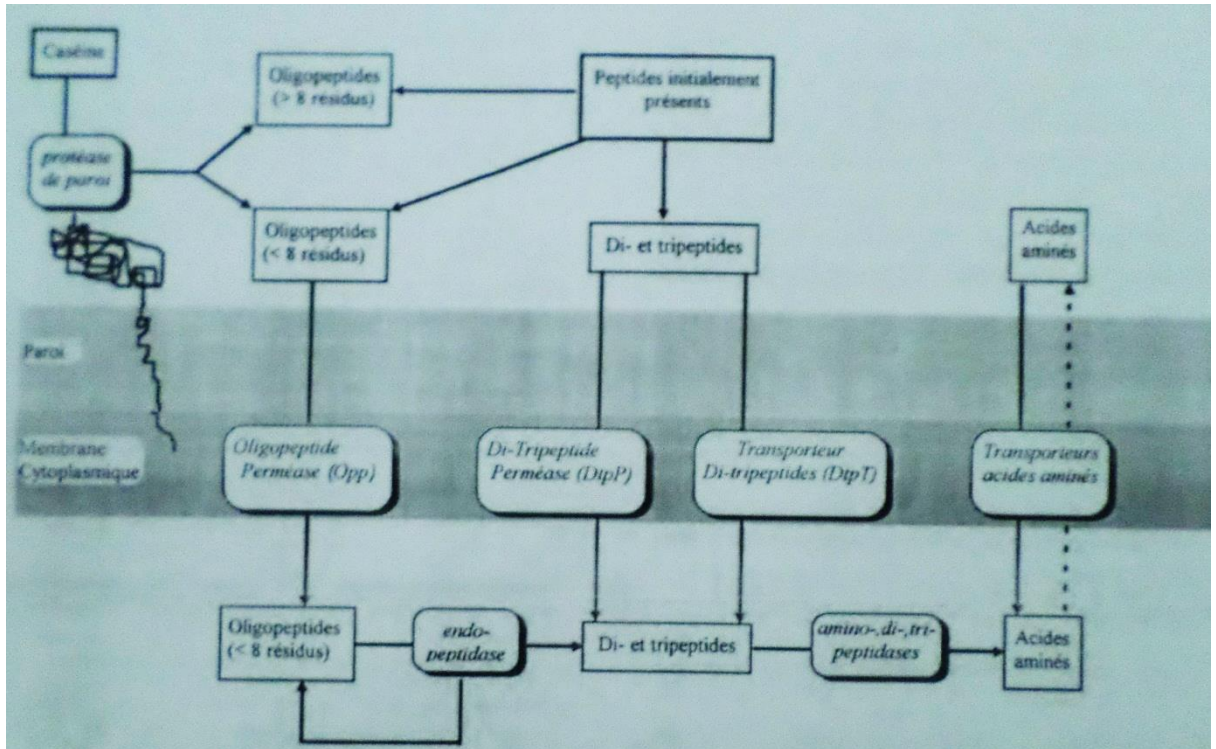


Figure02 : Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis* (Juillard et al., 1996).

I.4.3. Métabolisme du citrate

Dans les produits laitiers, l'acide citrique est considéré comme le précurseur principal des arômes, ainsi la formation de l'acétate, de l'acétoïne et de diacétyl est attribué au catabolisme de cet acide par les bactéries lactiques (Diviès, 1991).

Le mécanisme de production du diacétyl à partir du citrate par les bactéries lactiques mésophiles tels *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc lactis* a été largement étudié par (Diviès, 1991). (Figure 3).

La première étape du métabolisme du citrate est sa pénétration à l'intérieur de la cellule par un citrate permease qui présente une bonne activité à pH 5 chez *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* . Le citrate intérieur est hydrolysé par une citrate lyase en acétate et en oxaloacétate cet enzyme est constitutif chez *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* et elle est inductif chez *Leuconostoc* (Bekal et al., 19988). Par la suite, l'oxaloacétate est converti en pyruvate et en acétylaldéhyde thiamine pyrophosphate avec libération d'une molécule de CO₂

Chez les bactéries lactiques hétérofermentaires, le métabolisme du citrate s'effectue entre pH variant de 6,5 à 4,5, mais la production du diacétyl et d'acétoïne se fait à des pH acides (Starrenburg et Hugenholtz, 1991).

En général il est admis que le citrate n'est pas utilisé comme source d'énergie chez les bactéries aromatiques bien que leur croissance sur lactose soit stimulée par le citrate (Cogan, 1987).

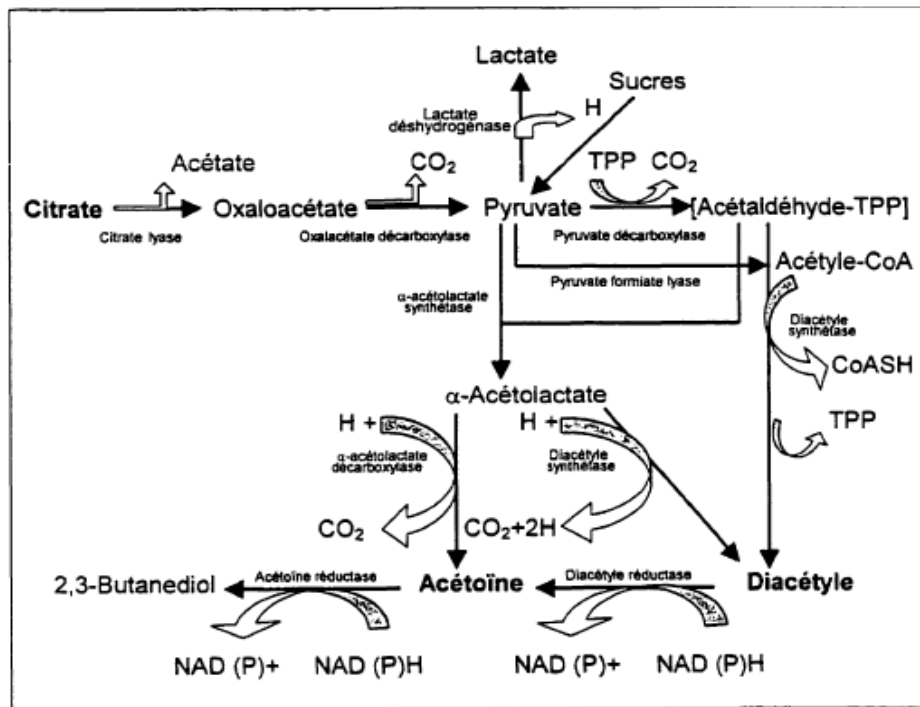


Figure 3 : Voie métabolique du citrate des lactocoques et leuconostocs citrate positif (Cit+) (Fox et al., 1990; Divies et al., 1991).

I.5. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques produisent divers composés tels que les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, le CO₂ et/ou les bactériocine pendant les fermentations lactiques (Deegan et al., 2006).

Les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées dans la biopréservation des nourritures incluent la production des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, de l'anhydride carbonique, du diacétyle, des antimicrobiens à large spectre tels que la reutérine et la production de bactériocines (Vermeiren et al., 2004).

Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes ; contaminants possibles des produits fermentés (Guessas et al., 2006).

I.5.1. Acides organiques

L'acide lactique est le métabolite principal des BL causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes (Eklund, 1989). La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme (Piard et

Desmazeaud, 1991). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (**Eklund, 1989**).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié à un certain pH semblable avec l'acide lactique. Les acides acétiques et propioniques agissent l'un sur l'autre sur les membranes de cellules pour neutraliser le gradient électrochimique de proton, mais l'effet de l'acide acétique et propioniques dépend souvent de la diminution du pH provoqué par l'acide lactique (**Eklund, 1989**). L'acide propionique réduit la croissance fongique, particulièrement à un pH inférieur, et affecte les membranes fongiques aux valeurs de pH en dessous de 4,5. L'acide propionique et acétique empêchent également l'assimilation d'acide aminé (**Eklund, 1989**).

La fermentation par les bactéries lactiques est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH (**Podolak et al., 1996**).

Les niveaux et les types d'acides organiques produits pendant les fermentations dépendent de l'espèce, de la composition du milieu et des conditions de croissance (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

Les stéréoisomères de l'acide lactique diffèrent également dans l'activité antimicrobienne, l'acide lactique L étant plus inhibiteur que l'isomère D (**Benthin et Villadsen, 1995**).

I.5.2. Acides gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (**Rao et al., 1984**) et des saucisses sèches (**Sanz et al., 1988**). L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (**Gould, 1991**).

I.5.3. Peroxyde d'hydrogène

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O₂) en super oxyde excité (O₂*), en peroxyde (H₂O₂) ou en eau (H₂O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (**Condon, 1987**).

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène sous l'action de la flavoprotéine oxydase du nicotinamide adénine hydroxyperoxydase dinucléotide (NADH). L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane ; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (**Kong et Davison, 1980**).

L'H₂O₂ peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O₂) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988**).

Le peroxyde d'hydrogène peut aussi activer le système lactoperoxydase avec la formation de l'hypothiocyanate et d'autres agents antimicrobiens. L'ion hypothiocyanate est un très puissant antimicrobien qui agit aussi bien sur les bactéries à Gram positive que sur les bactéries à Gram négative.

La production de H₂O₂ par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas sp* et de divers microorganismes psychrotrophes (**Davidson et al., 1983**).

La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et la disponibilité de l'oxygène (**Helander et al., 1997**).

I.5.4. Dioxyde de carbone (CO₂)

Il est principalement produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Eklund, 1984**).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram- (**Hotchkiss et al., 1999**). Le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg, 1989), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

I.5.5. Composants aromatiques

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants.

I.5.5.1. Diacétyle

Il est produit par des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* par la fermentation du citrate (**Lindgren et Dobrogosz, 1990 et Cogan et Hill, 1993**). Il est responsable de l'arôme et de la saveur du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyle sont de 2 à 7 µg/ml (**Earnshaw, 1992**).

Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyle bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (**Cogan, 1986**). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée. Cependant, le diacétyle peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (**Jay, 1992**) et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées.

Le diacétyle a été démontré pour être un antimicrobien efficace contre un éventail de bactéries Gram négatives et Gram positives, bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (**Gill et Halley, 2003**).

I.5.5.2. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* dans les produits laitiers (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

Les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (**Bottazzi et Dellaglio, 1967**). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (**Kulshrestha et Marth, 1974**).

I.5.5.3. Reutéline

La reutéline est produite par *Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (**Axelsson et al., 1989**). La reutéline est formée pendant la croissance anaérobique de *Lb. reuteri* par l'action de la glycérol déshydratase qui catalyse la conversion du glycérol en reutéline (**Talarico et al., 1988**). La reutéline est produit pendant la phase stationnaire de *Lactobacillus reuteri* dans un milieu contenant du glucose et du glycérol ou du glyceraldéhyde. Elle a été chimiquement identifiée pour être le 3-hydroxypropanal (α -hydroxypropionaldéhyde), un composé fortement soluble à pH neutre qui est en équilibre avec ses formes dimères monomériques et cycliques hydratées (**Axelsson et al., 1989 ; Talarico et Dobrogosz, 1989**).

La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram+ et à Gram-. Les organismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (Axelsson et al., 1989).

I.6. Bactériocines

Les bactériocines sont des composés de synthèse ribosomale produites par les bactéries dans le but d'inhiber la croissance des autres bactéries. Ces composés sont trouvés chez la plupart des espèces bactériennes étudiées jusqu'à aujourd'hui. Mais peu d'entre eux sont largement étudiés. En général, elles ont un spectre d'action restreint, inhibant seulement les bactéries voisines de la souche productrice. Les bactéries à gram+ n'inhibent pas les bactéries à gram- et vice versa (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

Habituellement, elles sont de faible poids moléculaire (mais des bactériocines à haut poids moléculaire sont également produites). C'est leur nature protéique et leur spectre d'inhibition étroit qui les distingue des antibiotiques. Au cours des deux dernières décennies, la sécurité alimentaire est devenue un problème majeur, et de grands efforts ont été fournis pour identifier des bactériocines qui inhibent la croissance des germes pathogènes et nuisibles. Pour l'utilisation dans l'aliment la bactériocine doit être :

- Stable à la chaleur ;
- Stable à l'acidité ;
- Résistante aux protéases qui se trouvent dans l'aliment ;
- Active pendant une période prolongée ;
- En activité au pH de l'alimentation (4,5 à 7,0) ;
- Avoir un effet bactéricide que bactériostatique ;
- Un large éventail d'hôtes, en inhibant plusieurs agents pathogènes et nuisibles (Fox et al., 2000).

I.6.1-Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

- **Classe I. Les lantibiotiques :** peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés posttraductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe

IA qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe IB qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147. La nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, est la bactériocine la plus largement étudiée de la classe I (**Dortu et Thonart, 2009 ; Rajaram et al., 2010**).

- **Classe II.** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNG ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large. La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (**Dortu et Thonart, 2009**).
- **Classe III.** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. (**Dortu et Thonart, 2009**).
- **Classe IV.** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (**Dortu et Thonart, 2009**).

Chapitre II

Les moisissures et les mycotoxines

II. Les moisissures

II.1.Généralités

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux, ubiquitaires (**Pitt et al., 2000**). Au sein du règne des champignons renfermant suivant les auteurs 65000 à 100.000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20.000 espèces. Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à quatre classes : zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (**Berthier et Valla, 2001**).

Les moisissures peuvent devenir visibles, lorsque leur développement est important, ce sont de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères, capables de se développer sur des substrats nutritifs variés et tout particulièrement sur les denrées alimentaires, il s'agit d'organismes hétérotrophes. Ces microorganismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc) (**Perry et al., 2004**). A côté de ces intérêts bénéfiques, les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Leur développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, altération de qualités organoleptiques (odeur et flaveur), réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés (**Pitt et al., 2000**). Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines. Parmi les 300 métabolites d'origine fongique, seule une trentaine est connue pour être des mycotoxines (**Bhatnagar et al., 2002**).

II.2. Identification des champignons

L'identification des espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments est basée sur la comparaison des critères d'ordre morphologique, physiologique et écologique, après leur culture sur différents milieux appropriés (**Guarro et al., 1999**). L'identification moléculaire est souvent utilisée.

II.2.1. Caractères morphologiques

L'observation de l'aspect de la colonie (couleur, texture), des septations, de la forme et du branchement des hyphes, des structures de sporulation et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon. Chaque espèce de champignon est caractérisée non seulement par sa couleur, son apparence et son mode de reproduction, mais

aussi par ses exigences spécifiques d'ordre physiologique (ex. température de croissance) et écologique (substrat, conditions d'environnement) (**Aazzoune, 2010-2011**)

II.2.2-Caractères moléculaires

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant pas obligatoirement un examen morphologique (**Peterson, 2006 ; Hinrikson et al., 2005**). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la région ITS1-5,8s- ITS2 et IGS (**Hinrikson et al., 2005**).

II.3.Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au côté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide....etc.).(**Guiraud, 1998**).

II.4.Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (**Davet, 1996**). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (figure 04) (**Bourgeois, 1989**).

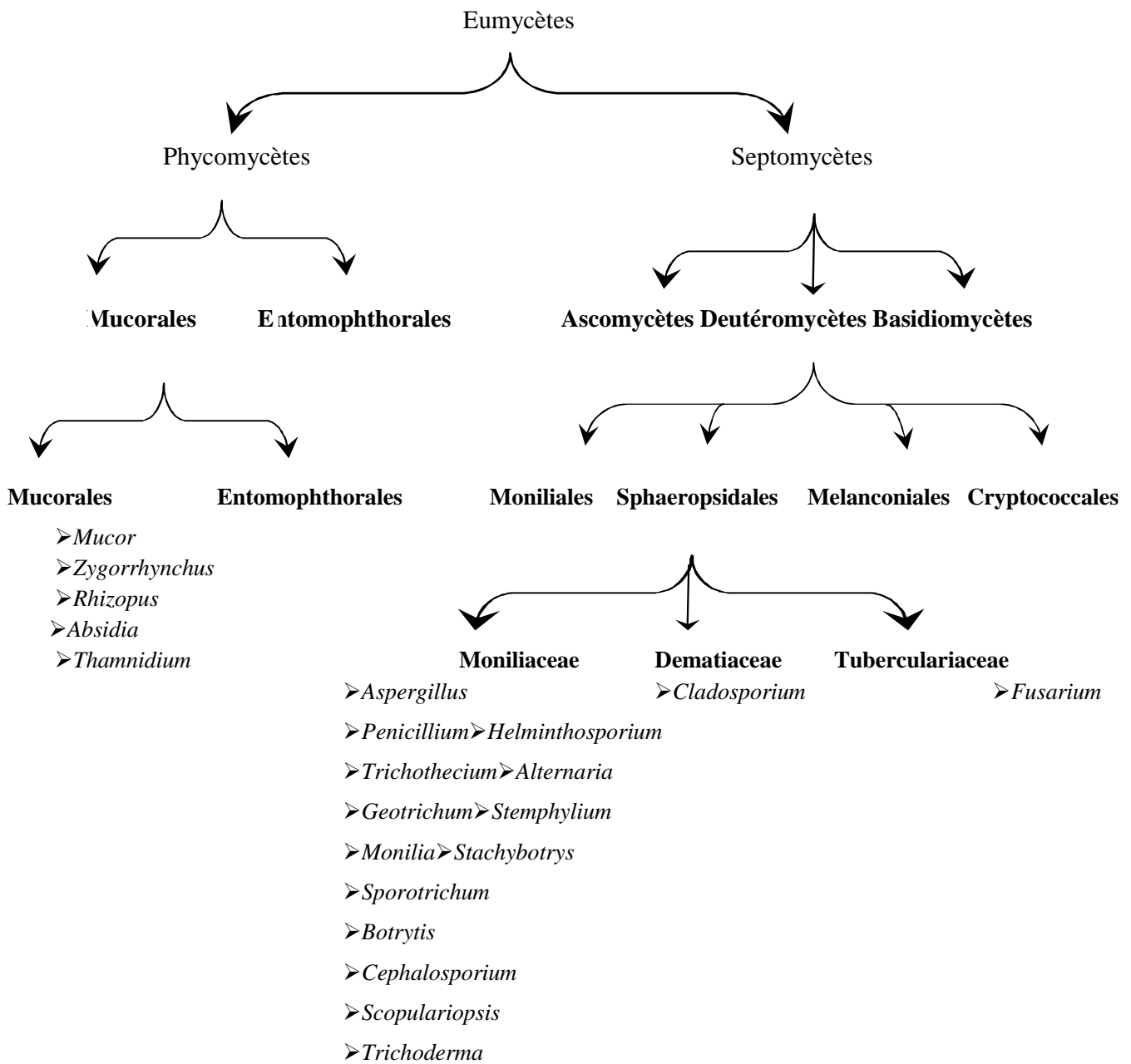


Figure 04 : Principales classes des moisissures (Bourgeois, 1989).

- **Zygomycètes**

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (**Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996**). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (**Guiraud, 1998**).

- **Ascomycètes**

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (**Bourgeois, 1998**).

- **Basidiomycètes**

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (**Botton et al., 1999**).

- **Deutéromycètes**

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (**Boiron, 1996**). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (**Punt et al., 2002; Frazier, 1967**).

II.5. Mycotoxinogénèse

L'élaboration des mycotoxines par certains champignons toxinogènes peut se faire à tous stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini. Celles-ci peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant la transformation ou au cours de toutes ces périodes. Les mycotoxines peuvent être présentes alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de microflore, soit du fait de traitements technologiques.

En effet, lorsqu'elles sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile, par conséquent, ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistants aux traitements thermiques ou chimiques (**Langseth et al., 1998 ; Cahagnier et al., 1995**). Toutefois, la présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe (**D'Mello et Macdonald, 1997**).

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (**Pfohl-Leskowicz, 1999**). Elles peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la microflore, soit du fait de traitements technologiques. La sécrétion de métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés à la souche fongique), extrinsèques (conditions de l'environnement).

II.5.1. Facteurs intrinsèques

Le potentiel génétique est un facteur important. Au sein du même genre, on peut distinguer des espèces connues pour être toxinogènes et d'autres non. Au sein d'une même espèce toxinogène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Par exemple, toutes les souches d'*Aspergillus parasiticus* produisent les aflatoxines par contre chez *Aspergillus flavus* la production est variable selon les souches. Par ailleurs un champignon peut produire plusieurs mycotoxines à la fois. Par exemple la production d'AFs et de CPA par *A.flavus*. En plus, une même mycotoxine peut être produite par des espèces différentes voire même par deux genres différents (ex. l'ochratoxine A produite par *Aspergillus* et *Penicillium*) (**Mitchell et al., 2004**).

II. 5.2. Facteurs extrinsèques

Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse des moisissures sont nombreux à savoir la température, activité de l'eau (a_w), le pH, la composition gazeuse, et la nature du substrat.

II.5.2.1. Température

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance. A l'image du champignon producteur, les mycotoxines peuvent être produites sur une large gamme de température. Par exemple, les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-42°C avec un optimum entre 24-28°C (Reiss *et al.*, 1998).

Aspergillus flavus et *A. niger* peuvent se développer entre 8 et 45 °C (Pitt et Hocking, 1997).

A 5°C, *Aspergillus* ne peut produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire les mycotoxines (Weidenbörner 1998 ; Northolt et Bullerman, 1982).

II.5.2.2. Activité en eau (a_w)

La disponibilité en eau nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszcowicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une A_w de 0,80 par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l' a_w est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

De même, la formation des aflatoxines par *A. flavus* nécessite une valeur d' a_w comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du micro-organisme producteur peut avoir lieu à des valeurs d' a_w plus basses. Certaines moisissures xérophiles (*Aspergillus flavus* ou *Penicillium restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuterie sèches à des a_w allant de 0.65– 0.75. Certains facteurs, tels que la pression osmotique, le substrat et la température, en réduisant l'humidité relative, peuvent conditionner l' a_w dans le milieu. Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer lorsque l' a_w est inférieure à 0,6, donc les produits alimentaires ayant une $a_w \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés (Troller, 1980).

II.5.2.3. Le pH

Comme pour la température et l' a_w , la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 4 à 9 avec un optimum de 4,5 à 6,5 et la production des mycotoxines à lieu aux voisinages des pH optimaux de croissance (Weidenbörner, 1998).

II.5.2.4. Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet dépresseur important sur la toxino-génèse. **Taniwaki et al. (2001)** ont montré qu'une teneur de 40% en CO₂ et 1% en O₂ réduit de 65% la croissance d'*A. flavus* et une inhibition totale de la production d'aflatoxine B₁. En outre, la production d'aflatoxine B₁ sur de l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5 % d'O₂, n'est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1%.

L'augmentation de la teneur en CO₂ (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. De même, la production de la patuline et d'acide pénicillique est réduite à de basses concentrations d'oxygène sans affecter la croissance du champignon producteur.

II.5.2.5. Nature du substrat

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant exclusivement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc.). En effet, les céréales, et les oléagineux, plus riches en sucres, et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Le Bars, 1998). Ainsi, la biogénèse des AFs, de l'OTA, de la stérigmatocystine, et de l'acide pénicillique, est favorisée, tout d'abord par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protides qui ont une moindre influence (**Lacey, 1989**).

La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (**Pfohl-Leszkowicz, 2001**).

II.6.2.6. Facteurs biologiques

Les insectes et les acariens sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (aflatoxine B₁, ochratoxine A, citrinine dans le maïs ou l'orge).

Les échantillons envahis par une seule espèce présentent généralement une imprégnation toxique bien plus importante que les échantillons ayant une mycoflore complexe. Par contre, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un

effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine. **Bouraima et al. (1993)** ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduits essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogénèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe. Lorsqu'il est plus abondant, il détournerait à son profit toute la phénylalanine ; l'OTA, un analogue de la phénylalanine ne pourrait alors être produit.

II.7. Les mycotoxines

Les mycotoxines (du grec mykês signifiant moisissure) sont des métabolites secondaires toxiques synthétisés pendant la phase stationnaire, de faibles masses moléculaires dont l'ingestion provoque une intoxication chez le consommateur. Ce sont des produits contaminant les denrées alimentaires d'origine animale ou végétale (**Chapeland-Leclerc et al., 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005**).

Les mycotoxines sont des substances chimiques complexes. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine, Fumitremorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxy nivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) (**Riba, 2008**).

II.7.1. les principales Mycotoxines

Les mycotoxines sont produites par une large gamme de moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Ceux-ci produisent comme mycotoxines :

- **Les aflatoxines**

En Angleterre (1960), l'ingestion d'une farine d'arachide importée du Brésil contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de dindonneaux. Ainsi en 1960, le nom aflatoxine est attribué à cette nouvelle matière toxique.

Les aflatoxines sont produites essentiellement par des *Aspergillus* sous des climats chauds et humides. L'*Aspergillus flavus* (d'où le nom de l'aflatoxine de « A-fla-toxine »), se développe particulièrement bien sur des graines d'oléagineuses (arachides, maïs), des fruits secs ou à coques, des céréales et des plantes aromatiques (épices ou aromates comme le piment, le paprika, le poivre, la noix de muscade et le cumin).

L'aflatoxine B1 (AFB1) est de loin la plus toxique et en règle générale la plus abondante, les autres aflatoxines co-sécrétées étant les aflatoxines B2, G1 et G2 (AFB2, AFG1, AFG2). Les aflatoxines M1 et M2 (AFM1, AFM2) sont des dérivés hydroxylés des aflatoxines B1 et B2 que l'on retrouve typiquement dans le lait de vache après métabolisation hépatique (**Chapeland Leclerc et al., 2005; Dragacci et Grosso, 2005**).

- **L'ochratoxine A**

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte en 1965 chez *Aspergillus ochraceus* lors d'un large criblage de métabolites secondaires chez l'espèce. L'ochratoxine A contamine de nombreuses denrées alimentaires (céréales, fèves de café et de cacao, raisins et produits d'origine animale comme les abats). Les ochratoxines peuvent être synthétisées par des *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, d'où le nom de la toxine) ou des *Penicillium* (*Penicillium verrucosum*)(**Dragacci et Grosso, 2005**).

- **Les fumonisines**

Les fumonisines produites par différentes espèces de *Fusarium* (*moniliforme*, *proliferatum* et *nygamai*), sont au nombre d'une quinzaine mais la fumonisine B1 (FB1) est de loin la plus répandue et la plus significative en terme de risque associé aux aliments. Elles ont été découvertes en 1988 à l'occasion de l'intoxication spectaculaire à évolution mortelle de chevaux contaminés par leur avoine (**Chapeland-Leclerc et al., 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005**).

- **La patuline**

La patuline est une petite mycotoxine excrétée par diverses espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, il s'agit d'une lactone insaturée, stable à très haute température, bactéricide et antifongique (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**).

- **Les trichothécènes**

Les trichothécènes sont produites principalement par *Fusarium tricinctum* sur millet, orge et blé, et subdivisées en trichothécènes A (toxines T2, HT2,...etc) et trichothécènes B (déoxynivalénol ou DON, nivalénol) (**Chapeland-Leclerc et al., 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005**).

- **La zéaralénone**

La zéaralénone est essentiellement produite sur le maïs d'où cette mycotoxine tire son nom, «zéa» signifiant maïs. Les espèces de *Fusarium* sont aussi capables de produire la zéaralénone connue des éleveurs de porc comme molécule à effet oestrogénique perturbant la reproduction des élevages (**Dragacci et Grosso, 2005**).

Chapitre III

Substances antifongiques

Les composés antifongiques pourraient permettre l'inhibition de la croissance de moisissures, d'améliorer la durée de vie de nombreux produits fermentés et, par conséquent de réduire les risques pour la santé des consommateurs suite à l'exposition aux mycotoxines (**Gourama et Bullerman, 1995**).

III.1. Définition des antifongiques

Les antifongiques (ou antifungiques) tirent leur nom du latin fungus qui signifie champignons. Ce sont donc des médicaments capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques. Aussi, Une substance antifongique ou antifungique (appelée également fongicide ou fongistatique) est une substance possédant la capacité de tuer ou de limiter la prolifération des champignons microscopiques (par exemple les substances traitant les mycoses) (**Chen et al., 2007**).

III.2. Classification des antifongiques

Les antifongiques utilisés peuvent être classés comme suivant :

- Les polyènes (amphotéricine B et ses dérivés)
- Les azolés
- Les échinocandines
- Les inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques (5-fluorocytosine)

Les médicaments antifongiques ont des structures moléculaires et des modes d'action différents et peuvent être classés en fonction de ces deux critères (**Pitt et Miscamble, 1995**).

III.3. Les substances antifongiques chez les bactéries lactiques

Les recherches sur l'activité antifongique chez les bactéries lactiques n'ont commencé qu'à la fin des années 50 et au début des années 60, avec **Guillo (1958)** qui élaborait un produit actif contre *Candida albicans* par *Lactobacillus acidophilus*, et **Marth et Hussong (1963)** qui ont testé le filtrat de *Leuconostoc citrovorum* ayant une activité antibactérienne sur quatre espèces de levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *Glutinis Torula* et *Mycotorula lipolytica*, mais tous les filtrats ont été jugés inactifs. **Collins et Hardt (1980)** ont constaté que le filtrat stérilisé d'une culture de *Lb. acidophilus* a pu légèrement retarder la croissance de *C. albicans* par rapport au bouillon fraîchement préparé. **Wiseman et Marth (1981)** ont démontré l'inhibition d'*Aspergillus parasiticus* par *Streptococcus lactis* C10, sans identification de la molécule inhibitrice. Actuellement, plusieurs équipes de recherche ont pu identifier les substances antifongiques produites par les bactéries lactiques (voir annexe 01), ainsi que l'effet synergique de l'acétate de sodium contenu dans le milieu de culture avec les

acides organiques produits par ces bactéries outre que les métabolites antifongiques, la compétition nutritionnelle a été prouvée aussi comme un obstacle antifongique (**Bayrock et Ingledew, 2004**).

III.3.1. Les acides organiques

Les principaux métabolites impliqués dans les activités antagonistes sont des acides organiques. L'acide lactique est le principal produit de la fermentation par les bactéries lactiques. C'est un produit majoritaire issu de la fermentation, mais d'autres acides organiques principalement acétique, formique, propionique, ou encore, caproïque et benzoïque sont également produits (**Kuwaki et al., 2002**).

III.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène produit par *Lb. acidophilus* G/12A et G/26/2 et *Lb. helveticus* HY7801 inhibe la croissance de *C. albicans* par oxydation des lipides membranaires et des protéines cellulaires (**Blagojev et al., 2012**).

III.3.3. Les bactériocines

Les composés protéiques antifongiques ont pour caractéristiques d'être des peptides de faibles poids moléculaire (environ 3 à 4 kDa) et même de poids moléculaire élevé (environ 43 kDa) ; sensibles aux enzymes protéolytiques telles que la protéinase K et la trypsine ; stables ou non stable à la chaleur et au stockage, actifs en présence de l'acide lactique non dissocié à pH 3 et 6, d'autres actifs à pH 11 (**Ahmed rather et al., 2013**).

Le mode d'action n'a pas encore été bien recherché. (**Okkers et al., 1999**).

III.3.4. Les dipeptides cycliques

Beaucoup de dipeptides cycliques, qui sont des composés intermédiaires dans la production de peptides non ribosomiques présentent des activités antifongiques. Ils ne sont cependant actifs qu'à des concentrations de l'ordre du mg/ml. La concentration minimale inhibitrice de cyclo (L-Phe-L-Pro) contre *A. fumigatus* et *P. roqueforti* est égale à 20 mg/ml, par contre la CMI est réduite à 10 mg/ml lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'acide phényllactique (**Ström et al., 2002**).

III.3.5. La reutérine

La reutérine obtenu d'une culture de *Lb. reuteri* ATCC 53608 et qui inhibe la levure *S. cerevisiae* a été purifiée en 1994, mais les premières preuves de l'activité antifongique de cette molécule ont été enregistrées en 1989 (**Dobrogosz et Lindgren, 1994**).

III.3.6. Le diacétyl

Cette molécule est un composé aromatique associé au goût du beurre (**Karimi et al., 2012 ; Schnürer et Magnusson, 2005 ; Smit et al., 2005**). Son activité antifongique a été démontrée chez *Lb. paralimentarius* PB127 par **Garofalo et al., 2012**).

III.4. Les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines

Les mycotoxines sont très stables, et difficiles à éliminer, capables de provoquer des maladies chez les plantes, les animaux et les humains. Ces substances coûtent annuellement des millions de dollars au niveau mondial pour la santé humaine, animale et les produits agricoles contaminés (**Chapeland-Leclerc et al., 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005**). Certaines bactéries lactiques, et majoritairement des espèces du genre *Lactobacillus*, ont été signalées à inhiber la production de mycotoxines (**Haskard et al., 2001; Gourama et Bullerman, 1995 ; Luchese et Harrigan, 1990**).

L'inhibition de la synthèse se fait par l'intermédiaire de composés de faible poids moléculaire, supposés protéiques, relâchés après lyse cellulaire ou pendant la croissance, sensibles à certaines enzymes protéolytiques et à haute température (**Gourama, 1991 ;Coallier-Ascah et Idziak, 1985**).

Quelques dipeptides cycliques aussi pourraient intervenir dans ce mécanisme (**Ström, 2005**). Plusieurs bactéries lactiques ont été jugées capables de se lier les mycotoxines, la liaison semble se faire au niveau du peptidoglycane et des polysaccharides de la paroi cellulaire (**Dalié et al., 2010 ;Haskard et al., 2001**).

Il appert que, les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines ont plusieurs origines possibles : la stimulation ou l'inhibition de la synthèse des mycotoxines, ou bien encore la dégradation ou la liaison des mycotoxines.

III.5. Facteurs affectant la production et l'activité des substances antifongiques

Les composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ne présentent une activité optimale que sous certaines conditions. Notamment, leur activité antifongique dépend de la température et du pH (**Rouse et al., 2008**). De même, leur production dépend du milieu de culture et de la phase de croissance (**Dalié et al., 2010**).

Batish et al. (1990) ont constaté que l'activité antifongique de *Lb. acidophilus* est maximale dans le milieu Elliker par rapport au M17 et MRS, et l'augmentation de la période d'incubation a entraîné une baisse dans l'activité antifongique. **Sathe et al. (2007)** ont démontré que l'activité antifongique de *Lb. plantarum* CUK501 est maximale à 30°C, lorsque la culture est à la fin de la phase logarithmique.

D'après **Black et al. (2013)**, l'inhibition fongique par des acides gras hydroxylés produits par *Lb. hammesii* DSM16381 augmente en présence des acides dont la longueur de la chaîne carbonique est plus longue. L'acétate de sodium présent dans le milieu MRS participe en synergie avec les acides organiques produits par les bactéries lactiques et augmente l'effet inhibiteur (**Schnuürer et Magnusson, 2005**).

En outre, certains genres et espèces semblent plus actifs que d'autres, *Lactobacillus plantarum* est le plus actif, et l'inhibition des levures généralement est difficile par rapport à l'inhibition des moisissures, de même, la germination des conidies est la phase de croissance la plus sensible à l'inhibition et la différence de sensibilité observée entre les espèces des moisissures peut être liée à leur capacité à changer le métabolisme cellulaire en réponse à des conditions de stress. La matrice alimentaire où on souhaite implanter les bactéries lactiques en tant que culture préservatrice et les cibles fongiques contre lesquelles on désire lutter vont influencer l'activité des souches, car chaque matrice est définie par un ensemble de paramètres physico-chimiques (**Gupta et Srivastava, 2014**).

Chapitre IV

Matériels et méthodes

IV.1.Lieu de travail

Ce travail a été réalisé dans sa totalité au laboratoire pédagogique du département de biologie à l'université AMAR THELIDJI – Laghouat- .

IV.2.Matériel biologique

IV.2.1. Les souches bactériennes

Les bactéries lactiques utilisées dans cette étude font partie de la collection personnelle de Mr : KRANTAR Kamel, encadreur de ce travail.

Elles ont été isolées à partir d'un complément alimentaire probiotique (Ultrabiotique, Nutrisanté Laboratoires) (Notice voir Annexe 01) ; et ont été identifiées grâce à leur profil fermentaire en utilisant les galeries API 50CHL. Les caractéristiques et l'origine de ces souches lactiques sont représentées dans le tableau 02.

Tableau 02 : Caractéristiques et origines des souches de bactéries lactiques utilisées dans ce travail.

Les souches lactiques	Code	Origine	Type respiratoire	Température optimale
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB 01	<i>Ultrabiotique</i>	Anaérobie	37°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LB 02	<i>Ultrabiotique</i>	Anaérobie	37°C

IV.2.2. les souches fongiques

Les souches fongiques représentés dans le tableau 03 ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique des bactéries lactiques, sont des souches de références fournit par Mr. KRANTAR Kamel.

Tableau 03 : Les différentes souches fongiques utilisées dans ce travail.

Les souches fongiques	codes	Références	Température	Milieu de cultrue	Mycotoxine produite
<i>Gibberella zeae (Fusarium graminearum)</i>	FG	CECT 2150	25°C	PDA	Zearalenanone
<i>Aspergillus ochraceus</i>	AO	NRRL 3174	25°C	PDA	OTA
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AP	CBS 100926	25°C	PDA	AFLs

IV.3. Milieux de culture :

Les bactéries lactiques ont été cultivées sur milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe) liquide et solide. Par contre le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) solide et semi solide (0,8% d'agar) a été utilisé pour la culture des souches fongiques.

La composition de ces milieux de culture est détaillée dans l'annexe 02

IV.4. Méthodes

IV.4.1. Revivification des souches et vérification de la pureté

A. Souches lactiques

Les souches lactiques *Lactobacillus plantarum* (LB 01), et *Lactobacillus acidophilus* (LB 02) ont été conservées à -20°C dans des tubes Eppendorf contenant du lait écrémé plus 30% de glycérol. Pour leur réactivation 50 µl de chaque tube Eppendorf ont étéensemencé dans 5ml de MRS liquide. L'incubation a été faite en anaérobiose à 37°C pour les deux souches LB 01 et LB 02 pendant 72 heures. Leur pureté a été vérifiée par observation microscopique à l'objectif x100 à immersion. L'authentification des souches a été réalisé par deux test : coloration du Gram et test de catalase (**Devoyod et Müller, 1969**).

Une culture mixte des deux souches LB01 et LB02 à été réalisé en ensemencant 50 ml de milieu MRS liquide avec 100 µl d'une culture de 16 heures de la souche LB01 et 100 µl d'une culture de 16 heures de la souche LB02, l'incubation a été faite à 37°C pendant 72 heures.

B. Souches fongiques

Les souches fongiques *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (FG), *Aspergillus ochraceus* (AO) et *Aspergillus parasiticus*(AP) ont été conservées dans le milieu PDA sous forme de gélose incliné à 4°C.

Pour vérifier leur pureté une observation au microscope optique (Objectif x 40) a été faite.

Les suspensions de spores nécessaires pour inoculer les milieux ont été préparées par ajout de 3 ml d'eau physiologique stérile contenant 0,05% de tween 80 dans les tubes de gélose incliné avec une agitation modérée. La concentration des spores de la solution mère obtenue a été déterminée par comptage sur cellule de Thoma puis est ajustée à 10⁶spores / ml. La suspension de spores a été conservée à 4°C.

IV.4.2. La mise en évidence de l'activité antifongique

L'activité antifongique des bactéries lactiques a été étudiée par des méthodes qualitatives et quantitatives.

IV.4.2.1. Test qualitatif : méthode de spots

Pour la recherche de l'activité antifongique des souches lactiques, la méthode de doubles couches ou de recouvrement décrite par (**Magnusson et Schnurer, 2001**) a été utilisée avec quelques modifications (figure 05). Les souches lactiques (LB01 et LB02) ainsi qu'une culture mixte des deux souches LB01 et LB02 ont été d'abord ensemencés en spots de 6 mm de diamètres sur milieu MRS Agar préalablement coulés dans des boîtes de Pétri puis ont été incubés à 37°C en aérobiose pendant 48 heures.

Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes avec 10 ml de milieu PDA (0,8 % d'agar) contenant 10⁶spores/ml de souches fongiques (FG, AO et AP).

Après 72 heures d'incubation à 25°C, les zones d'inhibitions autour de chaque spot de bactéries ont été calculées par la formule suivante :

$$\% \text{ ZI} = (\text{surface de la ZI} / \text{surface de la boîte}) \times 100$$

L'évaluation des pourcentages de ces zones d'inhibition se fait selon les critères suivants :

- (-) : absence de zone d'inhibition autour de chaque strie
- (+) : zone d'inhibition par strie comprise entre 0,1 à 3% de la surface des boîtes de Pétri
- (++) : zone d'inhibition par strie comprise entre 3 à 8 % de la surface des boîtes de Pétri
- (+++): zone d'inhibition par strie supérieur à 8% de la surface des boîtes de Pétri.

(Magnusson et Schnurer, 2001).

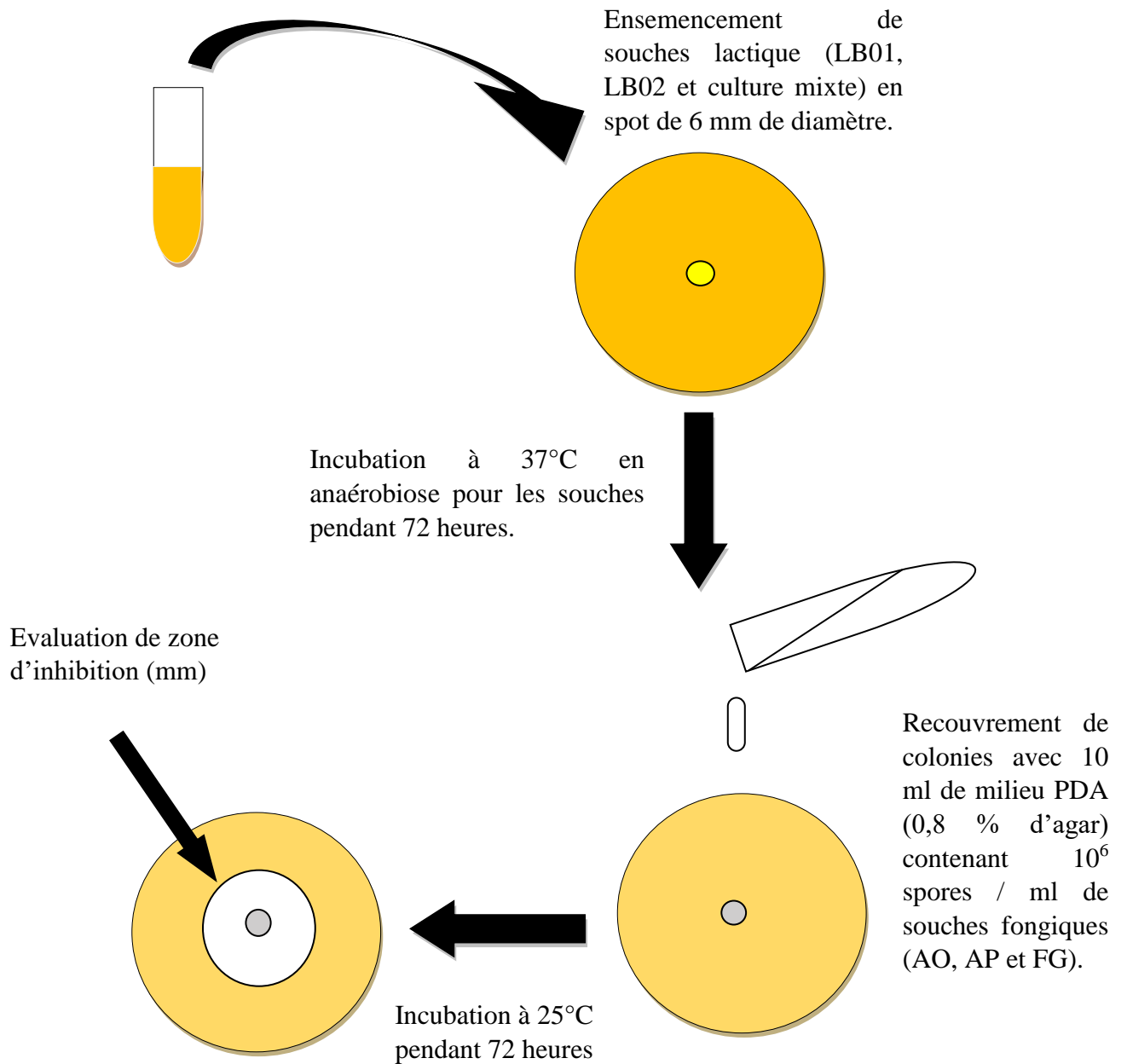


Figure 05 : Schéma représente les étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des stries (test qualitatif).

IV.4.2.2. Mesure de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires

A. La méthode de l'inhibition de croissance radiale : test qualitatif

La méthode utilisée est celle décrite par (Cabo *et al.*, 2000) avec quelques modifications. 1% (v/v) de chaque souche lactique d'une culture en milieu liquide de 16 heures a été inoculé dans 50 ml de milieux MRS bouillon contenu dans des Erlenmeyers de 250 ml. Les cultures des souches lactiques LB 01 et LB 02 ainsi qu'une culture mixte des deux souches LB01 et LB02 ont été incubés à 37°C en anaérobiose pendant 72 heures. Puis les 50 ml de milieu de chaque culture ont été prélevés et centrifugés à 4000 rpm pendant 20 minutes et les surnageants ont été conservés à 4°C.

3 ml du surnageant ont été prélevés chaque culture lactique et mélangés avec 15 ml de milieu PDA (0,8% d'agar). Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3 µl de suspension de spores (10⁶ spores/ml) ont été déposés à la surface du milieu sur un disque de 6 mm puis l'ensemble a été incubé à 25°C pendant 7 jours.

Le diamètre de la colonie fongique obtenue a été comparé à celui du témoin dans lequel le surnageant a été remplacé par de milieu MRS liquide stérile.

L'activité antifongique est exprimée en termes d'inhibition de la croissance de colonie comme suite :

$$\text{Inhibition (I) ou activité antifongique(A.A.F)} = 100 \times [1 - D_E / D_T]$$

D_E : diamètre de la colonie fongique dans l'échantillon

D_T : diamètre de la colonie fongique dans le témoin (figure 06)

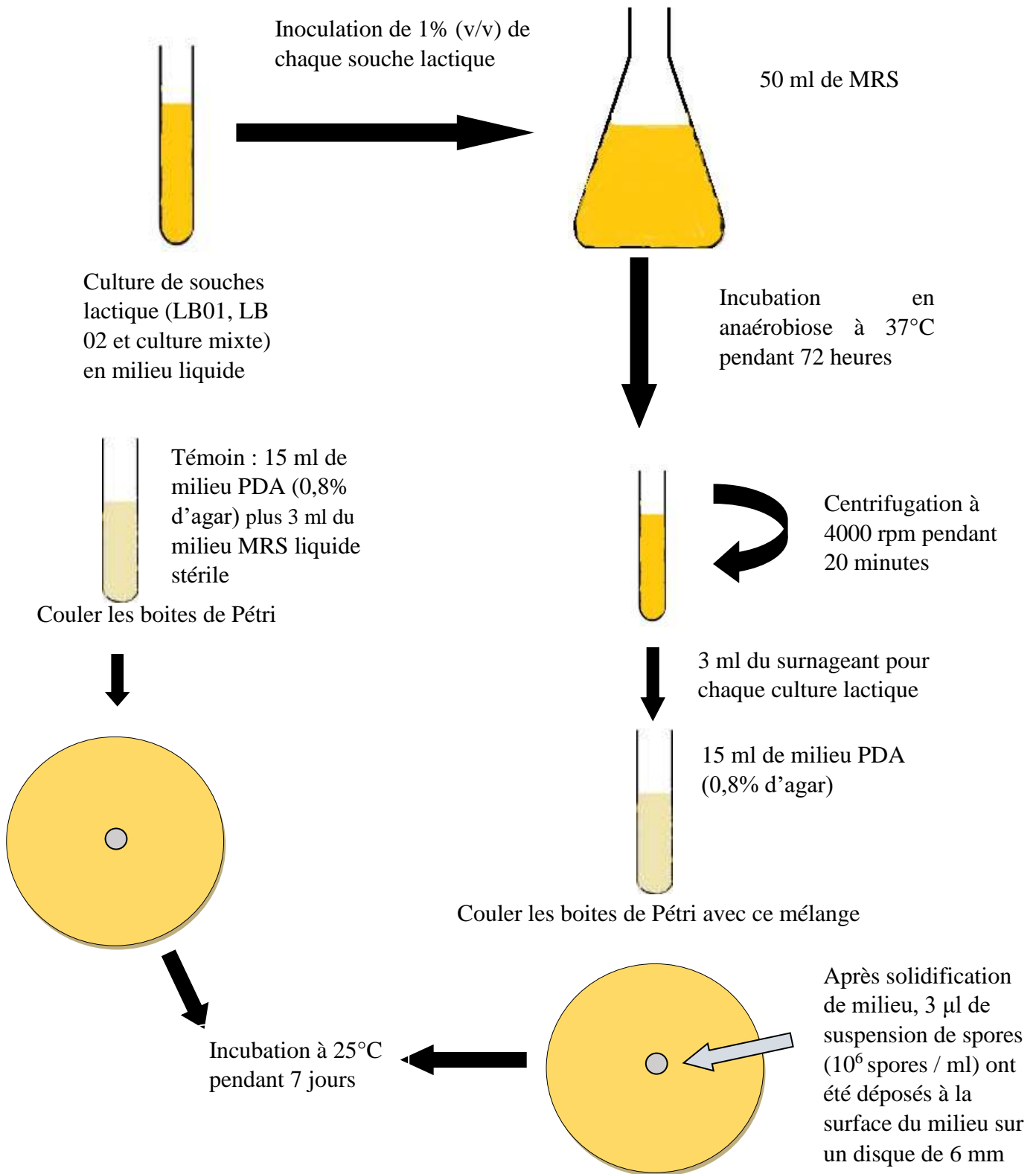


Figure 06 : Schéma représente les étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode de l'inhibition de croissance radiale (test qualitatif).

Chapitre V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

V.1. Résultats et interprétations

V.1. 1. Authenticité et pureté des souches.

A-Souches lactiques

Après 48 heures d'incubation à 37°C des deux souches lactiques la pureté a été vérifiée par la coloration de Gram et le test de catalase :

L'observation microscopique nous a permis d'authentifier les souches lactiques utilisées dans notre étude. Les souches LB01 et LB02 sont des bacilles à Gram positif, de forme allongés en chaînette plus ou moins longue caractéristique du genre *Lactobacillus* (figure 7)

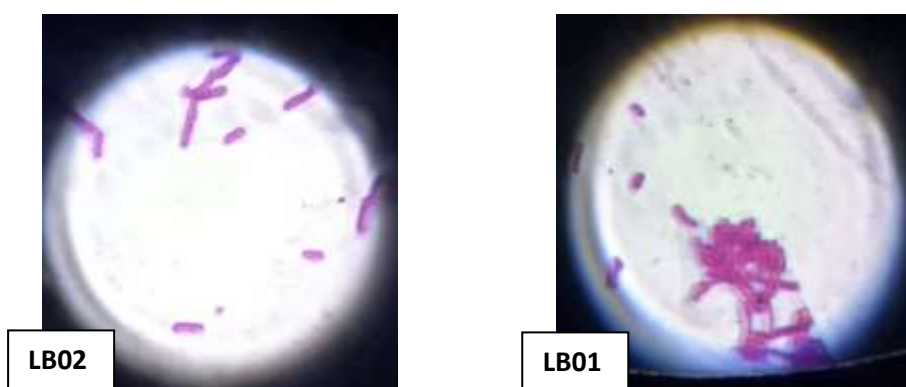


Figure 7 : Photos d'observation par microscope optique des cellules des bactéries lactiques après coloration de Gram (Objectif x100 à immersion) *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02)

L'absence d'effervescence et de dégagement de gaz dans ce test pour toutes les souches lactiques est interprétée par l'absence de catalase chez ces bactéries, donc se sont des catalase négative conformément au caractère des bactéries lactiques.

B. Souches fongiques

L'observation macroscopique des colonies fongiques et l'observation microscopique (Objectif x40) des prélèvements effectués par la méthode de scotch confirment la pureté des souches fongiques utilisées dans cette étude (figure 8 et 9).

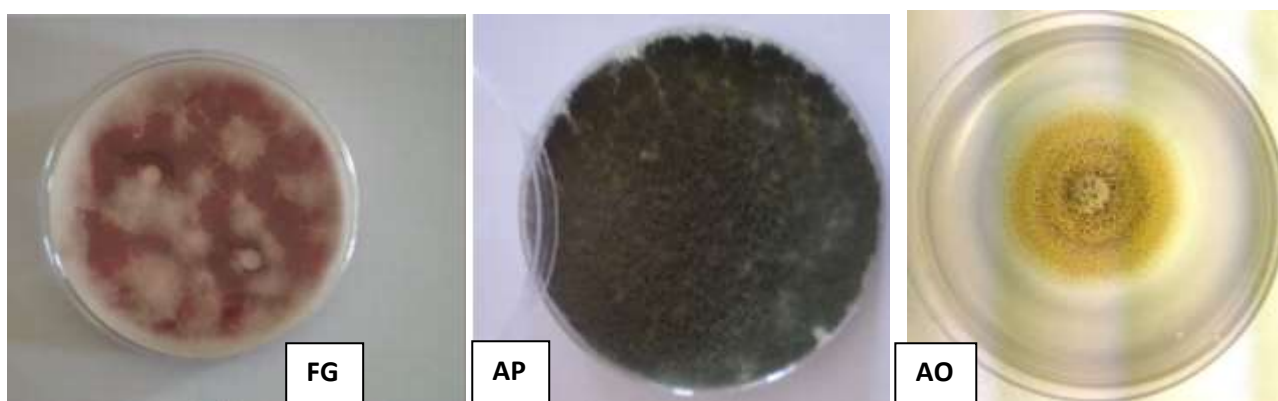


Figure 08: Photos d'observation macroscopique de l'aspect des cultures pures des souches fongiques sur milieu PDA. *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (FG), *Aspergillus ochraceus* (AO) et *Aspergillus parasiticus* (AP)



Figure 09 : Photos d'observation microscopique de souches fongiques sous microscope optique (Objectif x40) *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (FG), *Aspergillus ochraceus* (AO) et *Aspergillus parasiticus* (AP)

V.1.2. La mise en évidence de l'activité antifongique

V.1.2.1. Test qualitatif : méthode des spots.

La potentialité des bactéries lactiques à inhiber la croissance des souches fongiques a été définie comme une activité *antifongique*. La recherche de cette activité comme celle de tout antagonisme microbien peut être fortement influencée par les méthodes de criblage utilisées. Ce faisant, cette recherche doit se faire *via* des techniques simples, rapides, fiables et surtout efficaces. Notre choix s'est donc porté sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de (Magnusson et al., 2003) qui nous a permis de faire une première sélection des souches lactiques antifongiques.

L'activité antifongique des bactéries lactiques, a été évaluée par une méthode qualitative, qui a révélé une activité inhibitrice chez les deux souches lactiques vis-à-vis des trois souches fongiques testées. Les souches LB01 et LB02 en culture pure et en culture mixte se sont

distinguées par des zones d'inhibitions représentant respectivement 18%, 15% et 22 % de la surface totale de la boîte inoculée par la souche *Fusarium graminearum* (FG). Les résultats sont représentés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Résultats de l'estimation de l'activité antifongique des bactéries lactiques par la méthode qualitative des spots.

	LB01	LB02	Culture mixte
AP	07%	5%	08%
FG	18%	16%	22%
AO	10%	8%	12%

Lactobacillus plantarum (LB01) ; *Lactobacillus acidophilus* (LB02) ; *Fusarium graminearum* (FG) ; *Aspergillus ochraceus* (AO) ; *Aspergillus parasiticus* (AP).

A partir de ces résultats on constate que la souche *Fusarium graminearum* (FG) est la souche la plus sensible à l'activité des bactéries lactiques en culture pure et mixte et que la culture mixte des souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* est la plus performante. Donc à l'issue de ce test *Fusarium graminearum* (FG) a été retenue comme souche indicatrice et la culture mixte comme le mode inhibiteur le plus performant.

V.1.2.2. Mesure de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires

Nos résultats suggèrent que l'activité antifongique des deux souches lactiques *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* est liée à la production de métabolites antifongiques extracellulaires ; qui ont une activité élevée quand ils sont produits lors d'une culture mixte.

A. La méthode de l'inhibition de croissance radiale : test quantitatif

Les tests antérieurs, étaient basés sur un essai qui mesurait l'effet antifongique des bactéries lactiques sur la germination des spores des souches fongiques testées. Aussi, afin de connaître l'influence des souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* sur le développement du mycélium de la souche indicatrice FG, on a examiné l'impact des entités inhibitrices extracellulaires produites par les bactéries lactiques (dans les conditions optimales de culture précédemment définies) sur la croissance radiale du mycélium de la souche FG pendant 7 jours. Dans les cultures témoins, le surnageant de culture des souches lactiques, contenant les entités inhibitrices a été remplacé par de l'eau distillée stérile.

Les résultats repris dans la Figure 10 et 11 démontrent que les entités extracellulaires produites par les souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* en culture pure et mixte ont la capacité de retarder significativement le développement radial du mycélium de la souche *Fusarium graminearum* indiquant que les entités produites par les souches lactiques testées possèdent une action antifongique. *Fusarium graminearum* apparaît de loin la souche la plus sensible à l'action de ces composés bioactifs.

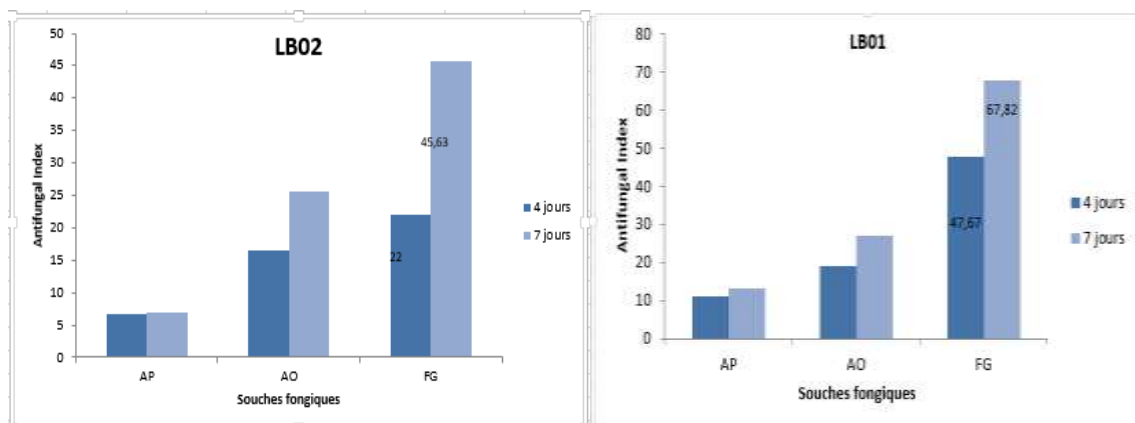


Figure 10 : Résultats de l'activité antifongique des souches *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) sur la croissance radiale du mycélium des souches *Fusarium graminearum* (FG) ; *Aspergillus ochraceus* (AO) ; *Aspergillus parasiticus* (AP).

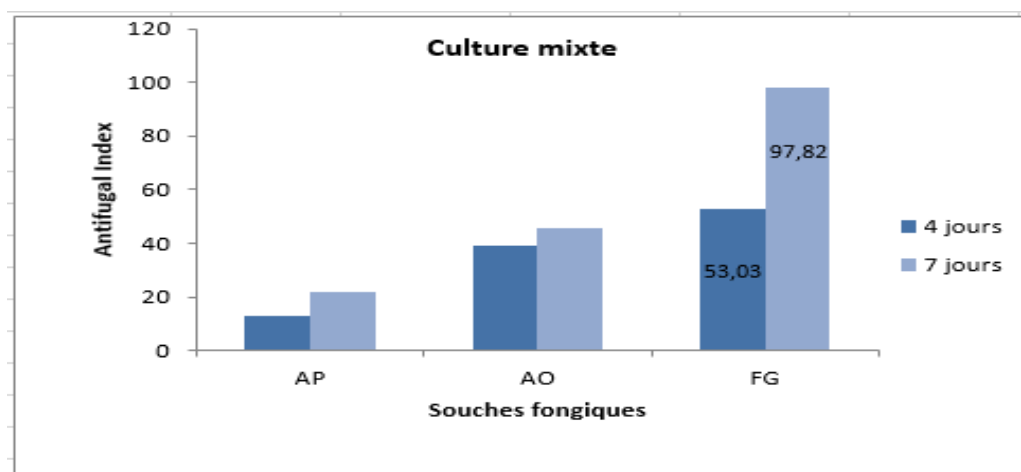


Figure 11 : Résultats de l'activité antifongique des souches *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) en culture mixte sur la croissance radiale du mycélium des souches *Fusarium graminearum* (FG) ; *Aspergillus ochraceus* (AO) ; *Aspergillus parasiticus* (AP).

Les résultats présentés dans la figure 10 et 11 démontrent que les deux souches lactiques *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02), sont capables de produire des composés bioactifs après 72 heures de culture puisque les surnageants de culture inhibent le développement de la souche indicatrice *Fusarium graminearum* (FG). La culture mixte des deux souches LB01 et LB02 produit plus de composés bioactifs que lors des cultures pure de chaque souche, l'index de l'activité antifongique contre *Fusarium graminearum* à presque atteint 100%. Par contre la souche *Lactobacillus acidophilus* (LB02) en culture pure a une efficacité intermédiaire.

Ces résultats confirment nos premières observations concernant les potentialités de ces souches lactiques à développer une activité antagoniste importante et significative contre la souche *Fusarium graminearum* (FG).

On remarque aussi que la souche fongique *Aspergillus parasiticus* demeure la plus résistante aux composés bioactifs produits par les souches lactiques LB01 et LB02 en culture pure ou en culture mixte.

V.2. Discussion

Ce travail se proposait de prévenir la croissance de certains champignons toxigènes du genre *Fusarium* et *Aspergillus* producteurs avérés de mycotoxines dans les denrées alimentaires par l'utilisation de l'antagonisme microbien généré par certains microorganismes. Notre choix s'est porté sur les bactéries lactiques dont leur activité antibactérienne et leur innocuité sont largement décrites. Les bactéries lactiques sont des probiotiques qui ont la capacité de produire des métabolites qui empêchent la croissance des flores non lactiques dont certains sont pathogènes ou préjudiciables à la qualité des aliments (agent de détérioration) (**Desmazeaud, 1992**).

Les enjeux de ces travaux étaient d'explorer la capacité des souches lactiques autochtones d'une variété de produits laitiers traditionnels locaux à inhiber la croissance de *Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus*, et *Aspergillus parasiticus* producteurs majeurs de mycotoxines (Zearalenone, OTA, AFLs, Patuline) sur les céréales et dans les produits laitiers, de caractériser les composés bioactifs susceptibles d'être produits.

Les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques ont dans certains cas été bien étudié, en particulier concernant l'effet antibactérien sous la forme de bactériocines (**Collado et al., 2005 ; Cakamoto et al., 2001 ; Armuzzi et al., 2001 ; Conducci et al., 2000 et Cocconier et al., 1998**) qui ont montrés l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les espèces pathogènes. Cependant, il ya relativement peu de rapports sur l'activité antifongique des bactéries lactiques.

Des bactéries lactiques démontrant une activité antifongique ont pourtant été isolées de plusieurs produits végétaux prêts à l'emploi tels que les tomates, les choux et les chicorés (**Vaughan et al., 1994**). Dans Leurs travaux de **Magnusson et schnurer (2001)** et **Magnusson et al. (2003)** ont décrit une souche *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* avec un large spectre d'inhibition contre les moisissures et les levures. Ces études sont essentielles pour une meilleure utilisation de ces souches lactiques comme agents de bioprotection. Le choix des bactéries lactiques comme agent bioprotecteur vient du fait de leur adaptabilité à différents biotopes (**Dalie et al., 2012**).

Récemment **Rouse et al. (2008)** ont isolé des bactéries lactiques à partir de matériel végétal, corroborant les travaux antérieurs entrepris par **Magnusson et al. (2003)**. Les bactéries lactiques présentant des activités antifongiques ont été également isolées d'autres systèmes biologiques tels que les ensilages (**Magnusson et Schnürer, 2001**), le lait cru et les saucissons (**Schwenninger et al., 2005**). Les bactéries lactiques sont depuis des décennies utilisées pour réaliser la fermentation des produits et assurer leur conservation, elles ont de ce fait acquis le statut **GRAS** (Generally Recognized As Safe).

Notre étude a démontré que la flore lactique d'un produits pharmaceutique commercialisé en Algérie comme complément alimentaire probiotique contient des bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus*) en plus de deux souches du genre *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium lactis*) qu'on n'a pas réussi à isoler dans ce travail ; présentant un grand potentiel d'inhibition de la croissance des moisissures ciblées (*Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus parasiticus*).

Les deux souches lactiques LB01 et LB02 possèdent un potentiel élevé et surtout quand ils sont en culture mixte. Les substances bioactifs de ces souches lactiques retardent la croissance radiale de la souche *Fusarium graminearum* de 53,03 % après 4 jours d'incubation pour la souche LB01 et 97,82% d'inhibition après 7 jours d'incubation et de 45,83% sur la croissance radiale d'*Aspergillus parasiticus* après 7 jours d'incubation. *Fusarium graminearum* est une souche très sensible aux métabolites secondaires, que se soit ceux des bactéries lactiques ou d'actinomycètes ou même d'huiles essentielles comme le confirme les travaux réalisés lors de projets de fin d'études précédents encadrer par les enseignants du département **Gouzi, H ; Gacem, M.A ; Krantar, K.**

Cependant, la souche *Aspergillus parasiticus* à montrer une résistance à l'activité antifongique des bactéries lactiques testées dans ce travail, ce qui confirme les résultats des travaux précédents réalisées dans notre département lors des projets de fin d'études de Master ou d'ingénieur, que ce soit sur l'activité des huiles essentielles ou de métabolites secondaires d'actinomycètes ou de d'autres souches lactiques (**Gouzi, H ; Gacem, M.A ; Krantar, K.**).

Cet effet fongistatique a été le résultat de l'activité de certains métabolites extracellulaires des bactéries lactiques car le test de la germination des spores fongiques la souche *Fusarium graminearum* dans les surnageants des souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* a montré une inhibition totale de la croissance des spores sur ces surnageants qui peut être due à une forte production d'acides organiques, sachant que les deux souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* ont un grand pouvoir acidophile.

Cette hypothèse est dans la continuité des conclusions de certains auteurs (**Schillinger et Villareal, 2010 ; Gerez et al., 2009 et Cabo et al., 2001**). La souche de *Fusarium graminearum* potentiellement productrices de zearalenone était de loin la plus sensible à cet agent bactérien.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La présente étude montre que les bactéries lactiques isolées à partir de différents produits laitiers peuvent présenter une activité antifongique contre un certain nombre de moisissures d'altération commune. L'activité inhibitrice est causée par plusieurs composés différents.

Les résultats obtenus, ont montrés qu'il y a une activité inhibitrice chez toutes les souches lactiques vis à vis de toutes les souches fongiques testées.

Les résultats de l'inhibition de la croissance radiale du mycélium des souches fongiques par les surnageants des souches lactiques testées ont montrés que *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) en culture pure retardent respectivement, la croissance radiale de la souche *Fusarium graminearum* (FG) de 67,82% et de 45,63% et le meilleur résultat a été obtenu avec la culture mixte des souches *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) avec une inhibition de la croissance radiale de *Fusarium graminearum* (FG) de 97,82%.

La conclusion générale qui se dégage de cette étude est que la microflore indigène du des produits laitiers contient des bactéries lactiques, appartenant au genre *Lactobacillus*, utilisées comme probiotiques dans des compléments alimentaires est capable d'inhiber la croissance des champignons toxigènes en l'occurrence celles productrices de zearalenone et Aflatoxines via la synthèse de plusieurs métabolites inhibiteurs de type métabolite secondaire.

Ces observations ouvrent des perspectives nouvelles de recherches, comme l'utilisation potentielle de des souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* comme adjuvant des produits alimentaires fermentés. En diminuant rapidement le pH, empêchant ainsi la croissance des moisissures indésirables, ces bactéries lactiques pourraient favoriser l'amélioration de la qualité et constituer un très bon inoculum commercial.

Ainsi, connaissant les conditions optimales de cultures en fioles, il serait intéressant d'optimiser la production de ces métabolites par l'utilisation des bioréacteurs *via* les cultures de type batch, fed-batch ou en continu. Ceci permettra de poursuivre la purification et la caractérisation de ces molécules. Une fois purifiées, l'effet de ces entités pourra être précisé sur la croissance fongique et la production de mycotoxines en condition réelle dans des essais pilotes.

Références bibliographiques

A

Aguillar F, Hussain SP et Cerutti P. 1993. Aflatoxin B1 induces the tranversion of G--T in codon 249 of the p 53 tumour suppresser in human hepatocyte. *Proc Nat Acad Sci* , 90: 8586-8590.

Ammor S. 2004. Ecosystème Microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. *Thèse de Docteur en physicochimie et qualité des bioproduits*. Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé. Université de Rennes 1.

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

B

Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F. et Obert J.P. 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 661-765.

Bekal S, Jozef V. B, Bart S, Dominique G, Samia H, Divies C, et Prevost F. 1988. Purification of *Leuconostoc mesenteroides* Citrate lyase and cloning and caractérisation of the cit CDEFG gene cluster . *J. Bacteriol.* 180 : 647 - 654 .

Benthin S. et Villadsen J. 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 647-654.

Berthier, J. et Valla G 2001. Moisissures-Mycotoxines et aliments : du risque à la prévention. Université Claude Bernard Lyon I
<http://handy.univlyon1.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.

Bhatnagar D, Yu J et Ehrlich K. C. 2002. Toxins of filamentous fungi. *Chemi and Immunol*, 81, 167-206

Boiron P. 1996. Organisation et biologie des champignons. *Nathan*. Paris. P. 19-79.

Bouraima Y, Ayi-Fanou L, Kora I, Sanni A, Creppy E E. 1993. Mise evidence la contamination des cereals par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Benin. In Creppy, EE., Castegnaro, M., Dirheimer (Eds). Human ochratoxicosis and its pathologies. 231, 101-110.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. 1999. Moisissures utiles et nuisibles. *Importance industrielle*. Masson. Paris. P. 12-426.

Bottazzi V. et Dellaglio F. 1967. Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.

Bourgeois C.M, Mescle J.F, Zucca J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier*. Paris. P. 216-244.

Byczkowski J et Gessner T. 1988. Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.* 20: 569-580.

C

Cabo M. L, Murado. M. A, Gonzalez, M. P, Pastoriza, L. 2000. Dose-response relationships. A model for describing interactions, and its application to the combined effect of nisin and lactic acid on *Leuconostoc mesenteroides*. *J App Microbiol* 88, 756-763.

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

Cahagnier B, Dragaci S, Frayssinet C, Frémy J.M, Hennebert G.L, Lesage - meessen L, Multon J.L, Richard-Molard D, Roquebert M.F. 1998. Moisissures des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec&Doc. France*.

Cairns-Fuller V, Aldred D, Magan N. 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain.

Chen C.N, Weng M. S, Wu C. L et Lin J. K. 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources, *Evid. Based Complement Alternat. Med. J.*, 1, 175-185.

Cogan T.M. et Hill C. 1993. Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, Second Edition, *Chapman and Hall, London*, pp. 193-255.

Cogan, T.M. 1987. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* ssp. Effects on growth substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 551-558.

Cogan T.M. 1986. The leuconostocs: Milk products. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods*, *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 25-40.

Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269- 280.

D

D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C 1997. Mycotoxins. *Animal Feed ScienceTechnology*, 69, 155-166.

Dalie D, Pinson-Gadais L, Atanasova-penichon V, Marchegay G, Barreau A, Deschamps A, Richard-Forget F. 2012. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food control*. 23: 405-411.

Davidson P.M., Post L.S., Braner A.L. et Mc Curdy A.R. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Foods*. eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. *Marcel Dekker Inc.*, New York. pp. 385-392.

Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. *INRA*. Paris. P. 52-57
Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. et Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.

Desmazeaud M., 1992. Les bactéries lactiques In : les groupes microbiens d'intérêt laitier.

Devoyod J. J, Muller M. 1969. La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Le Lait*, 487, 369.

Divies C. 1991. Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques. *Actes du colloque LACTIC . 91* : 103 - 119.

Dortu C. et 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.

Drouault S. et Corthier G. 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32: 101-117.

E

Earnshaw R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. ed. *Wood B.J.B. Elsevier Appl. Sci.* London and New York. pp. 211-232.

Eklund T. 1989. Organic acids and esters. In: *Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, Elsevier Appl Sci* London, pp. 161-200.

F

Fox P.F. , Lane C.N. 2000. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy. J.* 5: 720-730.

Frazier W.C. 1967. Food microbiology. *Academic press.* London. P. 3-429.

G

Gacem, M.A. “ l'ensemble des mémoires encadrer au département de biologie, faculté des sciences, université de Laghouat“

Gerez, C. L, Torino, M. I, Rollan, G, et de Valdez F.G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* **20**, 144-148.

Gill A.O. et 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.

Gould G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. eds.

Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York. pp. 461-483.

Gouzi, H. “ l’ensemble des mémoires encadrer au département de biologie, faculté des sciences, université de Laghouat“

Guarro J, Gené J. et Stchigel A.M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinic and Microbiol Review*, **12** (3), 454–500.

Guessas B, Hadadji M, Saidi N. et Kihal M. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* **32**: 3, 304-312.

Guiraud J.P. et Rosec J.P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237- 251.

Guiraud J. 2003. Microbiologie alimentaire. *Techniques d'analyse microbiologiques*. Ed, Dunod, Paris, 2003, 651 p.

Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. *Dunod*. Paris. P. 7-330.

H

Haddie J.M. 1986. Other streptococci. *In* : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). **1** : 1070.

Hammes, W. P. & Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science* **49**, S125-S138.

Hassan A.N. et Frank J.F. 2001. Starter Cultures and their use. *In*: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed.*, Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

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.

Hinrikson H.P, Hurst S.F, De Aguirre L., Morrison C.J. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, **43** (1), 129-137

Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Saf and Proces Techno*134-142.

Hotchkiss J.H., Chen J.H. et Lawless H.T. 1999. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* **82**: 690- 695.

J

Jay M.J. 1992. Modern Microbiology, *Van Nostrand Reinhold*, *4th ed.*, New York. 371 409.

Juillard, V., Foucaud, C., Desmazaud, M.J et Richard, J. 1996. Utilisation des sources d’azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Le lait* . **76** : 13 – 24.

K

Khalid N.M. et Marth E.H. 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.

Klaenhammer T. R, Barrangou R, Buck B. L, Azcarate-Peril M. A et Altermann E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.

Krantar, K. “ l’ensemble des mémoires encadrer au département de biologie, faculté des sciences, université de Laghouat“

Kulshrestha D.C. et Marth E.H. 1974. Inhibition of bacteria by some volatile and nonvolatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37: 510-516.

Kurtzman CD, Horn BW et Hesseltine CW. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 174-158.

L

Lacey J. 1989. Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. Mycotoxins and - phycotoxins 88. *Elsevier*, Amsterdam, pp 161–168.

Lane, C.N et Fox. P.F. 1996. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy*, J 6: 715-728.

Langseth, W., Hoie, R., Gullord, M. 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, section B: Soil and Plant Science*, , 45, 63-67.

Larpent S. P. 1997. Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Ed. *Tech et Doc*, *Lavoisier*, Paris.

Law, J., et Haandrikman, A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.

Le Bars J, Le Bars P. 1998. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing, *Rev. Med. Vet.*, 149, 493-500.

Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445.

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 et 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.

Leveau S. B. & Bouix M. 1993. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.

Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.

M

Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J. et Schnürer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Let.* 219: 129-135.

Magnusson J. et Schnürer J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.

Mitchell D, Parra R, Aldred D. et Magan N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Appl Microbiol.* **97**, 439–445.

N

Northolt M. D. et Bullerman L .B. 1982. Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Foo Protec*, 45, 519–26.

O

Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York*. 375–395.

P

Penaud. S. 2006. Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842 . *thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon*, 267p.

Perry J. J, Staley J. T et S. Lory. 2004. *Microbiologie. Dunod. France.*

Peterson S.W. .2006. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Euopenicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.

Pfohl-leszkowicz A. 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. *Lavoisier, Paris*, pp. 478.

Piard J.C. et Desmazeand M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.

- Pilet M.F, Magras C, Federigh M. 2005.** Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., *Economica. Paris.* 219-240.
- Pitt J.I., Basílico J.C., Abarca M.L et Lopez C. 2000.** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, **38**, 41–46.
- Pitt J.I., Hocking, A.D. 1997.** Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic and Professionnal, London*
- Pitt et Miscamble .1995.** Resistance of Candidaspecies to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect* ; Pp: 73- 85
- Podolak P.K, Zayas J.F, Kastner C.L. et Fung D.Y.C. 1996.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Fo Prot.* 59: 370-373.
- Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.
- Punt P. J, Van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J. & Van den Hondel C. 2002.** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* **20** (5): 200-206.

R

- Rajaram G., Manivasagan P., Gunasekaran U., Ramesh S., Ashokkumar S.,** Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties. *Afr. J. Pharmacy and Pharmacol.* 4(12) : p. 895-902.
- Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. et Cornwell P.E. 1984.** Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
- Riba A. (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie, *thèse de doctorat.*
- Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis J.P, Hanazawa R, Latgé J.P, Lortholary J, Makimura K, Morrison C.J, Murayama S.Y, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K et Yamaguchi H.1998.** *Molec Diag and Epidemiol of Fung Infec*, 36, 249–257.
- Rodgers S. 2003.** Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Fo Cont* 14, 35-42.
- Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D. 2008.** Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, *J. App Microbiol*, 104, 915-923.

S

- Sanz B, Selgas D, Parejo I. et Ordóñez J.A. 1988.** Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Fo Microbiol.* 6: 199-205.

- Schleifer K.H. 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* **46** : 201-203.
- Schmitt, P, Diviès, C et Merlot, C. 1990.** Utilization of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *crémoris* In continious culture . *Biotechnol. Let.* **12** (2) : 127 - 130 .
- Salminen S. Deighton M.A, Benno, Y et Gorbach, S.L. 1998.** Lactic acid bacteria in health and disease. In Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 2nd ed. Edited by Salminen SVWA, eds.; 1998:211–253.
- Schillinger U, Villarreal J. V. 2010.** Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Fo Cont.*
- Schwenninger S. M, Ah U. von Niederer B, Teuber M, et Meile, L. 2005.** Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J. Fo Protec* **68**, 111-119.
- Starenburg M. J. et hugenholtz T. C. 1991.** Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* . *Appl. Environm. Microbiol.* **12** : 3535 - 3540 .
- Stiles, M. E. et Holzapfel, W. H. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int Jou of FooMicrobiol* **36**, 1-29.

T

- Talarico T.L. et Dobrogosz W.J 1989.** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 674-679.
- Talarico T.L., Casas I.A., Chung T.C. et Dobrogosz W.J. 1988.** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agen Chemother.*
- Tamime A.Y. 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.,* New York. 261-366.
- Taniwaki M.H, Hocking A.D, Pitt J.I. et Fleet G.H. 2001.** Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *Intational J of Food Microbiol*, **68**, 125–133. *Uriage.* **1** : 239-290.
- Tantaoui-Elaraki A. 1977** Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. *Hom Ter et Eau* **6** (24) : 79-86.
- Thompson j., Gentry-weeks C.R. 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica*,
- Thompson, J.K et Collins, M.A. 1989.** Evidence for the conjugal transfer of a plasmid pVA797:pSA3 co-integrate into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**: 61-64.
- Topisirovic L., Milan K., Djordje F., Natasa G., Ivana S et Jelena L. 2006.** Potential of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food production and preservation. *Int Jou of Food Microbiol.* **112**: 230-235.

Troller J.A. 1980. Influence of a_w on micro-organisms in foods. *Food Techn*

V

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K et Swings J .1996. Polyphasic taxonom, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.

Vaughan E. E, Caplice, E, Looney R, O'Rourke N, Coveney H. Daly C. et Fitzgerald G. F.1994. Isolation from food sources, of lactic bacteria that produced antimicrobials. *J of App Bacteriol* 76, 118-123.

Vermeiren L, Devlieghere F. et Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 149-164.

W

Wagner M.K. et Moberg L.J. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol.* 1: 143-147.

Weidenbörner M. 1998. Lebensmittel-Mykologie B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.

Z

Zhennai, Y. 2000. Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. *Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61p.*

Annexes

Annexe 01 : Principales bactéries lactiques et leurs activités antifongiques vis-à-vis d'un certain nombre de champignons filamenteux selon Schnürer et Magnusson (2005).

LAB isolate ^a	Activity spectrum	Compound(s)
<i>Lactococcus lactis</i> C10	<i>Aspergillus parasiticus</i>	ND
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	<i>Aspergillus parasiticus</i>	ND
<i>L. lactis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	ND
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i>	Broad spectrum	King, Fowler, and Vandenberg (1986)
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i>	Broad spectrum	Vandenberg and King (1988)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Broad spectrum	3-HPA (reuterin)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unspecified spoilage mould	ND
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> DR1	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Possibly proteinaceous
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Possibly proteinaceous
<i>Lactobacillus acidophilus</i> R	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Batish, Lal, and Grover (1990)
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	ND
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconocstoc mesenteroides</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	ND
<i>L. plantarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND
<i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> LC-705	<i>Candida lusitanae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp.	ND
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Possibly proteinaceous
<i>L. casei</i>	<i>Penicillium</i> spp.	Possibly proteinaceous
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Possibly proteinaceous, < 1 kDa
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CB1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Monilia</i> spp.	Caproic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid
<i>L. plantarum</i> VTT E78076	<i>Fusarium avenaceum</i>	Benzoic acid, methylhydantoin, mevalonolactone, cyclo(Gly-t-Leu), Pentocin TV35b
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Candida albicans</i>	ND
<i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Penicillium expansum</i>	ND
<i>L. plantarum</i>	Broad spectrum	Phenyllactic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	Sodium acetate ^b
<i>L. plantarum</i> MiLAB 393	Broad spectrum	3-Phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Si3	Broad spectrum	Peptide, phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro), reuterin
<i>L. plantarum</i> MiLAB14	Broad spectrum	Hydroxy fatty acids, phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro), Cyclo(phe-OH-Pro)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MiLAB 24	Broad spectrum	
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> M3	<i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	proteinaceous

ND: not determines

^a Some species may have received new names trough taxonomic revision.

^b Sodium acetate from the MRS substrate was involved in the inhibitory action of lactic acid bacteria towards several moulds; the additional effect of other compounds was not determined.

Annexe 02 : Notice du complément alimentaire (Ultrabiotique, Nutrisanté laboratoires).

Ultrabiotique

Les Laboratoires Nutrisanté ont développé Ultrabiotique, un complexe de 4 souches de micro-organismes vivants: des lactobacilles et bifidobactéries (probiotiques).

Une flore intestinale équilibrée ou composée de « bonnes » bactéries est essentielle pour le bon fonctionnement immunitaire et digestif.

Cette flore, constituée de plusieurs milliards de micro-organismes vivants, colonise l'intestin et joue un rôle important au niveau de l'immunité en empêchant la prolifération de bactéries néfastes et en constituant une barrière de défenses naturelles de l'organisme.

Ultrabiotique est un **complexe de lactobacilles et bifidobactéries: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve***, qui apporte **8 milliards de probiotiques** pour 2 gélules.

Conseils d'utilisation:

- De 3 à 6 ans: 1 gélule par jour, ouvrir la gélule et mélanger le contenu avec une compote ou un yaourt.
- À partir de 6 ans: 2 gélules par jour, (1 le matin et 1 le soir au moment des repas).
- Cure de 8 jours à renouveler si nécessaire.

2 présentations d'Ultrabiotique sont disponibles:
 - 8 jours d'utilisation (16 gélules): ACL 7785228
 - 1 mois d'utilisation (30 gélules): ACL 4594002

ULTRABIOTIQUE PEUT ÊTRE CONSEILLÉ EN CAS:

- de prise d'antibiotiques qui altèrent la flore intestinale,
- d'hygiène alimentaire insatisfaisante,
- de transit perturbé,
- de troubles intestinaux en général,
- de stress répété (qui favorise l'irritabilité de l'intestin),
- de voyages à l'étranger.

IRB - Laboratoires Nutrisanté - 85612 Montaigu - FRANCE

Nutrisanté Renforcez votre nature.

Nutrisanté
Laboratoires

Créés en 1992, les Laboratoires Nutrisanté développent et produisent des compléments alimentaires d'une très haute technicité.

Pour ce faire, les chercheurs des Laboratoires Nutrisanté travaillent en partenariat avec les médecins et pharmaciens sur ce concept de la santé au naturel.

Ils développent des programmes d'études cliniques sur les actifs de ces produits afin de respecter l'homme dans sa globalité.

Leur approche nutritionnelle de la santé s'appuie donc sur des données scientifiques et cliniques des plus récentes.

Ainsi, la vocation des Laboratoires Nutrisanté est d'agir sur les déficits nutritionnels afin de préserver votre équilibre.

Les compléments alimentaires des Laboratoires Nutrisanté sont constitués majoritairement d'actifs d'origine naturelle participant pleinement au bien-être de l'homme et sont parfaitement tolérés par l'organisme.

Découvrez la gamme de produits des Laboratoires Nutrisanté présents dans les segments: des toniques (Force G), des défenses naturelles (Extrait de pépins de pamplemousse), de la ménopause (Manhaé), du capillaire (Nutricap), d'infusions biologiques, et bien d'autres sur www.nutrisante.fr

Tous nos produits sont présents en pharmacies et parapharmacies

Annexe 03 : Milieux de Culture

● **Milieu MRS (pH 6,5)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes :

Peptone 10g
Extrait de viande 10g
Extrait de levure 5g
Glucose 20g
Tween 80 1 ml
Phosphate bipotassique 2 g
Acétate de sodium trihydraté 5 g
Citrate d'ammonium 2 g
Sulfate de magnésium 0,2g
Sulfate de manganèse 0,05
Agar-agar 15g

● **Gélose PDA (pH 4,5)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes :

Infusion de pomme de terre 100g
Dextrose 20g
Agar-agar 15g
Eau distillée 1 l

● **Gélose PDA semi solide (pH 4,5)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes :

Infusion de pomme de terre 100g
Dextrose 20g
Agar-agar 08g
Eau distillée 1 l

Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum* LB01 et *Lactobacillus acidophilus* LB02 en culture pure et mixte.

Résumé

Les moisissures sont connues depuis longtemps par leurs effets nuisibles provoquant des altérations et des détériorations sur une large gamme de produits alimentaires. L'objectif de ce travail a été de tester l'activité antifongique de deux souches de bactéries lactiques provenant d'un complément alimentaire probiotique contre trois souches mycotoxigènes de références. Pour ce faire deux méthodes ont été appliquées afin de mettre en évidence l'activité antifongique à savoir la méthode des spots et la méthode d'inhibition de la croissance radiale. Les résultats obtenus, ont montrés qu'il y a une activité inhibitrice chez les deux souches lactiques vis à vis de toutes les souches fongiques testées. Les souches *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) ainsi que la culture mixte ces deux souches ont données des zones d'inhibitions représentant respectivement 18%, 15% et 22 % de la surface totale de la boîte inoculée par la souche *Fusarium graminearum*. Les résultats de l'inhibition de la croissance radiale du mycélium des souches fongiques par les surnageants des souches lactiques testées ont montrés que *Lactobacillus plantarum* (LB01) et *Lactobacillus acidophilus* (LB02) retardent respectivement, la croissance radiale de la souche *Fusarium graminearum* (FG) de 67,82% et de 45,63%. Le meilleur résultat a été obtenu par le surnageant de la culture mixte 97,82% d'inhibition de la croissance radiale de *Fusarium graminearum*. Cette étude nous a permis de découvrir les potentialités des bactéries lactiques dans le domaine de la biopréservation des produits alimentaires en général et particulièrement les produits laitiers altérables par moisissures.

Les mots clés : bactéries lactiques, activité antifongique, biopréservation, antagonisme , Fibre .

Contribution to the study of the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* LB01 and *Lactobacillus acidophilus* LB02 in pure and mixed culture.

Abstract

Fungi are known since long time by their deleterious effect causing alteration and deterioration over a wide range of food products. The objective of this work was to test the antifungal activity of two lactic acid bacteria strains from a probiotic dietary supplement against tree mycotoxinogenics referenced strains. Three methods were applied to bring out the antifungal activity: the spots method and inhibition of the radial growth method. The obtained results have shown that there is an inhibitory activity in all lactic strains against all fungal strains tested. *Lactobacillus plantarum* (LB01) and *Lactobacillus acidophilus* (LB02) have an inhibition area respectively representing 18%, 15% and 22 % of the total surface of the inoculated petri dish by *Fusarium graminearum* (FG). The results of the radial growth inhibition method on the tested fungal strains by the supernatants of lactic acid bacteria strains have shown that *Lactobacillus plantarum* (LB01) and *Lactobacillus acidophilus* (LB02) delay respectively, the radial growth of *Fusarium graminearum* (FG) by 67,82% and de 45,63%. The best result was obtained by the mixed culture supernatant 97,82% inhibition of radial growth of *Fusarium graminearum*. This study allowed us to discover the potential of acid lactic bacteria in the field of biopreservation food in general and particularly the dairy products alterable by fungi.

Key words: lactic acid bacteria, antifungal activity, biopreservation, antagonism ,fiber .

المساهمة في دراسة النشاط المضاد للفطريات لـ *Lactobacillus plantarum* LB01 و *Lactobacillus acidophilus* LB02 في الزراعة النقية والمختلطة.

ملخص:

تعرف الفطريات منذ زمن بتأثيرها السلبي من حيث التغيرات وتعفن الأطعمة. الهدف من هذه الدراسة هو اختبار النشاط المضاد للفطريات من طرف سلالتين من البكتيريا اللبنية على ثلاث سلالات فطرية مصنفة مرجعيا. من اجل هذا طبقت طريقتين هما طريقة البكتيريا الحية، وطريقة تثبيط النمو الشعاعي. النتائج بينت وجود نشاط مثبط عند سلالتين من البكتيريا اللبنية ضد جميع السلالات ال السلالات الفطرية المدروسة السلالات *Lactobacillus plantarum* (LB01) و *Lactobacillus acidophilus* (LB02) أعطت مساحة حيز تثبيط يصل 18% و 15% و 22% للمساحة الكلية للعبوة المزروعة بسلالة *Fusarium graminearum* (FG). اما نتائج التثبيط الشعاعي اثبتت تأخير النمو الشعاعي ل *Fusarium graminearum* (FG) بنسبة 67.82% من طرف السلالة *Lactobacillus plantarum* (LB01) وبنسبة 45.63% من طرف السلالة *Lactobacillus acidophilus* (LB02) وأفضل نتيجة للتثبيط الشعاعي اثبتت تأخير النمو الشعاعي ل *Fusarium graminearum* (FG) بنسبة 97.82% من طرف الوسط المختلط. هذه الدراسة مكنت من اكتشاف قدرة البكتيريا اللبنية في مجال المحافظة الحيوية لجميع المنتجات الغذائية بصفة عامة وخصوصا المنتجات اللبنية القابلة للتلف بواسطة الفطريات المجهرية

كلمات مفتاحية: بكتيريا لبنية، نشاط مضاد للفطريات، المحافظة الحيوية، التضاد الحيوي، الالياف.