

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCE ALIMENTAIRE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle BOUZIANE FADILA

Mlle CHAOUI BADIRA IMENE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: Nutrition et pathologie

THÈME

**Biopréservation des aliments par les bactéries
lactiques à caractère antifongique**

Soutenue le ../07/2021

DEVANT LE JURY

Président
Examineur
Encadreur

Dr. CHAALAL Abdelmelek
Dr. BOKAZZOULA Nawel
Dr. ZABOURI Younes

MCA
MCB
MCB

U.Mostaganem
U.Mostaganem
U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie
Université de Mostaganem*

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

*Au début et avant tout nous remercions **Allah** qui nous a donné le courage, la santé et la patience de finaliser ce travail.*

*Tout d'abord, nous remercions notre encadreur **Mr ZABOURI Younes** pour avoir accepté de nous encadrer et consacré autant de temps pour nous, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieuse pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire, nous le remercions vivement.*

*Nous adressons nos remerciements au **Dr. CHAALAL Abdelmalek**, maître de conférences A au Département des sciences alimentaires, Université Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury*

*Nos profonds remerciements vont au **Dr. BOUKAZZOULA Nawel** maître de conférences B au Département des Sciences alimentaires, Université de Mostaganem, qui nous fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Nous remercions également tous les membres de laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem Abdelhamid Ibn-Badis, qui nous ont bien aidés pour réaliser notre étude expérimentale dans des bonnes conditions.

Nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à notre formation.

Enfin nous remercions profondément nos précieuses familles et nos chères amies à la fois pour leur soutien et leur encouragement.

Dédicaces

*Avec un énorme plaisir, Un cœur ouvert et une immense joie, Que je dédie ce
modeste travail*

*A ma cher et magnifique **Mère** pour m'avoir toujours entourée d'affection,
Soutenue, rassurée et aidée, merci pour tant de patience et de force.*

*A mes chères sœurs Lamis, Batoul, Sara, Rima, Aicha
En leurs souhaitant beaucoup de sucée dans la vie*

Mon seul frère Rabie Rayane

*A Mon cher frère, que ma mère n'a pas enfanté **Abdelkrim** merci
pour ton aide et pour ton soutien*

A mes amis Amina, Imene, Dalal

Fadila

Dédicaces

*Avec l'expression de ma reconnaissance, et quels que soient les termes
embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère. A l'homme,
mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect:
mon cher père Lakhdar.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes
exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse mon adorable
mère Aïcha*

*A mes chères sœurs Sara, Aya et mon cher frère Hamza qui n'ont pas cessée de
me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les
protège et leurs offrent la chance et le bonheur.*

*A mon adorable petit frère Oualid qui sait toujours comment procurer la joie et
le bonheur pour toute la famille.*

*A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue
et joyeuse vie.*

A tous mes amis Dalel, Hasnia, Asma et Zahra

*Sans oublier mon binôme Fadéla pour son soutien moral, sa patience et sa
compréhension tout au long de ce projet*

Dadira Imen

ملخص :

يعد تلوث الأغذية بالعفن و الفطريات السامة مشكلة خطيرة وصعبة التحكم فيها لأنها تؤدي الى خسائر اقتصادية هائلة.

تعد السموم الفطرية واحدة من أخطر الملوثات. حيث يوجد حاليًا اهتمام كبير بتحسين جودة الأغذية وسلامتها من خلال طرق الحفظ والحماية الطبيعية.

يعتمد الحفظ البيولوجي للأغذية على استخدام الكائنات الحية الدقيقة و/أو مستقبلاتها لتأخير أو منع نمو الكائنات الدقيقة الملوثة.

يعد النشاط المضاد للفطريات للبكتيريا اللبنية أحد الخصائص البيولوجية المرغوبة. يمكن أن تكون فرضية منع نمو الكائنات الحية المنتجة للسموم الفطرية بواسطة البكتيريا اللبنية الأقل عدوانية حالاً فعالاً وصحياً. في الواقع، يمكن أن تنتج هذه السلالات مجموعة واسعة من المستقبلات المضادة للفطريات لمنع نمو الفطريات، ولديها القدرة على امتصاص السموم الفطرية أو تحليلها أو إزالة السموم منها، مما يجعلها بدائل جيدة للمواد الكيميائية المستخدمة. في الحفاظ على الطعام.

الكلمات المفتاحية: الفطريات، السموم الفطرية، بكتيريا حمض اللاكتيك، النشاط المضاد للفطريات، الحفظ البيولوجي، حفظ الأغذية.

Abstract

Mould contamination of food is a serious and difficult problem to manage as it leads to huge economic losses.

Mycotoxins have been recognized as one of the most dangerous pollutants in food. Currently, there is a major interest in improving food quality and safety through natural preservation and protection methods.

The biopréservation of food is based on the use of microorganisms and/or their metabolites to delay or inhibit the growth of contaminating microorganisms. The antifungal activity of lactic acid bacteria is one of the desired biological properties. The hypothesis of prevention of the growth of mycotoxin-producing organisms by less aggressive lactic acid bacteria could be an effective and healthy solution. Indeed, these strains can produce a wide spectrum of antifungal metabolites to inhibit the growth of molds, they have the ability to adsorb, degrade or detoxify fungal mycotoxins, this makes them good alternatives to chemicals used for the preservation of food.

Keywords: Moulds, Mycotoxins, Lactic acid bacteria, Antifungal activity, Biopreservation, Food preservation.

Résumer

La contamination des denrées alimentaires par des moisissures est un problème grave et difficile à gérer car il conduit à d'énormes pertes économiques.

Les mycotoxines ont été reconnues comme l'un des polluants les plus dangereux dans l'alimentation. Actuellement, il existe un intérêt majeur pour l'amélioration de la qualité et de la sécurité alimentaire par des méthodes de préservation et de protection naturels .

La biopréservation des aliments est fondée sur l'utilisation de micro-organismes et/ou leurs métabolites pour faire retarder ou inhiber la croissance des microorganismes contaminants. L'activité antifongique des bactéries lactiques est l'une des propriétés biologiques recherchée. L'hypothèse d'une prévention de la croissance des organismes producteurs de mycotoxines par des bactéries lactiques moins agressives pourrait être une solution efficace et saine. En effet, ces souches peuvent produire un vaste spectre de métabolites antifongiques pour inhiber la croissance des moisissures, elles ont la capacité d'adsorber, de dégrader ou de détoxifier les mycotoxines fongiques, cela en fait de bonnes alternatives aux produits chimiques utilisés pour la conservation des aliments.

Mots clé : Moisissures, Les mycotoxines, bactéries lactiques, Activité antifongique, Biopréservation, Conservation des aliments.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux :

Résumer

Introduction **1**

Chapitre I : **3**

Revue bibliographiques **3**

I .Les bactéries lactiques : **4**

I.1. Historique 4

I.2.définition et caractéristiques générale des bactéries lactiques 4

I.3. Identification des bactéries lactiques 5

I.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques 7

I .5. Intérêts technologiques des bactéries lactiques 10

I .6. Utilisation et applicationdes des bactéries latiques 11

I .7- Activité antifongique des bactéries lactiques 13

II .La biopréservation **15**

II .1.Aspects généraux de la biopréservation 15

II .2- Définition 15

II 3- Technique traditionnelle de la biopréservation 16

II .4-Rôle des bactéries lactiques en biopréservation 16

II. 5. Les bactéries lactiques dans la biopréservation 17

III . Les moisissures **18**

III .1. Définition 18

III.2. Caractéristiques principales 19

III.3. Écologie 19

III.4. Spores et cycle de vie 20

III.5. Les principaux genres des moisissures d'altération 20

III .6. Les mycotoxines 22

Chapitre II : **27**

Matériels Méthodes	27
I. Matériels :	28
I. 1. Bactéries lactiques	28
I .2. Les souches fongiques :	28
I .3. Milieux de Culture :	28
I .4. les réactifs	28
I .5. Matériel et Appareillages	28
II. Méthodes :	29
II.1.les souches fongiques	29
II .2.Les bactéries lactiques	31
II .3.Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques	33
Chapitre III :	37
Résultats et discussion	37
Résultats :	38
III .1. Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :	38
III .2.Etude des caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures :	39
III .3.La recherche de l'activité antifongique	40
Discussion générale :	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	47
Annexes	59

Liste des abréviations

A: Aspergillus.

AFB1: Aflatoxine B1.

AFG1: Aflatoxine G1.

CO2: Dioxyde de carbone.

C°: degré Celsius.

Ch: Champignons.

E :Entérocooccus.

F: Fusarium .

Fig: Figure .

g: gramme.

h: heur.

KDa: kilodaltone .

BL: Bactéries lactique.

Lb: *Lactobacillus* .

Min: minute .

ml: millilitre .

mm: millimètre .

MRS: Man, Rogosa et sharpe.

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide

OTA: ochratoxines.

P: Penicillium.

PDA: Potato Desxtrose Agar.

pH: Potentiel d'hydrogène.

S: Souche.

Sp: espèce.

Ml: micromètre.

Liste des figures :

N° figure	titre	page
Figure 1	(a) la forme cocci, (b) la forme bacille des bactéries lactiques observé au Microscope électronique à transmission	05
Figure 2	Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques.	06
Figure 3	<i>Lactobacillus plantarum</i> observé par microscope électronique à transmission	07
Figure 4	<i>Leuconostoc lactis</i> observé microscope électronique à transmission (x10000).	08
Figure 5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	08
Figure 6	<i>Enterococcus Faecium</i>	09
Figure 7	Morphologie en microscope électronique de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> (x1000)	10
Figure 8	Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model A: Barelle-stave ; B: Toroidal ; C : Wormhole	15
Figure 9	Schéma de la reproduction des moisissures	21
Figure 10	Observation microscopique d'une tête aspergillaire .	22
Figure 11	Appareil reproducteur des mucorales	22
Figure 12	schéma d'un <i>Penicillium</i>	23
Figure 13	observation microscopique d'un <i>Pénicillium</i>	23
Figure 14	Structure chimique d'Aflatoxine B1	24
Figure 15	Structure chimique de l'ochratoxine A	26
Figure 16	Structure chimique de patuline	27
Figure 17	Structure générale des fumonisines	27
Figure 18	Structure chimique de la zéaralénone	28
Figure 19	pain contaminé par des moisissures	31
Figure 20	Isolement de l'agent pathogène de pain	32
Figure 21	Les étapes de la technique monospore	33
Figure22	schéma représentant les étapes de préparation de pain au sourdough et des tests <i>in situ</i>	38
Figure 23	observation macroscopique des LB sur milieu MRS solide	41
Figure 24	Observation microscopique de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> et	42

	<i>Enterococcus sp</i> après coloration de Gram (G x100).	
Figure 25	Observation macroscopique de <i>Penicillium</i> et <i>Aspergillus</i>	42
Figure 26	Observation micriscopique de penicillium et aspergillus (bleu de coton x100)	43
Figure 27	croissance de moisissure <i>A</i> et <i>P</i> sur pain sourdough fermenté par des LB et sur des pain sans sourdoug	45

Liste des tableaux :

N° tableau	Titre	Page
Tableau 01	Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristique	10
Tableau 02	Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	13
Tableau 03	Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.	18
Tableau 04	Déchiffrage des souches lactique.	30
Tableau 05	concentration des ingrédients utilisés pour la production du pain avec et sans sourdough	37
Tableau 06	Evaluation l'activité antifongique des BL par confrontation contre <i>A. tubingensis</i> AN, <i>A. fumigatus</i> AF et <i>Talaromyces stollii</i> PM.	44

Introduction

Introduction

La préservation des aliments se base essentiellement sur le retard, la prévention ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants. Les méthodes physiques et chimiques de préservation provoquent des altérations de qualité nutritionnelle, et organoleptique des aliments, et une diminution de leur utilité suite au développement des résistances par les pathogènes. La résistance est attribuable à l'utilisation abusive et souvent prolongée des produits chimiques, ce qui permet aux souches de développer des mécanismes de résistance. Face à ces problèmes, la recherche scientifique s'oriente vers une nouvelle théorie, qui est la biopréservation (**Gould, 2000**).

La biopréservation est une alternative très prometteuse, ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence des agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté l'existence au sein de certains microorganismes des souches capables de contrôler la croissance fongiques telles que *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* et *Trichoderma* ...etc, mais certains d'entre eux sont responsables des problèmes sanitaires.

Les antagonistes doivent être capables d'assurer sainement la biopréservation, et tolérables par l'homme et les animaux, parmi ceux-ci, les bactéries lactiques, non seulement connues pour leur innocuité, mais aussi pour leurs activités antimicrobiennes, pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (**Djossou et al., 2011**).

La présence des moisissures dans un produit alimentaire peut améliorer les qualités organoleptiques ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques (les mycotoxines).

L'altération à n'importe quel point de la chaîne jusqu'à la consommation est exacerbée par les conditions auxquelles le produit alimentaire est exposé. Les principaux facteurs déterminant la croissance fongique sur un produit alimentaire sont l'activité de l'eau (A_w), la température, le pH, l'oxygène, la lumière et la présence d'autres microorganismes, qui peuvent restreindre la croissance fongique et la synthèse de mycotoxines.

Les moisissures peuvent proliférer sur les aliments et produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, lors du transport et de la transformation des matières premières.

La contamination fongique limite la durée de conservation, et est à l'origine d'une perte de 5 à 10 % des récoltes mondiales selon l'organisation mondiale pour l'alimentation et l'agriculture

Introduction

[FAO] et provoque des modifications physiques (moisissure visible ou décoloration, goût, odeur de moisi) et des modifications des qualités nutritives.

Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent divers produits alimentaires notamment les céréales, le café, les produits d'origine animale (lait, viande), les légumes, les fruits et les arachides appartiennent au genre *Aspergillus*. De cela, la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques, capables d'être utilisées comme des agents de biopréservation, afin de réduire les pertes engendrées dans les cultures et l'industrie agroalimentaire, et l'effet néfaste des moisissures et leurs mycotoxines, semble être l'un des outils les plus recherchés.

Dans ce contexte, le but de ce travail est la sélection des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Eterococcus*, isolées a partir de pain pouvant inhiber la croissance d'*Aspergillus* et *pénicilium*, la caractérisation des composés responsables de l'inhibition. Enfin, des tests in vivo pour démontrer leur utilités en tant qu'agent de biopréservation dans les produits alimentaires exposés à la contamination par des moisissures.

Chapitre I :
Revue bibliographique

I .Les bactéries lactiques :**I.1. Historique :**

Le terme bactéries lactique à été défini pour la première fois en 1919 par orla-jensen. On été retrouvées dans des sédiments datant de 2.75 milairds d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie de plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries **(Belyagoubi, 2014)**

De nous jours les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levues.principalement utilisés dans l'industrie alimentaire Pour la production et la fermentation des aliments et aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et bio polymères et acquière **(Brahimi, 2015).**

I.2.définition et caractéristiques générale des bactéries lactiques :

Les aliments fermentés avec des bactéries lactiques présentent une part importante de l'alimentation humaine.ces bactéries jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments ce qui a entrainé un intérêt scientifique de leur étude au cours des quelques dernières *décennies* **(Fennema et al, 2004)**. Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisés en industrie alimentaire, dans une grande variété de fermentations. En effet, ces bactéries participent à la transformation de produit animaux tels le lait et certains produits carné ainsi qu'à l'élaboration de produits végétaux. Elles sont aussi connues pour leur rôle probiotique **(Braegge, 2002)**.

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles **(Novel, 1993)**.

Elles rassemblent un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite :

- ☐ Homolactique si l'acide lactique produit constitue plus de 90 % des produits de fermentation,
- ☐ Hétérolactique facultatives si elles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique,

- Hétérolactique stricte si elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al*, 2005 ; Vandamme *et al*, 1996).

La division des BL se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (Salminen *et al*, 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka *et al*, 2011) pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*, 1999).

I.3. Identification des bactéries lactiques

I .3.1. Caractères morphologiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, immobiles, non sporulées et hétérotrophes (Yann, 2003 ; HO, 2008). Elles forment un groupe hétérogène composé de cocci et de bacilles ou bâtonnets (Fig 1) (Badis, 2005 ; Khalisanni, 2011)

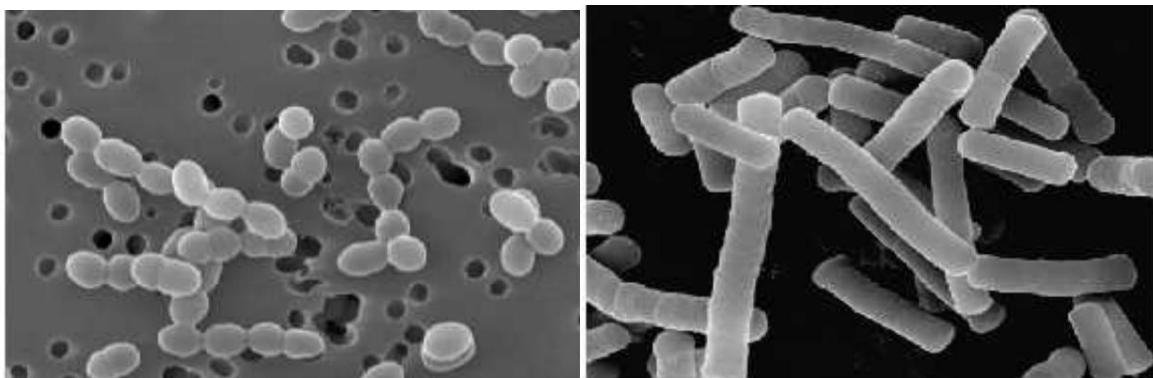


Figure 1 : (a) la forme cocci, (b) la forme bacille des bactéries lactiques observé au Microscope électronique à transmission (Makhloufi, 2011)

I .3.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Les bactéries lactiques sont chimiotropes et ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytiques, c'est à dire elles trouvent l'énergie nécessaire à partir d'une réaction de l'oxydation des sucres (Khalisanni, 2011; Meziani, 2011).

La conversion des sucres en acide lactique utilise deux voies:

- La voie homofermentaire ou glycolyse qui donne deux molécules de lactate par molécules de glucose (Fig 2).

- La voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates donnant un lactate, un acétate et une molécule de CO₂ par molécule de glucose (**Fig 2**) (**Savadogo, 2004**)

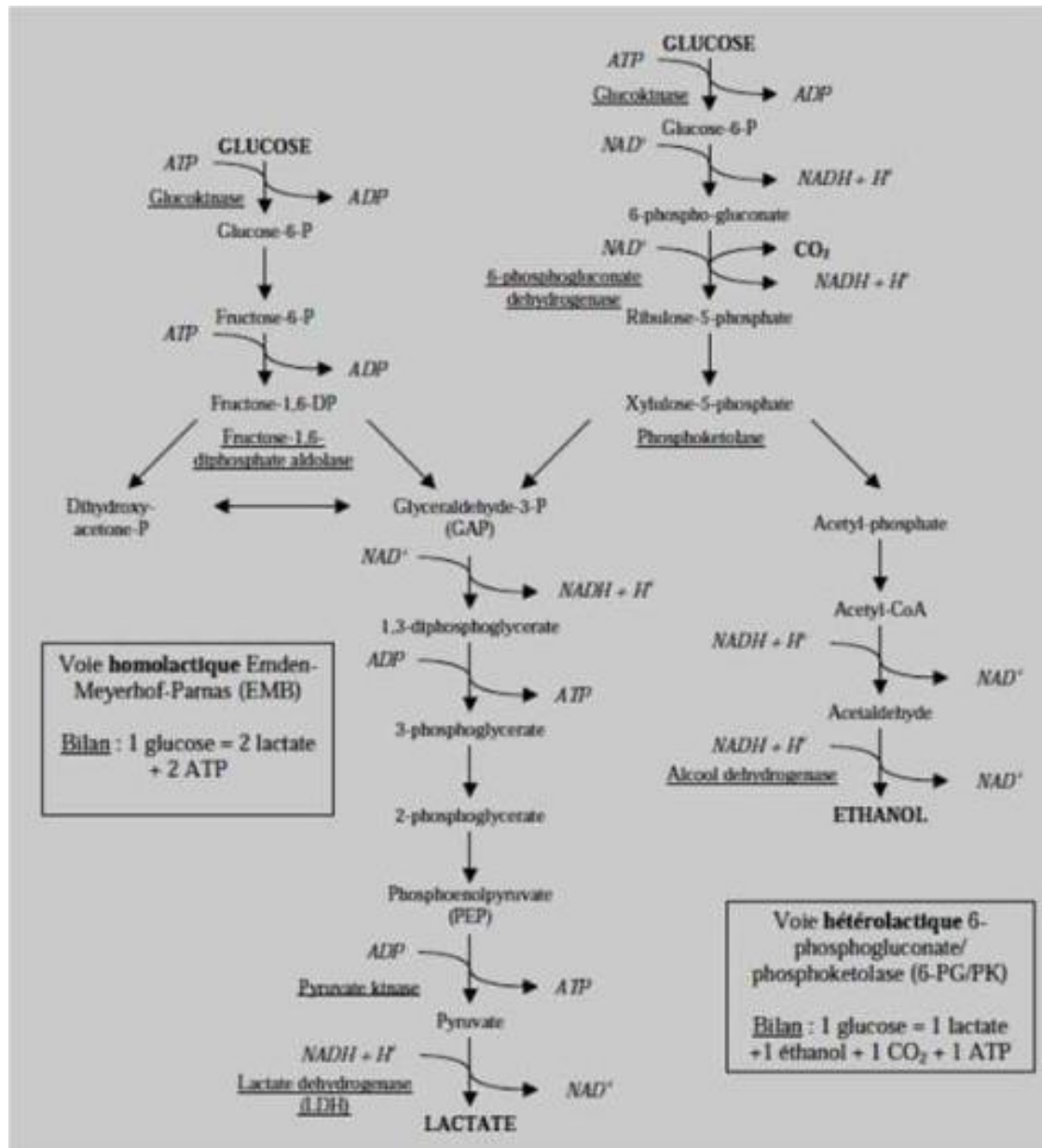


Figure 02 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques. (Matamoros, 2008)

I.3.3. Caractères immunologiques

Les bactéries lactiques peuvent être sensibles à leurs propres substances de défense comme la bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée «d'immunité».

C'est une lipoprotéine d'immunité codée par le gene LanI : Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec la bactériocine afin d'empêcher son insertion

dans la membrane et ainsi former des pores. La structure de ces protéines est très variable (Dortu, 2008; Mameche, 2008)

I.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

L'élaboration de la taxonomie est basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (tableau 01) (Zergoug, 2017),

I .4.1. Le genre *Lactobacillus*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ce sont des bactéries à gram positif communément trouvés dans divers milieux, elles peuvent se présenter sous forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes (Fig 03) (Patrick, 2004).

La multiplicité des niches écologiques des lactobacilles se reflète dans la diversité et de l'hétérogénéité phylogénétique du genre. Le genre comprend plus d'une centaine d'espèces différentes (Lahtinen *et al*, 2012).

Les lactobacilles ont été utilisés comme mesure préventive dans la lutte contre l'intolérance au lactose et inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes nuisibles à l'aide d'une réduction du pH de l'intestin. Certaines souches sont capables de produire des bactériocines et d'autres produits métaboliques comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂) et de diacétyl (Elfahri, 2012)



Figure 03: *Lactobacillus plantarum* observé par microscope électronique à transmission (Aznar1 et Zúñiga1, 2011)

I .4.2. Le genre *Leuconostoc*

Les *leuconostoc* sont des microorganismes procaryotes, mésophile, saprophytes, asporulés, habituellement non mobiles, dépourvus d'oxydase et de catalase, à Gram positif.

Sont définis pour la 1ere fois par **Vantieghem (1878)**, appartenant à la famille des *Leuconostocaceae*, anaérobie facultatif avec une forme ovoïde (**fig 04**), associées en paires ou en chaines courtes, elles colonisent des écosystèmes très variés tel que les végétaux et les animaux (**Hannachi, 2008**) Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Les leuconostoc sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire, ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol (**HO, 2008**)

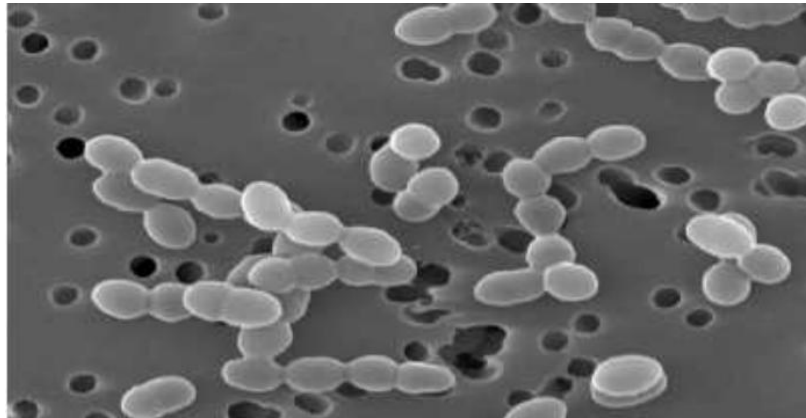


Figure 04 : *Leuconostoc lactis* observé microscope électronique à transmission (x10000).(Bendimerad, 2013)

I .4.3. Le genre *Streptococcus*

Des microorganismes appartenant à la famille de *Streptococcaceae*, ils ont une forme ovoïde, sphérique ou quelque fois allongées en fuseaux en paires ou en chainettes de moins de 2µm de diamètre (**Fig05**). Ce sont des bactéries à Gram positif, catalase négative, anaérobie facultative, sont toujours ou presque immobiles ils se distinguent par leur capacité de croître à 45°C.

Les streptocoques sont nutritionnellement fastidieux avec une demande de variabilité nutritionnelle (**Diallo 2010 ; Rabah, 2010**)

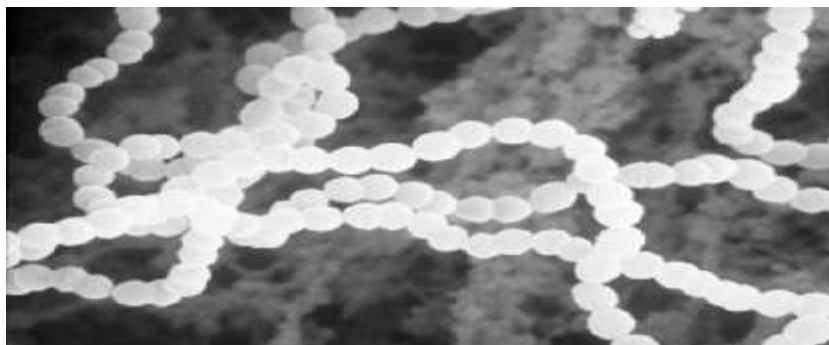


Figure 05 : *Streptococcus thermophilus* (**Franck Le Guerhier, 2013**)

I .4.4. Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* appartient à la famille des *Enterococcaceae*, il comporte actuellement 40 espèces. Ce sont des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies, généralement catalase négative, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes (**Fig 06**), homofermentaires, et cultivant avec un optimum thermique de 35 °C, à pH 9, 6 Les espèces *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* sont de médiocres agents acidifiants et protéolytiques du lait, *E. faecalis* présentant les plus fortes activités. Certaines souches d'*Enterococcus faecium* possèdent un effet favorable sur la croissance des animaux par compétition avec les germes pathogènes (**Fisher et Phillips, 2009; Silva et al., 2012; Bendimerad, 2013; Isnard, 2017**)

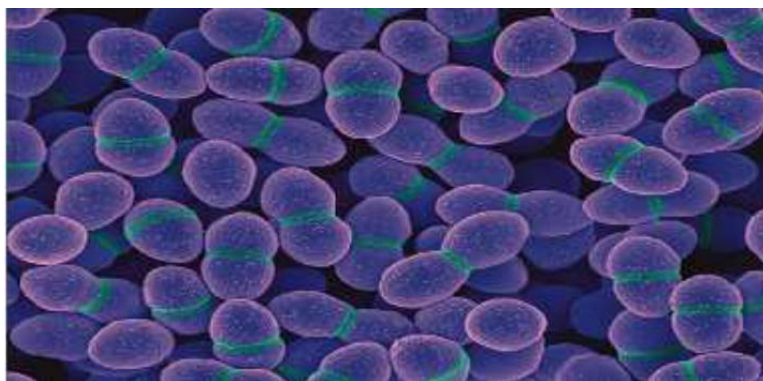


Figure 06 : *Enterococcus Faecium*

(<https://www.indiamart.com/proddetail/enterococcus-faecium-probiotics-8411604530.html>)

I .4.5. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques sont des cocci en paires ou en chaînes, de longueur variable de 0,5 à 1 µm de diamètre, à Gram positif (**Lazreg, 2017**). Ce sont des bactéries aéro-anaérobie facultatifs, immobiles, mésophiles, 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, capables de se développer à 10°C, mais pas à 45°C (**fig 07**).

En technologie laitière, les lactocoques jouent un rôle d'agent acidifiant « bioconservateur » (**Tchamba, 2007**).

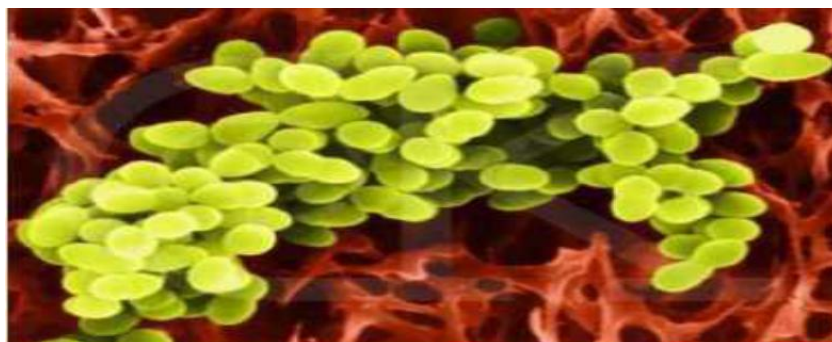


Figure 07 : Morphologie en microscope électronique de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* x1000 (Menad, 2017)

Tableau 01 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristique (Berguiga ; khemis, 2014)

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques	Habitats
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaire Hétérofermentaires	Thermophiles Mésophiles	Homme, carnés Produits laitiers, vegetaux
	Coques	Homofermentaire	Thermophiles	Produit laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Mésophiles croissance à 45 °C Thermorésistante	l'intestin de l'homme et des animaux, produit laitiers.
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produit végétaux

I .5. Intérêts technologiques des bactéries lactiques

I .5.1. Activité acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par l'hydrolyse de lactose grâce à la bêta-galactosidase pour produire le glucose et le galactose. Généralement le glucose provenant de cette hydrolyse sera fermenté pour produire des composés acides, du gaz carbonique ou de l'alcool. Cette production de composés acides va entraîner une baisse de

pH. Cette dernière peut induire des odeurs et des goûts particuliers. De plus, l'acidification limite les risques de développement de flore pathogène au cours de la croissance. **(Dib, 2015 ; Boullouf, 2016)**

I .5.2. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés, ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides, Cette activité protéolytique intervient de ce fait dans les caractéristiques du produit final, Technologiquement, l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages **(Mahi, 2010)**, De nombreuses protéases sont synthétisées par les bactéries lactiques qui peuvent être des aminopeptidases, dipeptidases ou tripeptidases, situées au niveau de la membrane plasmique ou dans le cytoplasme **(Bennama, 2012)**

I. 5.3. Activité aromatisant

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne, plusieurs espèces de bactéries lactiques sont capables de synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyle, l'acétone, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés.

Le diacétyle est le principal composé qui participe à l'arôme de très nombreux produits laitiers qui est issu du métabolisme du citrate par différentes espèces de bactéries lactiques.

D'autres travaux ont montré la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques **(Hammi, 2016 ; Belkheir, 2017)**.

I. 5.4. Activité antibactérienne

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques **(Hadj Abderrahman, 2015)**

Parmi ces substances qui ont un effet antibactérien :

- Les acides organiques : (acide lactique, acétique et propionique) exercent par leur nature la diminution du pH qui a un important effet antimicrobien. En effet, l'acide acétique possède une forte activité antibactérienne et un large spectre d'inhibition vis-à-vis des bactéries, des levures et des moisissures.
- Le dioxyde de carbone : joue aussi un double rôle antimicrobien : par sa propre activité antibactérienne et par la création de conditions d'anaérobiose.

- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : provoque parfois une auto inhibition des bactéries qui le produisent mais aussi inhibe la croissance d'autres microorganismes qui se trouve dans le milieu.
- Les bactériocines : sont des substances de nature protéique produites par certaines bactéries lactiques, exercent une action antibactérienne contre des souches distinctes des souches productrices et contre certains pathogènes, jouant ainsi un rôle primordial dans la bioconservation des aliments (**Ammar et Irid, 2009**).

I .6. Utilisation et application des bactéries latiques

Les bactéries lactiques ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et par là d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des altérations organoleptiques. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (**MAYRA-MAKINEM et BIGRET, 1998**).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (**RUAS-MADIEDO et al., 2002 ; WISSELINK et al., 2002**).

Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (**RODRIGUEZ et al., 2003**) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (**LANGELLA et al., 2001**).

La fermentation améliore la conservation et modifie la saveur des aliments. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain (**Tableau2**) (**LANGELLA et al., 2001**). Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al., 20018**). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (**Mkrtchyan et al., 2010**).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**).

(**Uehara et al., 2006**) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

Taleau 2: Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (**SPINLER, 1995**)

famille	Genre	substrat	Exemple
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Lait	laits fermentés, yaourts, kéfirs, la plupart des fromages
		Viande	saucissons secs, jambons secs
		poissons	nuoc mam
		végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
		céréales	pain au levain, bières
	<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute, ensilage
		Viande	saucisses semi-séchées, saucissons secs
		poissons	nuoc mam
		céréales	pain au levain, riz fermenté
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Lait	fromages blancs, à pâte molle ou pressée non cuite, kéfirs
	<i>Streptococcus</i>	Lait	yaourts, laits fermentés, fromages à pâte pressée cuite
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Tetragenococcus</i>	végétaux	sauce de soja,
		poissons	saumure d'anchois, sauce de poisson, nuoc mam
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	végétaux	choucroute, olives, vin, cidre
		Lait	fromages, kéfirs
	<i>Oenococcus</i>	végétaux	Vin
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Lait	laits fermentés

I.7- Activité antifongique des bactéries lactiques

I.7.1- Historique

Les moisissures constituent une flore d'altération naturellement présentes sur les aliments tels que les produits laitiers, le fromage, le pain, les produits agricoles en stockage et les ensilages (**Bullerman 1977; Moon, 1983 ; Bonestroo et al., 1993 ; Filtenborg et al., 1996**). Les genres les plus courants sont *Penicillium* et *Aspergillus* sur le café, le cacao, l'arachide, les

fruits secs, les fruits frais, et les légumes et *Fusarium* sur les **céréales (Filtenborg et al., 1996; Jefca, 2001).**

L'idée de l'utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle de la croissance des moisissures dans les aliments vient de la cohabitation entre bactéries et moisissures sur ces aliments, mais aussi de la résistance croissante des moisissures aux antibiotiques. Ainsi certaines souches de *Penicillium*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* se développent bien en présence de sorbate de potassium et de benzoate **(Nielsen et Boer, 2000 ; Davidson, 2001).** De plus le nombre de moisissures dégradant le sorbate est sans cesse croissant **(Nielsen et Boer, 2000).**

I.7.2 - Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action

Les bactéries lactiques recensées dans la littérature comme présentant des propriétés antifongiques appartiennent fréquemment au genre *Lactobacillus* et quelque rares fois aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus*. Parmi les *Lactobacillus*, l'espèce *Lactobacillus plantarum* revient souvent, suivie de *Lactobacillus casei* variante *rhamnosus* et de *Lactobacillus lactis*.

Les spectres d'activité de ces bactéries sont très variés, regroupant des moisissures des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* et des espèces de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* **(Olga, 2011).**

I.7.3- Les composés antimycotoxinogène des bactéries lactique

Les premiers composés antifongiques identifiés chez les bactéries lactiques sont des métabolites primaires, souvent des acides organiques, produits au cours de la croissance du microorganisme. Il s'agit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène **(Lindgren et Dobrogosz, 1990).** Aussi la découverte des bactériocine a donné un élan pour le développement d'aliment de qualité sanitaire meilleur **(Collins et al.,1989 ; Axelsson 2004 ; Djadouni et Kihal.,2012).**

D'autres acides ont été mis en évidence chez *Lactobacillus plantarum*: ce sont l'acide benzoïque, l'acide 3-phenyllactique et l'acide 4-hydroxy-phenyllactic acid **(Niku-Paavola et al., 1999 ; Lavermicocca et al., 2000 ; Ström et al., 2002).** Certains auteurs ont mis en évidence des protéines antifongiques chez les bactéries lactiques suivantes : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei subsp. pseudoparaplantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici* **(Olga, 2011).**

I.7.4- Mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries Lactiques

Pour le mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactique Nous développerons uniquement Mode d'action des bactériocines.

I.7.4.1- Mode d'action des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocine est très largement étudié .il est admis qu'il se décompose en trois étapes :

- 1- Adsorption et structuration de la bactériocine : consiste en fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. Durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité.
- 2- Insertion de la bactériocine et formation de pores dans la cellule cible : consiste en insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique durant cette étape plusieurs peptide anti bactérien sont recruté pour formé un port.
- 3- Les conséquences de la présence de pores : ce dernier conduit a des fuites de composé intracellulaire vitaux .leur perte entraine donc des effets néfaste pour la cellule allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne a la mort cellulaire (**Huang, 2006**).

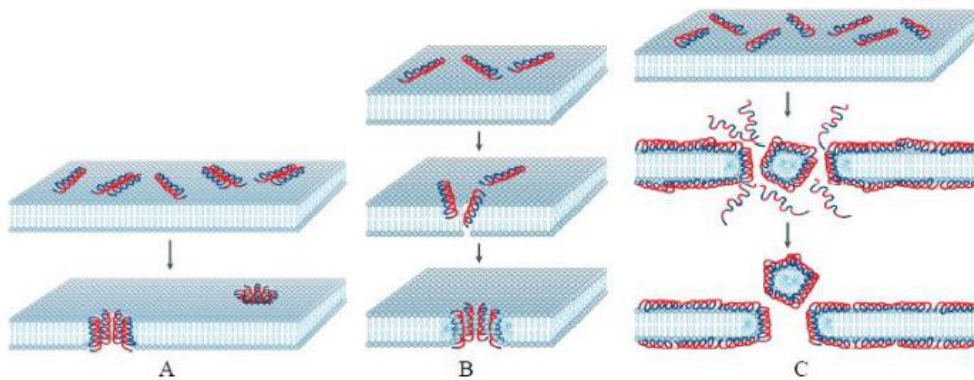


Figure 8 :Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model
A: Barelle-stave ; B: Toroidal ; C : Wormhole (**Brogden,2005**).

II .La biopréservation

II .1.Aspects généraux de la biopréservation

Certaines techniques de conservation suffisent à elles seules à préserver un aliment pour une durée satisfaisante. Dans le cas de la pasteurisation ou de l'appertisation, la majorité des flores

présentes sur le produit est détruite par la chaleur, et le conditionnement hermétique empêche une décontamination ultérieure. De même le salage ou le séchage modifient de façon radicale le produit (taux de sel supérieur à 15-20%, aw très basse...), ce qui retarde la croissance des flores susceptibles d'entraîner une altération. Cependant ces techniques s'accompagnent d'une transformation importante du produit. De plus en plus de consommateurs préfèrent aujourd'hui des produits moins fortement préservés, ce qui permet de retrouver des qualités organoleptiques plus proches du produit d'origine. Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières (**Leistner, 2000**). Il s'agit d'appliquer successivement plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes. Chacun n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisante en soi pour obtenir une bonne conservation. C'est alors la succession de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée ; diminution : réfrigération), l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate...) et la biopréservation (**Leistner, 2000**).

II .2- Définition

La biopréservation consiste à ajouter sur un aliment un ou des microorganismes et/ou leur métabolite, sélectionné pour leurs capacités à inhiber la croissance de microorganismes indésirables, dans le but d'augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires et/ou limiter la croissance des certains microorganismes pathogènes (**Dridet et al., 2009**).

La biopréservation fait partie des techniques qui peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières. Elle peut être utilisée sur des produits légèrement préservés, sur des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou sur des produits ayant subis une cuisson rapide. Différents mécanismes entrent en jeu lors de la biopréservation. L'inhibition des flores indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de bactériocines (**Helander et al., 1997**). L'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de biopréservation (**Stiles, 1996**) se rapproche d'avantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

II 3- Technique traditionnelle de la biopréservation

Plusieurs techniques sont utilisées pour la conservation des aliments. Le séchage, la lyophilisation, les entrepôts frigorifiques, l'entreposage en atmosphère modifiée, le chauffage, l'irradiation, sont autant de méthodes physiques utilisées pour la conservation des aliments (**Legan ,1993 ; Farkas, 2001**). Les additifs chimiques tels que l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide propionique, l'acide citrique, et les acides benzoïques et sorbiques sont utilisés comme conservateur dans les denrées alimentaires (**Brul and Coote, 1999**).

Certains antibiotiques comme la natamycine sont très efficaces contre les moisissures et les levures. Ils sont utilisés comme conservateur à la surface des fromages (**Davidson, 2001**).

Récemment la réglementation de l'Union Européenne 95/2/CE a réduit les concentrations des conservateurs chimiques dans les produits de boulangerie (**Union Européenne, 2005**) dans un souci de préserver la santé du consommateur. Dans cette optique la biopréservation a acquis un intérêt croissant dans l'industrie agro-alimentaire grâce à l'introduction de substances naturelles d'origines animales (lyzosome, lactoferrin, magainins, etc.), végétales (phytoalexines, herbes et épices) et microbiennes (antibiotiques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, acides organiques) (**Gould, 1996**).

II .4-Rôle des bactéries lactiques en biopréservation

Les bactéries lactiques sont naturellement présentes dans les aliments ou intentionnellement ajoutées en tant que probiotiques dans divers produits alimentaires. Cette fonction découle d'une baisse rapide du pH ce qui favorise la sécurité des produits par l'inactivation des agents pathogènes tel que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sur la viande (**Bacus, 1984; Schillinger et al., 1996**). Ainsi se crée les conditions biochimiques par la modification des matières premières pour atteindre les propriétés finales sensorielles et simultanément améliorer la stabilité et la conservation du produit en inhibant les changements indésirables provoqués par les microorganismes ou les réactions abiotiques (**Kunz, 1989; Ammor et Mayo,2007**). Ces bactéries sont principalement : *Lactobacillus plantarum* (**Valeirio, 2008**), *Lactobacillus sake* (**Schillinger et Lücke, 1989**). Elles produisent les composés antimicrobiens suivants : acide lactique, acide acétique, peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines (**DeVuystand Vandammaue, 1994a; Aymerich, 2000**).

II. 5. Les bactéries lactiques dans la biopréservation

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (**voir tableau 3**). Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits

réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches (pour revue, voir **Stiles, 1996 et Guinane et al., 2005**).

Tableau 3 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

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

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines. Les acides organiques sont les produits directs de la fermentation. Leur libération dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne. Ainsi Wilson et al. (2005) ont démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* dans des produits végétaux par une souche de *Lb. plantarum* était due à la production d'acide lactique. Cependant dans certains produits une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est produit en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes telles que la NADH oxydase, la pyruvate oxydase ou la superoxyde dismutase. Les bactéries

lactiques ne disposant pas de catalase pour le réduire, ce composé s'accumule dans le milieu. Son potentiel d'oxydation élevé lui permet d'altérer les acides nucléiques et d'oxyder les lipides, entraînant une inhibition des microorganismes.

Le diacétyl est un produit de la fermentation du citrate. Il est produit principalement par les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action aromatique est recherchée dans certains fromages tels que le Gouda. Son activité inhibitrice est en général peu importante, due à la faible quantité présente dans les produits.

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

Les bactériocines sont classées en 3 groupes selon leur structure :

- ❖ Les bactériocines de classe I sont dénommées les lantibiotiques. Ce sont des petits peptides (moins de 5kDa) qui subissent une modification post-traductionnelle et qui contiennent des acides aminés modifiés tels que la lanthionine. On y retrouve par exemple la nisine.
- ❖ La classe II est elle-même subdivisée en trois sous-classes : IIa, IIb et IIc. Tous les peptides compris dans cette classe sont petits (environ 10 kDa), thermorésistants et ne subissent pas de modification post-traductionnelle. Les bactériocines de classe IIa sont des peptides à activité anti-listeria avec une partie N-terminale comprenant une séquence conservée du type Tyr-Gly-Asn-Gly-Val et un pont disulfure. Leur pI est compris entre 8 et 10. Les bactéries lactiques sont les principaux producteurs de bactériocines de classe IIa. Le peptide de référence de cette classe est la pédiocine (Cleveland *et al.*, 2001 ; Drider *et al.*, 2006). Les bactériocines composées de deux peptides forment le groupe IIb. Enfin le groupe IIc comprends les bactériocines à un seul peptide ne rentrant pas dans les catégories précédentes.
- ❖ La classe III comprend les gros peptides (plus de 30 kDa) thermosensibles, sur lesquels peu d'informations sont encore disponibles.

❖ III. Les moisissures

III.1. Définition

Les moisissures sont des organismes eucaryotes, filamenteux structurés en mycélium saprophytes, hétérotrophes ayant une paroi polysaccharidique. Ils ont une structure végétale, mais à l'inverse des autres végétaux, ils sont dépourvus de pigments photosynthétiques (**Ozenda, 2006**). Sur le plan économique on peut distinguer deux groupes de moisissures (**Prescott et al., 2013**):

Les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques comme *Penicillium. camemberti* et *P. roqueforti* dans la fromagerie; *P. jensenii* ou *P. nalgiovense* en salaisonnerie (**Basset et Laffont, 2011**).

-Les moisissures nuisibles toxigènes peuvent se développer dans différents substrats et produire dans certaines conditions de température et d'humidité des molécules toxiques dénommées mycotoxines. Ces produits sont très toxiques pour l'homme et les animaux (**Mathew et al., 2011**).

III.2. Caractéristiques principales

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques, dont:

- ✓ Elles ont une paroi cellulaire formée par plusieurs couches disposées les unes sur les autres. Elles contiennent 80% à 90% de polysaccharides, le reste étant des protéines et des lipides (**Ripert, 2013**). La chitine est un composé spécifique de la paroi où elle représente le composé majeur. Néanmoins, chez certaines espèces la chitine peut être partiellement ou totalement remplacée par la cellulose. Elles ont de ce fait un rôle taxonomique important (**Botton et al., 1990**).
- ✓ Les moisissures sont caractérisées aussi par la présence de glycogène comme substance de réserve et l'absence de la chlorophylle (**Tabuc, 2007**).
- ✓ La reproduction et la dissémination des moisissures s'effectuent grâce à la formation des spores sexuelle ou végétative (**Guiraud et Rosec, 2004**).

III.3. Écologie

Les moisissures ont un rôle capital dans le cycle de la matière organique, elles participent à la formation de l'humus ; la couche supérieure du sol. Elles sont omniprésentes dans notre environnement (sol, eau, plantes...) et sont véhiculées par l'air, les matières premières, l'homme et les animaux. Il y a environ 99 000 espèces fongiques qui ont été décrites mais on estime que leur nombre total pourrait atteindre 5 millions (**Kupferschmidt, 2012**).

Les champignons filamenteux sont saprophytes capables de se développer sur de nombreuses matières premières et aliments transformés tels que les céréales, viandes, lait et produits laitiers, fruits, pain... Cette capacité résulte de leur aptitude à croître sur une gamme relativement large de pH, d'activité de l'eau (a_w) et dans une moindre mesure de température, à l'exception de certains champignons thermorésistants. Les moisissures sont capables de se développer à des a_w comprises entre 0.99 jusqu'à des a_w en dessous de 0.85 pour certaines moisissures xérophiles. Certains de ces contaminants sont capables de se développer à de basses températures (en dessous de 0 °C) et d'autres peuvent se développer jusqu'à 45 °C, comme par exemple *Aspergillus niger*. Du point de vue du pH, les différentes moisissures peuvent se développer sur une gamme de 2 à 8.5, avec des optimums se situant plutôt entre 4 et 6 (Pitt et Hocking, 1997).

III.4. Spores et cycle de vie

Les conidiospores, appelées également spores, sont les formes de reproduction asexuée des champignons filamenteux (Fig 9). Elles vont germer et émettre un filament qui va croître et se ramifier lorsque les conditions environnementales sont favorables et qu'il y aura une source d'alimentation disponible. Elles forment alors un nouveau mycélium, puis des conidiophores dans le cas d'un deutéromycète (D'Enfer, 1997).

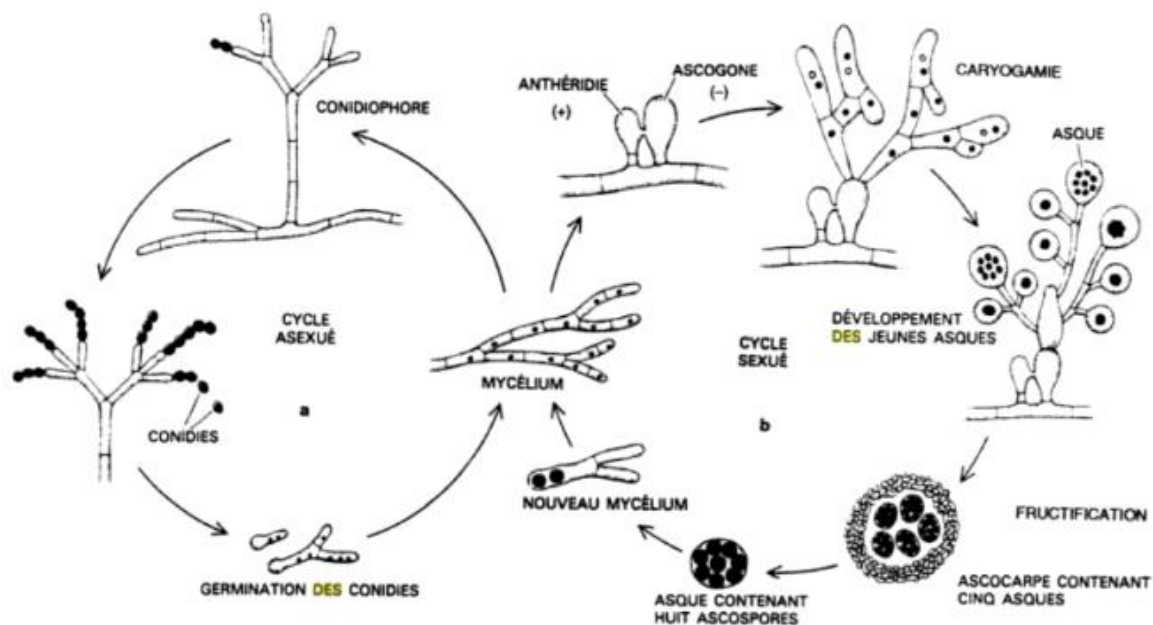


Figure 09. Schéma de la reproduction des moisissures (Meyer et al., 2004)

III.5. Les principaux genres des moisissures d'altération

III .5.1. Le genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes (**Chabasse et al., 2002**) appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Ils sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalin ou coloré, présentent un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores (**Fig 10**) dressés, terminés en vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou les phailides. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes *aspergillaires* à l'examen microscopique des colonies (**Fig 11**) (**Chabasse et al., 2002 et Reboux et al., 2010**). Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, ces genres comprend de 180 à 250 espèces selon les auteurs dont seules *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, et *A. niger* sont considérées comme thermotolérantes (**Reboux et al., 2010**).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques (**Botton et al., 1990**).

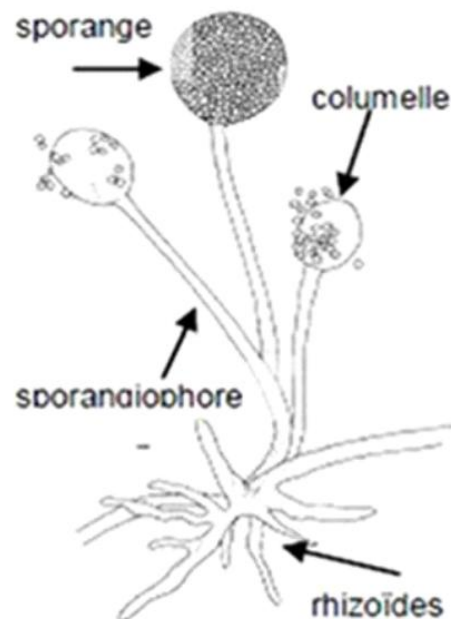
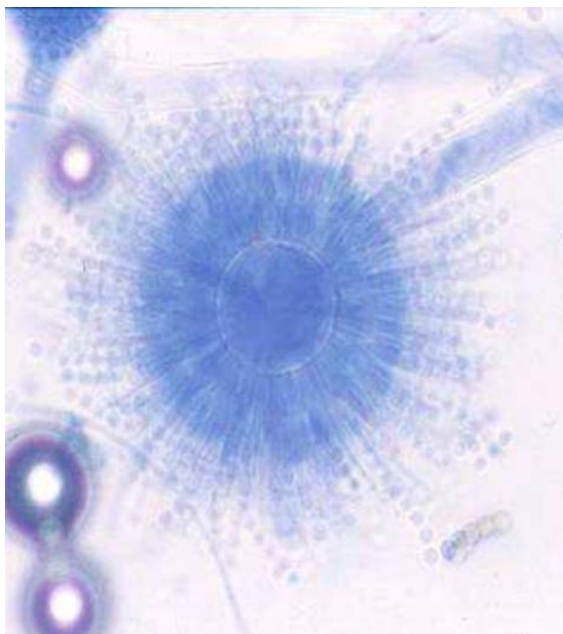


Figure 10. Observation microscopique d'une tête aspergillaire (Reboux, 2008)

Figure 11. Appareil reproducteur des mucorales (Dufresn et St-Germain, 2013)

III .5.2. Niveau de contamination des aliments par les *Aspergillus*

Les céréales sont les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par le genre *Aspergillus* (Peterson et al., 2008) en raison de leur capacité de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d'humidité (Mathew et al., 2011). Ces espèces de stockage se multiplient plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000).

Dans le cas des grains de blé stockés: *A. niger* et *A. fumigatus* sont les plus fréquemment observées. Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température d'environ 70°C, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *A. restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%. Au-dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que: *A. repens* et *A. ruber* prédominent et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Mathew et al., 2011).

III .5.3. Le genre *Penicillium*

De tous les champignons, c'est probablement le genre *Penicillium* qui est le plus ubiquitaire. Il comporte plus de 200 espèces qui se rencontrent partout de l'équateur aux pôles (Reboux et al., 2010). Ce genre se caractérise par l'aspect du conidiophore (Fig 12,13) qui est divisé en articles rappelant ainsi la forme d'un pinceau (Champion, 1997). Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées (Botton et al., 1990).

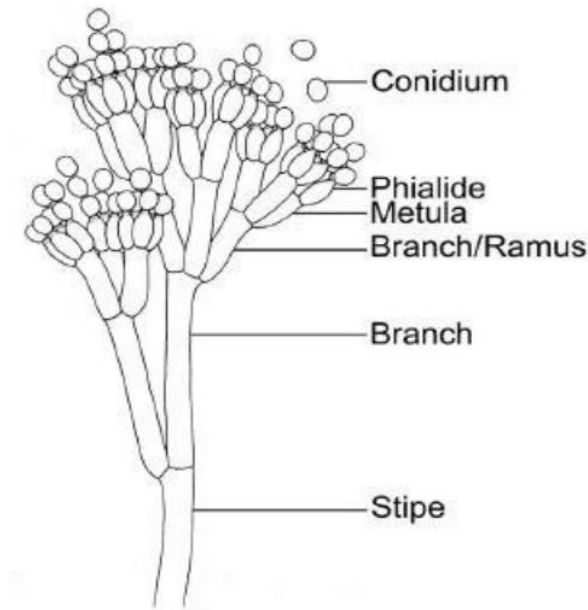


Figure 12 :schéma d'un *Penicillium*
(Visagie et al., 2014)

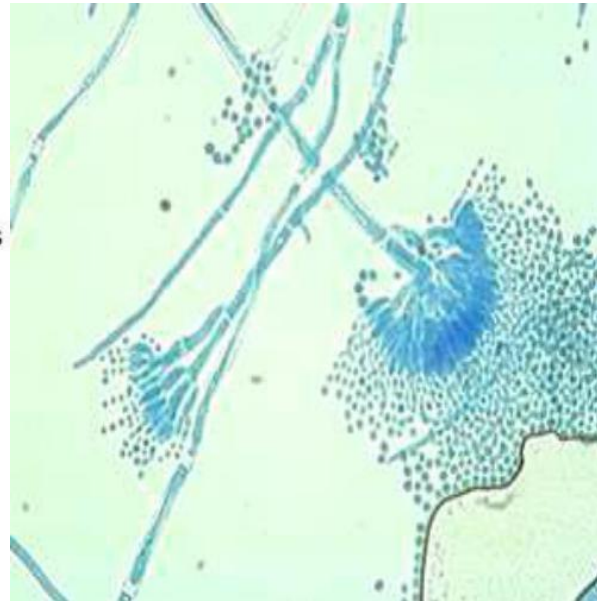


figure 13 : observation microscopique
d'un *Pénicillium* (Reboux et al., 2008)

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

III .6. Les mycotoxines

III .6.1. Généralités

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant « poison ». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faible concentration, d'induire un effet toxique (Roboux, 2006). Ce sont des métabolites secondaires produits à la fin de la phase stationnaires et phase de déclin. Les mycotoxines peuvent se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (Ruppel et al., 2004 et Ashiq et al., 2015).

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxicogène. Elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines de ces champignons (Chapelend et al., 2005).

Les mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicité aiguë et chronique allant de la mort à des

effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil pulmonaire, ainsi que sur le système digestif et rénal (**Pitt, 2000**).

III .6.2. Nature et origine des mycotoxines

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents :

✓Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.

✓Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions. Ainsi, l'acide coumarique, présent en faible concentration peut être transformé par différentes moisissures en 4-hydroxycoumarine, puis en dicoumarol, anticoagulant puissant.

✓La toxine est un métabolite propre de champignon : aflatoxine, zéaralénone (**LeBars. 1998, Guerre et al., 2000**).

III .6.3. La mycotoxinogénèse

La mycotoxinogénèse est définie comme étant l'ensemble de facteurs de synthèse et d'excrétion des mycotoxines. La synthèse des mycotoxines, encore appelée toxinogénèse, est un processus d'une grande complexité. Il semblerait qu'il s'agisse d'une réaction du champignon face à des conditions environnementales stressantes (température, humidité trop élevées ou trop basses). La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. D'une manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (**Blumenthal, 2004 ; Bouras et al.2016**).

III .6.4. Les différents types des mycotoxines

Plus de 150 champignons mycotoxinogènes sont actuellement connus, la plupart appartenant aux genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. Puisque la plupart des espèces mycotoxinogènes peuvent produire plus d'une mycotoxine, environ 300 à 400 mycotoxines ont été découvert jusqu'à présent. En raison de leur haut degré de structure, diversité et origines biosynthétiques, classer ces mycotoxines est plutôt difficile. Les principales mycotoxines sont les aflatoxines, fumonisines, trichothécènes (types A et B), ochratoxines,

alcaloïdes de l'ergot, citrinine, patuline et zéaralénone et ses métabolites (Pamel *et al.*, 2010 et Gomez *et al.*, 2020).

III .6.4.1. Les Aflatoxines

Les Aflatoxines sont produites essentiellement par *Aspergillus flavus*, et apparaissent sur de nombreux produits crus tels que les céréales, les épices, les figues et les olives (Roussos *et al.*, 2006). Parmi la vingtaine d'aflatoxines recensées, quatre seulement se retrouvent dans les aliments (Aflatoxines B1, B2, G1, G2). Les Aflatoxines sont à l'origine de nombreuses pathologies dont le cancer du foie, l'hépatite chronique, la jaunisse et la cirrhose. Il existe aujourd'hui dans la plupart des pays des contrôles réguliers et systématiques de la teneur en aflatoxines des principaux produits primaires (céréales, fruits secs...). Le lait et la viande sont également très contrôlés (Le Bars, 2000 ; Milita *et al.*, 2010 ; Akaki *et al.*, 2018), La condition optimale pour la production d'aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus* sont 33 ° C et l'aw de 0.99 (Milani, 2013).

Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1. Parmi les aflatoxines, l'AFB1 (Fig 14) est la plus fréquente et la plus toxique (Diakite *et al.*, 2017).

Les aflatoxines ont des effets cancérigènes, tératogènes, hépatotoxiques, mutagènes et immunosuppresseurs. Le foie est le principal organe affecté, ils sont associés à la fois à une toxicité aiguë et chronique cancérogénique dans les populations humaines et animales (Bennet et Klich., 2003).

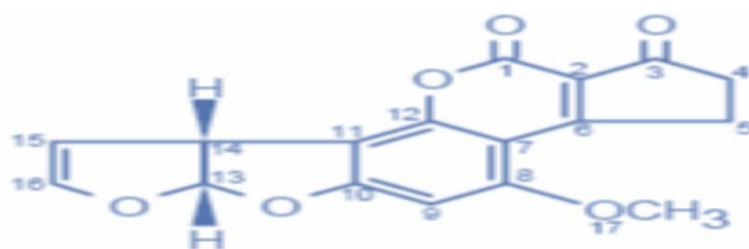


Figure 14. Structure chimique d'Aflatoxine B1 (Yiannikouris *et al.*, 2002).

III .6.4.2. Les Ochratoxines

Parmi les ochratoxines, l'ochratoxine A (OTA) (Fig 15) est la plus toxique, la plus fréquente et la mieux connue, les autres membres de cette famille comme, par exemple les ochratoxines B, C, α et β ont une structure semblable à celle de l'OTA, mais sont moins toxiques et beaucoup plus rares (Brochard *et al.*, 2009 ; Mitchel *et al.*, 2004).

L'OTA est un dérivé de phénylalanine produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (Pitt et Hocking, 1997). Il est connu par ses propriétés néphrotoxiques, cancérigènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt, 2000). L'OTA est sécrétée par des moisissures de genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*) ou *Penicillium* (*P. verrucosum*). Les *Penicillium* sont particulièrement présents dans nos régions aux climats tempérés et humides et peuvent donc infester des cultures céréalières telles que l'orge, le blé, l'avoine, le seigle ou vivrières (légumineuses) sur pied ou lors du stockage des grains (Frisvad et al., 2004).

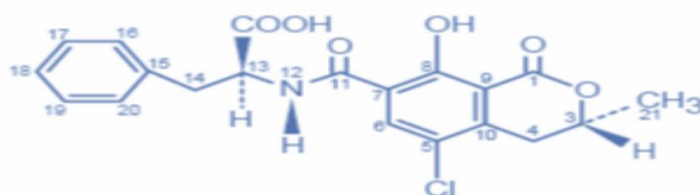


Figure 15. Structure chimique de l'ochratoxine A (Yiannikouris et al., 2002).

III .6.4.3. La patuline

La patuline (Fig16) a été isolée pour la première fois par Birkinshaw et al. en 1943 de *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium expansum*, c'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. Parmi les espèces d'*Aspergillus*, le nombre d'espèces productrices de patuline est limité à trois groupes : *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus* et *A. longivesica* (Puel et al., 2010).

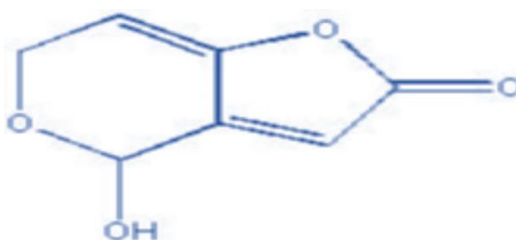


Figure 16. Structure chimique de patuline (Zain, 2011)

III .6.4.4. Les fumonisines

Les fumonisines (Fig17) produites par différentes espèces de *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum* et *F. 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 cheveux contaminés par leur avoine (**Chapelend-Leclerc et al., 2005**). Les fumonisines sont largement présentes comme contaminants dans le maïs, le riz, les figues, la bière, et autres produits. Les températures de 15 à 30 ° C et l'activité de l'eau de 0,9 à 0,995, ont été signalées comme des conditions optimales pour leur production (**Sanchis et Magan, 2004**).

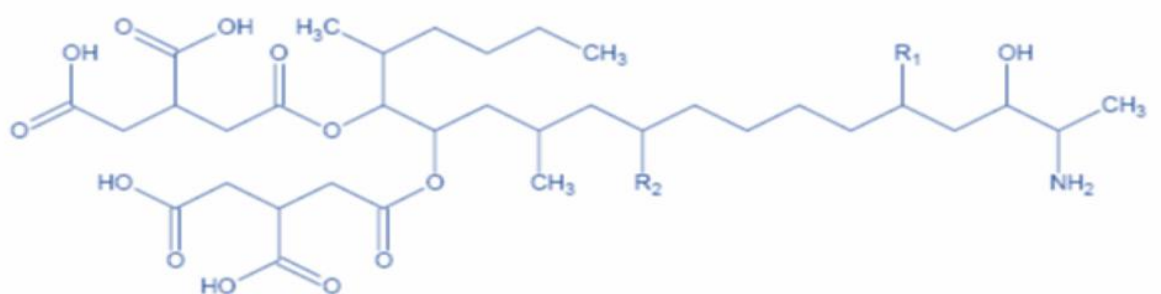


Figure 17. Structure générale des fumonisines (**Yiannikouris et al., 2002**)

III .6.4.5. La zéaralénone

La zéaralénone (**Fig18**) est une lactone de l'acide resocyclique, c'est une toxine oestrogène, également produite par *Fusarium graminearum*. L'effet de la zéaralénone chez les animaux est un syndrome bien défini, elle provoque des problèmes génitaux en particulier chez les porcs. Les symptômes comprennent l'hyperémie et gonflement oedémateux de la vulve en prépubère cochettes ou, dans les cas plus graves, prolapsus du vagin et rectum. La zéaralénone a été impliquée dans plusieurs incidents de changements pubertaires précoces chez les enfants (**Pitt et al., 2000 et Desjardins et al., 2006**). C'est un stimulant potentiel de la tumorigenèse du sein humain, de plus, il est hépatotoxique, hématotoxique, génotoxique et immunotoxiques (**Gao et al., 2013 ; Hueza et al., 2014 et Achiq, 2015**).

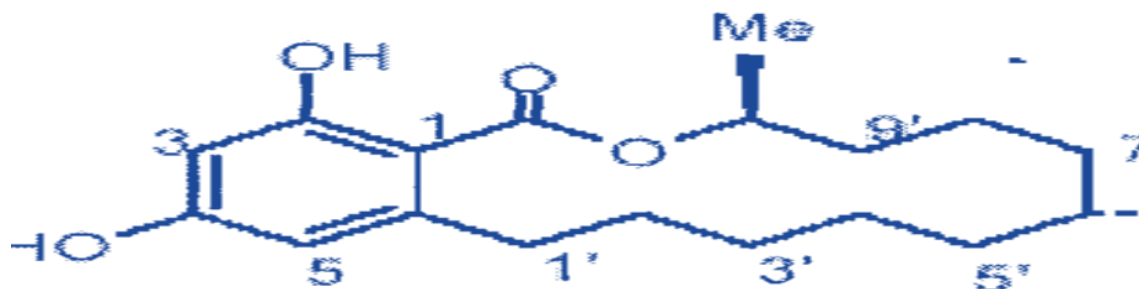


Figure 18. Structure chimique de la zéaralénone (**kim et al., 2000**).

Chapitre II :
Matériels Méthodes

I. Matériels :**I. 1. Bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques ont été principalement fournies par Mr ZABOURI enseignant au département des sciences Alimentaires à l'université de Mostaganem, identifiées par la biologie moléculaire.

Tableau4: Déchiffrement des souches lactique.

Les souches	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Eterococcus faecium</i>	<i>Eterococcus lactis</i>
Chiffres	4.18	35/ 14.2	10

I .2. Les souches fongiques :

Les souches pathogènes d'*Aspergillus* et *Penicillium* utilisées au cours des manipulations proviennent d'un isolement effectué à du pain qui sont présentant les symptômes d'une maladie fongique.

I .3. Milieux de Culture :

Les principaux milieux de culture utilisés au cours des expériences sont les suivants:

- **MRS Agar (Man, Rogosa et Sharpe):** Le milieu MRS gélifié (pH 6,5) est utilisé pour le repiquage des souches lactiques et la réalisation des tests d'inhibition.
- **MRS bouillon:** Ce milieu (pH 6,4) a été utilisé pour la revivification des souches lactiques et la production des métabolites extracellulaires anti-fongiques .
- **PDA (Potato Dextrose Agar):** Le milieu gélifié pomme de terre glucosé (pH 6 ,5) est préparé au laboratoire pour le repiquage des espèces fongiques et aussi la réalisation des tests d'inhibition.

Le milieu agaré généralement utilisée pour identifier les mycètes isolés.

I .4. Les réactifs :

Les réactifs utilisés lors de notre étude sont les suivants:

- ✓ Cristal violet, Lugol, l'éthanol et Fuschine pour la coloration de Gram.
- ✓ l'huile à immersion pour l'observation microscopique.
- ✓ Bleu de méthylène.
- ✓ L'eau distillée stérile.

I .5. Matériel et Appareillages

Les appareils utilisés lors de notre étude sont les suivants:

- ✓ Autoclave .

- ✓ Bain marie .
- ✓ Etuve .
- ✓ Réfrigérateur .
- ✓ Vortex électrique .
- ✓ Balance .
- ✓ Plaque chauffante .
- ✓ Microscope optique .
- ✓ Micropipette .
- ✓ Cellule de Malassez.
- ✓ Papier PH

II. Méthodes :

II.1.les souches fongiques :

II .1.1.Echantillonnage à partir de pain contaminé :

La méthode est fait dans des conditions stérile, les parties malades sont découpées séparément en petits morceaux à l'aide d'un spatule stérile. Par la suite, ces morceaux sont déposés dans des boîte de pétri, contenant le milieu PDA. Les boîtes sont mises à incuber sous une température de 27°C pendant 6 à 7 jours.



Figure 19 : Pain contaminé par des moisissures

II .1.2.Le repiquage successif :

Pour la purification des souches fongiques, il suffit de prélever avec une anse stérile quelques spores ou un fragment mycélien à la marge de chaque colonie et de transférer l'inoculum

individuellement sur une nouvelle boîte de milieu PDA+ANT (pour minimiser la contamination), puis Les boîtes sont scellées avec du papier cellophane. L'incubation est réalisée à une température 27°C, pendant à 5-7 jours.

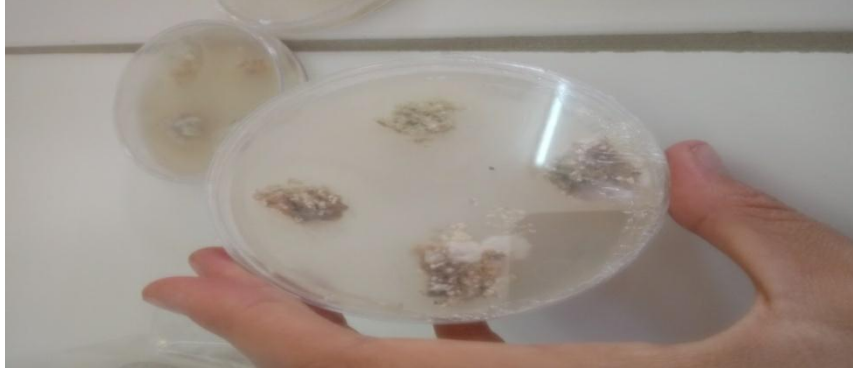


Figure 20 : Isolement de l'agent pathogène de pain

II. 1.3.technique de culture monospore :

Cette technique permet d'obtenir une culture pure à partir des spores fongiques par étalement sur un milieu aga.

- la souche à monospore est repiquée dans une boîte contenant du milieu PDA et laissée se développer sur la totalité de la surface de la boîte pendant 06à 07 jours.

- Un explant est prélevé à partir de la périphérie de la boîte et introduit dans un tube contenant 09 ml d'eau distillée stérile, après agitation, une suspension sporale est obtenu à partir de laquelle des dilutions au dixième sont réalisées comme suit :

- 01 ml de la suspension sporale est prélevé puis introduite dans un tube contenant 09 ml d'eau distillée stérile. Cette opération est reproduite autant de fois jusqu'à la dilution volume.
- A partir des deux dernières dilutions (10^{-4} et 10^{-5}), 01 ml, est prélevé puis étalé à l'aide de billes stériles sur milieu agar
- Après 24h d'incubation à 27°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, le repérage et la délimitation des spores en germination sont effectués. Ces dernière sont prélevées à raison de 03 à 04 conidies puis déposées dans de nouvelles boîte de pétri contenant du milieu PDA puis incubées à 25°C pendant une semaine

II .1.4.Préparation de suspension monosporale :

La champignon est cultivé sur milieu PDA à 30° C pendant 5 jours, puis 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte, cette suspension est filtrée et dénombrée par cellule de Malassez.

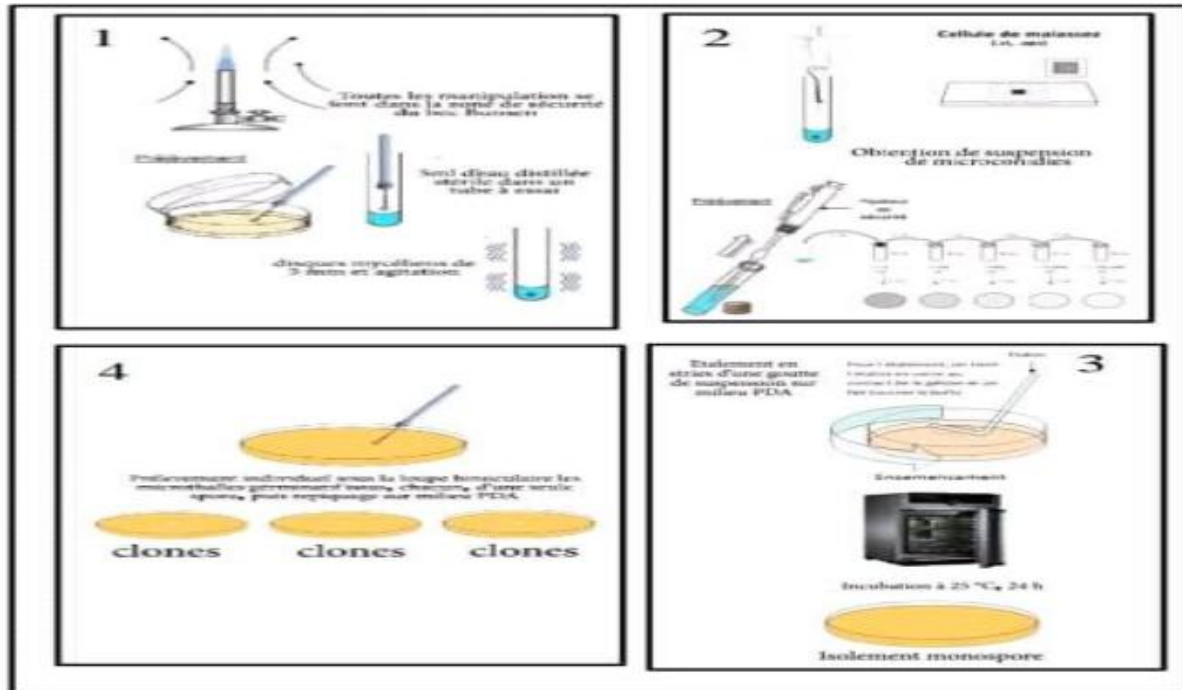


Figure 21: Les étapes de la technique monospore (d'après Booth, 1971 ;Bleabid, 2003).

II .1.5. Identification des champignons :

Les isolats fongiques sont identifiés par une étude macroscopique des caractères cultureux sur milieu PDA et une étude microscopique des caractères morphologiques des cultures par observation au microscope photonique. L'examen direct au microscope photonique d'un fragment de culture de champignon âgé de 5 à 7 jours entre lame et lamelle, dans une goutte de bleu de coton permet d'observer l'aspect microscopique des échantillons.

II .2. Les bactéries lactiques

II .2.1 purification et repiquage :

Cette phase conduira à une souche pure est d'une importance capitale, toutefois elle est très délicate et comporte plusieurs étapes. La purification des bactéries lactiques est réalisée sur bouillon MRS à pH 6,2, puis incubées pendant 24 à 48 h à 30°C . après incubation on voit un anneau clair au fond de tube .Après repiquage, un ensemencement a été réalisé sur MRS solide et incubé 24 h à 30°C. Après incubation, on prend d'une colonie à l'aide d'une anse de platine et déposée dans un tube à essai contenant le milieu 9 ml MRS liquide. après

plusieurs repiquage jusqu'à pureté totale les souches purifiées sont examinées à l'œil nu , puis on procède directement à la coloration de Gram.

La coloration de Gram a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie et leur mode d'association.

II .2.2. Conservation des souches lactiques :

II .2.2.1. Conservation a courte durée :

Chaque souche estensemencée sur gélose MRS inclinée et incubée à 30°C pendant 24h.les cultures sont conservées à 4°C pendant plusieurs semaines. Mais un repiquage périodique reste nécessaire.

II .2.2.2.Conservation de longue durée :

Elle se fait par ensemencement des souches dans des Eppendorf, les cultures lactiques jeunes à raison de 70% additionné de 30% de glycérol et on les place dans le congélateur à - 20°C.

II .2.3. Identification des souches utilisées :

L'identification des bactéries lactiques est établie en se basant l'étude de leurs caractères morphologiques (examens macroscopique et microscopique).

II .2.3.1. Test macroscopique :

Ce test se manifeste par l'observation à l'oeil nu sur gélose adaptée pour chaque souche et noter la couleur; la taille et l'aspect des colonies (**Bey, 2009**). L'observation macroscopique est faite après 24heures d'incubation à 37°C sur gélose MRS pour les bactéries lactiques .

II .2.3.2. Test microscopique :

L'aspect microscopique consiste à observer la forme, taille, le mode d'association et le type de Gram des cellules après coloration de Gram. Cette dernière est une coloration classique en microbiologie, elle permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif (**Benbou, 2012**).

II .2.3.3.coloration de Gram :

L'observation microscopique au grossissement (x100) après coloration de Gram permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Elle permet aussi d'observer la morphologie et l'arrangement cellulaire (**Larpent, 1997**).

Sur une lame propre on fait un étalement de la souche à tester à l'aide d'une anse de platine, qu'on fixe par la chaleur, la coloration se fait en recouvrant la lame par le violet de Gentiane pendant 1min, puis on jette le colorant et on ajoute le lugol et on laisse agir pendant 1min, on décolore ensuite par l'alcool et on ajoute le deuxième colorant, la fushine qu'on laisse agir

pendant 1min et on lave à l'eau. Enfin, on sèche la lame et on observe à l'immersion x100 (Larpent, 1997).

II .3.Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques :

II .3.1. Préparation de la culture de 18 h des souches lactiques :

A partir d'une culture jeune sur des boites de gélose MRS, nous avons prélevé quelques colonies avec la pipette Pasteur que nous avons suspendues dans un tube à essai contenant 05 ml de bouillon MRS (pH 6.5), puis incubé à 37°C pendant 18 heures.

II .3.2. Méthode de confrontation :

Tout d'abord un strie de chaque culture lactique est déposé sur des boites de Pétri contenant le milieu MRS puis incubées à 30°C pendant 48h. Ensuite un disque de 5mm de champignon est déposé dans la même boite qui est incubée une autre fois à 30°C pendant trois jours. Après incubation, le diamètre de croissance du champignon est mesuré (Gerbaldo *et al.*, 2012)

II. 3.3. Méthode des stries :

La souche lactique estensemencée en un strie dans une boite de Pétri contenant le milieu MRS, puis incubée à 30°C pendant 48h. Les colonies obtenues seront ensuite recouvertes par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar (0.7 % d'agar) contenant 0,1 ml de suspension monosporale (103 spores/ml). Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition seront évaluées autour des stries de bactéries selon les critères suivants : (-) : absence de zone d'inhibition ; (+) : Zone d'inhibition comprise entre 0,1 à 3 % de la surface de la boite de Pétri ; (++) : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8 % de la surface de la boite de Pétri ; (+++) : Zone d'inhibition supérieure à 8 % de la surface de la boite de Pétri (Magnusson *et al.* 2003).

II .3.4. Méthode des puits :

Tout d'abord les surnageants de chaque souche lactique cultivée dans un bouillon MRS (30°C- 18h) sont préparés après centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min. La filtration du surnageant est faite en utilisant un filtre Millipore de 0.22 µ est nécessaire prévenir la croissance des cellules bactériennes.

Sur la surface gélosée d'une boite de Pétri, contenant 10 ml de MRS agar recouvert par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar contenant la suspension monosporale (103 spores/ml), des puits sont creusées en utilisant l'emporte pièce. Ensuite, 100 µl des surnageants de chaque culture ont été déposés dans les puits.

Le témoin négatif correspond au milieu de culture non inoculé. Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition sont calculées autour de chaque puits (**Laref, 2014**).

II .3.5. Test in situ sur pain au sourdough :

Les 2 souches *Lb. plantarum* et *E. faecium* et une autre souche témoin ont été d'abord cultivées dans 9 mL de bouillon MRS, à partir de tubes cryoconservés. Après croissance pendant 24h à 30 °C, 100 µL de la pré-culture a étéensemencée dans 9 mL de bouillon MRS et les tubes ont été incubés pendant 18h à 30°C. Les cellules ont été par la suite, lavées deux fois avec du sel de tryptone à travers une centrifugation à 5000g pendant 5 min et remises en suspension dans 40 ml d'eau du robinet stérile.

Afin de préparer 1 Kg de sourdough, 410g de farine de blé bio T80 (Golden Oatmeal, France) a été mélanger avec 460 mL d'eau de robinet stérile, 60g de saccharose, 30g NaCl Et 40 mL de l'inoculum bactérien ajusté à $2,5 \times 10^8$ UFC/mL. Après homogénéisation manuel pendant 5 min, les flacons ont été incubés à 30°C pendant 48h (**Dal Bello et al., 2007**). Le pH,des sourdough a été mesuré avant et après 48h de fermentation à partir d'échantillon de sourdough de 10 g.

Afin d'évaluer la croissance des BL et des potentielles levures (contaminants). Un dénombrement à partir de plusieurs échantillons de sourdough fermenté pendant 48h, a été fait sur le milieu MRS pour les BL et YGC (extrait de levure, glucose, chloramphénicol) pour les levures. Tout d'abord plusieurs tubes contenant 9mL d'eau physiologique stérile ont été préparés et à partir des échantillons de sourdough, des dilutions décimales ont été réalisées. Après comptage des boîtes 10-5, 10-6, 10-7 et 10-8 , les concentrations ont été calculées avec cette formules :

$$\text{Nombre de cellules UFC/ml} = \text{Nombre de colonies} \times 1/V \times 1/D$$

V est le volume d'ensemencement et D la dilution prise en compte, seulement les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été prises en compte (Guiraud, 2003)

Pour la préparation 1 Kg de pain au sourdough, 450 g de farine de blé Bio T80 (**Golden Oatmeal, France**) a été mélangé avec 210 mL d'eau de robinet stérile, 300 g (30%) de Sourdough fermenté, 12 g de saccharose, 12 g de NaCl et 10 g de la levure déshydratée *Saccharomyces cerevisiae* (Levure de boulangerie Carrefour, France). Après homogénéisation pendant 3 min de tous les composants, la pâte a été pétrit pendant 20 min dans une machine à pain (Moulinex OW240E30, France) puis mise dans une barquette stérile et couverte pour une

fermentation pendant 1h30min à la température de la pièce ($\approx 24^{\circ}\text{C}$). Ensuite, la pâte a été découpée selon les dimensions souhaitées (18 cm x 9 cm x 5 cm) ensuite recouverte pour une deuxième fermentation de 1h30min à la température de la pièce ($\approx 24^{\circ}\text{C}$). Une fois terminé, le pain a été cuit au four (Carbolite-Gero, France) à 220°C pendant 40min (**Russo et al., 2017**). Finalement, après 1h de refroidissement, le pain a été découpé en morceaux de dimensions précises (4 cm x 1 cm x 4 cm) et mis dans des boîtes de Petri de 140mm (4 morceaux par boîte). 2h après la cuisson, le pH de la mie a été mesuré avec l'électrode de surface (Eutech instruments, Singapore), ainsi que l'aw avec un Aw-mètre (Novasina, France).

Quant au pain témoin sans sourdough, ce dernier a été préparé de la même manière que les pains au sourdough. Cependant, les concentrations d'ingrédients utilisés étaient différentes.

Tableau 05 : concentration des ingrédients utilisés pour la production du pain avec et sans sourdough

Ingrédient (g/kg ou ml/kg)	Pain sans sourdough	Pain au sourdough
Farine	600	450
Eau	360	210
NaCl	12	12
Saccharose	12	12
Levure	10	10
Sourdough		300
Eau totale	360	360

Les morceaux de pain ont ensuite été contaminé artificiellement par inoculation en surface de 50 spores des cibles fongiques *Aspergillus tubingensis* AN et *Aspergillus flavus* T5. Les boîtes de Pétri ont ensuite été scellées avec du papier parafilm, transférées dans une grande boîte (avec un couvercle) contenant de l'eau distillée à 20% de glycérol afin de maintenir une aw stable dans le pain. Les boîtes ont été après incubées pendant 5 à 10 jours à 25°C . Des pains témoins positifs sans cibles fongiques et témoins négatifs avec cibles fongiques mais sans BL antifongiques, ont également été préparés, 4 morceaux de pain ont été utilisés pour chaque analyse. L'activité antifongique des différentes souches a été évaluée en comptant les jours de retard de la croissance fongique sur pain au sourdough en comparaison avec les témoins négatifs et des photos ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique durant tout le temps d'incubation.

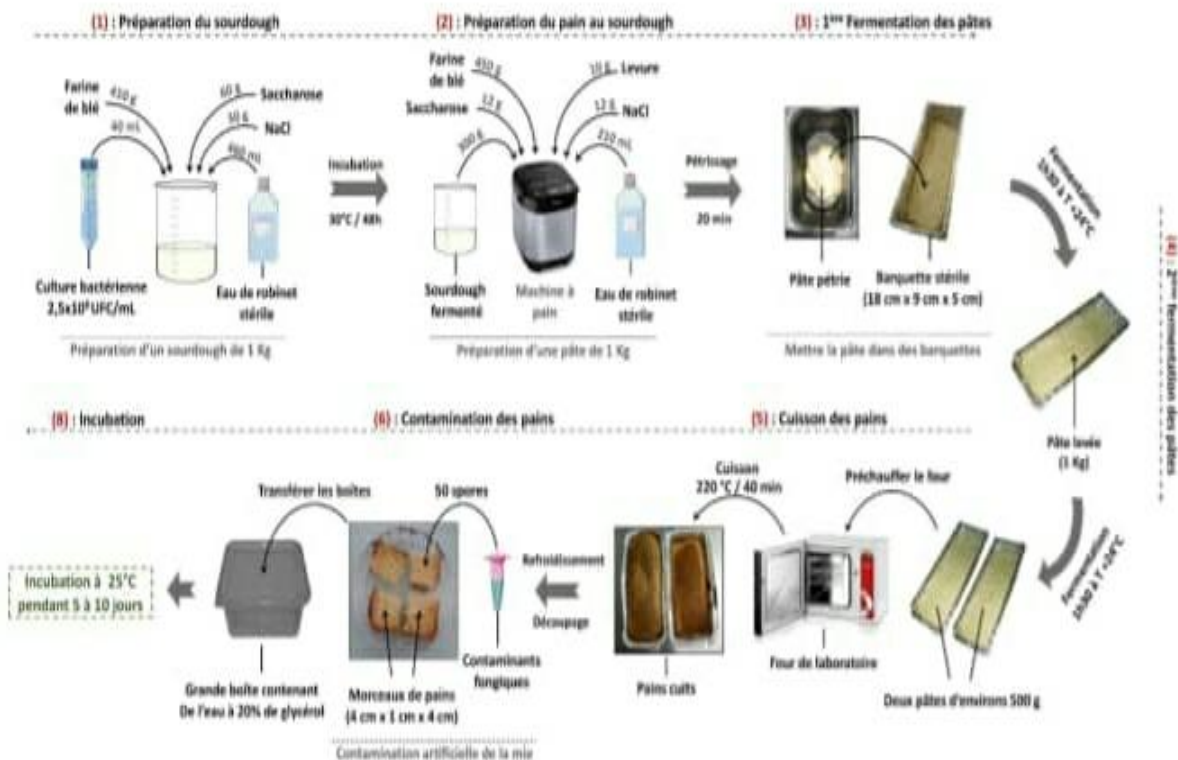


Figure22 : Schéma représentant les étapes de préparation de pain au sourdough et des tests *in situ*

II .3.6.Tests sensoriels

Avant l'évaluation sensoriels des pains au sourdough, un contrôle microbiologique a été effectuée afin d'éviter tous les dangers potentiels sur la santé des 30 participants. 4 germes ont été recherchées *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positive*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*

II. 3.6.1.Evaluation sensorielle de pain au sourdough

Les tests sensoriels ont été fait sur les pains au sourdough. Tout d'abord, 15 mL des morceaux de mie de pain sans ou avec sourdough de dimension 4 cm x 1 cm x 4 cm, ont été distribués dans pots stériles. Par la suite, les pots ont été recouverts avec du papier en aluminium et étiquetés, chaque pot a eu un code attribué.. 30 personnes (non entraînées) ont participé et ont évalué le produit en fonction de 5 critères, la couleur, l'odeur, texture en bouche, goût et appréciation globale de l'aliment, mais aussi l'acceptabilité de produit et intérêt de consommation. Les 5 critères ont été notés sur une échelle hédonique de 1-8, ou 1 = je n'aime pas et 8 = j'aime beaucoup

II.3.7. Les substances antifongiques secrétées par les LAB :

LAB produisent de nombreux métabolites antifongiques tels que les acides organiques, le diacétyl, les antimycotiques bioactifs, peptides, acides gras, acides carboxyliques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, lactones, alcools, CO₂ et la reutérine qui ont la capacité d'inhiber la croissance fongique (**Crowley et al., 2013b**). Elles peuvent aussi dégrader les mycotoxines telles que ; les ochratoxines, les aflatoxines e (**Sadiq et al., 2019**).

La tendance de l'exploitation des souches de LAB comme agents antifongiques est plus fréquente dans presque tous les secteurs dont la boulangerie et des produits laitiers sont les plus courants.

Les acides organiques sont considérés comme les principaux métabolites des LAB qui affectent considérablement les champignons par l'inhibition de la croissance mycélienne.

Parmi ces acides organiques, l'acide lactique présentant une activité inhibitrice moindre contre les champignons par rapport à d'autres acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide propionique.

De plus, il a été déterminé que les acides lactique, acétique et propionique ont un effet sur le retard de croissance (λ) des moisissures . La combinaison de l'acide acétique avec les deux conservateurs propionate et sorbate a montré des effets antifongiques additifs contre *Aspergillus* et *Penicillium* dans les pains.

Ces acides, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et inhibent les systèmes membranaires de transport actif (**Sadiq et al., 2019**).

Chapitre III :
Résultats et discussion

Résultats :**III .1. Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :**

Lors de cette étude la confirmation de l'identité des souches est faite par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (Carr *et al.*, 2002).

III .1.1. Critères morphologiques :

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies circulaires, bombées et de couleur blanche, leur taille est d'environ 1mm à 2 mm de diamètre.



Figure 23 : Observation macroscopique des LB sur milieu MRS solide .

L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélée deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes, mais les bâtonnets présents des cellules associées en paires ou en courtes chaînette.

L'observation microscopique a montré que toutes les souches sont Gram positif.

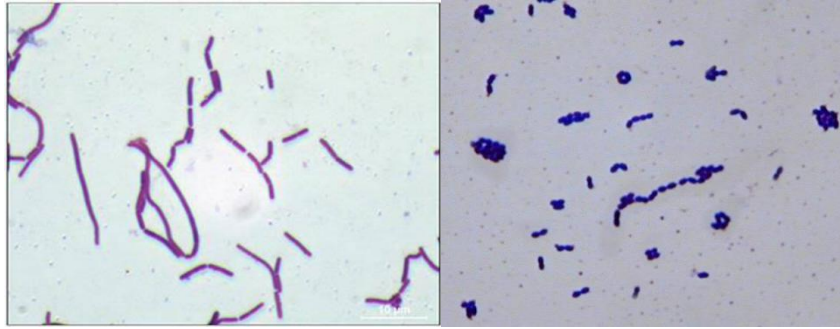


Figure 24: Observation microscopique de la souche *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus sp* après coloration de Gram (G x100).

III .2.Etude des caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures :

a- Les caractères morphologiques macroscopiques

Les isolats fongiques sont sélectionnés pour une caractérisation morphologique des colonies sur milieu pomme de terre agar (PDA). Après l'observation macroscopique, nous avons confirmés deux espèces des moisissures sont: *pénicillium* et *Aspergillus*.

-*Pénicillium* pousse doucement sur le milieu PDA, leur croissance est moyenne avec une colonie poudreuse de couleur verte pistache, le revers est blanc.

- *Aspergillus* pousse rapide sur le milieu PDA, leur croissance est fort avec une colonie de couleur noir.

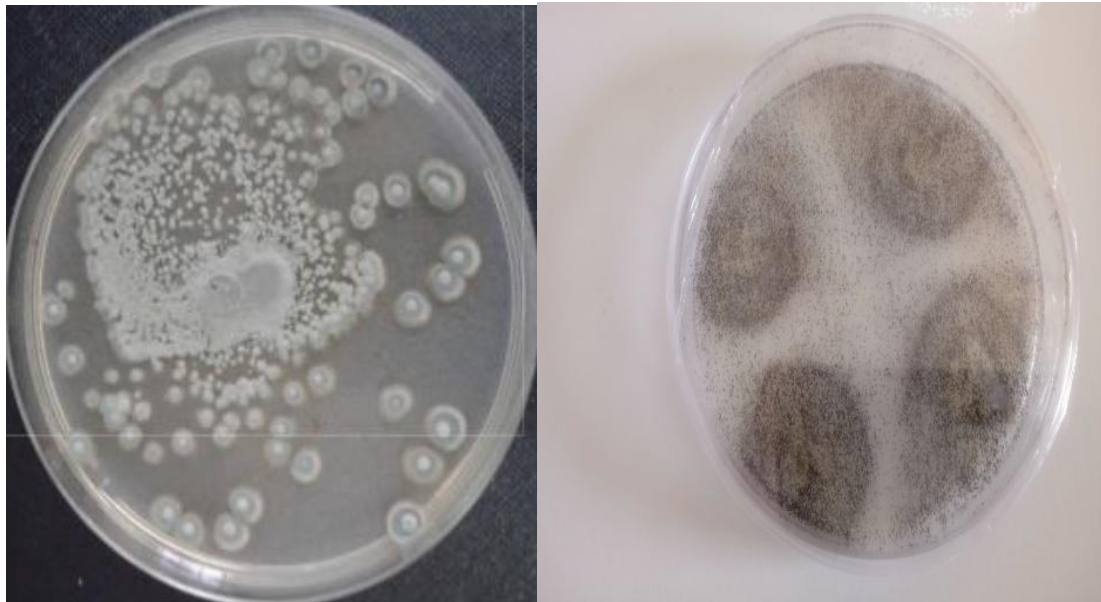


Figure25 : Observation macroscopique de *Penicillium* et *Aspergillus*

- **les caractères morphologiques microscopiques :**

-Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux. Le conidiospore ramifié possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes

-Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le talle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiospores dressés, terminés en vésicule.

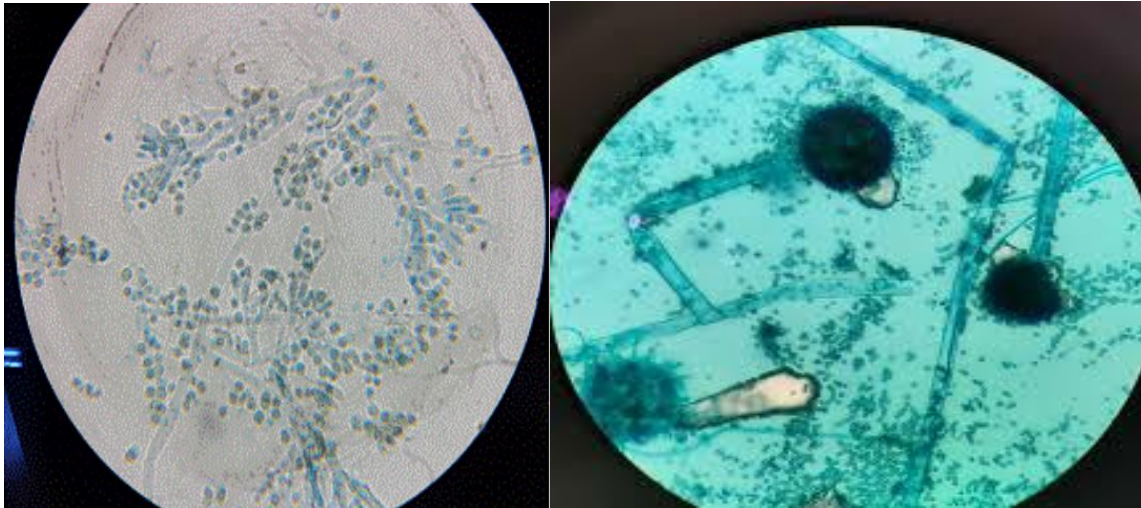


Figure26: Observation microscopique de *Penicillium* et *Aspergillus* (Bleu de coton X100)

III .3.La recherche de l'activité antifongique :

III.3.1 Méthode de confrontation :

L'activité antifongique à été déjà recherché par **Ouiddir, M.2019** qui étudie 194 isolats de BL par la méthode confrontation contre les moisissures *A. tubingensis* AN, *A. fumigatus* AF et *Talaromyces stollii* PM.

Cette étude a permis de pré sélectionner 30 souches dont 17 *Lactobacillus paracasei*, 2 *Lb. Plantarum* et 11 *Ln. mesenteroides*, .

A travers ses résultats nous montre que les BL de genre *Lb. Plantarum* a une forte activité antifongique contre les moisissure par rapport les autres souches .car les moisissures développent mais reste limitée et ne dépasse pas les stries de bactéries lactiques.

Tableau 05: Evaluation l'activité antifongique des BL par confrontation contre *A. tubingensis* AN, *A. fumigatus* AF et *Talaromyces stollii* PM.

Souches	<i>Aspergillus tubingensis</i> AN	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF	<i>Talaromyces stollii</i> PM
B07	+	-	-
B16	+	-	-
S8	-	+	+
S9*	-	+	+
S2	-	+	+
S3	-	+	+
B12'	-	+	+
B04	+	+	-
TE6	+	-	+
CH1	+	+	+
CH2	+	+	+

Quant à la souche *Lb. plantarum*, elle a déjà été décrite dans divers études en tant que souche forte à activité antifongique contre diverses moisissures comme celles du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Mucor* (Lavermicocca *et al.*, 2000 ; Magnusson *et al.*, 2003 ; Dal Bello *et al.*, 2007 ; Cheong *et al.*, 2014 ; Saladino *et al.*, 2016 ; Yan *et al.*, 2017)

III .3.2. Test in situ sur des pains au sourdough :

Les résultats ont été similaires contre l'*aspergillus*, le pain sourdough de *Lb. plantarum* était également le plus antifongique et a inhibé la cible pendant 2 jours.

Ceci est basé sur les résultats que vous obtenez (Ouidir, M.2019) Les tests in situ ont montré que le pain au sourdough pouvait ralentir la croissance des deux cibles fongiques *A. tubingensis* et *A. flavus*. En effet, *A. tubingensis* n'a pu croître qu'à partir du 5ème jour dans le pain *Lb. plantarum* et à partir du 4ème jour dans le pain *Ln. mesenteroides* L1 alors que dans le pain contrôle, la moisissure avait commencé à se développer à partir du 3ème jour.

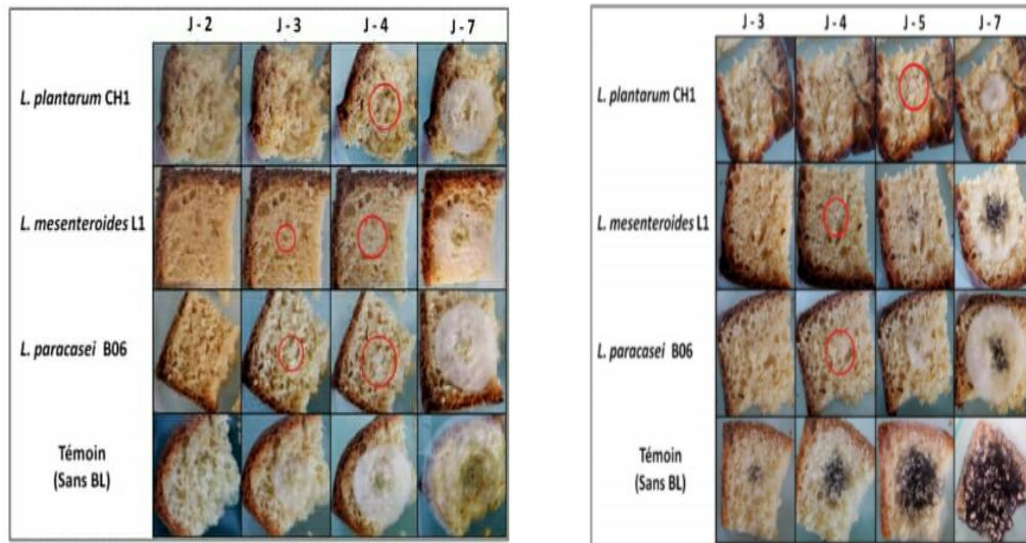


Figure 27 : Croissance de moisissure *A* et *P* sur pain sourdough fermenté par des LB et sur des pain sans sourdough(Ouiddir, M .2019)

III.3.3. Tests sensoriels

Les résultats des pains n'ont pas révélé grande différence entre les pains au sourdough et le pain sans sourdough. Statiquement les 30 personnes ont trouvé que le pain sans sourdough avait une couleur et une odeur plus attirante que les pains au sourdough. Cependant, le pain au sourdough *Lb. plantarum* CH1 a été le plus apprécié et le mieux noté de tous les pains et les légères différences étaient dans profil du goût et de la texture.

Ces résultats sont en accord avec la recherche de (Oiuiddir M, 2019) qui est fait sur du pain au sourdough.

Conclusion

Conclusion

La qualité sanitaire des produits alimentaires peut être menacée par toute une gamme de contaminants, incluant des toxines d'origine naturelle. Parmi celles-ci figurent les mycotoxines, responsables d'intoxications alimentaires, qui sont produites par des moisissures pathogènes.

Depuis ces dernières années, les méthodes de prévention utilisant l'antagonisme microbien sont en plein essor comme en témoignent les nombreuses publications parues chaque année sur ce sujet. En revanche, force est de souligner que ces méthodes sont encore dans la majorité des cas au stade expérimental. La prévention par les micro-organismes revêt deux aspects, elle peut se faire soit par utilisation directe des micro-organismes antagonistes, soit par application des produits finaux de leur métabolisme. L'utilisation de micro-organismes non pathogènes comme les bactéries lactiques, représente une solution efficace et saine.

Les bactéries lactiques, au statut généralement reconnu comme sûr, sont appréhendées comme un choix approprié pour être utilisés comme conservateurs naturels pour contrôler la croissance fongique et la production de mycotoxines. Les espèces des bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites antifongiques tels que : les acides organiques, la reutéline, les dipeptides cycliques, les acides gras, le peroxyde d'hydrogène, l'acide phényllactique, le dioxyde de carbone et les bactériocines. Ces métabolites sont aptes à inhiber la croissance fongique. Le potentiel de nombreuses espèces lactiques à éviter la détérioration associée aux champignons a été exploité dans une variété de denrées alimentaires et aliments pour animaux. En effet, la bio-préservation en utilisant les bactéries lactiques est une alternative très prometteuse, ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence de ces agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement.

Cette étude fournit les mises à jour les plus récentes sur l'intérêt des bactéries lactiques : leur innocuité que ce soit dans le domaine alimentaire ou sanitaire et leur capacité à servir l'activité antifongique et les substances anti-mycotoxiques, et ceci en vue de leur utilisation possible comme bio-conservateurs utiles dans l'industrie agro-alimentaire.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

Référence :

A

ABDERRAHMAN, H. (2015). Recherche des substances à activité antimicrobiennes produites par des souches bactériennes isolées à partir du lait bovin. Biologie, kasdi Merbah Ouargla. Master: 64.

Akaki D., Manizan M.A., Montet D., Brabet C., Koffi-nevry R. et Piro-Metayer I.(2018). Évaluation des pratiques culturelles de l'arachide favorisant la contamination par les aflatoxines dans trois régions de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological Chemical Sciences*. 12(4): 1590-1600.

Ammo, M.S., Mayo, B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76, 138–146

Ashiq S.(2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(2): 159–175

Axelsson, L. (2004). Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3ed edition) Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.

Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I., Hugas, M. (2000) Bacteriocin producing *lactobacilli* in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17: 33–45.

B

Basset, T. et Laffont, C. (2011). Les contaminations fongiques. *La Lettre de l'OCIM. Musées, Patrimoine et Culture Scientifiques et Techniques*, 138: 48-54.

Bacus, J. (1984) Update: meat fermentation. *Food Technology*. 38: 59-63.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R..(2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie* N°23.Pp :30 37.

Références bibliographiques

- Bennett J.W. et Klich M.(2003).** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 497–516.
- BENNAMA, R. (2012).** *Streptococcus thermophilus* : isolement et recherche systématique de souche indigènes productrices d'exopolysaccharides, Oran. Doctorat: 153.
- BELKHEIR, K. (2017).** Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactique isolées du lait de chamelle d'Algérie Réalisation de ferments lactiques. Génie microbiologique, Oran 1 Ahmed Ben Bella. Doctorat: 198..
- Belabid, L. (2003).** La fusariose vasculaire de la lentille (lens culinaris Med.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- Belyagoubi , L.(2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen, Algérie. 170p.
- Blumenthal Z.C.(2004).** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39 :214–228
- Brochard G. et Le Bacle C.(2009).** Mycotoxine en milieu de travail. *Institut National de La Recherche Scientifique*. 299-307.
- Brogden, KA. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250.
- Braegger C., (2002).** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant. *Paediatrica*, 13 : 50-53.
- Brul, S., Coote, P. (1999)** Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.

Références bibliographiques

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^{ème} éditions Masson: 16-400.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P.(1990). Moisissures utiles et nuisibles Importance industrielle. Ed : Masson. Paris. p512.

Bouras N., Guezlane-Tebibel N., Et Ould El Hadj M.D.(2016). Les Mycotoxines: Un Danger De Santé Public. *Algerian Journal of Arid Environment* .6(1) :32-49

BOULOUF, A. (2016). Technologie Alimentaire, Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza ». Technologie alimentaire, frères mentouri Constantine. Magister: 135.

Bonestroo, M. H., Dewit, J. C., Kusters, B. J. M., Rombouts, F. M. (1993) Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 311–320.

Bullerman, L. B. (1977) Incidence and control of mycotoxin producing molds in domestic and imported cheeses. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 31, 435–446.

C

Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B. et Penn P.(2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation de biologie médicale*. 25 :36-68

Champion R.(1997). Identifier les champignons transmis par les semences. Ed : *Quae*, France, 398p

Chang I, Kim J.D.,(2007), Inhibition of Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus casei*, *Mycobiology*, 35, 76-81.

Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T. et Villard J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Francophone des Laboratoires*. 373 :61-66.

Coallier-Ascah J, 1981, Effect of interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on the production of aflatoxin, ph.D thesis, Montréal, Québec, Canada.

Références bibliographiques

Coallier-Ascah J, Idziak E.S.,(1985), Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus Flavus* on Production of Aflatoxin, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 163-167.

Collins, A., Brown, J.S., Newman, S.E. (1989). Cognitive apprenticeship: Teaching the craft of reading writing and mathematics. In L.B. Resnick (Ed.), *Knowing, learning, and instruction: Essays in honor of Robert Glaser*. Hillsdale, NJ: Erlbaum *Community (3rd edition)*. Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

Crowley S., Mahony J., & van Sinderen . (2013).Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives.*Trends in Food Science & Technology*, P33(2), 93–109

D

Davidson, M. P. (2001) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 593–627). Washington: ASM press

De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.),

D'Enfert C. 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 21: 163-172.

Diakite A., Irie M.G.B., N'dri D.K. et Yapo J.A.(2017). Détermination De La Contamination Par L'aflatoxine B1 De La Pâte D'arachide Consommée Par La Population En Côte D'ivoire : Intérêt De La Chromatographie Sur Couche Mince. *International Journal Biologcal Chemical Science*. 11(4): 1646-1654 .

DIB, W. (2015). Caractéristique et rôle probiotique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre : effet immunomodulateur chez la souris Balb/c, ORAN. Doctorat: 188.

Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, and H. Prevost.(2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(2): 564-582.

Références bibliographiques

DORTU, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires Wallonie-Europe. Doctorat: 155.

Dufresne P. et St-Germain G.(2013). Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire. Ed Laboratoire de Santé Publique du Québec. p57.

E

ELFAHRI, K. (2012). Release of bioactive peptides from milk proteins by *Lactobacillus* species, school of biomedical and health science. Doctorat: 133.

F

Farkas, J.(2001) Physical methods for food preservation. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and frontiers.pp. 567–592.

Feillet, P. (2000). Le grain de blé: Composition et utilisation. Editions Quae. Institut National de la Recherche INRA. Paris: 308.

Fennema, O.F., Hui, Y.H., Karel, M., 3 Walstra, P., Whitaker, J.R. (2004). Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books. New York: Marcel Dekker, Inc. 19–30.

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U. (1996) Moulds in foodspoilage. International Journal of Food Microbiology, 33, 85–102.

Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .55(23) :32-9727

G

Gao F., Jiang L.P., Chen M., Geng C.Y., Yang G., Zhong L.F. et Liu X.F.(2013). Genotoxic effects induced by zearalenone in a humane embryonic kidney cell line. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 755(1): 6-10.

Références bibliographiques

Gerbaldo G.A, Barberisa C, Pascuala L, Dalceroa A, Barberisa L., (2012), Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiology Letter*, 332, 27-33

Gomez J.V., Tarazona A., Mateo F., Jiménez M., Romera D., et Mateoa E.M.(2020). Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food control*.118.

Gould, G. W. (1996) Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal Food Microbiology*. 33, 51–64.

Guiraud, J.P. et Rosec, J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98(6): 1316-1325.

H

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

Hueza I.M., Raspantini P.C., Raspantini L.E., Latorre A.O. et Gorniak S.L.(2014). Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins*. 6(3): 95-1080.

I

ISNARD, C. (2017). « *Enterococcus spp*: entre pathogènes opportunistes et probiotiques », , université de Caen Normandie, 299p., Caen Normandie. Doctorat: 299.

Image:(http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).

J

Jefca, (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2001) Safety Evaluation of CertainMycotoxins in Food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, WHO, Geneva, Switzerland, p. 366.

K

Références bibliographiques

Kim D.H., Lee C.S., Hyun W.J., Ko W.S., et Kim K.S.(2000).Fusarium fruit Rot of citrus in jeju. *Island Microbiology*.28(3) :158-162.

Kunz, B. (1989) Aspects in the use of starter cultures in meat products. Co MST-89: 176–180

Kupferschmidt K.(2012). Attack of the Clones. *Science magorg*. 337(6095) : 636-638.

König Helmut, Fröhlich Jürgen, 2009. Lactic Acid Bacteria In Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. König H. et al. (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 3-29 (URL: <http://link.springer.de/link/service/books>)

L

Langella, P., Nouillale, S., Commissaire, J., Bolotine, A., Gruss et le Loir Y. (2001). Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Lait 81, 19-28. Stiles, M. E., and Holzapfel, H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*.36: 1-29.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4084–4090.

LAZREG, L. (2017). Bactériocines d'entérocoques isolés de lait cru et beurre de l'ouest algérien, Oran. Doctorat: 193

Le Bars J. et Le Bars P.(2000). Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: Coffee biotechnology and quality. Sera T., Soccol C.R., Pandey A. et Roussos S. Ed : Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 355-368.

Legan, J.D. (1993) Moulds spoilage of bread: the problem and some solutions. *International. Biodeterioration. Biodegradation*. 32:33–53.

Leistner, L.(2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol*. 55(1-3): 181-186.

Références bibliographiques

Leveau, J.Y. et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.

M

Magnusson J, Schnürer J., (2001), Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, Applied and Environmental Microbiology, 67, 1-5. Novel,

Mathew, S., Thomas, G. et Ahmad, T. (2011). An evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal Journal of Biotechnology*, 1(1): 9-13.

MATAMOROS, S. (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid, NANTES. Doctorat: 189.

MAMECHE-DOUMANDJI, A. (2008). Purification et caractérisation de bactériocine produites par des bactéries lactiques autochones isolées, institut national agronomie. Doctorat: 111.

MAKHLOUFI, K. M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, pierre et marie curie – paris. Doctorat: 229

MAHI, M. (2010). Étude technologique des bactéries lactique isolées à partir du lait de Brebis Oran. Magister: 107

Mayra-Makinen, A. et Bigret. (1998). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). Lactic acid bacteria: microbiology et functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102.

MENAD, N. (2017). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de Salmonella sp, Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Doctorat: 196

Références bibliographiques

Meyer A., Deiana J. et Bernard A.(2004). Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed : Doin. 115- 172.

Milani J.M.(2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinary Medicine*. 58(8): 405–11.

Milita NM, Mihaescu G, Chifiriuc C, (2010). Aflatoxins health risk factors. *Bacteriologia Virusologia Parazitologia Epidemiologia*. 55 : 19-24.

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. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 439-445.

Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate, and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 453–460.

N

Nielsen, P. V., de Boer, E. (2000) Food preservatives against fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.), *Introduction to food- and airborne fungi* (pp. 357–363). Utrecht: Centraal Bureau voor Schimmelcultures

Niku-Paavola, M., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A. (1999) New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29–35.

Novel, (1993). Les bactéries lactiques, JY Leveau et M. Bouix, Microbiologie industrielle, Les micro-organismes d'intérêt industriel, Paris: Tec et Doc Lavoisier. 170- 374.

R

Références bibliographiques

Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L.(2010). Pollution atmosphérique, moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue française d'Allergologie*. 50 : 611–620.

Reboux G.(2008). Micro-organismes environnementaux en milieu agricole. *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU de Besançon*. 10-20

Ripert, C. (2013). Mycologie médicale. 2ème éditions. Technique and Documentation Lavoisier: 1-48.

Rodgers, S., P. Peiris, and G. Casadei.(2003). Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 66(4): 674-678.

RODRIGUEZ J. M., MARTINEZ M. I., HORN N. et DODD H. M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80, 101-116.

Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhe, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C., Ismaili-Alaoui, M. (2006).Characterization of filamentousfungiisolatedfrom olive and olive cake: Toxinogenicpotential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6): 500-506

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz J., et ZoonP. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International*.

Ruppel P., Delfosse Ph., Hornick J.L.(2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annale de Médecine Vétérinaire*. 148 :141-146

O

Olga, D. (2011).Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A p. 17-38.

Références bibliographiques

Orla-Jensen S., (1919). The Lactic Acid Bacteria. Dairy Bacteriology, Fred Host and Son, Copenhagen, Denmark

Ouiddir , M. (2019). Etude de l'activité antifongique des bactérie lactique et de biopréservation des aliment .doctorat d'Oran :78/211.

Ozenda, P. (2006). Les végétaux: Organisation et diversité biologique. Editions Dunod: 32-62.

P

Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A. et Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an UHPLC-MS/MS multi-mycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Springer*. 1-11.

Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C. et Samson, R.A. (2008). Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*: 32-57.

Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi,(2005). Bactéries lactiques In: Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments". Federighi M. Economica, pp: 219-242.

Pitt J.I. et Hocking A.D.(1997). Fungi and food spoilage. 2ème Ed. Blackie Academic and Professional, London.p 503.

Pitt J.I.(2000). Toxigenic fungi: which are important?. *Medical Mycology Suppl.* 38: 17-22.

Pitt J.I. et Hocking A.D. (1997). Fungi and food spoilage. 2ème Ed. Blackie Academic and Professional, London.p 503.

Prescott, L.M., Harley, J.P. et Klein, D.A. (1999). Microbiology, 4ème editions. New York: WCB / McGraw-Hill.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., (1999). Microbiology, 4th edn. New York: WCB/McGraw-Hill.

Pringsulaka, O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul K.,

Références bibliographiques

Rangsiruji A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547- 551.

Puel O., Galtier P. et Oswald I.P.(2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. 2 (4): 613–631

S

Sadiq, F.A ., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. et Chen, W. (2019).Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents. *Institute of Food Technologists*,p1541-4337.

Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.

Sanchis V. et Magan N.(2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. Mycotoxins in food. Detection and control. A volume in Wood head Publishing Series in *Food Science , Technology and Nutrition*. 174-189.

SAVADOGO, A. (2004). Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactique productrice d'exopolysaccharide isolée à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso,Ouagadougou. Doctorat: 143

Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. (1996) Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science Technol.* 71: 158-164.

Schillinger, U., Lucke F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

Stiles, M., Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp: 1-29.

U

Références bibliographiques

Union Européenne (2010/5) Règlement (CE) N° 1881/2006 ; N°105/2010 Teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A. Journal Officiel de l'Union Européenne

T

Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Bucarest, France.

V

Valerio F.,P.DeBellis, S.L.Lonigro, A.Visconti, Lavermicocca P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* spoilage, *Int.J.Food Microbiol.* 122 328–332.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407. 134

Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T. et Samson R.A.(2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycologie.* 78: 343- 371.

Y

Yiannikouris A. et Jouany J.P.(2002). Mycotoxins in feeds for ruminants ; fate and effects on animals. *Institut National de la Recherche Agronomique.* 15: 3-16.

Z

Zain M.E.,(2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society.* 15(2):129-144.

Annexes

Annexes :

Préparation du milieu de coulture « Potato Dextrose Agar (PDA) »

Ingrédients	L'unité
Pomme de terre	200g
Agar agar	20g
Glucose.	20g
L'eau distillé.	1000g

-La pomme de terre est épluchée, puis coupée en petit morceaux, puis jetées dans une Quantité suffisante d'eau distillée en ébullition et cuits pd 30 min.

-Après décantation, nous filtrons sur papier filtre, ce filtrat est ensuite ajusté avec l'eau Distillée jusqu'à un litre (1000 ml).

-On y ajoute du glucose, puis on stérilise le milieu à 120°C, pendant 20min.

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Ingrédients	L'unité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	<u>20g</u>
Tween 80	<u>1ml</u>
Phosphate dipotassique	<u>2g</u>
Acétate de sodium	<u>5g</u>
Citrate de sodium	<u>2g</u>
Sulfate de magnésium	<u>0.2g</u>
Sulfate de manganèse	<u>0.05g</u>
Eau distillée	<u>1000ml</u>

pH = 6.5.

Autoclavage : 120°C pendant 20 min.

Annexes

Milieu de culture MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Ingrédients	L'unité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillée	1000ml
Agar	15g

pH = 6.5. Autoclavage : 120°C pendant 20 min.

Milieu Agar 2 %

Ingrédients	Unité
agar	20g
Eau distillée	1000ml