

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة محمد الصديق بن يحيى – جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية

وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

Thème

**Screening de souches de bactéries lactiques à activité anti-
Aspergillus, isolées du blé fermenté traditionnellement**

Membres de Jury

Présidente: Dr Akroum S.

Examinatrice: Dr Laggoune S.

Encadrant: M^{me} Benhamada N.

Présenté par:

Bouhekrit Meryem

Zerroug Djahida

Boulahia Farida

Année Universitaire : 2018 / 2019

Numéro d'ordre (bibliographique)

Remerciements

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

Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.

Tout d'abord, nous remercions notre encadreur M^{me} Benhamada Nabila 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 la remercions vivement.

Nous remercions monsieur Khanouf T. pour son aide et ses conseils.

Nous remercions les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger notre modeste travail et de nous honorer: Dr Laggoune S. et Dr Akroum S.

Nous remercions également tous les membres des laboratoires de microbiologie de l'université de Jijel Mohammed Saddik Benyahia, qui nous ont bien aidés pour réaliser notre étude 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.



Tables des matières

Table des matières

Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Les bactéries lactiques

I.1. Définition.....	2
I.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques.....	2
I.3. Classification des bactéries lactiques.....	2
I.3.1. <i>Lactobacillus</i>	3
I.3.2. <i>Enterococcus</i>	3
I.3.3. <i>Lactococcus</i>	3
I.3.4. <i>Streptococcus</i>	3
I.3.5. <i>Leuconostoc</i>	3
I.3.6. <i>Pediococcus</i>	4
I.4. Intérêt et innocuité des bactéries lactiques.....	4
I.4.1. Demain alimentaire.....	4
I.4.2. Demain de la santé.....	5
I.5. Activité antimicrobienne et/ou antifongique des bactéries lactiques.....	5
I.5.1. Les acides organiques.....	5
I.5.2. Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	5
I.5.3. Le dioxyde de carbone (CO ₂).....	5
I.5.4. Le diacétyle.....	6
I.5.5. La production d'antibiotique (reutéline).....	6
I.5.6. Les bactériocines.....	6
I.5.6.1. Définition et classification.....	6

Table des matières

Chapitre II: Les moisissures

II.1. Définition.....	7
II.2. Caractéristiques principales.....	7
II.3. Le genre <i>Aspergillus</i>	7
II. 3.1. Caractéristiques des <i>Aspergillus</i>	8
II.3.2. Niveaux de contamination des aliments par les <i>Aspergillus</i>	8
II.3.3. Les mycotoxines.....	9
II.3.3.1. Définition des mycotoxines.....	9
II.3.3.2. <i>Aspergillus</i> et ces mycotoxines.....	9
II.3.3.3. Toxicité des mycotoxines.....	11
II.3.3.4. Lutte biologique des mycotoxines.....	12

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériels.....	13
I.1.1. Matériels biologiques.....	13
I.1.1.1. Souches bactériennes lactiques.....	13
I.1.1.2. Souches fongiques.....	13
I.1.2. Milieux de Culture.....	13
I.1.3. Produits chimiques et réactifs.....	14
I.1.4. Matériels et Appareillages.....	14
I.2. Méthodes.....	15
I.2.1. Revivification des souches lactiques.....	15
I.2.2. Confirmation de la viabilité et la pureté.....	15
I.2.2.1. Souches lactiques.....	15
I.2.2.2. Souches fongiques.....	16
I.2.3. Screening des différents isolats.....	16
I.2.3.1. Préparation de suspension monosporale.....	16
I.2.3.2. Test qualitatif: méthode de stries ou de double couches.....	16

Table des matières

I.2.3.3. Test quantitatif.....	17
I.2.3.4. Détermination du spectre d'inhibition de la souche lactique sélectionnée.....	17
I.2.3.5. Identification de souche lactique sélectionnée.....	18
I.2.3.6. Caractérisation physicochimique des composés anti- <i>Aspergillus</i>	19
Chapitre II : Résultats et discussion	
II.1. Revivification des souches	21
II.1.1. Souches lactiques.....	21
II.1.2. Souches fongiques.....	21
II.2. Screening des bactéries lactiques à activité anti- <i>Aspergillus</i>	22
II.2.1. Test qualitatif : Méthode de stries ou de double couches.....	22
I.2.2. Test quantitatif.....	25
II.2.2.1. Co-culture sur milieu solide.....	25
II.2.2.2. Mesure de l'activité anti- <i>Aspergillus</i> des métabolites extracellulaires.....	25
II.2.3. Détermination du spectre d'inhibition des souches lactiques sélectionnées.....	26
II.3. Identification de la souche lactique sélectionnée.....	27
II. 3.1. Examen macroscopique et microscopique.....	27
II. 3.2. Tests physiologiques et biochimiques.....	28
II.4. Caractérisation physicochimique des métabolites extracellulaire anti- <i>A. niger</i> produite par <i>Lactococcus sp.</i> (S011).....	30
II.4.1. Influence de la température.....	30
II.4.2. Influence du pH.....	31
II.4.3. Influence d'enzyme protéolytique.....	32
Conclusion.....	34
Références bibliographiques.....	35
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1: Mycotoxines et exemples de moisissures pouvant les sécréter.....	10
Tableau 2: Caractérisation des différentes souches lactiques isolées du blé fermenté traditionnellement.....	21
Tableau 3: Activité anti- <i>Aspergillus niger</i> des bactéries lactiques par la méthode de stries et ou de double couches.....	22
Tableau 4: Activité anti- <i>Aspergillus flavus</i> des cinq souches sélectionnées par la méthode de stries et ou de double couches.....	27
Tableau 5: Résultats des différents tests physiologiques et biochimiques de la souche sélectionnée.....	29
Tableau 6: Profil fermentaire des sucres pour la souche sélectionnée.....	30

Liste des figures

Figure 1: Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) des principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	9
Figure 2: Structure chimique des aflatoxines.....	11
Figure 3: Structure chimique d'ochratoxine A.....	11
Figure 4: Structure chimique de patuline.....	12
Figure 5: Aspect macroscopique d' <i>A. niger</i> (a) et d' <i>A. flavus</i> (b).....	22
Figure 6: Inhibition d' <i>Aspergillus niger</i> par les souches S005 (a: -), S006 (b: +), S018 (c: ++) et S011 (d: +++)......	24
Figure 7: Influence des souches S011, S015, S017, S030 et S032 sur la croissance d' <i>A. niger</i>	25
Figure 8: Mesure de l'activité anti- <i>Aspergillus</i> des surnageants des souches lactiques (S011, S015, S017, S030 et S032)......	26
Figure 9: Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) de la souche S011.....	28
Figure 10: Effet de température sur l'activité antifongique des métabolites de <i>Lactococcus sp.</i>	31
Figure 11: Effet du pH sur l'activité antifongique des métabolites de <i>Lactococcus sp.</i> (S011)......	32
Figure 12: Effet d'enzyme sur l'activité antifongique des métabolites de S011.....	32

Liste des abréviations

BL: Bactéries lactiques

Lc: Lactococcus

St: Streptococcus

Lb: Lactobacillus

Pc: Pediococcus

A: Aspergillus

P: Penicillium

NaCl: Chlorure de sodium

GC: Guanine Cytosine

ADN: Acide désoxyribonucléique

EPS: Exopolysaccharides

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

CO₂: Dioxyde de carbone

AF: Aflatoxines

OTA: Ochratoxine A

KDa: Kilo Dalton

DL₅₀: Dose létale de 50% de la population

pH: Potentiel d'hydrogène

ssp: Sous espèce

ADH: Arginine deshydrolase

MEVAG: Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

MRS: Man, Rogosa et Sharpe

PDA: Potato Dextrose Agar



Introduction

Introduction

La contamination fongique des aliments provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications biochimiques (modification des qualités nutritives). Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant principalement au genre *Aspergillus* présentes dans l'air ambiant, le sol, sur les cultures...etc. Elles sont capables, en se développant par exemple sur certains substrats tels que les céréales, de synthétiser et d'excréter des mycotoxines, contaminants naturels de la chaîne alimentaire, retiennent de plus en plus l'attention dans le monde entier, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé publique, la productivité animale et le commerce (**Wu, 2006**).

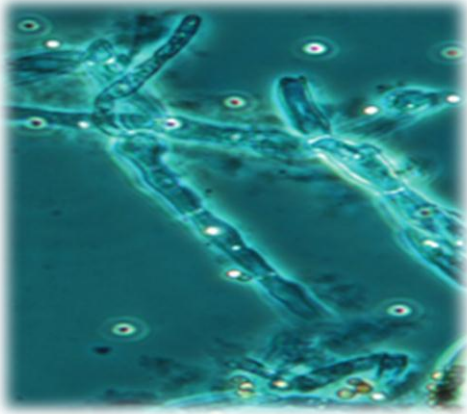
Les recherches concernant le contrôle biologique des moisissures phytopathogènes se sont intensifiées depuis ces dernières années. Le développement de ces méthodes permettrait de définir des stratégies de préventions plus respectueuses de l'environnement. Des substances d'origines naturelles biosynthétisées par des bactéries, des champignons ou des plantes supérieures se sont révélées être des sources importantes de molécules capables d'inhiber la croissance des moisissures (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité de produire des substances antimicrobiennes (**Leroy et De Vuyst, 2004**) telles que les acides organiques, qui font baisser le pH dans le milieu, la synthèse de bactériocines qui renforcent la conservation, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutérine et le peroxyde d'hydrogène (**Dortu et Thonart, 2009**), en plus de leur effet probiotiques qui leur permet de remplacer les additifs chimiques par des composés naturels, en même temps, fournir au consommateur de nouveaux produits alimentaires (**Leroy et De Vuyst, 2004; Salminen et al., 2004**).

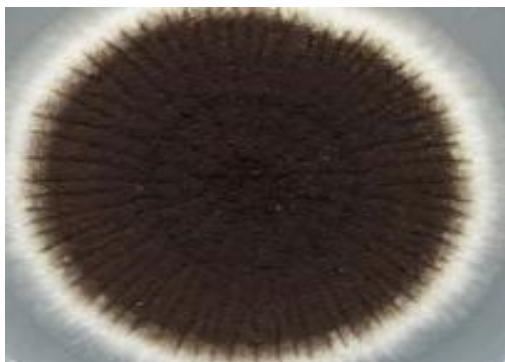
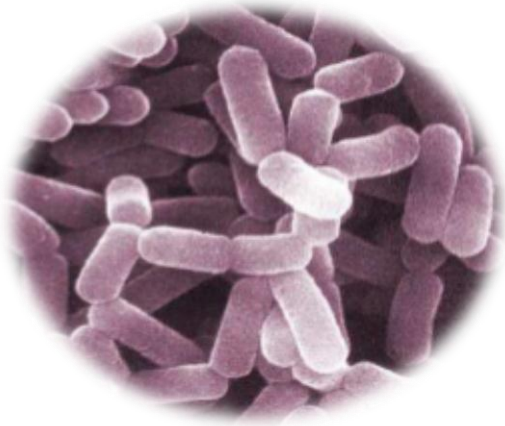
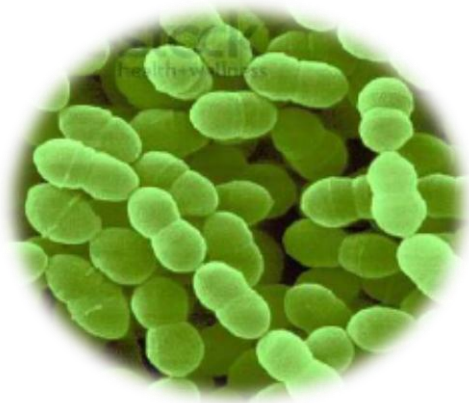
Sur le plan expérimental, peu de recherches sont consacrées à l'étude de l'activité antifongique des bactéries lactiques, pour cela, nous nous sommes intéressées à l'étude de cette activité en utilisant des bactéries lactiques du blé fermenté traditionnellement.

L'objectif de notre travail consiste à faire une sélection des bactéries lactiques du blé fermenté, capables d'inhiber la croissance de deux espèces du genre *Aspergillus*: *A. niger* et *A. flavus*. Il s'articule autour des points suivants:

- Evaluer qualitativement et quantitativement l'activité anti-*Aspergillus* des bactéries lactiques.
- Sélectionner la souche lactique la plus pertinente.
- Caractériser et identifier la souche lactique la plus efficace.
- Caractériser les inhibiteurs extracellulaires produits par l'isolat lactique en question.



*Synthèse
bibliographique*





Chapitre I:
Les bactéries
lactiques

Chapitre I: Les bactéries lactiques

I.1. Définition

Les bactéries lactiques (BL) sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes ou chimioorganotrophes (Axelsson, 2009). Le terme fait référence au fait que l'acide lactique est le produit final de la fermentation glucidique de ces bactéries (Björkroth et Koort, 2016).

I.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Les BL sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvées dans tous types d'habitat. Ce sont des bactéries à Gram-positif dont la teneur en guanine et cytosine (GC) est inférieure à 53% ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (Gonzalez et al., 2000). Ces bactéries peuvent avoir des formes de bâtonnet ou de coque, sont immobiles et ne sporulent pas. Elles ont également un métabolisme aérobie ou anaérobie, ne produisent pas de catalase, ne possèdent ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004; Zhang et Cai, 2014).

Les BL ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires et produisent d'autres composés (acétate et éthanol en général) en même temps que l'acide lactique (Drouault et Corthier, 2001).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique 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). Elles sont capables de croître à des températures inférieures à 5°C et supérieures à 45°C, le pH optimal de croissance varie entre 4 et 4,5 mais la prolifération peut s'effectuer à des pH compris entre 3,2 et 9,6 (Caplice et Fitzgerald, 1999).

I.3. Classification des bactéries lactiques

Les BL comprennent une large gamme de genres comprenant un nombre considérable d'espèces (Stiles et Holzappel, 1997), dont :

-Historiquement, le groupe comportait les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Stiles et Holzappel, 1997; Axelsson, 2004).

-Actuellement, les BL regroupent treize genres bactériens différents: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*,

Carnobacterium, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2009**), dont les plus étudiés sont: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (**Drouault et Corthier, 2001**).

I.3.1. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (leur GC varie entre 32% et 53%). Il contient plus de 120 espèces et 20 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement (**Zhang et Cai, 2014**). Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles, isolés ou en chaînettes. Ces bactéries peuvent se développer entre 2°C et 53°C avec un optimum compris entre 30°C et 40°C (**Mofredj et al., 2007**).

I.3.2. *Enterococcus*

Ce genre est formé d'espèces dont les contenus en GC sont voisins (37,5% à 44%). Par contre, si l'on se réfère aux taux d'hybridation ADN-ADN, elles apparaissent génétiquement différentes les unes des autres. Les entérocoques se présentent sous forme de coques en courtes chaînes. Elles ont la capacité de croître à une température entre 10°C et 45°C, à un pH alcalin de 9,6 dans une solution contenant 6,5% de NaCl (**Hancock et Gilmore, 2000**); ces caractéristiques sont utilisées pour leur identification (**Apha-Awwa-Wef, 2012**).

I.3.3. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lc. lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces: *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *Hordniae* (**Pot, 2008**). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C (**Tamime, 2002**). Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5 (**Zhang et Cai, 2014**).

I.3.4. *Streptococcus*

Ces microorganismes ont un contenu en GC de 35% à 46% (**Pilet et al., 2005**). Les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes qui ont une disposition en paires ou en chaînes longues. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables à se développer à 15°C et à pH de 9,6 (**Huys et al., 2012**).

I.3.5. *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* ressemble le plus étroitement au genre *Lactobacillus* (**Zhang et Cai, 2014**). Les espèces de ce genre s'arrangent en paires ou en chaînes. Leur température optimale de croissance se situe entre 20°C et 30°C avec un pH optimum de croissance égal à 6,5 et leur contenu GC sont assez voisins (37% à 45%) (**Tamime, 2002**).

1.3.6. *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques en paires ou tétrades. Elles sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose (Pilet et al., 2005). Elles ont un contenu en GC de 34% à 42% (Gurira et Buys, 2005). Sept espèces de *Pediococcus* sont connues: *Pc. acidilactici*, *Pc. damnosus*, *Pc. dextrinicum*, *Pc. inopinatus*, *Pc. parvutus*, *Pc. pentosaceus* et *Pc. urinaeequi*. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pc. halophilus*, renommée *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolèrent jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

I.4. Intérêt et innocuité des bactéries lactiques

Les BL ont un rôle central en plusieurs secteurs tel que: l'industrie alimentaire, pharmaceutique, l'agroalimentaire et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques (Belyagoubi, 2014).

I.4.1. Domaine alimentaire

Les BL sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation des différents aliments. Elles sont utilisées pour améliorer les caractéristiques organoleptiques des produits fermentés (Dortu et Thonart, 2009).

-La capacité des BL à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Welman et Maddox, 2003). La présence de ces souches productrices d'EPS dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour les différentes industries. Elles permettent ainsi d'améliorer la texture, de diminuer la synérèse et d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit (Ricciardi et Clement, 2000). La majorité des études portant sur la production d'EPS par les BL portent sur les genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Badel et al., 2011).

-La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des BL utilisée dans les industries alimentaires. Les BL interviennent par fermentation des substrats, en transformant les glucides en acide lactique (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004). Suivant les espèces, les sucres sont ensuite catabolisés selon deux voies différentes: soit la voie homofermentaire, soit la voie hétérofermentaire.

-Certaines BL sont capables de produire des composés d'arômes. La plupart de ces composés sont issus du métabolisme du citrate: l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (Tamime, 1990). Les lactobacilles (*Lb. helveticus* et *Lb. bulgaricus*) synthétisent de l'acétaldéhyde, la teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (Vignola, 2002).

I.4.2. Domaine de la santé

Dans le domaine de la santé, certaines BL spécifiques telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* sont utilisées comme probiotiques. Les probiotiques sont définis comme tous microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante exercent un effet potentiellement bénéfique sur la santé de l'hôte par amélioration des propriétés de la flore intestinale (**Salminen et al., 2004**).

Les souches lactiques probiotiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telle que les diarrhées, les allergies alimentaires et d'autres effets comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez les nourrissons, des propriétés anti-cancérigènes, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori* et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**Salminen et al., 2004**). Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en générale l'intestin et d'autre part agir (**Butel, 2014**).

I.5. Activité antimicrobienne et/ou antifongique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules capables d'empêcher la croissance de certains germes pathogènes (**Deegan et al., 2006**).

I.5.1. Les acides organiques

Les BL produisent différents types d'acides organiques comme: l'acide lactique, acétique et propionique au cours de processus de fermentation alimentaire par catabolisme des sources de carbone. Ces acides sous leur forme dissociée ou non dissociée agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en diminuant le pH du milieu intracellulaire ce qui provoque l'inhibition d'une partie de la flore indésirable dans l'aliment (**Cotter et Hill, 2003**).

I.5.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

En présence d'oxygène les BL sont capables de produire l'H₂O₂ par l'action des oxydases, de flavoprotéines et de superoxyde dismutase. Chez les BL la catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du H₂O₂ en oxygène et en eau, est absente et en conséquence l'H₂O₂ produit s'accumule dans l'environnement et peu inhiber certains microorganismes présents. L'inhibition se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures cellulaires protéiques (**Zalan et al., 2005**).

I.5.3. Le dioxyde de carbone (CO₂)

Les BL hétérofermentaires synthétisent le CO₂ comme métabolite secondaire. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les microorganismes aérobies. Le mécanisme de cette activité est mal connu, mais il a été suggéré que les décarboxylations enzymatiques étaient inhibées et que

l'accumulation du CO₂ dans la bicouche lipidique causait un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Ammor et al., 2006).

I.5.4. Le diacétyle

Le métabolisme du citrate permet la formation de diacétyle (2,3-butanedione) par l'intermédiaire du pyruvate principalement par des BL appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Karimi et al., 2012). Son activité antifongique a été démontrée chez *Lb. paralimentarius* PB127 par (Garofalo et al., 2012).

I.5.5. La production d'antibiotique (reutéline)

La reutéline est parmi les antibiotiques des BL (Talarico et al., 1990). Les BL ne peuvent pas dégrader le glycérol par la voie oxydative qui est incomplète chez elles. La seule voie de dégradation de glycérol se fait à travers la synthèse de la reutéline [3-hydroxypropionaldéhyde] (Blagojev et al., 2012).

I.5.6. Les bactériocines

Selon les auteurs les bactériocines des BL sont les plus abordées dans les recherches scientifiques. Ces substances protéiques sont des toxines à spectre d'action plus au moins large (Riley et Wertz, 2002).

I.5.6.1. Définition et classification

La définition la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexe de protéines (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactériocines produites par les BL sont réparties en quatre classes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action comme proposé par (Klaenhammer, 1993).

A. Classe I (Les lantibiotiques): Peptides de taille inférieure à 5 KDa, stable à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement (Dortu et Thonart, 2009).

B. Classe II: Ce sont des bactériocines de faible masse moléculaire inférieure à 10 KDa, thermostables et ne subissant pas de modifications post-traductionnelles. Cette classe a été divisée en trois sous classes: sous classe II A, II B et II C (Dridier et Prévost, 2009).

C. Classe III: Ont une masse moléculaire supérieure à 30 KDa et sont thermostables. Cette classe ne contient que quatre bactériocines (Helveticin, Enterolysine A, ZoocinA et Millericin B) (Nigutova, 2007).

D. Classe IV: Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique (Dortu et Thonart, 2009).



Chapitre II:
Les moisissures

Chapitre II: Les moisissures

II.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**).

II.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**).

II.3. Le genre *Aspergillus*

Dans la nature, les *Aspergillus* sont les principaux agents de décomposition de diverses substances organiques, de plusieurs maladies des plantes et de production des toxines indésirables (**Amaike et Keller, 2011**) qui peuvent contaminé divers produits végétaux et animaux (**Gugnani, 2003**). Les *Aspergillus* aient en général un mode de vie saprophytique, certains peuvent aussi être pathogènes ou commensaux dans les plantes cultivées (**Pitt et al., 2000**). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, physiologiquement et génétiquement proches (**Botton et al., 1990**). Les espèces d'*Aspergillus* les plus rencontrées à l'échelle mondiale sont A.

parasiticus, *A. flavus* et *A. Ochraceus* (**Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003**).

II.3.1. Caractéristiques des *Aspergillus*

Aspergillus fait partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des Hyphomycètes, famille des Moniliaceae (**Schuster et al., 2002**). Il est caractérisé par un appareil végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides (**Bennett, 2010**). Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (**Dijksterhuis et Wösten, 2013**) (figure 1). Alors les conidiophores sont un paramètre essentiel d'identification et de classification dans le genre *Aspergillus*. L'ensemble vésicule + métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire (**Bennett, 2010**).

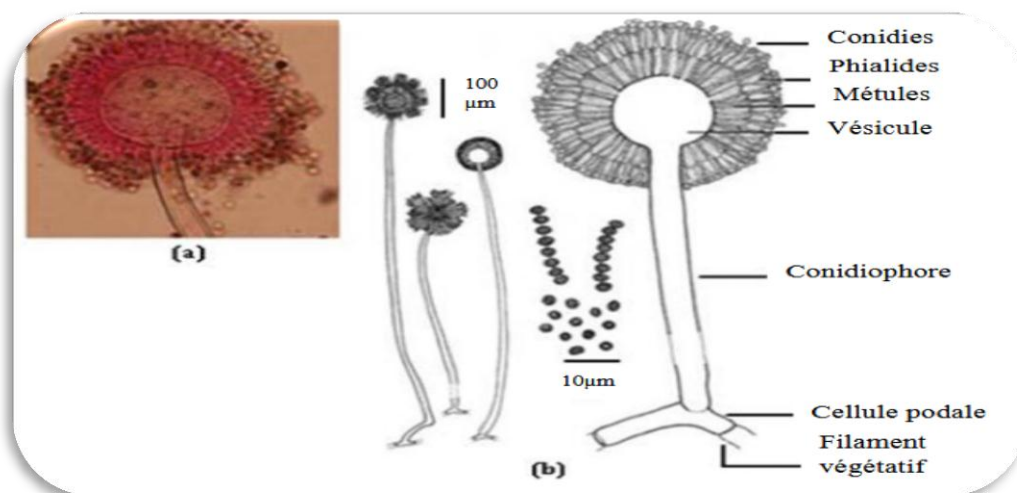


Figure 1: Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) des principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (**Pasqualotto, 2010**).

II.3.2. 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).

II.3.3. Les mycotoxines

II.3.3.1. Définition des mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec «mycos» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. Il s'agit donc des métabolites secondaires toxiques produits par certaines souches de moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

Les mycotoxines sont aussi des composés de faible poids moléculaire non volatils aux températures ambiantes. Elles sont secrétées par les moisissures pendant le processus de dégradation de la matière nutritive et sont supposées leur servir de défense contre les autres microorganismes et d'autres moisissures (Brochard et Le Bâcle, 2009).

II.3.3.2. *Aspergillus* et ses mycotoxines

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire des mycotoxines (tableau 1) responsables de pathologies humaines et animales, les espèces principales sont: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, et *A. parasiticus* (International Agency for Research on Cancer, 2000).

Tableau 1: Mycotoxines et exemples de moisissures pouvant les sécréter
(Brochard et Le Bâcle, 2009)

Mycotoxines	Moisissures
Acide cyclopiazonique	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. camemberti</i>
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. bombyci</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. pseudotamarii</i>
Citrinine	<i>A. oryzae</i> , <i>A. niveus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. terreus</i>
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. carbonarius</i>
Patuline	<i>A. clavatus</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. expansum</i>
Stérigmatocystine	<i>A. versicolor</i> , <i>A. niduans</i>
Toxinestrémorgènes	<i>A. clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i>

A. Les aflatoxines

Les aflatoxines constituent un groupe de dix-huit composés dont quatre sont les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments. Il s'agit des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (Figure 2) (Alshannaq et Yu, 2017). Trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2, *A. parasiticus* produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1, G2) et *A. nomius*, une souche rare proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines B et G. Les conditions les plus favorables à la production d'aflatoxines sont une activité en eau relativement faible (0,84 - 0,86) et une température élevée, comprise entre 25°C et 40°C (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

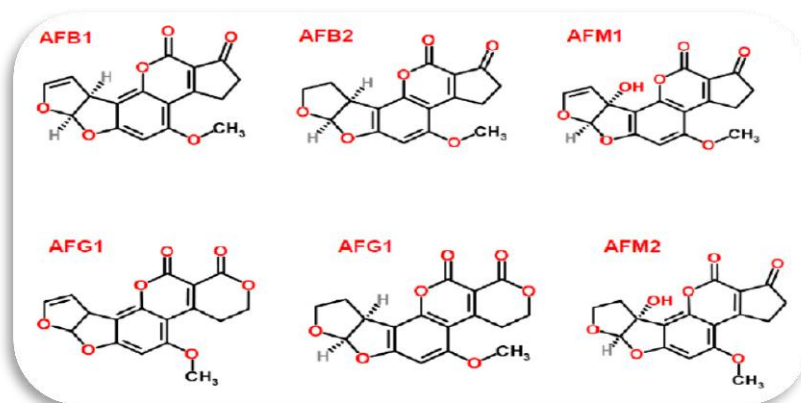


Figure 2: Structure chimique des aflatoxines (Alshannaq et Yu, 2017).

B. Les ochratoxines

La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important (Alshannaq et Yu, 2017). Leur développement a lieu au cours du stockage lorsque les conditions de conservation sont mauvaises (Pfohl-Leskowicz et al., 2002). L'ochratoxine A ou OTA (Figure 3) est produite par des *A. ochraceus* et *P. verrucosum* qui en fait un contaminant pouvant être produit dans des conditions assez variables. En effet, la température optimale de production de l'OTA par *A. ochraceus* est de 28°C, cette production étant fortement réduite à 15°C ou 37°C. Au contraire *P. verrucosum* développe et peut produire de l'OTA dans une gamme de températures qui varie de 4°C à 30°C. Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillium*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (Alshannaq et Yu, 2017).

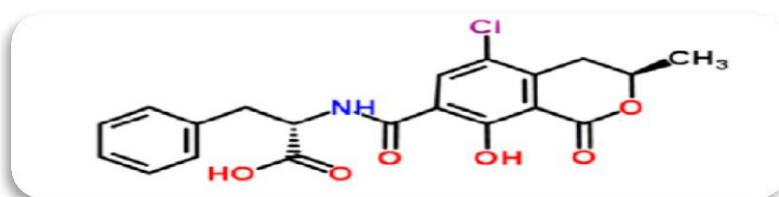


Figure 3: Structure chimique d'ochratoxine A (Alshannaq et Yu, 2017).

C. La patuline

La patuline (Figure 4) est une mycotoxine produite par de nombreuses moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* (Norma et al., 2001). C'est un contaminant fréquent des pommes abîmées et stockées ainsi que des ensilages. Sur le plan biologique, cette mycotoxine apparaît à petites doses comme un antibiotique à large spectre d'action, mais on l'abandonne à cause de sa toxicité. (Haumann, 1995).

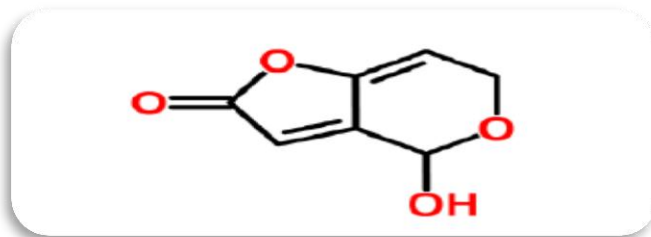


Figure 4: Structure chimique de patuline (Alshannaq et Yu, 2017).

II.3.3.3. Toxicité des mycotoxines

Les effets des mycotoxines sur la santé humaine et animale sont variés: Effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes, immunosupresseurs, oestrogéniques, nécrosants, neutrotoxiques et néphrotoxiques. Les organes et les tissus cibles sont très divers: foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines. Des lésions irréversibles peuvent être aussi produites (Wangicar et al., 2005).

Les mycotoxines sont responsables d'intoxications aiguës parfois mortelles, ou d'intoxications chroniques (Portelli, 2005).

A. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë se caractérise par la dose létale DL_{50} qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée (Hussein et Brasel, 2001).

Si la denrée alimentaire est très fortement contaminée les mycotoxines peuvent être responsables d'épisodes d'intoxication aiguë d'évolution éventuellement mortelle. Chez l'homme ce type d'intoxication aiguë reste exceptionnel (Portelli, 2005).

B. Toxicité chronique

Le danger des mycotoxines résulte d'une exposition chronique à de faibles quantités pendant une durée prolongée. La toxicité des mycotoxines dépend de la molécule en cause, de la fréquence d'exposition et de la quantité absorbée (Castagnero, 1999).

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles (Hussein et Brasel, 2001).

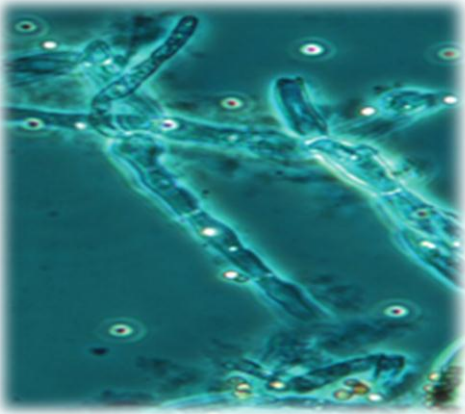
La patuline serait cancérigène chez l'animal. Sa génotoxicité n'est pas entièrement avérée et l'intoxication chronique par cette substance peut associer à des troubles nerveux (**Biing-Hui et al., 2003**).

II.3.3.4. Lutte biologique des mycotoxines

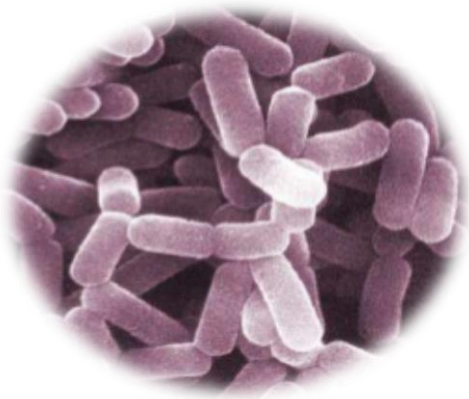
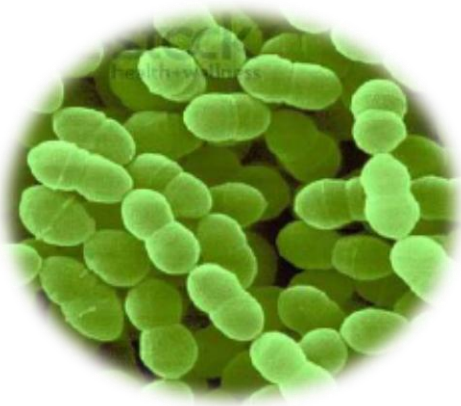
Les méthodes de lutte sont nombreuses et varient selon le type de mycotoxine, mais selon (**Galvano et al., 2001**) l'efficacité de chaque méthode doit être évaluée selon des critères spécifiques à savoir:

- Inactiver, réduire ou éliminer la toxine dans l'aliment.
- Ne générer aucun résidu toxique dans l'aliment.
- Ne pas altérer les propriétés technologiques et nutritionnelles de l'aliment.
- Etre techniquement et économiquement faisable.

Les méthodes biologiques restent encore moins étudiées. Selon (**Lopez-Garcia et Park, 1999**) ces méthodes ayant des propriétés de décontamination efficace, sont en général le résultat spécifique de produits par des microorganismes sélectionnées. Selon (**Bhatnagar et al., 1991**) la détoxification biologique des mycotoxines consiste en une transformation ou une dégradation enzymatique des toxines en produits moins toxiques. Une fois les microorganismes et les enzymes responsables de la détoxification sont découverts, les études doivent être focalisées sur le développement et l'optimisation des procédures sous divers conditions.



*Partie
expérimentale*





Chapitre I:
Matériel et méthodes

Chapitre I: Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire N°3 de microbiologie de la Faculté des Sciences de l'université Mohammed Soddik Benyahia de Jijel. Les expériences ont été menées depuis le 23 Avril jusqu'au 30 Juin 2019.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

I.1.1.1. Souches bactériennes lactiques

32 souches bactériennes lactiques isolées du blé fermenté traditionnellement par Madame Benhamada Nabila ont été utilisées au cours de nos essais.

I.1.1.2. Souches fongiques

Au cours de nos études deux souches fongiques de référence ont été fournies par Madame Bourzama (Université de Skikda) ont été utilisées:

-*Aspergillus niger* ATCC 10577

-*Aspergillus flavus* ATCC 9643

I.1.2. 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 gélosé (pH $6,5 \pm 0,2$) est utilisé pour le repiquage des souches lactiques et la réalisation des tests d'inhibition.
- ✓ **MRS bouillon:** Ce milieu (pH $6,4 \pm 0,2$) a été utilisé pour la revivification des souches lactiques et la production des métabolites extracellulaires anti-*Aspergillus*.
- ✓ **PDA (Potato Dextrose Agar):** Le milieu gélosé pomme de terre glucosé (pH $5,6 \pm 0,2$) est préparé au laboratoire pour le repiquage des espèces d'*Aspergillus* et aussi la réalisation des tests d'inhibition.
- ✓ **Milieu Gibson et Abdel Malek:** Utilisé pour la détermination du type fermentaire des bactéries lactiques.
- ✓ **Gélose semi-solide au lait citraté:** Sert à la recherche de la citratase chez les bactéries lactiques.
- ✓ **Lait de Sherman à 0,1% et à 0,3% de bleu de méthylène:** Utilisé pour étudier le pouvoir coagulant et la sensibilité des bactéries lactiques aux colorants.
- ✓ **Lait écrémé stérilisé citraté:** Pour étudier la production d'acétoïne par les bactéries lactiques.

- ✓ **Bouillon hypersalé à 4,5% et à 6,5% de NaCl:** Utilisé pour la sélection des lactocoques lactiques.
- ✓ **Gélose au sang de cheval:** Pour étudier l'aptitude à l'hémolyse des bactéries lactiques.
- ✓ **Milieu Môeller à arginine:** Pour la recherche de l'arginine deshydrolase.
- ✓ **Citrate de Simmons:** Pour la recherche de citratase.
- ✓ **Milieu MEVAG sans sucre:** Pour la réalisation des profils fermentaires des sucres.
- ✓ **Les sucres:** On a utilisé les 12 sucres suivants: glucose, galactose, saccharose, mannose, révulose, trehalose, inositol, salisine, adonitol, glycerine, cellobiose et ribose.

La composition des différents milieux de culture utilisés au cours de cette étude expérimentale est représentée dans l'annexe N°I.

I.1.3. Produits chimiques et réactifs

Les Produits chimiques et 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.
- ✓ Acide Chlorhydrique (HCl) et l'Hydroxyde de sodium (NaOH) pour l'ajustement de pH.
- ✓ Trypsine (from hog pancreas).
- ✓ Bleu de méthylène.
- ✓ Citrate de sodium.
- ✓ NaCl.
- ✓ L'eau distillée stérile.
- ✓ L'eau physiologique stérile.
- ✓ L'eau oxygénée (H₂O₂).

I.1.4. Matériel et Appareillages

Les appareils utilisés lors de notre étude sont les suivants:

- ✓ Autoclave (Pbibrand).
- ✓ Bain marie (Gerhardt et memmert).
- ✓ Etuve (memmert).
- ✓ Four Pasteur (memmert).
- ✓ Spectrophotomètre (JENWAY).
- ✓ Centrifugeuse (Sigma).
- ✓ Réfrigérateur (ENIEM).
- ✓ Vortex électrique (VWR).
- ✓ Balance (KERN).

- ✓ pH mètre (HANNA instrument).
- ✓ Plaque chauffante (Heidolph).
- ✓ Microscope optique (Olympus).
- ✓ Micropipette (Smart et Oragon).
- ✓ Cellule de Malassez.
- ✓ Filtre millipore à seringue (0,22 μ m).
- ✓ Papier Watman.

I.2. Méthodes

I.2.1. Revivification des souches lactiques

À partir de chaque souche conservée dans le glycérol, une culture a été prélevée et déposée dans un tube contenant 5 ml de bouillon MRS pour redémarrer leur croissance et leur capacité métabolique. Les tubes ont été par la suite incubés à 37°C/48H. Pour chaque souche nous procédons à l'étude du Gram et du catalase.

-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**).

-La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H₂O et ½ O₂ (**Guiraud, 2003**). Une goutte de H₂O₂ est déposée sur une lame qui contient une goutte de culture bactérienne prélevée à partir de bouillon MRS. La décomposition de H₂O₂ est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles.

I.2.2. Confirmation de la viabilité et la pureté

I.2.2.1. Souches lactiques

Les bactéries lactiques revifiées ont subi une étape d'isolement et repiquage sur gélose MRS, après l'incubation à 37°C/48H, une colonie de chaque souche a étéensemencée dans MRS bouillon.

I.2.2.2. Souches fongiques

Les deux souches fongiques *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* ont été ensemencées sur gélose PDA afin de confirmer leur viabilité et pureté. Après la période d'incubation à 25°C/5jours l'observation macroscopique et microscopique ont été effectués.

I.2.3. Screening des différents isolats

La recherche de l'activité anti-*Aspergillus* des isolats a été réalisée en premier lieu par un test qualitatif et les résultats obtenus ont été ensuite confirmés pour les cinq souches sélectionnées qui ont une activité anti-*Aspergillus* plus efficace par un test quantitatif.

I.2.3.1. Préparation de la suspension fongique

L'*Aspergillus niger* et l'*Aspergillus flavus* sont cultivés sur milieu PDA à 25°C pendant 5 jours, après l'incubation 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte, cette suspension est filtrée sur papier Watman pour l'obtention de la solution mère. La suspension fongique d'*A. niger* et d'*A. flavus* nécessaire pour ensemencer le milieu doit être fraîche et préparée par l'ajout de 1ml de suspension fongique à partir de la solution mère dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile pour l'obtention de dilution 10⁻¹. La concentration des spores de dilution obtenue est déterminée par comptage sur cellule de Malassez puis ajustée à 10⁶ spores /ml (**Magnusson et al., 2003**).

I.2.3.2. Test qualitatif: méthode de stries et /ou de double couches

Pour la recherche de l'activité anti-*Aspergillus niger* des souches, la méthode de stries ou de double couches décrite par (**Magnusson et al., 2003**) a été utilisée. Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries de 2 cm sur 15 ml de milieu MRS Agar préalablement coulés dans des boîtes de Pétri puis incubés en anaérobiose à 30°C/48H. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes avec 10 ml de milieu PDA (0,8% d'agar) contenant 10⁶ spores.ml⁻¹ d'*A. niger*. Après 72 heures d'incubation à 25°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour de chaque strie de bactéries selon les critères suivants:

(-): Absence de zone d'inhibition autour de chaque strie.

(+): Zone d'inhibition par strie comprise entre 0,1 à 3% de la surface des biotes de Pétri.

(++): Zone d'inhibition par strie comprise entre 3 à 8% de la surface des biotes de Pétri.

(+++): Zone d'inhibition par strie supérieur à 8% de la surface des biotes de Pétri.

I.2.3.3. Test quantitatif

A. Co-culture sur milieu solide

La méthode utilisée est une variante de celle décrite par (Florianowicz, 2001). Une colonie de bactérie lactique (isolat) a été activée dans 5 ml de bouillon MRS pendant 12 à 16 heures à 30°C. 200 µl de la culture obtenue ont été prélevés etensemencés en profondeur dans 15 ml de milieu PDA. Après solidification du milieu de culture, un disque stérile de 6 mm de diamètre a été déposé à la surface au centre, puis a été saturé avec 10µl de suspension de spores (10^6 spores.ml⁻¹). Les cultures ont été incubées à 25°C et le suivi a été réalisé pendant deux semaines.

Pour déterminer l'influence des isolats, la croissance des souches fongiques a été mesurée tous les deux jours.

B. Mesure de l'activité anti-*Aspergillus* des métabolites extracellulaires

La méthode utilisée est celle décrite par (Cabo et al., 2000) avec quelques modifications. 100 ml de milieu MRS bouillon contenu dans des Erlenmeyers de 250 ml ont été inoculés avec une culture d'une nuit (12 à 16 heures) de la souche lactique à 1% (v/v). La culture a été incubée à 30°C pendant 72 ou 120 heures. 20 ml de milieu de culture ont été prélevés et centrifugés à 10.000 g pendant 10 min puis stérilisés par filtration (millipore 0,22 µm). 2 ml du surnageant ont été prélevés et mélangés avec 15 ml de milieu PDA (concentration x 2). Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3µl de suspension de spores (10^6 spores/ml) ont été déposés à la surface du milieu puis l'ensemble a été incubé à 25°C pendant 5 jours. Le diamètre de la colonie fongique obtenue a été comparé à celui du témoin dans lequel le surnageant a été remplacé par de l'eau distillée stérile.

L'activité anti-*Aspergillus* est exprimée en termes d'inhibition de la croissance de colonie comme suite:

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

D_E: Diamètre de la colonie dans l'échantillon.

D_T: Diamètre de la colonie dans le témoin.

Les tests d'inhibition (test qualitatif et test quantitatif) ont été réalisés en triplicate.

I.2.3.4. Détermination du spectre d'inhibition de la souche lactique sélectionnée

Afin d'étudier le spectre d'inhibition des souches lactiques sélectionnées, les bactéries ont été testées vis à vis la souche fongique *A. flavus* ATCC 9643. La méthode d'inhibition qui a été utilisée est celle décrit au point (I.2.3.2).

I.2.3.5. Identification de souche lactique sélectionnée

L'identification de souche lactique sélectionnée (S011) la plus pertinente et efficace a été réalisée par des méthodes d'analyses classiques basées sur des critères phénotypiques (physiologiques et biochimiques).

A. Examen macroscopique et microscopique

-L'examen macroscopique est porté sur l'observation sur boîte qui permet de décrire l'aspect, la forme, la surface et la couleur des colonies.

-La coloration de Gram a été réalisée une deuxième fois pour confirmer le type de Gram.

B. Tests physiologiques et biochimiques

B.1. Test de croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Pour se faire, la souche sélectionnée a été incubée à deux températures différentes: 37°C et 44°C pendant 24 heures sur bouillon MRS. La croissance est révélée par la présence d'un trouble dans le milieu (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

B.2. Tests de croissance en milieux hostiles

B.2.1. Lait de Sherman

Il s'agit de tester l'aptitude des bactéries lactiques à pousser en présence de bleu de méthylène. Pour cela deux laits écrémés stérilisés ont étéensemencés l'un à 0,1% de bleu de méthylène et l'autre à 0,3% de bleu de méthylène, par la souche à tester. Après l'incubation à 30°C /24H, les observations relatives à la réduction du bleu de méthylène ont été notés (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

B.2.2. Bouillon hypersalé

La croissance en présence de différentes concentrations en chlorure de sodium donne des renseignements précieux pour l'identification. Pour réaliser ce test deux milieux hypersalés: à 4,5% et 6,5% de NaCl ont étéensemencés par la souche à tester, l'incubation se fait à 37°C /24H et la croissance se traduit par apparition d'un trouble (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

B.2.3. Recherche de l'arginine deshydrolase (ADH)

Pour la recherche de l'arginine deshydrolase, un tube contenant le milieu Mœller à arginine a étéensemencé par la souche à tester et l'incubation se fait à 37°C/24H. La dégradation de l'arginine et la libération d'ammoniac empêchent le virage de couleur au jaune (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

B.2.4. Production de citratase

Le citratase est mise en évidence par culture sur gélose citrate de Simmons. La gélose est ensemencée par la souche à tester par piqure centrale et incubée à 37°C pendant 7 jours. Résultat positive s'est révélé par virage de milieu au jaune (**Guiraud, 1998**).

B.2.5. Production d'acétoïne

L'acétoïne est mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer après un ensemencement du lait écrémé stérile citraté par la souche à tester et une culture de 7 jours à 37°C (**Guiraud, 1998**).

B.2.6. Caractère homo ou hétérofermentaire

Il est défini de façon simple par le test de Gibson et Abdel Malek qui traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaires.

Pour se faire, le milieu a été ensemencé par piqure centrale puis un bouchon de la gélose blanche a été ajouté. L'incubation se fait à 37°C pendant 7 jours. Un métabolisme hétérofermentaire pousse le bouchon vers le haut (**Guiraud, 1998**).

B.2.7. Test d'hémolyse

La gélose au sang de cheval a été coulé en boîte de Pétri, et après solidification la souche a été ensemencée en surface par stries, et l'incubation a été réalisée à 37°C/24H.

La lecture des résultats se fait comme suite:

- Colonies entourées d'une zone franches d'hémolyse, il s'agit de souches Beta-hémolytiques.
- Le milieu entourant la colonie devient verdâtre ce qui résulte de la production de peroxyde d'hydrogène. On est en présence d'une hémolyse alpha.
- Le milieu n'est pas modifié; c'est une hémolyse gamma (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

B.3. Fermentation des sucres

Ce test permet d'apprécier la capacité de souche à fermenter quelques sucres, le test est réalisé sur microplaques stériles. Pour se faire, le milieu MEVAG contenant le sucre (12 sucres ont été utilisés) a été ensemencé puis une goutte de l'huile de vaseline stérile a été versée en surface du chaque puits pour favoriser l'anaérobiose. L'incubation se fait à 37°C/24H. Le virage de couleur au jaune témoigne la possibilité de la réaction (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

I.2.3.6. Caractérisation physicochimique des composés anti-*Aspergillus*

A. Effet de température

Des aliquotes de 10 ml du surnageant, stérilisés par filtration sur membrane millipore (0,22 µm), ont été chauffés à 25°C, 50°C, 70°C et 90°C pendant 1 heure au bain marie et à 120°C pendant 20 min à l'autoclave. A l'issue de ce traitement, les échantillons ont été rapidement refroidis puis 2ml du

surnageant ont été prélevés et mélangés avec 15ml de milieu PDA (concentration x 2). Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3µl de suspension de spores (10^6 spores.ml⁻¹) ont été déposés à la surface du milieu. Les cultures ont été incubées à 25°C/5jours (Magnusson *et al.*, 2003).

B. Effet de pH

La sensibilité des métabolites inhibiteurs produits par la souche lactique sélectionnée à la variation du pH, a été évaluée en ajustant le pH d'un aliquote de 10 ml du surnageant à 3, 5, 7, et 8. Après filtration sur membrane millipore (0,22 µm). Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3µl de suspension de spores (10^6 spores.ml⁻¹) ont été déposés à la surface du milieu. Les cultures ont été incubées à 25°C/5jours (Magnusson *et al.*, 2003).

C. Effet d'enzyme protéolytique

L'enzyme protéolytique utilisée dans cette étude est la Trypsine. A partir du surnageant précédemment obtenu, des aliquotes de 10 ml ont été prélevés et leur pH a été ajusté au pH optimal d'enzyme (pH 8). 3ml du surnageant ont été ensuite traités avec 3 mg d'enzyme puis l'ensemble a été incubé à 37°C pendant 1 heure. A la fin de la période d'incubation, l'échantillon a été chauffé à 70°C pendant 20 min puis stérilisé par filtration sur membrane millipore (0,22µm).Le pH d'échantillons a été réajusté à la valeur initiale 4,3. Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3µl de suspension de spores (10^6 spores.ml⁻¹) ont été déposés à la surface du milieu. Les cultures ont été incubées à 25°C/5jours (Dalié *et al.*, 2010).



Chapitre II:
Résultats et discussion

Chapitre II: Résultats et discussion

II.1. Revivification des souches

II.1.1. Souches lactiques

32 souches de bactéries lactiques isolées des échantillons du blé par la méthode traditionnelle ont été repiquées sur milieu MRS bouillon, la croissance était caractérisée par l'apparition d'un trouble. En, suite les souches ont été repiquées sur milieu MRS gélosé, après l'incubation à 37°C/48H, le test de catalase et la coloration de Gram ont été menés. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant:

Tableau 2: Caractérisation des différentes souches lactiques isolées du blé fermenté traditionnellement

Isolat	Test de catalase	Test de coloration de Gram
S001 à S020	-	Cocci +
S021	-	Bacille +
S022	-	Cocci +
S023	-	Bacille +
S024 à S029	-	Cocci +
S030	-	Bacille +
S031	-	Cocci +
S032	-	Bacille +

Tous les isolats sont catalase négative (-) et Gram positif (+). La forme cocci est plus répandue que la forme bacille; elle représente 87,5% de la totalité des souches isolées alors que cette dernière ne représente que 12,5% seulement.

II.1.2. Souches fongiques

Après l'observation macroscopique (figure 5) et microscopique des deux cultures fongiques, nous avons confirmés que les deux espèces sont: *A. niger* et *A. flavus*.

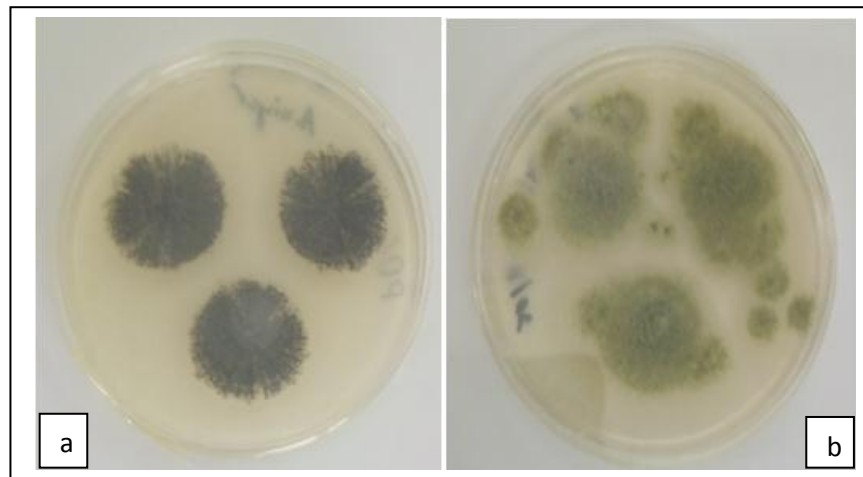


Figure 5: Aspect macroscopique d'*A. niger* (a) et d'*A. flavus* (b).

II.2. Screening des bactéries lactiques à activité anti-*Aspergillus*

La potentialité des bactéries lactiques à inhiber la croissance des souches d'*Aspergillus* a été définie comme une activité «anti-*Aspergillus*». Afin de déterminer une telle activité des BL isolées, deux types d'expérimentation ont été conduits. En premier lieu, les propriétés inhibitrices des isolats ont été évaluées par une méthode qualitative, ensuite les résultats sont confirmés par une méthode quantitative.

II.2.1. Test qualitatif: Méthode de stries et/ou de double couches

La production des substances antifongiques envers l'*A. niger* a été recherchée par la méthode de double couche de (Magnusson *et al.*, 2003) qui nous a permis de faire une première sélection des souches lactiques anti-*Aspergillus* (tableau 3 et figure 6).

Tableau 3: Activité anti-*Aspergillus niger* des bactéries lactiques par la méthode de stries et/ou de double couches

Souches	Activité antifongique contre <i>A. niger</i>
S001	++
S002	++
S003	-
S004	+
S005	+
S006	++
S007	+

Partie expérimentale

S008	++
S009	+
S010	-
S011	+++
S012	-
S013	++
S014	+
S015	+++
S016	-
S017	+++
S018	+
S019	+
S020	+
S021	-
S022	+
S023	++
S024	-
S025	-
S026	++
S027	+
S028	++
S029	+
S030	+++
S031	-
S032	+++

-: aucune croissance fongique; +: pas de croissance fongique sur 0.1 à 3% de la surface de la boîte par la souche lactique; ++: pas de croissance fongique sur 3 à 8% de la surface de la boîte par la souche lactique; +++: pas de croissance fongique sur 8% de la surface de la boîte par la souche lactique.

Partie expérimentale

Les résultats ont montré qu'environ 68,75% des isolats (S001, S002, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S011, S013, S014, S015, S017, S018, S019, S020, S022, S023, S026, S027, S028, S029, S030 et S032) présentaient une activité antifongique, mais les zones d'inhibition sont variables selon la souche (+, ++ ou +++). Alors que 31,25% (S003, S010, S012, S016, S021, S024, S025 et S031) des isolats ne présentaient aucune activité antifongique (-).

D'après le tableau, nous avons remarqué que les souches lactiques codées (S011, S015, S017, S030 et S032) ont démontré une bonne activité antifongique (+++), elles sont plus pertinentes car elles présentaient des zones d'inhibition supérieures à 8% en comparant avec les résultats des autres souches ayant présenté une activité anti-*Aspergillus*. A partir de ces résultats, ces cinq souches sont sélectionnées pour la suite des tests.

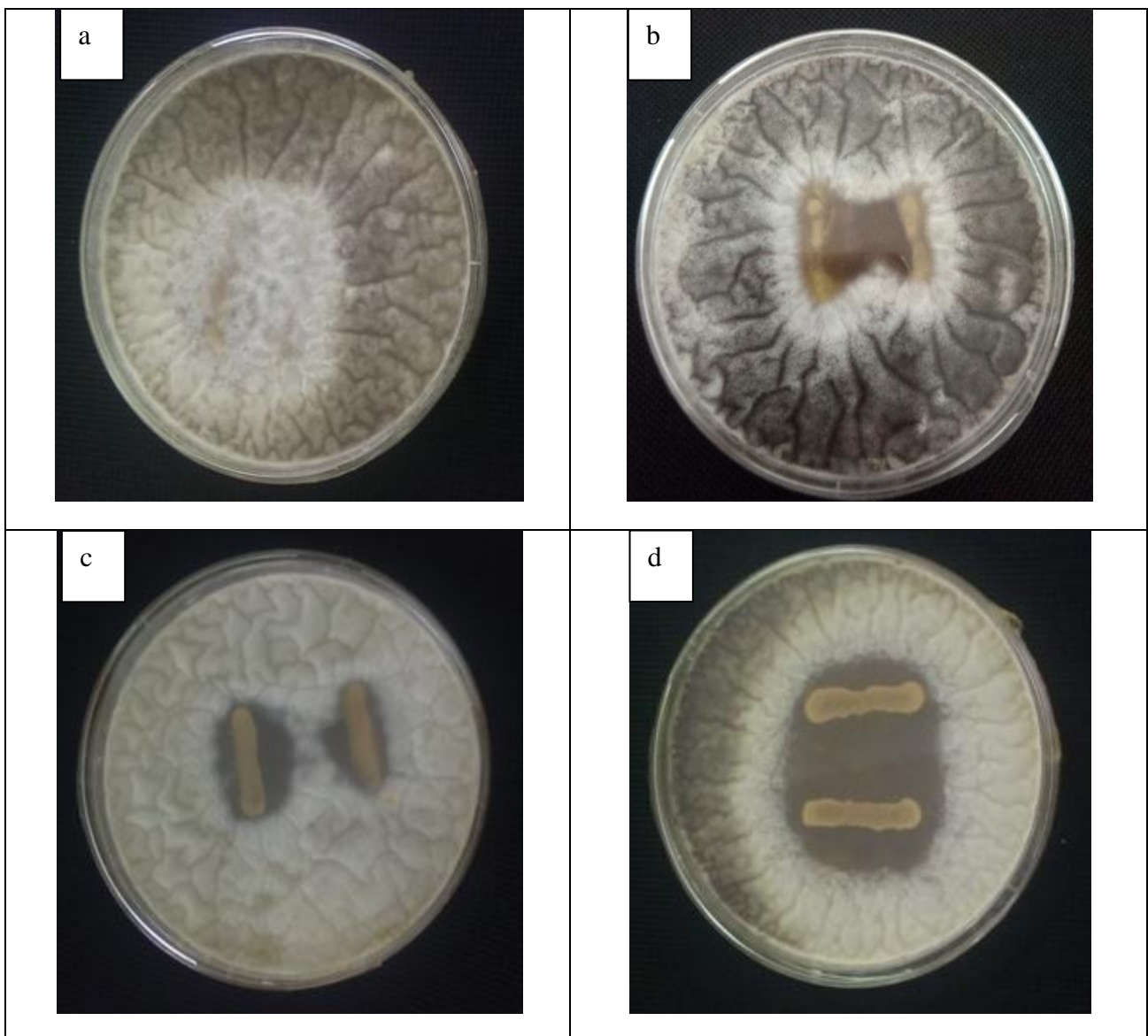


Figure 6: Inhibition d'*Aspergillus niger* par les souches S005 (a: -), S006 (b: +), S018 (c: ++) et S011 (d: +++).

II.2.2. Test quantitatif

II.2.2.1. Co-culture sur milieu solide

L'activité antifongique des isolats (S011, S015, S017, S030 et S032) a été confirmée en utilisant la méthode de (Florjanowicz, 2001). Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 7.

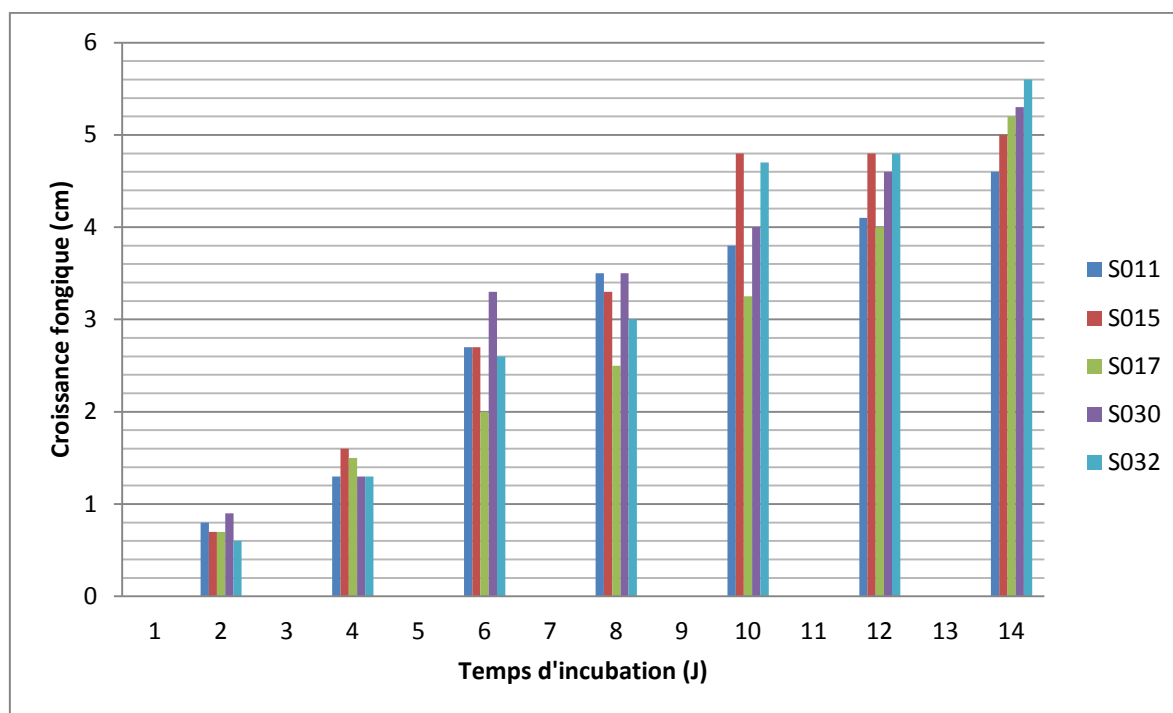


Figure 7: Influence des souches S011, S015, S017, S030 et S032 sur la croissance d'*A. niger*.

D'après les résultats de la figure 7, on a remarqué une différence de croissance fongique entre les cinq souches ce qui explique la différence d'efficacité inhibitrice mise en jeu par les cinq isolats, cette différence ne se révèle qu'après six jours de culture.

En effet, pendant presque toute la première semaine de culture, on a pu constater que la manchette d'inhibition a été dirigée vers la souche S032, mais au bout du quatorzième jour de culture, l'isolat S011 induit une meilleure inhibition par rapport aux autres isolats. Ce qui fait que, les deux souches (S011 et S032) sont les souches les plus efficaces parmi les cinq isolats.

II.2.2.2. Mesure de l'activité anti-*Aspergillus* des métabolites extracellulaires

Les résultats présentés dans la figure 8 démontrent que les cinq souches lactiques sont capables de produire des substances inhibitrices après 120 heures de culture puisque les surnageants de culture inhibent le développement d'*A. niger*.

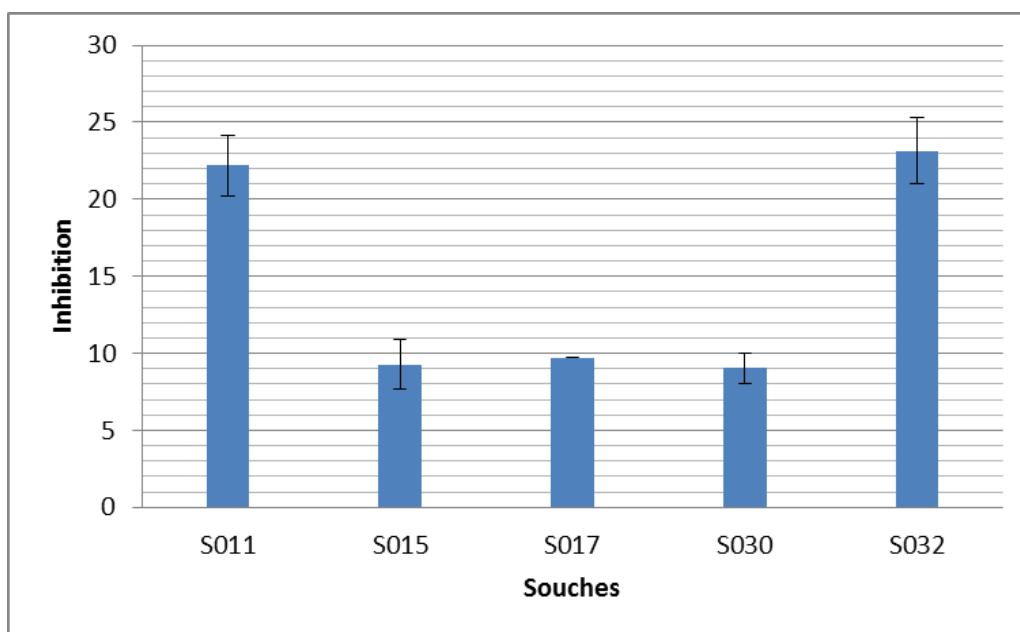


Figure 8: Mesure de l'activité anti-*Aspergillus* des surnageants des souches lactiques (S011, S015, S017, S030 et S032).

D'après la figure, on remarque que les isolats S011 et S032 présentaient la plus forte activité inhibitrice (22% et 23% respectivement), ces résultats sont en bonne corrélation avec les précédents. L'isolat codé S017 possède une activité inhibitrice de 9,5%, suivi des isolats S015 et S030 (9%). Nos données suggèrent que les deux isolats S011 et S032 produiraient des substances inhibitrices plus efficaces ou en plus grande quantité que les trois autres isolats (S015, S017 et S030).

II.2.3. Détermination du spectre d'inhibition des souches lactiques sélectionnées

Dans le présent test, nous avons évalué la capacité d'inhibition des cinq isolats lactiques contre l'*Aspergillus flavus* en suivant la méthode qualitative de double couche de (Magnusson et al., 2003), décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Nous avons remarqué que 3 souches (S011, S015 et S030) inhibent la croissance d'*A. flavus* (+ ou ++). Par ailleurs, les souches S017 et S032 ne possèdent aucune activité vis-à-vis cette souche fongique. En comparant l'activité antifongique de ces souches vis-à-vis l'*A. flavus* à celle vis-à-vis l'*A. niger* nous avons constaté que l'inhibition était plus efficace contre l'*A. niger* donc elle est apparue comme la souche fongique la plus sensible. De plus les deux souches (S011 et S032) qui avaient de bons résultats dans les tests précédents paraissent moins inhibitrice (S011: +) et sans effet (S032:-) contre l'*A. flavus*. Dans le même contexte la souche codée S015 paraît plus efficace car elle présentait une zone d'inhibition comprise entre 3 et 8% (++) .

Tableau 4: Activité anti-*Aspergillus flavus* des cinq souches sélectionnées par la méthode de stries et /ou de double couches

Souches	Activité antifongique contre <i>A. flavus</i>
S011	+
S015	++
S017	-
S030	+
S032	-

-: aucune croissance fongique; +: pas de croissance fongique sur 0.1 à 3% de la surface de la boîte par la souche lactique; ++: pas de croissance fongique sur 3 à 8% de la surface de la boîte par la souche lactique.

La sélection préliminaire des isolats lactiques avec activité antifongique (contre *A. niger* et *A. flavus*) démontre que 68,75% des isolats sont capables d'inhiber la croissance des espèces fongiques en question. Le même résultat est trouvé par (Adebayo et Aderye, 2010) qui ont rapporté que 68% des bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés nigériens présentaient une activité antifongique contre *A. niger* et *A. flavus*. Selon eux, cette inhibition fongique est associée à la production de bactériocines.

Dans l'ensemble et en se basant sur les résultats précédents, seulement l'isolat S011 fait l'objet de complément d'étude.

II.3. Identification de la souche lactique sélectionnée

En vue de déterminer l'identité de la souche S011, des méthodes d'analyse basées sur des critères phénotypiques (identification physiologique et biochimiques) ont été utilisées. Les résultats sont présentés dans les tableaux 5 et 6.

II.3.1. Examen macroscopique et microscopique

-L'observation de la souche sélectionnée à l'œil nu sur boîte a montré des colonies bien isolées, de petite taille avec un relief bombé régulier de couleur blanchâtre (figure 9).

-L'observation microscope après coloration de Gram a révélé que la souche S011 est une coque à Gram positive (figure 9).

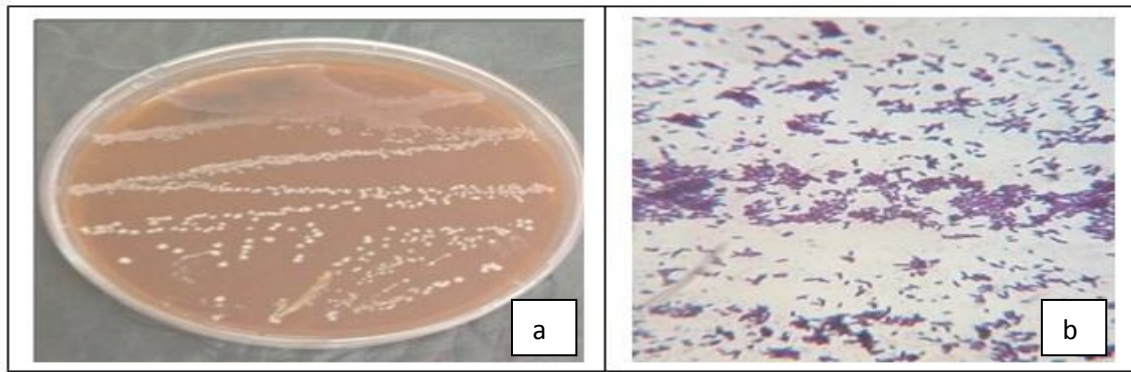


Figure 9:Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) de la souche S011.

II.3.2. Tests physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat sont présentées dans le tableau 7.

- ✓ Le test de catalase a montré que la souche étudiée est catalase négative (pas de dégagement gazeux) et a été considérée comme étant bactérie lactique.
- ✓ Après la période d'incubation à deux températures différentes (37°C et 44°C) pendant 24H sur bouillon MRS, nos résultats montrent que la souche lactique sélectionnée a la capacité de pousser seulement à 37°C et pas à 44°C. Donc cette dernière est une mésophile et la souche *Streptococcus thermophilus* est écartée.
- ✓ L'étude de l'aptitude de la souche lactique sélectionnée à pousser en présence de bleu de méthylène (0,1% et 0,3%) a montré que la souche étudiée est incapable de faire la réduction du bleu de méthylène et la coagulation du lait.
- ✓ Les résultats de croissance à deux concentrations différentes de NaCl montrent que la souche S011 présente une croissance abondante en milieu contenant la concentration 4,5% de NaCl par contre aucune croissance n'a été observée dans le milieu à 6,5% en NaCl. Selon (Axelsson, 2004) et (Pilet et al., 2005); les genres pedicocques et enterococques ont la capacité de croître dans un milieu de 6,5% en NaCl, alors que les lactococques et les streptococques sont sensibles à cette concentration. En comparant ces descriptions avec nos résultats, nous avons présumés que notre isolat S011 qu'on a sélectionnée est probablement une lactococque.
- ✓ Les bactéries à ADH positive vont acidifier le milieu de culture en fermentant le lactose ce qui traduit par une couleur jaune du milieu, puis en déshydratant l'arginine, elles vont alcaliniser le milieu après son acidification et garder une couleur violette. D'après nos résultats, la souche était ADH négative ce qui explique leur incapacité à décomposer l'arginine et de libérer l'ammoniac par le système de l'arginine deshydrase.
- ✓ Le caractère d'utilisation de citrate est absent chez la souche S011.

Partie expérimentale

- ✓ D'après (**Phalip et al., 1994**), l'acétoïne est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique. Après l'incubation de 7 jours, deux réactifs VPI et VPII ont été ajoutés au tube. Après un délai de 10 min les résultats obtenus montrent que la souche est incapable de produire l'acétoïne. Selon (**Stiles et Holzapfel., 1997**), les lactocoques sont incapables de produire l'acétoïne.
- ✓ Le type fermentaire permet d'apprécier le type du métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé pour différencier entre les souches homofermentaires et hétérofermentaire. Nos résultats de la recherche de type fermentaire sur milieu Gibson et Abd El Malek montrent que le développement de souche S011 ne provoque pas une discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Donc cette souche est considérée comme homofermentaire (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique (**Carr et al., 2002**).
- ✓ De plus, les résultats de test d'hémolyse montrent une absence d'halo vert autour des colonies, la souche S011 est considérée comme gamma hémolytique.

Tableau 5: Résultats des différents tests physiologiques et biochimiques de la souche sélectionnée

Tests	La souche S011
Catalase	-
Gram	+
Croissance à: 37°C	+
44°C	-
Croissance à: 4,5% NaCl	+
6,5% NaCl	-
Lait de Sherman à: 0,1% bleu de méthylène	-
0,3% bleu de méthylène	-
Citratase	-
Acétoïne	-
Adénine deshydrogénase (ADH)	-
Type fermentaire	Homofermentaire
Hémolyse	Gamma

-: résultat négatif; +: résultat positif.

- ✓ La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse de

profil fermentaire qui est utilisé avec d'autres tests pour la mise en évidence des bactéries lactiques révèle une grande diversité métabolique des carbohydrates chez S011 (tableau 8).

Tableau 6: Profil fermentaire des sucres pour la souche sélectionnée

Sucres	La souche S011
Salicine	-
Galactose	-
Inositol	±
Glycérine	-
Mannose	-
Lévulose	-
Glucose	+
Adonitol	-
Tréhalose	-
Celobiose	-
Saccharose	+

-: résultat négatif; +: résultat positif; ±: résultat intermédiaire.

En concluant avec comparaison des résultats trouvés dans notre étude, concernant les caractéristiques physiologique et biochimique ainsi que le profil fermentaire, avec les données de la littérature, que notre souche lactique sélectionnée appartient au genre *Lactococcus* (Tamime, 2002; Pot, 2008; Zhang et Cai, 2014).

II.4. Caractérisation physicochimique des métabolites extracellulaires anti-*A. niger* produite par *Lactococcus sp.* (S011)

L'objectif de cette étape est de parvenir à caractérisation et si possible l'identification des métabolites produits par la souche *Lactococcus sp.* (S011) responsables de l'activité anti-*Aspergillus*. Pour atteindre cet objectif, il est indispensable de définir les conditions optimales de production de ces métabolites par la bactérie.

II.4.1. Influence de la température

Les résultats des traitements des substances inhibitrices par la chaleur (Figure 10) ont montré que l'augmentation de température affecte l'activité antifongique du surnageant sans cellules jusqu'à la perte totale d'activité antifongique à la température de 120°C, ce qui montre la sensibilité des

substances inhibitrices à l'augmentation de la température. D'après la même figure, on remarque que ces substances inhibitrices présentent une bonne inhibition à la température 50°C (30,55 %), cette inhibition fongique se diminue au fur et à mesure que la température augmente. Des résultats similaires ont été obtenus par (**Gourama, 1997**) qui a montré que l'activité antifongique a été perdue lors du traitement du surnageant de *Lactobacillus casei* à 100°C pendant 10 min. De plus, les données obtenues par (**Reddy et Ranganathan, 1985**) témoignent d'une production maximale de métabolites antifongiques par *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* à 25°C, ce qui n'est pas le même pour notre résultat.

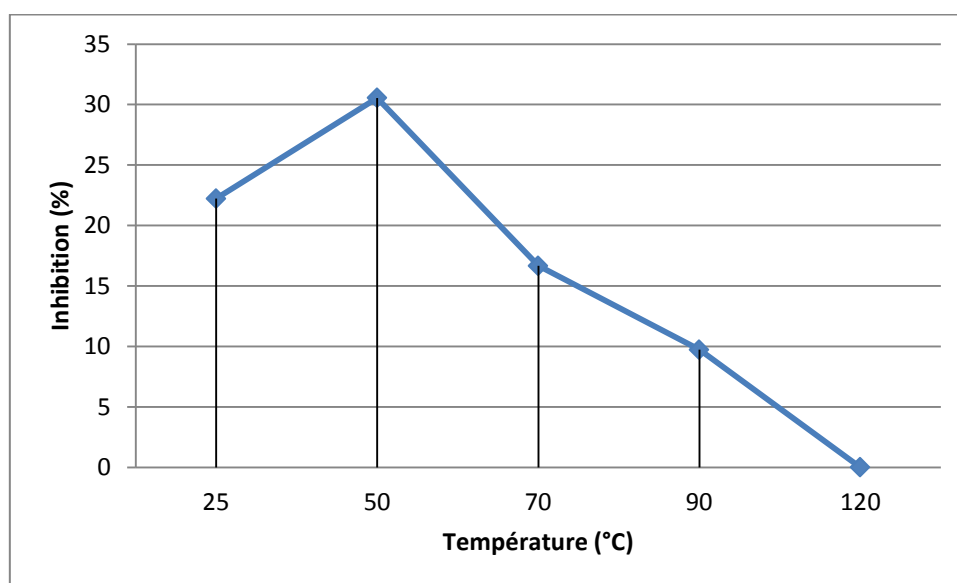


Figure 10: Effet de température sur l'activité antifongique des métabolites de *Lactococcus sp.*

II.4.2. Influence du pH

Comme d'autres types de métabolites, la production de substances antimicrobiennes par les bactéries lactiques pourrait varier avec le pH. D'après nos (figure11) résultats une faible croissance fongique a été observée à pH 3, avec une bonne inhibition qui atteint 45,83 %, et au-delà de ce Ph nous avons observé une diminution du pourcentage d'inhibition jusqu'à la stabilité à pH 7. Donc la meilleure inhibition a été observée à pH acide. Cela suggèrent la contribution des acides organiques dans l'activité antifongique par ce que leur activité dépend fortement de pH (**Cabo et al., 2002**).

Selon (**Magnusson et Schnurer, 2001**), la substance antifongique est active à pH compris entre 3 et 4,5, et la neutralité du milieu affecte beaucoup l'activité antifongique; c'est le même résultat trouvé dans la présente étude.

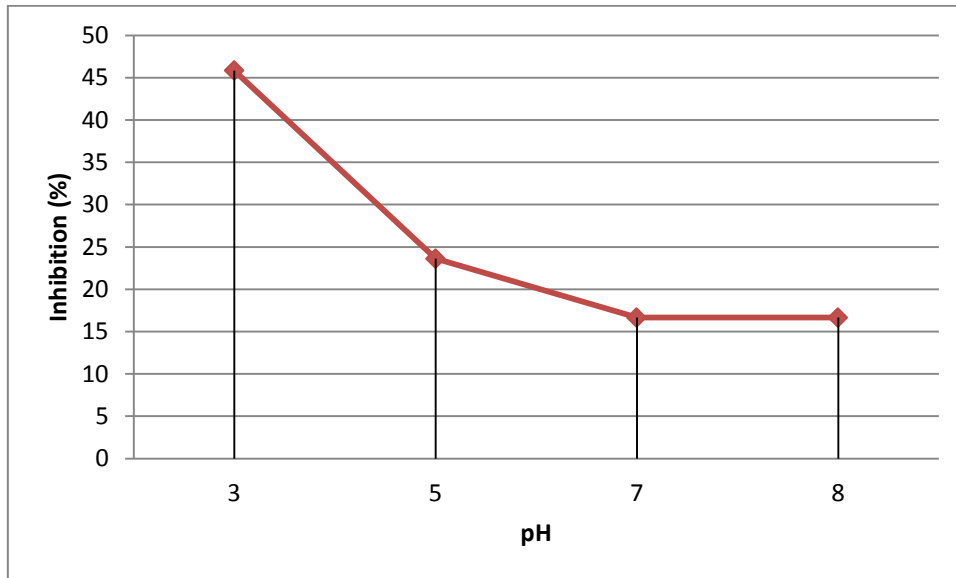


Figure 11: Effet du pH sur l'activité antifongique des métabolites de *Lactococcus sp.* (S011).

II.4.3. Influence d'enzyme protéolytique

Comme le montre la figure 12, le traitement de surnageant avec l'une des enzymes protéolytiques qui est la trypsine n'affecte pas l'activité antifongique du surnageant de la souche *Lactococcus sp.* (Niku-Paavola et al., 1999) ont montré que les enzymes protéolytiques n'ont pas affecté l'activité antifongique de *Lb. plantarum*. (Gerez et al., 2009) ont également signalé que la protéinase K n'a pas affecté l'activité inhibitrice du surnageant de plusieurs lactobacilles. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les substances antifongiques sont de nature non protéique, et l'effet antifongique de l'isolat *Lactococcus sp.* (S011) n'est pas associé aux bactériocines.

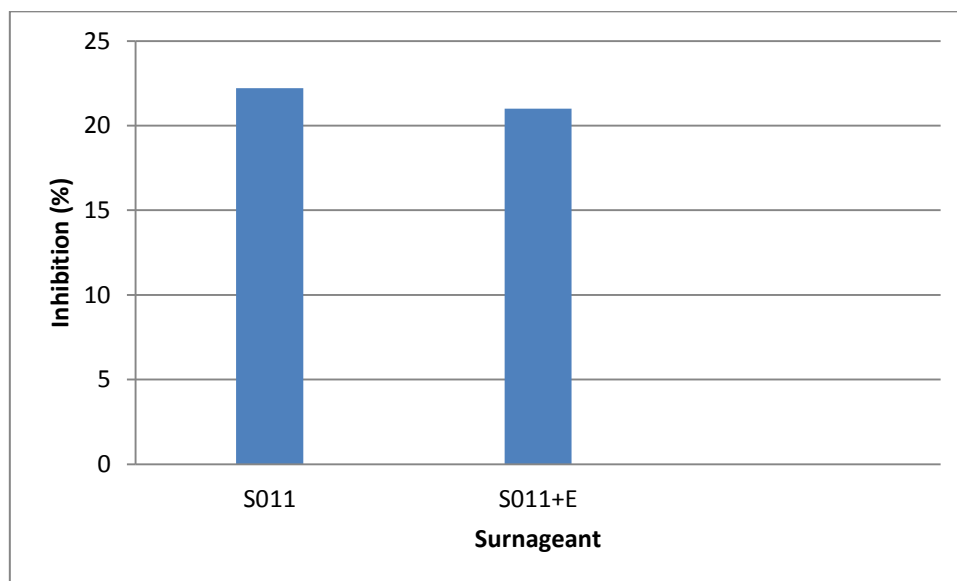


Figure 12: Effet d'enzyme sur l'activité antifongique des métabolites de S011.

Cette étude préliminaire sur la nature biochimique des métabolites produits par *Lactococcus sp.* (S011) a montré que ces métabolites sont sensibles à la chaleur, résistent au traitement enzymatique par la trypsine, et plus efficace à pH acide, ce qui suggère une forte contribution des acides organiques dans l'activité anti-*Aspergillus*. D'après (Riley et Wertz, 2002) ces molécules constituèrent la première cause de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques.

Plusieurs études ont confirmé nos résultats (Rouse et al., 2008; Gerez et al., 2009). En accord avec les données bibliographiques, les acides organiques pourraient agir en synergie avec d'autres composés tels que certains peptides dont l'activité antifongique dépend du pH (Dalié et al., 2010). Par ailleurs, des recherches précédentes ont prouvé que l'acide lactique et l'acide acétique peuvent réduire le nombre de spores des *Aspergillus sp.* (Gourama et Bullerma, 1995) et (Mandal et al., 2013) ont constaté que le pH acide avec les métabolites inhibiteurs de *Lactobacillus sp.* réduisent la longueur du tube germinatif d'*A. flavus*.



Conclusion

Conclusion

Notre étude a pour objectif de prévenir la croissance de deux moisissures du genre *Aspergillus* par l'utilisation des bactéries lactiques isolées du blé fermenté traditionnellement. Après l'évaluation qualitative et quantitative de l'activité antifongique des isolats lactiques, nous avons noté que 68,75 % de souches lactiques présentaient une inhibition fongique. Parmi ces souches, l'isolat S011 paraît le plus pertinent. Son action anti-*Aspergillus* par les tests qualitatif et quantitatif est proche à celle détectée sur le surnageant selon la méthode de co-culture. Ses caractéristiques physiologique et biochimique, indiquent que cette souche appartient au genre *Lactococcus*.

Les substances produites par *Lactococcus sp.* (S011) sont sensibles à la température, stables à l'enzyme protéolytique, montrent une forte activité à pH 3 et inhibent le champignon testé. D'après ces résultats, nous avons pu conclure que cet effet antifongique est attribué aux acides organiques produits par la souche en question.

L'effet inhibiteur des bactéries lactiques est un mécanisme complexe, qui laisse place à d'autres études, afin de comprendre le mécanisme de production et le mode d'action des composés inhibiteurs. Les bactéries lactiques montrent une réelle possibilité d'application pour la biopreservation. Ces observations ouvrent donc, des perspectives nouvelles de recherches à savoir:

- ✓ Identifier génétiquement la souche lactique la plus pertinente.
- ✓ Connaître les conditions optimales de culture et de production de métabolites inhibiteurs.
- ✓ Appliquer la souche lactique efficace dans des matrices alimentaires pour la bioconservation contre les champignons contaminants.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- Adebayo, C.O. et Aderiye, B.I. (2010).** Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some nigerian fermented foods. *Research Journal of Microbiology*, 5(11): 1070-1082.
- Alshannaq, A. et Yu, J.H. (2017).** Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6): 632.
- Amaike, S. et Keller, N.P. (2011).** *Aspergillus flavus*. Annual Review of *Phytopathology*, 49:107-133.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. et Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6): 454-461.
- Apha., Awwa. et Wef. (2012).** Standard Methods for examination of water and waste water. 22^{ème} editions. Washington: American Public Health Association, 1360.
- Axelsson, L. (2009).** Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. Edited by Salminen, S., Wright, A.V. et Ouwehand, A. In *Lactic Acid Bacteria- Microbiological and Functional Aspects*: 1-139.
- Axelsson, L.T. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Edited by Salminen, S., Wright, A.V. et Ouwehand, A. In *Lactic Acid Bacteria- Microbiological and Functional Aspects*. New York. Marcel Dekker: 1-66.
- Badel, S., Bernardi, T. et Michaud, P. (2011).** New Perspectives for *Lactobacillus* Exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1):54-66.
- Basset, T. et Laffont, C. (2011).** Les contaminations fongiques. La Lettre de l'OCIM. *Musées, Patrimoine et Culture Scientifiques et Techniques*, 138: 48-54.
- Blagojev, N., Škrinjar, M., Vesković-Moračanin, S. et Šošo, V. (2012).** Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3): 7219-7226.
- Belyagoubi, L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries actinomycètes et bactéries lactiques : Issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd. Algérie: 170.
- Bennett, J.W. (2010).** An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus. Molecular Biology and Genomics*: 1-17.

- Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B. et Bennett, J.W. (1991).** Biological detoxification of mycotoxins. *Mycotoxins and Animal Foods*: 816-826.
- Biing-Hui, L., Feng-Yih, Y., Ting-Shuan, W., Shuan-Yow, L., Mao-Chang, S., Mei-Chine, W. et Shin-Mei, S. (2003).** Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191: 255-263.
- Björkroth, J. et Koort, J. (2016).** Lactic acid bacteria, taxonomy and biodiversity. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 8: 45-48.
- Bourgeois, C.M. et Leveau, J.Y. (1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires: Le contrôle microbiologique. Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, 3(2): 260-266.
- 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.
- Brochard, G. et Le Bâcle, C. (2009).** Mycotoxines en milieu de travail : Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. INRS, Documents pour le Médecin du Travail, 119: 299-301
- Butel, M.J. (2014).** Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-Infectieux*, 16(2): 33-43.
- Caplice, E. et Fitzgerald, G.F. (1999).** Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2): 131-149.
- Carr, F.J., Chill, D. et Maida, N. (2002).** The lactic acid bacteria a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.
- Cabo, M.L., Braber, A.F. et Koenraad, P.M. (2002).** Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65:1309-1316.
- Castegnaro, M. et Pfohl-Leskowicz, A. (2002).** Les mycotoxines: Contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2^{ème} éditions. Paris. Technique and Documentation Lavoisier: 27-79.
- Castagnero, M. (1999).** Risques cancérogènes. Edité par Pfohl-Leskowicz, A. Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. Londres, Paris, New York. Technique and Documentation Lavoisier: 121-140.

- Cotter, P.D. et Hill, C. (2003).** Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biological Reviews*, 67(3): 429-453.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Atanasova-Penichon, V. et Richard-Forget, F. (2010).** Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) isolated from maize leaf to suppress fumonisin-producing fungal growth. *Journal of Food Protection*, 73(6): 1129-1137.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. (2010).** Lactic acid bacteria potential for control of mould growth and mycotoxins. A review. *Food Control*, 21: 370-380.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. et Ross, P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9):1058-1071.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. et Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Bactéries Lactiques (TomeI). Editions Loriga: 25-70.
- Dijksterhuis, J. et Wösten, H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology*, 74: 8-23.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1): 143-154.
- Drider, D. et Prévost, H. (2009).** Bactéries lactiques: Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. Editions Economica.
- Drouault, S. et Corthier, G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32(2): 101-117.
- Feillet, P. (2000).** Le grain de blé: Composition et utilisation. Editions Quae. Institut National de la Recherche INRA. Paris: 308.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003).** Manuel sur l'application du système de l'analyse des risques: Points critiques pour leur maîtrise (haccp) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Editions FAO: 1-6.
- Florjanowicz, T. (2001).** Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology*, 212(3): 282-286.
- Galvano, F., Piva, A., Ritlen, A. et Galvano, G. (2001).** Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*, 64(1): 120-131.

- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollan, G. et De Valdez, G.F. (2009).** Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20: 144-148.
- Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L. et Otero, A. (2000).** Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17(4): 383-391.
- Garofalo, C., Zannini, E., Aquilanti, L., Silvestri, G., Fierro, O., Picariello, G. et Clementi, F. (2012).** Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31): 7719-7728.
- Gourama, H. (1997).** Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *LWT Food Science Technology*, 30: 279-283.
- Gourama, H. et Bullerma, L.B. (1995).** Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 58:1249-1256.
- Gugnani, H.C. (2003).** Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Bioscience*, 8(1-3): 346.
- Guiraud, J.P. et Rosec, J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR.
- Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Techniques and Documentation. Paris (Dunod): 90-292.
- Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire: 1^{ère} éditions. Paris (Dunod): 185-186.
- Gurira, O.Z. et Buys, E.M. (2005).** Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology*, 22(2-3): 159-168.
- Hancock, L.E. et Gilmore, M.S. (2000).** Pathogenicity of enterococci. Edited by Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferritti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. Gram positive pathogens. *American Society of Microbiology*: 251- 258.
- Haumann, B.F. (1995).** Eradicating mycotoxins in foods and feeds. *International News on Fats , Oils and Related Materials*, 6(3): 248-257.
- Hussein, H.S. et Brasel, J.M. (2001).** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2): 101-134.
- Huys, G., Leisner, J. et Bjorkroth, J. (2012).** The lesser LAP gods: *Pediococcus*, *Lucnostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* and affiliated genera. Edited by Sampo, L., Arthur, C., Ouwehand, S., Salminen, S. et Wriht, A.V. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Function Aspects, 4^{ème} éditions. CRC Press. New York.

- International Agency for Research on Cancer. (2000).** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. List of IARC evaluations. IARC. Lyon.
- Karimi, R., Sohrabvandi, S. et Mortazavian, A.M. (2012).** Sensory characteristics of probiotic cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5): 437-452.
- Klaenhammer, T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*. 12:39-85.
- Larpent, S.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Editions Technique and Documentation Lavoisier. Paris.
- Leroy, F. et De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15:67–78.
- Lopez-Garcia, R. et Park, D. (1999).** Systèmes de gestion intégrée des mycotoxines. 3^{ème} conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. 3-6 Mars. Tunis, Tunisie.
- Magnusson, J. et Schnurer, J. (2001).** *Lactobacillus coryniformis subsp. Coryniformis* Strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1-5.
- Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. et Schnurer, J. (2003).** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219: 129-135.
- Mandal, V., KumarSen, S. et Mandal, N.C. (2013).** Production and partial characterization of an inducer dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 2445-2453.
- 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.
- Mäyrä-Mäkinen, A. et Bigret, M. (2004).** Industrial use and production of lactic acidbacteria. Edited by Salminen, S., Wright, A.V. et Ouwehand, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 3^{ème} Editions. Marcel Dekker. Inc. New York: 73-102.
- Mofredj, A., Bahloul, H. et Chanut, C. (2007).** *Lactococcus lactis*: An opportunistic bacterium?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37(4): 200-207.
- Nigotova, K. (2007).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires: 13.

- Norma, L., Leggott, S., Gordon, S. et Shephard, D. (2001).** Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*, 12: 73-76.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A. et Mattila-Sandholm, T. (1999).** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 29-35.
- Ozenda, P. (2006).** Les végétaux: Organisation et diversité biologique. Editions Dunod: 32-62.
- Phalip, V., Schmitt, P. et Divies, C. (1994).** A method for screening diacetyl and acetoin-producing bacteria on agar plates. *Journal of Basic Microbiology*, 34(4): 277-280.
- Pasqualotto, A.C. (2010).** Aspergillosis: From diagnosis to prevention. Edited by Springer Science and Business Media. New York: 1027.
- Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C. et Samson, R.A. (2008).** Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*: 32-57.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. et Castegnaro, M. (2002).** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19(3): 282-302.
- Pilet, M.F., Magras, C. et Federighi, M. (2005).** Bactéries lactiques in bactériologie alimentaire “compendium d’hygiène des aliments”. Editions Economica. Paris: 219-242.
- Pitt, J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L. et Lopez, C. (2000).** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical mycology*, 38(1): 41-46.
- Portelli, C. (2005).** Mycotoxines. Bulletin Veterinaire. Bimestriel-Societe Veterinaire Pratique de France, 89(1): 47.
- Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria in Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Edited by Corrieu, G. et Luquet, F.M. Technique and Documentatuion Lavoisier. Paris: 1-106.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. et Klein, D.A. (1999).** Microbiology, 4^{ème} editions. New York: WCB / McGraw-Hill.
- Prescott, L., Woolverton, C.J., Sherwood, L.M. et Willey, J.M. (2013).** Microbiologie.4^{ème} editions: 600-606.
- Reddy, N.S. et Ranganathan, B. (1985).** Effect of Time, Temperature and pH on Growth and Production of Antimicrobial Substances by *Streptococcus-Lactis Subsp Diacetyllactis* S1- 67/C. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 40: 346-348.

- Ricciardi, A. et Clementi, F. (2000).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science*, 12(1): 23-45.
- Riley, M.A. et Wertz, J.E. (2002).** Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1): 117-137.
- Ripert, C. (2013).** Mycologie médicale. 2^{ème} éditions. Technique and Documentation Lavoisier: 1-48.
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. et Van Sinderen, D. (2008).** Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 915-923.
- Salminen, S., Ouwehand, A. et Wright, A.V. (2004).** Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 4^{ème} éditions. CRC Press.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. et Van Dijck, P.W. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5): 426-435.
- Stiles, M.E. et Holzapfel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1): 1-29.
- 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.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Fiuzat, M. et Dobrogosz, W. (1990).** Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1195-1197.
- Tamime, A.Y. (1990).** Microbiology of starter cultures. Edited by Robinson, R.K. Elsevier, London. *Dairy Microbiology*, 2: 131- 201.
- Tamime, A.Y. (2002).** Microbiology of starter cultures. Edited by Robinson, R., ZHANG, H. et CAI, Y. (2014). *Dairy Microbiology Handbook*: 261-366.
- Vignola, C.L. (2002).** Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique. Québec: 608.
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K. et Telang, A.G. (2005).** Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4): 607-615.
- Welman, A.D. et Maddox, I.S. (2003).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21: 269-274.

Références bibliographiques

Wu, F. (2006). Economic impact of fumonisin and aflatoxin regulations on global corn and peanut markets. *The Mycotoxin Fact Book*: 83-93.

Zalán, Z., Németh, E., Baráth, Á. et Halász, A. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3): 219-225.

Zhang, H. et Cai, Y. (2014). Lactic acid bacteria fundamentals and practice. Springer Dordrecht Heidelberg. New York London: 536.



Annexes

Annexe I: Composition des différents milieux de cultures

➤ Milieu MRS Agar pH 6,5

Ingrédients	L'unité
Peptone	10,00 g
Extrait de viande	10,00 g
Extrait de levure	5,00 g
Sodium acétate	5,00 g
Di-potassium hydrogénophosphate	2,00 g
Polysorbate 80	1,00 g
Ammonium citrate	2,00 g
Magnésium sulfate	0,10 g
Manganèse sulfate	0,05 g
Glucose	20,00 g
Agar	15,00 g
Tween 80	1 ml

➤ Bouillon MRS pH 6,4

Ingrédients	L'unité
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	5,0 g
Citrate ammonium	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
Phosphate bi potassium	2 g
Hydrogénophosphate de Potassium	2,0 g
Sulfate de magnesium, 7H ₂ O	0.2 g
Sulfate de magnesium, 4H ₂ O	0.5 g

➤ PDA pH 5,6

Ingrédients	L'unité
Infusion de pomme de terre	200 ,00 g
Glucose	20 ,00 g
Agar	15,00 g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Milieu Gibson AbelMalak pH 6,5**

Ingrédients	L'unité
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	50 g
Jus de tomate	100 g
Lait	50 ml
Gélose nutritive ordinaire	200 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Gélose semi solide au lait citraté pH 7**

Ingrédients	L'unité
Lait écrémé stérile	5 ml
Citrate de sodium	0,25 ml
Gélose blanche	3 ml
Eau distillée	1000 ml

➤ **Lait écrémé stérilisé citraté** : Gélose semi solide au lait citraté sans gélose blanche

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Lait de Sherman à 0,1% de bleu de méthylène**

Ingrédients	L'unité
Bleu de méthylène	150 mg
Lait écrémé	50 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Lait de Sherman à 0,3% de bleu de méthylène**

Ingrédients	L'unité
Bleu de méthylène	150 mg
Lait écrémé	50 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Bouillon hypersalé pH 7,2**

Ingrédients	L'unité
Extrait de viande	5 g
Glucose	5 g
Peptone	15 g
NaCl	40/65 g
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

➤ **Gélose au sang de cheval pH 7,3**

Ingrédients	L'unité
Mélange de peptones	21 g
Amidon	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	12 g
Sang de cheval	70 ml

➤ **Milieu Mœller à l'arginine pH 6,8**

Ingrédients	L'unité
Peptone pepsique de viande	5 g
Extrait de viande	5 g
Pourpre de bromocrésol	0,01 g
Rouge de crésol	0,005 g
Glucose	0,50 g
Pyridoxal	0,005 g
Arginine	10 g
Eau distillée	1000 ml

➤ **Milieu Citrate de Simmons pH 6,8**

Ingrédients	L'unité
Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate de mono -ammoniaque	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Citrate de sodium	5 g
Chlorure de sodium	0,008 g
Bleu de Bromothymol	15 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

➤ **MEVAG sans sucre pH 7,7**

Ingrédients	L'unité
Extrait de viande	3 g
Chlorure de potassium	5 g
Rouge de phénol	20 mg
Agar	15 g

➤ **Gélose blanche**

Ingrédients	L'unité
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 ml

➤ **L'eau Physiologique pH 7**

Ingrédients	L'unité
NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Présenté par: Zerroug Djahida Bouhekrit Meryem Boulahia Farida	Encadré par: M ^{me} : Benhamada Nabila	Date de soutenance: 16/07/2019
--	---	--

Screening de souches de bactéries lactiques à activité anti-*Aspergillus*, isolés du blé fermenté traditionnellement

Résumé

La préservation des aliments se base essentiellement sur le retard, ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants, et l'activité antifongique des bactéries lactiques est l'une des propriétés biologiques recherchées.

Cette étude a été axée sur une sélection des bactéries lactiques isolées de blé fermenté traditionnellement, capables d'inhiber la croissance de deux espèces du genre *Aspergillus*: *A. niger* et *A. flavus*.

L'activité antifongique de trente-deux souches lactiques a été évaluée par une méthode qualitative, ensuite les résultats sont confirmés par une méthode quantitative. Cinq souches ont été retenues pour leur activité antifongique par rapport aux autres souches. Parmi ces dernières nous avons sélectionnées et identifiées l'isolat *Lactococcus sp.* (S011) comme étant la meilleure souche pour son activité antifongique efficace. La caractérisation biochimique des composés anti-*Aspergillus* produits par S011 a montré que ces métabolites sont thermosensibles, résistants à la trypsine et actifs à pH acide, identifiés d'une manière préliminaire comme acides organiques. Cette bactérie est montrée comme agent de biopreservation du blé fermenté traditionnellement.

Mots clés: Sélection, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Lactococcus sp.*, activité antifongique.

Summary

Preservation of foods mainly depends on delaying or inhibiting the growth of spoilage microorganisms, and antifungal activity of lactic acid bacteria is one of the technological properties researched.

This study focused on a selection of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented wheat, able to inhibit the growth of certain species of genus *Aspergillus*: *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* mycotoxin producers.

The antifungal activity of thirty-two lactic acid strains was evaluated by a qualitative method, after the results are confirmed by a quantitative method. Five strains were selected for their effective antifungal activity compared to other strains. The strain S011 has been selected and identified for their effective antifungal activity.

The biochemical characterization of the anti-*Aspergillus* compounds produced by S011 showed that these metabolites are thermosensitive, trypsin-resistant and active at acidic pH identified in a preliminary manner as organic acids. This bacterium has been shown effective as an agent of biopreservation in the traditionally fermented wheat.

Key words: Selection, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Lactococcus sp.*, antifungal activity.

ملخص

الحفاظ على الأطعمة يعتمد بشكل أساسي على تأخير أو تثبيط نمو الكائنات الحية الدقيقة الملوثة، و النشاط المضاد للفطريات في بكتيريا حمض اللبنيك هو أحد الخصائص التكنولوجية المرغوبة.

ركزت هذه الدراسة على اختيار بكتيريا اللبنيك المعزولة من القمح المخمر تقليدياً، والقادرة على تثبيط نمو بعض الأنواع من منتجي السموم الفطرية: *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus*.

تم تقييم النشاط المضاد للفطريات لدى اثنين وثلاثين سلالة من حمض اللبنيك بطريقة نوعية، وبعد ذلك تم تأكيد النتائج بطريقة كمية. تم اختيار خمس سلالات لنشاطها الفعال ضد الفطريات مقارنة بالسلالات الأخرى. تم اختيار (*Lactococcus sp.* (S011) وتحديدها على أنها أفضل سلالة لنشاطها المضاد للفطريات.

أظهر التوصيف الكيميائي الحيوي للمركبات المضادة أن هذه المستقبلات حساسة للحرارة ومقاومة للترسيب ونشطة في درجة الحموضة المنخفضة، وتم تحديدها بطريقة أولية كأحماض عضوية. هذه البكتيريا أظهرت نفسها كعامل للحفاظ الحيوي للقمح المخمر تقليدياً.

الكلمات المفتاحية: اختيار، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus niger*، *Lactococcus sp.*، النشاط المضاد للفطريات.