

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I	
I.1. Les bactéries lactiques.....	3
I.2. La recherche de l'activité antifongique	4
I.3. Les lactobacilles et l'inhibition fongique	4
I.4. Les substances antifongiques	5
I.4.1. Les acides organiques.....	6
I.4.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	8
I.4.3. Les bactériocines	8
I.4.4. Les dipeptides cycliques.....	10
I.4.5. La reutéline	11
I.4.6. Le diacétyle	11
I.5. Facteurs affectant la production et l'activité des substances antifongiques	16
I.6. La biopréservation.....	17
I.6.1. La biopréservation des céréales et ses dérivés	17
I.6.2. La biopréservation des produits laitiers	19
I.6.3. La biopréservation des fruits et légumes et ses dérivés	20
I.6.4. La biopréservation de la viande et ses dérivés	21
I.6.5. La biopréservation de l'ensilage	21
I.7. Les avantages de l'application des bactéries lactiques.....	22
I.8. Les bactéries lactiques et les mycotoxines	23
I.8.1. Généralité sur les mycotoxines	23
I.8.2. Les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines	25
I.8.2.1. La stimulation.....	25
I.8.2.2. L'inhibition.....	26
I.8.2.3. La dégradation.....	27

I.8.2.4. La liaison	28
I.8.2.4.1. La liaison de l'ochratoxine A	28
I.8.2.4.2. La liaison de l'aflatoxine B1	29
I.8.2.4.3. La liaison de l'aflatoxine M1	31
I.8.2.4.4. La liaison de la patuline	32
I.8.2.4.5. La liaison de la zéaralénone	32
I.8.2.4.6. La liaison de la beauvericine	32
I.8.2.4.7. La liaison des trichothécènes et des fumonisines	33

Chapitre II

II. Matériels et méthodes	34
II.1. Echantillonnage.....	34
II.2. Isolement des bactéries lactiques	34
II.3. Les souches fongiques	34
II.4. La recherche de l'activité antifongique.....	34
II.4.1. Préparation de suspension monosporale	35
II.4.2. Test qualitatif : Méthode des stries	35
II.4.3. Test qualitatif : Méthode de confrontation.....	35
II.4.4. Test quantitatif : Méthode des puits.....	35
II.5. Conservation des souches	36
II.6. Pré-identification des souches.....	36
II.7. Détermination du spectre d'inhibition	37
II.8. Caractérisation des métabolites antifongiques.....	37
II.8.1. L'effet de la température.....	37
II.8.2. L'effet des enzymes protéolytiques	37
II.8.3. L'effet du pH.....	37
II.8.4. La détection des substances volatiles.....	37
II.8.5. L'effet fongicide ou fongistatique	38
II.8.6. L'effet du milieu	38
II.9. Cinétique de production des métabolites antifongiques	38
II.10. Facteurs affectant la production des substances antifongiques.....	39
II.10.1. L'activité antifongique à différentes températures d'incubation	39
II.10.2. L'activité antifongique à différentes périodes d'incubation	39
II.10.3. L'activité antifongique à différents pH du milieu initial	39
II.10.4. L'activité antifongique sur MRS agar modifié	39

II.10.5. L'activité antifongique en présence de glycérol	40
II.11. L'effet des substances antifongiques sur la morphologie d' <i>Aspergillus</i>	40
II.12. Décontamination	40
Chapitre III	
III. Résultats et discussion	41
III.1. La recherche de l'activité antifongique des lactobacilles	41
III.2. Caractérisation des métabolites antifongiques	43
III.2.1. L'effet de la température	43
III.2.2. L'effet des enzymes protéolytiques	44
III.2.3. L'effet du pH	44
III.2.4. Détection des substances volatiles.....	45
III.2.5. L'effet fongicide ou fongistatique	46
III.2.6. L'effet du milieu.....	46
III.3. Cinétique de production des métabolites antifongiques	47
III.4. Facteurs affectant la production des substances antifongiques	51
III.4.1. L'activité antifongique à différentes températures	51
III.4.2. L'activité antifongique à différentes période d'incubation	52
III.4.3. L'activité antifongique à différents pH du milieu initial.....	54
III.4.4. L'activité antifongique sur MRS modifié.....	54
III.4.5. Production des substances antifongiques en présence de glycérol.....	57
III.5. L'effet des substances antifongiques sur la morphologie d' <i>Aspergillus</i>	58
III.6. Décontamination.....	60
Discussion générale	62
Conclusion	64
Références bibliographiques.....	65
Annexe.....	78

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 technologiques recherchées. L'effet antifongique a été recherché par la méthode de double couche chez 54 souches de bactéries lactiques, isolées du lait cru de chamelle, ensilage et du carotte. Environ 16.66 % des isolats ont montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus* sp. Six d'entre elles, appartenait au genre *Lactobacillus*. Les souches de *Lactobacillus plantarum* LB54, LB52, LB51, LB20, LB24 et *Lactobacillus farciminis* LB53 produisent des composés antifongiques actifs contre *Aspergillus* sp., *Fusarium roseum*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. et *Stemphylium* sp. Aucun changement dans les zones d'inhibition n'a été détecté après traitement par des enzymes protéolytiques, par chauffage, par réfrigération et par congélation. Aucune activité inhibitrice n'a pu être détectée vis-à-vis d'*Aspergillus* sp. par le surnageant non concentré et les substances volatiles. Une inhibition totale a été observée à pH 2 pour toutes les souches, hormis la souche *Lactobacillus plantarum* LB52. On remarque une diminution dans l'inhibition pour les valeurs de pH 3, 4 et 5, due à la contribution des acides dans l'activité antifongique. *Lactobacillus plantarum* et *farciminis* sont capables de produire des composés antifongiques à différentes températures d'incubation (25°C, 30°C et 37°C). Une meilleure inhibition a été observée sur MRS dont le glucose est remplacé par sorbitol, ou mannitol ou tréhalose ou sucrose. L'ajout de glycérol dans le milieu MRS augmente l'effet inhibiteur de *Lactobacillus plantarum* LB54 et LB52. La même zone d'inhibition en présence et en absence d'acétate de sodium a été observée. Aucune inhibition n'a été observée sur MRS sans extrait de viande et glucose. La source de carbone, la température d'incubation, le pH et la composition du milieu, ainsi que la phase de croissance des souches affectent l'activité antifongique. *Lactobacillus plantarum* et *farciminis* inhibent la germination des spores et la croissance de mycélium, et provoquent des malformations au niveau du thalle, conidiophore et la spore d'*Aspergillus* sp. Ces bactéries se sont montrées efficace comme agent de biopréservation dans le jus d'abricot.

Mots clés: *Lactobacillus*, substances antifongiques, *Aspergillus*, biopréservation.

Abstract

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. The antifungal activity was screened with overlay method of 54 strains of lactic acid bacteria isolated from silage, camel milk and carrot. Approximately 16.66% of the isolates showed inhibitory activity against *Aspergillus* sp. Six of them, belonging to the genera *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* LB54, LB52, LB51, LB20, LB24 *Lactobacillus farciminis* LB53 strains produce antifungal compounds active against *Aspergillus* sp., *Fusarium roseum*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. and *Stemphylium* sp. Inhibition zone did not change after treatment with proteolytic enzymes, heating, refrigeration and freezing. No inhibitory activity could be detected against *Aspergillus* sp. with non-concentrated cell free supernatant and volatile substance. A total inhibition was observed at pH 2 by all strains, except the strain *Lactobacillus plantarum* LB52, and a decrease in the inhibition at pH values 3, 4 and 5, due to acids contribution in the antifungal activity. *Lactobacillus plantarum* and *farciminis* were able to produce antifungal compounds under different temperatures (25°C, 30°C, 37°C). The best inhibition was done when the glucose was replaced with sorbitol, or mannitol or trehalose. The addition of glycerol in MRS medium enhanced the inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* LB54 and LB52. The same zone of inhibition in the presence and absence of sodium acetate was observed. No inhibition was observed on the media MRS without meat extract and glucose. The carbon source, the incubation temperature, pH and the medium composition, as well as the growth phase of strains affect the antifungal activity. *Lactobacillus plantarum* and *farciminis* inhibit spore germination and mycelia growth of *Aspergillus* sp., and cause malformations in the thalle, conidiophore and spore. These bacteria have been shown effective as an agent of biopreservation in the apricot juice.

Keywords: *Lactobacillus*, antifungal substances, *Aspergillus*, biopreservation.

ملخص

الحفاظ على الأطعمة يعتمد أساسا على تأخير أو تثبيط نمو الكائنات الدقيقة الملوثة، والنشاط المضاد للفطريات ببكتيريا الحليب هو واحد من الخصائص التكنولوجية التي يبحث عنها البحث عن النشاط المضاد للفطريات تم بطريقة الطبق المزوج ل 54 سلالة من بكتيريا الحليب المعزولة من حليب الجمل الخام، الجزر والحشيش المخمر. قرابة 16,66 % من العزلات أظهرت نشاطا مثبطا ل *Aspergillus sp.* ستة من بينهم تنتمي إلى نوع *Lactobacillus*.

سلالات *Lactobacillus plantarum* LB54, LB52, LB51, LB20, LB24 و *Lactobacillus farciminis* و *LB53* تنتج مواد مضادة للفطريات نشطة ضد *Aspergillus sp.*, *Fusarium roseum*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* و *Stemphylium sp.*

لا يوجد أي تغير في مناطق التثبيط بعد المعالجة بالإنزيمات البروتينية المحللة، التدفئة، التبريد والتجميد. لا يمكن الكشف عن أي نشاط مثبط ضد فطر *Aspergillus sp.* بالطافي الغير مركز و المواد الطيارة. تم ملاحظة تثبيط كامل في درجة الحموضة 2 بواسطة جميع السلالات باستثناء *Lactobacillus plantarum* LB52، وانخفاض في التثبيط في درجة الحموضة 3 ، 4 و 5 ، هذا لتدخل الأحماض في النشاط المضاد للفطريات. *Lactobacillus plantarum* و *farciminis* قادرة على إنتاج مواد مضادة للفطريات في درجات حرارة تحضين مختلفة (25 °م، 30 °م و 37 °م). أفضل تثبيط تم ملاحظته على MRS عندما تم تغيير الغلوكوز بالتريالوز، أو السوربيتول أو المانيتول. إضافة الغليسرول إلى وسط MRS يزيد من التأثير التثبيطي ل *Lactobacillus plantarum* LB54 و LB52. وقد لوحظ نفس التثبيط في وجود وعدم وجود أسيتات الصوديوم. مصدر الكربون، درجة حرارة التحضين، درجة حموضة الوسط، مكونات الوسط و مرحلة النمو تؤثر على النشاط المضاد للفطريات. *Lactobacillus plantarum* و *farciminis* تثبط إنتاش الأبواغ و النمو المشيجي لعفن *Aspergillus sp.* و تسبب تشوهات على مستوى المثمرة ، حامل الأبواغ و البوغة. هذه البكتيريا أظهرت فعالية إستعمالها كعامل للحفظ الحيوي في عصير المشمش.

كلمات مفتاحية : *Lactobacillus* ، حفظ حيوي، *Aspergillus*، مضاد الفطريات.

Abréviations

% : pour cent.

°C : degré celsius.

A. : *Aspergillus*.

ADH : arginine dihydrolase.

AFB1 : aflatoxine B1.

AFB2 : aflatoxine B2.

AFG1 : aflatoxine G1.

AFG2 : aflatoxine G2.

AFM1 : aflatoxine M1.

AFM2 : aflatoxine M2.

Aw : activité de l'eau.

C. : *Candida*.

CaCo3 : carbonate de calcium.

CO₂ : dioxyde de carbone.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

cm : centimètre.

Da : dalton

DO : densité optique.

Don : déoxynivalénol.

DLC : date limite de consommation.

F. : *Fusarium*.

FAO : organisation mondiale pour
l'alimentation et l'agriculture.

FB1 : fumonisine B1

FB2 : fumonisine B2

g : gramme.

GRAS : Generally Recognized as Safe

h : heure.

HCL : l'acide chlorhydrique.

K. : *Kluyveromyces*.

KDa : kilodalton.

Lb. : *Lactobacillus*.

Lc. : *Lactococcus*.

mg : milligramme.

min : minute.

ml : millilitre.

mM : milli-molaire.

MRS : De Man, Rogosa and Sharpe.

MRS-BCP : milieu MRS additionné de
Pourpre de Bromocrésol.

MRSEV-BCP : milieu MRS sans extrait
de viande additionné de Pourpre de
Bromocrésol.

NADH : Nicotinamide adénine
dinucléotide.

ng : nanogramme.

Pc. : *Pediococcus*.

pH : potentiel d'hydrogène.

QPS : présomption de sécurité qualifiée.

P. : *Penicillium*.

Pka : constante acide de dissociation.

S. : *Saccharomyces*.

sp : espèce.

spp : espèces.

St. : *Streptococcus*.

Subsp : sous espèce.

Tris : trishydroxyméthylaminométhane.

UFC : unité formant colonie.

UHT : ultra-haute température.

W. : *Weissella*.

We. : *Wickerhamomices*.

µg : microgramme.

µl : microlitre.

µ : micron.

Liste des tableaux

Tableau 1. Les substances antifongiques identifiées chez les bactéries lactiques	12
Tableau 2. Caractérisation phénotypique des isolats des lactobacilles.....	42
Tableau 3. Activité antifongique : par double couche, par confrontation, du surnageant et le spectre d'activité de <i>Lactobacillus</i>	43
Tableau 4. L'effet des enzymes protéolytiques et la température sur les substances antifongiques.	44
Tableau 5. L'effet antifongique sur la germination des conidies et la croissance du mycélium.	46
Tableau 6. Activité antifongique à différentes températures d'incubation.....	52
Tableau 7. Activité antifongique à différentes périodes d'incubation.....	52
Tableau 8. Activité antifongique sur MRS modifié.....	56
Tableau 9. Activité antifongique en présence de glycérol.....	57
Tableau 10. Décontamination de jus d'abricot.	61

Liste des figures

Figure 1. Activité antifongique par confrontation.	45
Figure 2. L'effet du pH sur les substances antifongiques produites par les lactobacilles.....	45
Figure 3. Suivi de la croissance des lactobacilles et du pH dans le milieu MRS	48
Figure 4. Diamètre de mycélium inhibé par les métabolites des lactobacilles.	50
Figure 5. Pourcentage d'inhibition d' <i>Aspergillus</i> sp. par les métabolites des lactobacilles. .	51
Figure 6. Activité antifongique à différentes températures.....	53
Figure 7. Activité antifongique à différentes périodes d'incubation	53
Figure 8. Activité antifongique à différents pH.	56
Figure 9. Activité antifongique en présence de différentes sources de carbone.	56
Figure 10. Observation microscopique de l'effet des substances antifongiques sur la morphologie d' <i>Aspergillus</i> sp.....	59
Figure 11. Décontamination de jus d'abricot.	61

Introduction

Clicours.COM

Introduction

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

La biopréservation est une alternative très prometteuse, ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence des agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté l'existence au sein de certains microorganismes des souches capables de contrôler la croissance fongiques telles que *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* et *Trichoderma* ...etc, mais certains d'entre eux sont responsables des problèmes sanitaires. Les antagonistes doivent être capables d'assurer sainement la biopréservation, et tolérables par l'homme et les animaux, parmi ceux-ci, les bactéries lactiques, non seulement connues pour leur innocuité, mais aussi pour leurs activités antimicrobiennes, pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (Djossou *et al.*, 2011). La présence des moisissures dans un produit alimentaire peut améliorer les qualités organoleptiques ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques (les mycotoxines).

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

Les moisissures peuvent proliférer sur les aliments et produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, lors du transport et de la transformation des matières premières. La contamination fongique limite la durée de conservation, et est à l'origine d'une perte de 5 à 10 % des récoltes mondiales selon l'organisation mondiale pour l'alimentation et l'agriculture [FAO] et provoque des modifications physiques (moisissure visible ou décoloration, goût, odeur de moisi) et des modifications des qualités nutritives.

Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent divers produits alimentaires notamment les céréales, le café, les produits d'origine animale (lait, viande), les légumes, les fruits et les arachides appartiennent au genre *Aspergillus*. De cela, la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques, capables d'être utilisées comme des agents de biopréservation, afin de réduire les pertes engendrées dans les cultures et l'industrie agroalimentaire, et l'effet néfaste des moisissures et leurs mycotoxines, semble être l'un des outils les plus recherchés. Dans ce contexte, le but de ce travail est la sélection des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, isolées de différents produits pouvant inhiber la croissance d'*Aspergillus* sp., la caractérisation des composés responsables de l'inhibition. Enfin, des tests *in vivo* pour démontrer leur utilités en tant qu'agent de biopréservation dans les produits alimentaires exposés à la contamination par des moisissures.

Chapitre I : Rappel bibliographique

I.1. Les bactéries lactiques

L'utilisation des ferments lactiques pour la production de fromage et de lait caillé a été introduite presque simultanément en 1890 par Weigmann et Starch, après la première découverte, en 1861, par Louis Pasteur par l'implication de microorganismes vivants dans les procédés de fermentations alimentaires, suivi par le premier isolement d'une culture bactérienne pure, *Bacterium lactis*, par Lister en 1873. Cela a ouvert la voie à l'industrialisation de la fermentation des aliments (Stiles et Holzapfel, 1997) ; mais les premières preuves de fermentation, impliquant fort probablement des bactéries lactiques, remontent à 7000 ans avant J.-C (Muñoz *et al.*, 2010). Elles consistent en la découverte, principalement en Egypte, en Mésopotamie et dans le bassin méditerranéen, d'ustensiles et de contenants ayant servi à la fabrication de produits laitiers fermentés. De nombreux documents et monuments historiques font référence à la production de fromage, de yaourt et de beurre. Ces procédés de fabrication seraient apparus avec le début de l'élevage des ruminants (moutons, chèvres et vaches) et de l'agriculture, nés au Moyen-Orient (Delavenne, 2012). Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles dans la préparation et la transformation des aliments, et sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux procédés de fermentation tels que l'ensilage, les produits laitiers fermentés, et dans la production et la conservation des saucisses et de la viande, ainsi que la fermentation des olives et des légumes et en pâtisserie (Rees, 1997 ; Marco, 2011). Le terme bactéries lactiques a été défini pour la première fois en 1919 par Orla-Jensen basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Il ne désigne pas une classe phylétique mais un ensemble de bactéries à Gram positif, catalase négative, non sporulantes, immobiles et qui produisent majoritairement de l'acide lactique par la fermentation de composés glucidiques (Stiles et Holzapfel, 1997). La production de l'acide lactique est accompagnée par la production d'autres composés comme le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène et l'acide acétique (Pawlowska *et al.*, 2012). Ce terme est utilisé pour les genres de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Pawlowska *et al.*, 2012). De nombreuses applications des bactéries lactiques et notamment des lactobacilles dans le domaine des probiotiques sont proposées: traitement de l'intolérance au lactose, prévention et réduction de la durée des diarrhées à *rotavirus* chez l'enfant, diminution du cholestérol, régulation du transit intestinal, ré-équilibre de la flore intestinale après une antibiothérapie ou une infection par un pathogène et traitement des maladies inflammatoires du tube digestif (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Tailliez, 2004).

I.2. La recherche de l'activité antifongique

La recherche de souches lactiques à caractère antifongique se fait souvent en premier lieu par la méthode de double couche, puis par la méthode de 96 puits ou bien de diffusion en gélose, la méthode de confrontation est aussi applicable.

La méthode de double couche consiste à ensemencer deux stries bactériennes d'une culture ou de colonie sur un milieu MRS. Après croissance dans les conditions adéquates à la souche bactérienne, les stries bactériennes sont recouvertes par 10 ml d'une gélose à faible pourcentage d'agar (0.7 à 0.8 %) pour faciliter la diffusion, contenant les spores du champignon et adéquate à la croissance. Après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé, il se produit un halo d'inhibition autour des stries qui permet d'évaluer le pourcentage d'inhibition par rapport à la surface de la boîte de Pétri (Magnusson *et al.*, 2003). La confrontation par contact direct, consiste à déposer une bouture de champignon de diamètre précis, dans la même boîte de Pétri ensemencée préalablement par la bactérie, et contenant un milieu adéquat pour la croissance bactérienne et fongique. Cette méthode consiste à évaluer la croissance du champignon par mesure de diamètre, après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé (Gerbaldo *et al.*, 2012). Dans la méthode de diffusion en gélose, le surnageant de culture bactérienne, concentré ou non et stérilisé par filtration, est déposé en puits creusé dans la gélose. Le champignon cible est inclus dans la gélose. La gélose contient également un faible pourcentage d'agar. Après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé, il se produit un halo d'inhibition autour du puits qui permet de mesurer un diamètre, ce diamètre reflète la valeur de l'inhibition en millimètre (Magnusson *et al.*, 2003). Dans la méthode de 96 puits ou de micro-titrage en puits sur plaque, le surnageant, concentré ou non et stérilisé par filtration, est mélangé à du milieu de culture liquide contenant les spores du champignon et déposé dans le puits. Cette méthode consiste à évaluer le pourcentage d'inhibition de la germination du champignon par mesure de DO à 550 nm, après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé (Magnusson *et al.*, 2003).

I.3. Les lactobacilles et l'inhibition fongique

La description de *Lactobacillus* a été démontrée par Beijerinck en 1901. Les lactobacilles peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes, homofermentaires ou hétérofermentaires et ubiquistes. La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C (Stiles

et Holzapfel, 1997 ; Tailliez, 2004). Le genre *Lactobacillus* est le plus retrouvé parmi les bactéries lactiques à caractère antifongique, suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* ainsi que des genres *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins retrouvés (Shekh *et al.*, 2009 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Dalié *et al.*, 2010a ; Nakata *et al.*, 2010 ; Ndagano *et al.*, 2011 ; Baek *et al.*, 2012).

Les lactobacilles démontrant une activité antifongique ont été isolés de plusieurs produits tels que les végétaux prêts à l'emploi (les tomates et les carottes), l'ensilage, le lait cru, les saucissons, le levain et les céréales (Magnusson et Schnürer, 2001 ; Sathe *et al.*, 2007 ; Hassan et Bullerman, 2008 ; Ryan *et al.*, 2011 ; Delavenne *et al.*, 2012). Les souches à caractère antifongique proviennent de lait de vache sont de 49 % et de chèvre sont de 43 %, alors que seulement 8 % ont été isolés à partir de lait de brebis, et 94 % des souches appartenant au genre *Lactobacillus*. Le lait de vache et de chèvre est un réservoir des lactobacilles à caractère antifongique en été et automne. *Lactobacillus plantarum* principalement retrouvé au printemps (Delavenne *et al.*, 2012), mais ça n'empêche pas que certains chercheurs ont trouvé la majorité des bactéries lactiques à caractère antifongique ne sont pas des lactobacilles, par exemple environ 60 % de la flore lactique de la grenade présentent une activité antifongique dont 82 % sont des coques (Gajbhiye *et al.*, 2012).

I.4. Les substances antifongiques

Les recherches sur l'activité antifongique chez les bactéries lactiques n'ont commencé qu'à la fin des années 50 et au début des années 60, avec Guillo (1958) qui élaborait un produit actif contre *Candida albicans* par *Lactobacillus acidophilus*, et Marth et Hussong (1963) qui ont testé le filtrat de *Leuconostoc citrovorum* ayant une activité antibactérienne sur quatre espèces de levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *Glutinis Torula* et *Mycotorula lipolytica*, mais tous les filtrats ont été jugés inactifs. Collins et Hardt (1980) ont constaté que le filtrat stérilisé d'une culture de *Lb. acidophilus* a pu légèrement retarder la croissance de *C. albicans* par rapport au bouillon fraîchement préparé. Wiseman et Marth (1981) ont démontré l'inhibition d'*Aspergillus parasiticus* par *Streptococcus lactis* C10, sans identification de la molécule inhibitrice. Actuellement, plusieurs équipes de recherche ont pu identifier les substances antifongiques produites par les bactéries lactiques (**Tableau 1**), ainsi que l'effet synergique de l'acétate de sodium contenu dans le milieu de culture avec les acides organiques produits par ces bactéries (Stiles *et al.*, 2002). Outre que les métabolites antifongiques, la

compétition nutritionnelle a été prouvée aussi comme un obstacle antifongique (Bayrock et Ingledew, 2004).

I.4.1. Les acides organiques

Les principaux métabolites impliqués dans les activités antagonistes sont des acides organiques. L'acide lactique est le principal produit de la fermentation par les bactéries lactiques. C'est un produit majoritaire issu de la fermentation, mais d'autres acides organiques principalement acétique, formique, propionique, ou encore, caproïque et benzoïque sont également produits (Noda *et al.*, 1980 ; Kuwaki *et al.*, 2002).

L'acide lactique et l'acide acétique ont été les principales substances antifongiques produites par *Leuconostoc citreum* et *Weissella confusa*, ces acides organiques ont été capables d'inhiber la croissance de *Cladosporium* sp. YS1 et *Penicillium crustosum* YS2 à des concentrations supérieures à 17.5 mM (Baek *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action dépend du pH et de leur constante acide de dissociation (pKa), qui détermine leur forme dissociée ou non dissociée à un pH donné. Lorsque le pH est inférieur ou égal à son pKa, un acide est sous sa forme non dissociée (Gerez *et al.*, 2010 ; Blagojev *et al.*, 2012). La forme non dissociée de ces molécules lipophile, leur permettent de diffuser à travers la membrane plasmique et de pénétrer la cellule, dans laquelle le pH plus basique, favorise la dissociation de ces acides. Les protons accumulés dans le cytosol diminueront le pH de ce dernier et permettent ainsi d'inhiber les principales activités métaboliques de la glycolyse (Mollapour et Piper, 2008 ; Blagojev *et al.*, 2012). Les bactéries lactiques peuvent produire un mélange d'acides organiques lors de la fermentation, y compris l'acide n-valérique, caproïque, formique et butyrique, le mélange produits par *Lb. sanfrancisco* CB1, agit de manière synergique (Corsetti *et al.*, 1998). Le mélange aussi de l'acide lactique avec une substance de masse moléculaire de 83 non identifiée, agit de manière synergique et provoque des malformations au niveau du mycélium et conidie (Mandal *et al.*, 2013).

L'ajout de 5 % de surnageant de *Lb. brevis* PS1 contenant des acides organiques et des protéines, dans le milieu de culture retarde la croissance de tube germinatif de *Fusarium culmorum*, par contre une quantité de 10 % l'inhibe totalement (Mauch *et al.*, 2010). L'acide phényllactique est un acide organique faible, produit par certaines espèces lactiques comprenant le genre *Lactobacillus* en parallèle avec l'acide hydroxyphényllactique, à partir de la phénylalanine. Cet acide possède des propriétés antifongiques (Valerio *et al.*, 2004 ; Corsetti et Valmorri, 2011).

Le catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques est initié par une réaction de transamination qui requiert la présence d'un α -kéto acide comme accepteur pour le groupement amine (Ndagano, 2011). La phénylalanine subit une réaction de transamination par une aminotransférase, la glutamate déshydrogénase, au cours de laquelle le groupement amine de la phénylalanine est transféré à l' α -kétoglutarate et le groupement cétone de ce dernier est transféré à la phénylalanine. Cette réaction génère la formation du glutamate et du phénylpyruvate ou acide phénylpyruvique. Celui-ci est ensuite converti en acide phényllactique par une lactate déshydrogénase (Mu *et al.*, 2012). *Lb. plantarum* MiLAB 393 produit l'acide 3-phényllactique (Ström *et al.*, 2002). Mais seules de fortes concentrations seront actives contre les levures et les moisissures [concentration minimale inhibitrice comprises entre 2.5 et 7.5 mg/ml] (Sjögren, 2005 ; Armaforte *et al.*, 2006 ; Valan Arasu *et al.*, 2013). *Lb. plantarum* 21B produit l'acide phényllactique et 4-hydroxyphényllactique (Lavermicocca *et al.*, 2000). L'acide phényllactique inhibe l'enzyme phénylalanine déshydrogénase qui à partir de la phénylalanine génère de la pyridine intervenant dans la synthèse des nucléotides, possède une structure similaire à la phénylalanine déshydrogénase lui permettant de mimer le substrat originel et sa structure chimique est semblable à d'autres composés antifongiques, tels que la Phénylalanine-Proline et la Phénylalanine-4-OH-Proline (Ström *et al.*, 2002 ; Ström, 2005). Certaines études mettent en évidence les propriétés antifongiques des acides gras et des acides gras hydroxylés (Sjögren *et al.*, 2003). Les acides gras, produits par les bactéries lactiques à partir des lipides, mais également à partir des acides aminés (Ganesan *et al.*, 2004). Leur mécanisme d'action n'est pas connu, mais il est supposé qu'ils altèrent la fluidité des membranes et la composition des lipides, ou bien encore qu'ils interfèrent avec la germination des spores (Ström, 2005 ; Black *et al.*, 2013b). *Lb. plantarum* MiLAB 393 produit les acides 3-hydroxydécanoïque, 3-hydroxydodécanoïque, 3-hydroxytétradécanoïque et 3-hydroxy-5-*cis*-dodécanoïque (Magnusson, 2003 ; Sjögren *et al.*, 2003). Ces acides gras 3-hydroxylés ont des concentrations minimales inhibitrices de l'ordre de 10 à 100 μ g/ml contre plusieurs levures et moisissures (Magnusson *et al.*, 2003 ; Sjögren *et al.*, 2003 ; Broberg *et al.*, 2007). Les bactéries lactiques peuvent dégrader la leucine en acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque, cet acide a été détecté dans le surnageant de *Lb. plantarum* VE56 et *W. paramesenteroides* LC11. L'effet inhibiteur provoqué a été fait par les baisses d'expression des gènes impliqués dans la formation des spores (*brlA*), mais en même temps, le surnageant de culture active la voie de signalisation FadA/PkaA, dont le PkaA régule négativement les expressions de *brlA* (Ndagano, 2011 ; Ndagano *et al.*, 2011).

I.4.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase, elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène, produit en croissance aérobie grâce à des flavoprotéines oxydases, à des NADH peroxydases, NADH oxydases ou α -glycérophosphate oxydases (Condon, 1987). Le peroxyde d'hydrogène produit par *Lb. acidophilus* G/12A et G/26/2 et *Lb. helveticus* HY7801 inhibe la croissance de *C. albicans* par oxydation des lipides membranaires et des protéines cellulaires (Strus *et al.*, 2005 ; Blagojev *et al.*, 2012 ; Hyun-Min *et al.*, 2012).

I.4.3. Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides synthétisées par les ribosomes entre la fin de la phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire. Elles représentent une large classe de substances qui diffèrent suivant leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leurs cibles et leur mode d'action. Le classement des bactériocines produites par les bactéries lactiques porte le nom de "classification de Klaenhammer". Cette classification se base sur la structure de la bactériocine (Klaenhammer, 1993 ; O'Keeffe et Hill, 1999).

Les classes majeures de bactériocines produites par les bactéries lactiques sont les suivantes:

- **Classe I : Les lantibiotiques** : Le nom lantibiotique est une abréviation pour désigner un peptide antibiotique qui contient une lanthionine, de poids moléculaire inférieur à 5 kDa.
 - **Type A** : Comprend les peptides linéaires flexibles, comme la nisine.
 - **Type B** : Comprend les peptides globulaires, qui sont soit non chargés ou chargés négativement.
- **Classe II** : Les protéines de faibles poids moléculaire (<10 kDa) et stables à la chaleur.
 - **Classe IIa** : "Pediocin-like bacteriocins", ce nom fait référence à la première bactériocine découverte dans cette classe.
 - **Classe IIb** : "Two-peptide bacteriocins" La lactococcine G (Len- α) et (Len- β) fut la première bactériocine de cette classe.
 - **Classe IIc** : Sont des bactériocines cycliques dont les extrémités N-terminale et C-terminale sont liées de manière covalente.
 - **Classe IId** : Sont des peptides linéaires non cycliques.
- **Classe III** : Sont des protéines de hauts poids moléculaire et sensibles à la chaleur, dont la masse moléculaire est supérieure à 30 kDa.

- **Classe IV** : Sont des protéines complexes dont l'activité requiert l'association de carbohydrates ou de moitiés lipidiques (Nissen-Meyer *et al.*, 2009 ; Nissen-Meyer *et al.*, 2010 ; Stoyanova *et al.*, 2012).

Les composés protéiques antifongiques ont pour caractéristiques d'être des peptides de faibles poids moléculaire (environ 3 à 4 kDa) et même de poids moléculaire élevé (environ 43 KDa) ; sensibles aux enzymes protéolytiques telles que la protéinase K et la trypsine ; stables ou non stable à la chaleur et au stockage, actifs en présence de l'acide lactique non dissocié à pH 3 et 6, d'autres actifs à pH 11 (Magnusson et Schnürer, 2001 ; Atanassova *et al.*, 2003 ; Coda *et al.*, 2008 ; Falguni *et al.*, 2010 ; Shekh et Roy, 2012 ; Ahmed rather *et al.*, 2013).

Le mode d'action n'a pas encore été bien recherché, mais la pentocine Tv35b produite par *Lb. pentosus* Tv35b de taille moyenne de 3.9 kDa est une bactériocine qui pourrait agir par la formation des pores membranaires (Okkers *et al.*, 1999).

La nisine Z, produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL 719, a démontré une activité antifongique contre *C. albicans* par une détérioration de la paroi, apparition de vacuoles qui sont larges et irrégulières, augmentation de la granulation du cytoplasme lors de la phase stationnaire et un blocage de la transformation de la forme blastospore à la forme hyphe (Le Lay *et al.*, 2008), par contre la levure *S. cerevisiae* résiste à la nisine, et seulement la levure sans paroi cellulaire qui est sensible à cette bactériocine (Dielbandhoesing *et al.*, 1998). La plantaricine J conduit à une initiation à la mort cellulaire de *C. albicans*, due à sa toxicité, par discontinuité de la membrane cellulaire et des noyaux endommagés (Sharma et Srivastava, 2014).

Durancine A5-11a et A5-11b affectent la membrane cellulaire, les vacuoles, le noyau et le réticulum cytoplasmique de *Debaryomyces hansenii* LMSA2.11.003 (Belguesmia *et al.*, 2012). La bactériocine produite par *Lb. plantarum* YML007, limite la croissance du mycélium, provoque des changements morphologiques tels que des dommages au niveau de la paroi, et la réduction de la taille des hyphes d'*A. niger*, d'*A. oryzae*, d'*A. flavus* et de *F. oxysporum* (Ahmad Rather *et al.*, 2013).

L'effet inhibiteur du brevicine SG1 produite par *Lb. brevis* SG1 vis-à-vis de *C. albicans* est dépend de la dose utilisée, et supposé antibiose, la même bactériocine provoque une inhibition de la ramification des hyphes, réduit la longueur du tube germinatif et la biomasse totale de *P. citrinum*. Le mode d'action est supposé cytolytique et fungiolytique et la paroi est la cible principale (Adebayo et Aderiye, 2011).

I.4.4. Les dipeptides cycliques

Beaucoup de dipeptides cycliques, qui sont des composés intermédiaires dans la production de peptides non ribosomiques présentent des activités antifongiques (Ström *et al.*, 2002). Ils ne sont cependant actifs qu'à des concentrations de l'ordre du mg/ml. La concentration minimale inhibitrice de cyclo (L-Phe-L-Pro) contre *A. fumigatus* et *P. roqueforti* est égale à 20 mg/ml, par contre la CMI est réduite à 10 mg/ml lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'acide phényllactique (Ström *et al.*, 2002 ; Magnusson, 2003). L'acidification et la température jouent un rôle important dans la production de dipeptides cycliques, mais à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (Dal Bello *et al.*, 2007 ; Ryan *et al.* 2009). Différentes souches de *Lactobacillus plantarum* produisent des dipeptides cycliques par exemple *Lb. plantarum* VTT E-78076, produisant le cyclo (glycyl-L-leucyl) (Niku-Paavola *et al.*, 1999), *Lb. plantarum* MiLAB 14 et *Lb. plantarum* MiLAB 393 produisant le cyclo (Gly-L-Leu), le cyclo (L-Phe-L-Pro) et le cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro).

D'autres souches telles que *Pediococcus pentosaceus*, *Lb. sakei* et *Lb. coryniformis* Si3 produisent le cyclo (Phe-Pro) et le cyclo (Phe-OH-Pro) (Ström *et al.*, 2002 ; Magnusson, 2003). *Pc. pentosaceus* MiLAB 170 produit le cyclo (L-Phe-cis-4-OH-D-Pro), le cyclo (L-Leu-trans-4-OH-L-Pro) et le cyclo (L-Leu-cis-4-OH-D-Pro) (Ström, 2005) et *Lb. amylovorus* DSM 19280 produit à la fois plusieurs dipeptides tels que le cyclo (L-Pro-L-Pro), le cyclo (L-Leu-L-Pro), le cyclo (L-Tyr-L-Pro), le cyclo (L-Met-L-Pro) et le cyclo (L-His-L-Pro) (Ryan *et al.*, 2011). Un autre dipeptide cyclique de poids moléculaire de 288 g/mol montre une activité antifongique, il se trouve dans le surnageant du *Lb. plantarum* 8826, *Lb. sakei* 16 et une bactérie lactique LB112 non identifiée (Benomar, 2005).

Ström *et al.* (2005) ont étudié le mode d'action de l'acide lactique et l'acide phényllactique avec le cyclo (L-Phe-L-Pro), produits par *Lb. plantarum* Milab 393 contre la croissance d'*A. nidulans* J283. Ces substances affectent la morphologie de mycélium, diminuent la biomasse à 36 % et augmentent la quantité des protéines fongiques.

I.4.5. La reutérinte

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

Les bactéries lactiques 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 reutérinte [3-hydroxypropionaldéhyde, ou 3-HPA] (Blagojev *et al.*, 2012). Cette molécule peut être synthétisée par différentes espèces du genre *Lactobacillus* [*brevis*, *buchneri*, *collinoïdes*, *coryniformis* et *reuteri*] pendant la phase stationnaire de croissance en anaérobiose, lorsque le glycérol est présent dans l'environnement et lorsqu'il y a une faible concentration de glucose (Martín *et al.*, 2005 ; Schnürer et Magnusson, 2005).

La dégradation de glycérol afin de produire de la reutérinte à effet antifongique a été corroborée par des preuves fournies par Magnusson (2003), lors de l'addition de glycérol dans le milieu MRS. D'après Magnusson, l'augmentation de l'effet antifongique de *Lb. coryniformis* Si3 en présence de glycérol est due à la présence de glycérol/diol déhydratase opéron (*pdu* opéron). Ce gène est responsable de la première étape de transformation de glycérol à 3-HPA.

I.4.6. Le diacétyl

Le métabolisme du citrate permet la formation de diacétyl (2,3-butanedione), par l'intermédiaire du pyruvate principalement par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Cette molécule est un composé aromatique associé au goût du beurre (Schnürer et Magnusson, 2005 ; Smit *et al.*, 2005 ; Karimi *et al.*, 2012). Son activité antifongique a été démontrée chez *Lb. paralimentarius* PB127 par Garofalo *et al.* (2012).

Tableau 1. Les substances antifongiques identifiées chez les bactéries lactiques

La souche	Les substances antifongiques	Références
<i>Pediococcus halophilus</i>	Acide lactique, acide acétique	Noda <i>et al.</i> (1980)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reutérine	Chung <i>et al.</i> (1989)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	Bactériocine (10.500 Da)	Batish <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20312	Peroxyde d'hydrogène	Gourama (1997)
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 1825		
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> CB1	Acide caproïque, acide formique, acide propionique, acide butyrique, acide n-valérique	Corsetti <i>et al.</i> (1998)
-	Nisine	Dielbandhoesing <i>et al.</i> (1998)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Pentocine TV35b (3.9 kDa)	Okkers <i>et al.</i> (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076	Acide benzoïque, méthylhydantoïne, cyclo (Gly-L-leu), mévalonolactone	Niku-Paavola <i>et al.</i> (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 21B	Acide phényllactique, acide 4-hydroxyphényllactique	Lavermicocca <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> Si3	Bactériocine (3 Kda)	Magnusson et Schnürer (2001)
<i>Enterococcus faecalis</i> TH10	Acide oxalique, acide malonique	Kuwaki <i>et al.</i> (2002)
<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393	Cyclo (L-Phe-L-Pro), cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), cyclo (Phe-Pro), cyclo (Phe-OH-Pro), acide 3-phényllactique	Ström <i>et al.</i> (2002)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> Si3	Cyclo (Phe-4-OH-Pro)	Magnusson <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> M3	Bactériocine (43 kDa)	Atanassova <i>et al.</i> (2003)

<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 14	Acide 3-hydroxydécanoïque, acide 3-hydroxydodécanoïque, acide 3-hydroxytétradécanoïque, acide 3-hydroxy-5- <i>cis</i> -dodécénoïque	Sjögren <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bactériocine (14 kDa)	Morgan <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus brevis</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 14	Cyclo (L-Leu- <i>trans</i> -4-OH-L-Pro), cyclo (L-Phe- <i>cis</i> -4-OH-D-Pro), cyclo (L-Leu- <i>cis</i> -4-OH-D-Pro), cyclo (L-Leu- <i>trans</i> -4-OH-L-Pro)	Sjögren (2005)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MiLAB 170		Sjögren (2005)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MiLAB 170	Cyclo (L-Leu- <i>cis</i> -4-OH-D-Pro)	
<i>Lactobacillus plantarum</i> FST 1.7	Cyclo (Leu-Pro)	Dal Bello <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus fermentum</i> L23	Bactériocine inférieure à 7000 Da	Pascual <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> UL 719	Nisine Z	Le Lay <i>et al.</i> (2008)
<i>Pediococcus acidilactici</i> UL5	Pédiocine PA-1	Ngondet (2008)
<i>Enterococcus faecalis</i> CHD 28.3	Bactériocine (11 kDa)	Roy <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 19280	Cyclo (Pro-Pro), cyclo (Tyr-Pro), cyclo (Met-Pro), cyclo (His-Pro), acide D-glucuronique, acide salicylique, acide p-coumarique, acide 3-phénylpropanoïque, acide (<i>E</i>)-2-méthylcinnamique, acide 3-(4-hydroxyphényl) lactique, cytidine, 2'-déoxycytidine, décanoate de sodium	Arendt <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus brevis</i> NCDC 02	Bactériocine inférieure à 5 kDa et supérieure à 1 kDa	Falguni <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	Cyclo (Leu-Leu)	Yang et Chang (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> sp. TN635	Bactériocine BacTN635 (4 kDa)	Smaoui <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 194	Bactériocine (1995 Da)	Stoyanova <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> K-205		
<i>Lactobacillus brevis</i> SG1	Brevicine SG1	Adebayo et Aderiye (2011)

<i>Lactobacillus plantarum</i> VE56	Acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque	Ndagano <i>et al.</i> (2011)
<i>Weissella paramesenteroides</i> LC11		
<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	δ-dodécalactone	Yang et Chang (2011)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Acide pyruvique, acide pyroglutamique, acide 3-hydroxyphénylacétique	Bianchini (2011)
<i>Lactobacillus garvieae</i>		
<i>Lactobacillus paralimentarius</i> PB127	Diacétyl	Garofalo <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus casei</i> AST18	Cyclo (Leu-Pro), 2,6-diphényl-piperidine, 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tétrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;10,20-d]pyrazine	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus plantarum</i> IMAU10014	Acide benzèneacétique, ester 2-propényle	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 251	Bactériocine inférieure à 10 kDa	Gerez <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus arizononas</i> R13	Acide DL-β-hydromyristique	Brosnan <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus reuteri</i> R2		
<i>Lactobacillus arizononas</i> R13	Acide vanillique, acide azélaïque, acide décanoïque, acide (S)-(-)-2-hydroxyisocaproïque, acide hydrocinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide DL-p-hydroxyphényllactique, acide DL-β-hydroxylaurique, acide 3-(4-hydroxy-3-methoxyphényl) propanoïque, 1,2-dihydroxybenzène	
<i>Lactobacillus reuteri</i> R2		
<i>Weissella cibaria</i> PS2		
<i>Enterococcus durans</i> A5-11	Durancine A5-11a et A5-11b (5206 Da et 5218 Da)	Belguesmia <i>et al.</i> (2012)
<i>Lactobacillus hammesii</i> DSM16381	Acide mono-hydroxyoctadécénoïque	Black <i>et al.</i> (2013b)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC27651		
<i>Lactobacillus hammesii</i> DSM16381	Acide 10-hydroxy-12- octadécénoïque	Black <i>et al.</i> (2013b)

<i>Lactobacillus hammesii</i> DSM16381	Acide 10-hydroxy- <i>cis</i> -12- octadécénoïque avec l'acide 10-hydroxy- <i>trans</i> -12-octadécénoïque	Black <i>et al.</i> (2013a)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC27651		
<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW1460		
<i>Lactobacillus paracasei</i> LZ54	Bactériocine (5 KDa)	Lou <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i> YML007	Bactériocine (1256.617 Da)	Ahmad Rather <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	Acide 5-oxododécénoïque	Ryu <i>et al.</i> (2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i> K35	Acide 2-butyl-4-hexyloctahydro-1H-indène, acide oleique, acide palmitique, acide linoleique, acide stéarique	Sangmanee et Hongpattarakere (2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	Plantaricine (Pln E, F, J et K)	Sharma et Srivastava (2014)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> FX-6	Bactériocine (2113.842 Da)	Miao <i>et al.</i> (2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LBP-K10	<i>cis</i> -cyclo(L-Val-L-Pro), <i>cis</i> -cyclo(L-Phe-L-Pro)	Kwak <i>et al.</i> (2014)
<i>Weissella hellenica</i> D1501	Weissellicine D (62.42 KDa)	Chen <i>et al.</i> (2014)
<i>Lactobacillus amylovorus</i> JG2	Acide 2-hydroxydodécénoïque, acide décénoïque, acide 3-(4-hydroxy-3- méthylphényl) propionique, acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique	Guo <i>et al.</i> (2014)

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

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

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

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

En outre, certains genres et espèces semblent plus actifs que d'autres, *Lactobacillus plantarum* est le plus actif, et l'inhibition des levures généralement est difficile par rapport à l'inhibition des moisissures, de même, la germination des conidies est la phase de croissance la plus sensible à l'inhibition et la différence de sensibilité observée entre les espèces des moisissures peut être liée à leur capacité à changer le métabolisme cellulaire en réponse à des conditions de stress. La matrice alimentaire où on souhaite implanter les bactéries lactiques en tant que culture préservatrice et les cibles fongiques contre lesquelles on désire lutter vont influencer l'activité des souches, car chaque matrice est définie par un ensemble de paramètres physico-chimiques (Gerez *et al.*, 2009 ; Delavenne *et al.*, 2013 ; Gupta et Srivastava, 2014).

I.6. La biopréservation

La biopréservation consiste à ajouter à un aliment une culture simple, ou mixte de microorganisme, ou une molécule purifiée d'origine microbienne, en vue d'augmenter sa date limite de consommation (DLC) et de lutter contre les pathogènes (Stiles, 1996 ; Ross *et al.*, 2002). Ces microorganismes sont dits GRAS (Generally Recognized as Safe) aux États-Unis et QPS (Qualified Presumption of Safety ou présomption de sécurité qualifiée) en Europe (Pawlowska *et al.*, 2012). Pour être applicables dans les produits alimentaires, ils doivent être incapables de provoquer chez le consommateur des affections et de transférer à celui-ci la résistance aux antibiotiques (Ström *et al.*, 2005).

Les bactéries lactiques par leur utilisation en alimentation humaine, sont considérées comme non pathogènes et GRAS et ne présentent pas de problème de sécurité sanitaire, on trouve cependant quelques pathogènes opportunistes parmi les bactéries lactiques utilisées en agroalimentaire. Il s'agit pour la plupart d'espèces du genre *Enterococcus* et *Lactobacillus*. Les lactobacilles sont généralement non pathogènes, mais peuvent être isolés en quantité importante dans les caries actives et sont aussi à l'origine de cas rares d'infections opportunistes chez des patients atteints de pathologies entraînant une immuno-dépression. Par contre, aucun problème causé par la consommation d'aliments contenant des bactéries lactiques n'a été détecté jusqu'à présent, mais elles peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques, et transmettre leurs gènes de résistances aux pathogènes (Tailliez, 2004 ; Ammor *et al.*, 2007 ; Dalié, 2010 ; Pawlowska *et al.*, 2012).

I.6.1. La biopréservation des céréales et ses dérivés

Le pain est l'un des aliments de base les plus importants dans le monde et est généralement considéré comme une denrée périssable. La moisissure est la forme la plus fréquente de contamination microbienne dans le pain conduisant à des pertes économiques énormes. L'altération fongique du pain est principalement due au *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Rhizopus* (Ryan *et al.*, 2008 ; Pawlowska *et al.*, 2012). La saveur, la valeur nutritive et la durée de conservation du pain sont améliorés par l'ajout de levain (Gerez *et al.*, 2010 ; Pawlowska *et al.*, 2012). Le levain lactique a été trouvé capable d'inhiber la croissance fongique et de prolonger la durée de conservation du pain par rapport aux conservateurs chimiques.

L'étude de Lavermicocca *et al.* (2000) a révélé que, le surnageant de *Lb. plantarum* 21B concentré ou non concentré est efficace que les conservateurs chimiques tels que le propionate

de calcium. *Lb. amylovorus* DSM 19280 aussi conduit à une durée de vie de 14 jours, qui est plus élevée que celle observée pour un pain contenant 0.3 % de propionate de calcium seulement (Ryan *et al.*, 2011 ; Belz *et al.*, 2012).

Autre étude réalisée par Muhialdin *et al.* (2011), a révélé la capacité de *Lb. fermentum* Te007, *Pc. pentosaceus* et *Lb. pentosus* G004 à inhiber la germination des conidies d'*A. niger* pour une durée de 21, 16 et 12 jours respectivement dans le pain. La croissance fongique du *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* et *Penicillium* est inhibée aussi dans le pain de blé par *Lb. plantarum* FST 1,7 et 1,9 (Dal Bello *et al.*, 2007 ; Ryan *et al.*, 2008).

Parfois les bactéries lactiques à caractère antifongique ne pourraient pas inhiber les champignons dans l'hydrolysate de la farine, dans ce cas, une autre solution a été mise en place, qui est l'utilisation de métabolites de ces bactéries, par exemple, la pulvérisation sur la surface du pain les métabolites de *Pc. acidilactici* KTU05-7, *Pc. pentosaceus* KTU05-8 et KTU05-10 inhibent la croissance des champignons de 8 jours (Cizeikiene *et al.*, 2013).

L'activité antifongique des bactéries lactiques peut augmenter par l'ajout d'un autre produit ou bien d'un autre microorganisme, par exemple l'effet antifongique de *Lb. buchneri* avec *Lb. diolivorans* a été attribué à une combinaison d'acétate et de propionate (Zhang *et al.*, 2010). *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* en présence de propionate de calcium (0.2 %) ont retardé la croissance fongique de 8 jours par rapport au pain fermenté par la levure de boulangerie seulement (Gerez *et al.*, 2009).

L'association de *Lb. plantarum* 21B avec *S. cerevisiae* retarde la croissance fongique pour une période de sept jours (Lavermicocca *et al.*, 2000), par contre l'association de *Lb. rossiae* LD108 avec *Lb. paralimentarius* PB127 a montré une inhibition fongique de 30 jours (Garofalo *et al.*, 2012).

L'activité combinée des composés d'un extrait d'eau de fève avec levain fermenté par *Lb. brevis* AM7 retarde la croissance fongique pour une période de 21 jours (Coda *et al.*, 2008). Levain fermenté par *Wickerhamomices anomalus* LCF1695 et *Lb. plantarum* présente une forte activité antifongique en fonction des activités synergiques entre les peptides inhibiteurs libérés par *Lb. plantarum* et l'acétate d'éthyle produit par *We. anomalus* (Coda *et al.*, 2011).

Autre que le pain, les gâteaux de riz ont été aussi préservés par *Leuconostoc citreum* ou *Weissella confusa* contre la croissance de *Penicillium* (Baek *et al.*, 2012).

Au cours d'un maltage de l'orge, *Lb. plantarum* E76 diminue de 20 % de contamination par *Fusarium*, cette bactérie est utilisée comme culture starter avec *Pc. pentosaceus* dans le maltage afin d'équilibrer la communauté microbienne (Laitila *et al.* 2002 ; Laitila *et al.*, 2006).

La prolongation de la durée de préservation de soja dépend de la concentration de surnageant utilisée, un concentré de 4 fois de *Lb. plantarum* AF1 fait plus d'une semaine d'inhibition de la croissance d'*A. flavus* ATCC 22546, et un concentré de 5 fois de *Lb. plantarum* YML007 fait plus de 15 jours d'inhibition de la croissance d'*A. niger* (Yang et Chang, 2010 ; Ahmad Rather *et al.*, 2013).

I.6.2. La biopréservation des produits laitiers

Les produits laitiers sont un excellent substrat pour la croissance des champignons. Les champignons les plus fréquemment isolés comprennent *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* et *Phoma*. Les bactéries lactiques sont couramment utilisées comme ferments lactiques dans la production des produits laitiers fermentés. Elles offrent des avantages organoleptiques, technologiques et nutritionnels (Pawlowska *et al.*, 2012).

Une culture du yaourt de commerce en présence d'une culture de protection, constituée de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, SM63 ou, en combinaison avec *Propionibacterium jensenii* SM11 conservée à 6°C inhibe la croissance de *Candida pulcherrima*, *C. magnoliae*, *C. parapsilosis* et *Zygosaccharomyces bailii* (Miescher Schwenninger et Meile, 2004). Delavenne *et al.* (2013) ont trouvé que le yaourt fermenté par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np inhibe la croissance de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *P. brevicompactum*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Yarrowia lipolytica* à 10°C pour une période de 6 semaines.

L'ajout de 2 % de la souche *Lb. casei* AST18 dans le yaourt inhibe la croissance de *Penicillium* sp. (Li *et al.*, 2011). Les deux souches *Lb. plantarum* 16 et 62 maintiennent un effet fongistatique dans le yaourt pour une durée de 30 jours à 4°C (Crowley *et al.*, 2012). Mäeyräe-mäekinen et Suomalainen (1994) ont trouvé de manière inattendue que l'effet antifongique de la souche *Lb. casei* ssp. *ramnosus* LC-705 DSM 7061 a été amélioré par l'intermédiaire d'une souche de *Propionibacterium shermanii* ou en combinaison avec une autre souche de *Lb. casei* ssp. *pseudopantarum* 1931, par contre l'association de *Lb. plantarum* DSM 25837 avec une bactérie du genre *Propionibacterium*, ou une autre souche du genre *Lactobacillus* n'augmente pas l'effet inhibiteur (Benfeldt et Morgenstern, 2013). L'effet synergique entre les souches est aussi étudié en fromage et yaourt par Miescher Schwenninger et Meile (2003). Ils ont utilisé les souches *Propionibacterium jensenii* SM11, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM20, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM29 et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM63.

Muhialdin *et al.* (2011) ont constaté que la croissance d'*A. oryzae* et *A. niger* dans le fromage a été retardée de 6 à 9 jours à 20°C et 30°C, alors que 19 à 29 jours à 4°C par *Lb. fermentum* Te007, *Lb. pentosus* G004, *Lb. paracasei* D5 et *Pc. pentosaceus* Te010.

La réduction de *S. cerevisiae* dans le fromage après 30 jours à 4°C était à peu près similaire à la culture de *Candida* sp. par l'ajout de la souche *Lb. rhamnosus* B-445 ou *Lb. plantarum* DSA 20174 chacune en association avec *Propionibacterium thoenii* P-127 (El-Shafei *et al.*, 2008). Vandenberg et Kunka (1989) ont utilisé une molécule antifongique produite par *Pc. acidilactici* ATCC 25742 contenant de l'acide lactique et de la valine ayant un poids moléculaire inférieur à 500 daltons, comme substance inhibitrice dans la préservation de yaourt, margarine et fromage.....etc.

Deux cultures de protection sont commercialisées en 1996 et 2004 par Danisco (Danisco, Copenhague, Danemark), l'une se nomme HOLDBAC™ YM-B (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS et *Lb. rhamnosus* LC705) qui produit l'acide propionique, l'acide acétique, le diacétyle et l'acide 2-pyrrolidone-5-carboxylique, mais auparavant a été nommée Bio Profit sous la commercialisation de Wiesby (Benfeldt et Morgenstern, 2013), et l'autre se nomme HOLDBAC™ YM-C (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS et *Lb. paracasei* SM20) qui produit l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide 2-pyrrolidone-5-carboxylique et l'acide 3-phényllactique. Les cultures sont utilisées dans le fromage, yaourt et crème fraîche (Grattepanche *et al.*, 2008 ; Miescher Schwenninger et Meile, 2011).

I.6.3. La biopréservation des fruits et légumes et ses dérivés

Les fruits et légumes sont également affectés par les champignons appartiennent au genre *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Sclerotinia* et *Zygosaccharomyces* (Sathe *et al.*, 2007 ; Pawlowska *et al.*, 2012).

L'addition du surnageant de *Lb. fermentum* Te007, *Lb. pentosus* G004, *Lb. paracasei* D5 et *Pc. pentosaceus* Te010 à l'échantillon de la purée de tomate augmente la durée de conservation de 5 à 7 jours à 20°C et 30°C, et 23 à 40 jours à 4°C (Muhialdin *et al.*, 2011). *Lb. plantarum* CUK-501 a été trouvé capable d'inhiber la croissance d'*A. flavus*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus stolonifer* et de *Botrytis cinerea* dans les concombres (Sathe *et al.*, 2007).

Le jus de betterave fermenté par *Lb. plantarum* LOCK 0858 ou *Lb. acidophilus* Ch-5 inhibe totalement *F. latenicum* LOCK 0508, *Mucor hiemalis* LOCK 0519, *A. niger* LOCK 0436 et *Alternaria alternata* LOCK 0405 (Klewicka *et al.*, 2004).

Après une période de 6 jours à température ambiante, *Pc. pentosaceus* 54 inhibe totalement la croissance de *Penicillium expansum* sur la poire (Crowley *et al.*, 2013), *Pc. pentosaceus* R47 a été trouvé aussi capable d'inhiber totalement plusieurs moisissures pendant 14 jours dans un milieu à base de pomme (Rouse *et al.*, 2008).

Lan *et al.* (2012) ont trouvé que *W. cibaria* 861006 est la meilleure bactérie à caractère antifongique dans les raisins contaminés par *Penicillium oxalicum* I092302, une autre souche de *W. cibaria* TM128 a été trouvée aussi capable de diminuer de 50 % de contamination fongique des pommes (Trias *et al.*, 2008). Les souches *Lb. plantarum* 16 et 62 ont exercé les meilleures propriétés de protection contre *Rhodotorula mucilaginosa* lorsqu'elles sont inoculées dans du jus d'orange conservé à 25°C pendant 30 jours. Seulement *Lb. plantarum* 62 a montré une inhibition à 4°C (Crowley *et al.*, 2012).

I.6.4. La biopréservation de la viande et ses dérivés

La viande est un produit alimentaire très périssable, et est un excellent moyen pour le développement des micro-organismes, et affectée par les champignons appartiennent au genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* et *Scopulariopsis* (Dijksterhuis et Samson, 2007).

Lb. acidophilus NCDC 291 inhibe *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* dans la viande de poulet (Garcha et Natt, 2012). La détérioration des saucisses fumées a montré la présence d'*Eurotium repens*. L'inhibition a été faite par une bactériocine synthétisée par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 194 et K-205 (Stoyanova *et al.*, 2010).

I.6.5. La biopréservation de l'ensilage

L'altération fongique de l'ensilage est principalement due au *Fusarium*, *Aspergillus*, *Byssoschlamys*, *Paecilomyces* et *Penicillium* (Pawlowska *et al.*, 2012).

Fermentation de l'herbe par les bactéries lactiques a été testée pour des activités antifongiques contre *Rosellinia necatrix*, *Helicobasidium mompa*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium graminicola* et *Pyricularia oryzae*. Les bactéries lactiques ont réduit le taux de croissance de ces champignons à 100 % mis à part le *Fusarium oxysporum* à 35 % (Kuwaki *et al.*, 2004). L'inoculation de *Lb. buchneri* PW01 réduit la quantité de levures dans l'ensilage (Driehuis *et al.*, 1999).

Les bactéries lactiques peuvent être utilisées comme un additif, par exemple *Lb. plantarum* MiLAB393 mélangé avec *Pc. acidilactici*, *Enterococcus faecium* et *Lactococcus lactis* est actuellement dans le marché comme un additif d'ensilage (FeedTech F3000) commercialisé par De Laval (Suède) à partir de 2005. L'effet antifongique de cette culture est dû à la production de l'acide 3-phényllactique, les dipeptides cycliques et la nisine (Melin *et al.*, 2007 ; Grattepanche *et al.*, 2008 ; Miescher Schwenninger et Meile, 2011). Un autre additif d'ensilage constitué par *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. plantarum* a montré un effet antifongique (Gourama et Bullerman, 1995).

I.7. Les avantages de l'application des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont de bonnes candidates pour limiter la croissance fongiques dans les produits alimentaires. Ces bactéries produisaient des métabolites inhibiteurs, cependant le mécanisme de production ainsi que le mécanisme d'action de ces métabolites inhibiteurs sont encore peu étudiés. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité antifongique devrait désormais être facilitée par les données génomiques. Les génomes peuvent effectivement être exploités pour la découverte de nouvelles substances antifongiques, mais également pour connaître les voies de biosynthèse des molécules antifongiques. Des études ont montré que l'information génétique de l'activité antifongique des bactéries lactiques est située dans le chromosome ou bien dans un plasmide codé (Batish *et al.*, 1997 ; Osuntoki *et al.*, 2003 ; Kumar *et al.*, 2010). Freitas *et al.* (2005) ont transféré le gène de la protéine antifongique AFP1 de *Streptomyces tendae* à *Lactococcus lactis*, et Wang *et al.* (2013) ont trouvé que la souche F3A3 obtenu à partir d'un brassage chromosomique entre *Lb. plantarum* IMAU10014 et *Lb. helveticus* IMAU40097, est la bonne pour la biopréservation des fruits de kumquats, donc le transfert des gènes et le brassage chromosomique sont encore possible dont le but d'obtenir une souche de pouvoir limiter la croissance fongique et d'assurer sainement la biopréserve. De plus, la consommation des métabolites antifongiques de *Lb. plantarum* AF1 ou *Lb. plantarum* DW3 ne provoque aucun effet sur la santé animale (Kantachote *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2013), et la consommation de maïs traité par *Lb. plantarum* YML007 provoque une augmentation de la prise de poids des animaux (Ahmad Rather *et al.*, 2014). Les champignons ont montré une résistance croissante à des médicaments antifongiques, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour prévenir les infections fongiques, les lactobacilles pourraient être capables de réduire ces dernières et d'utiliser comme une solution alternative afin de les minimiser.

L'association de fluconazole avec une capsule contenant *Lb. rhamnosus* GR-1 et *Lb. reuteri* RC-14 diminue les symptômes de l'infection due à *C. albicans* après 28 jours et le traitement par voie orale par des capsules contenant *Lb. rhamnosus* GR-1 et *Lb. fermentum* RC-14 lyophilisés diminue l'infection après 4 semaines de traitement (Mailänder-Sánchez *et al.*, 2012), de plus *Lb. crispatus* a été trouvé capable de favoriser la défense des cellules épithéliales contre l'infection par *C. albicans* grâce à la participation de TLR2/4 (Toll-like receptors) et interleukine 8 (Rizzo *et al.*, 2013).

I.8. Les bactéries lactiques et les mycotoxines

I.8.1. Généralité sur les mycotoxines

Les mycotoxines (du grec mykês signifiant moisissure) sont des métabolites secondaires toxiques synthétisés pendant la phase stationnaire, de faibles masses moléculaires dont l'ingestion provoque une intoxication chez le consommateur. Ce sont des produits contaminant les denrées alimentaires d'origine animale ou végétale (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005). Les mycotoxines sont produites par une large gamme de moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Ceux-ci produisent comme mycotoxines :

- Les aflatoxines

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

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

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

- L'ochratoxine A

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

- Les fumonisines

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

- La patuline

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

- Les trichothécènes

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

- La zéaralénone

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

I.8.2. Les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines

Les mycotoxines sont très stables, et difficiles à éliminer, capables de provoquer des maladies chez les plantes, les animaux et les humains. Ces substances coûtent annuellement des millions de dollars au niveau mondial pour la santé humaine, animale et les produits agricoles contaminés (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005). Certaines bactéries lactiques, et majoritairement des espèces du genre *Lactobacillus*, ont été signalées à inhiber la production de mycotoxines (Luchese et Harrigan, 1990 ; Gourama et Bullerman, 1995 ; Haskard *et al.*, 2001). L'inhibition de la synthèse se fait par l'intermédiaire de composés de faible poids moléculaire, supposés protéiques, relâchés après lyse cellulaire ou pendant la croissance, sensibles à certaines enzymes protéolytiques et à haute température (Coallier-Ascah et Idziak, 1985 ; Gourama, 1991). Quelques dipeptides cycliques aussi pourraient intervenir dans ce mécanisme (Ström, 2005). Plusieurs bactéries lactiques ont été jugées capables de se lier les mycotoxines, la liaison semble se faire au niveau du peptidoglycane et des polysaccharides de la paroi cellulaire (Haskard *et al.*, 2001 ; Dalié *et al.*, 2010b). Il appert que, les interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines ont plusieurs origines possibles : la stimulation ou l'inhibition de la synthèse des mycotoxines, ou bien encore la dégradation ou la liaison des mycotoxines.

I.8.2.1. La stimulation

Certaines mycotoxines, leur production est induite en présence de bactéries lactiques. Une activation importante de la production de fumonisines associée à une réduction de croissance fongique est observée par *Pc. pentosaceus* L006. L'influence de *Pc. pentosaceus* L006 sur la production de fumonisines par les souches de *Fusarium* est souche-dépendante (Dalié *et al.*, 2012). Hassan et Bullerman (2008) ont indiqué une augmentation significative de la production de la FB1 et de DON respectivement chez *Fusarium proliferatum* M 5991 et *F. graminearum* R 4053 lorsqu'ils sont cultivés simultanément en milieu liquide avec *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*.

La production de l'aflatoxine est plus élevée aussi dans un bouillon de Lab-Lemco tryptone modifié, inoculé par *Aspergillus parasiticus* en association avec *Lactococcus lactis* et dans des milieux dont le pH initial est égal à 4.2 (Luchese et Harrigan, 1990). Dans le même milieu, l'aflatoxine G1 produite par *Aspergillus flavus* V3734/10 NRRL 2999 est stimulée par

Streptococcus lactis 354/07 NCDO 497, la stimulation est due à la présence de la nisine et de l'extrait de levure (Ward, 1976).

L'effet de différentes souches de *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus* CCN 12, *Lb. acidophilus* CCN 36 et *Lb. acidophilus* CCN 68) et deux souches de *Bifidobacterium* (*B. bifidum* BB13 et *B. bifidum* CCN 381) sur la production de l'AFB1 par *Aspergillus flavus* NRRL 2999 a été déterminé par Kabak et Var, (2004). Les bactéries n'ont pas été efficaces dans la prévention de la croissance d'*A. flavus* NRRL 2999 dans un bouillon de MRS et lait écrémé. Cependant, des niveaux plus élevés de l'AFB1 ont été obtenus en présence des souches de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*.

I.8.2.2. L'inhibition

Les interactions entre les bactéries lactiques et les moisissures conduisent parfois à une inhibition de l'un de ces microorganismes et ses métabolites.

L'association de *Streptococcus lactis* avec *Aspergillus flavus* réduit les teneurs en aflatoxines, en parallèle, l'*Aspergillus flavus*, réduit la croissance de *Streptococcus lactis* et affecte la morphologie de la cellule bactérienne (Coallier-Ascah et Idziak, 1985). L'inhibition de la production d'aflatoxine par *Streptococcus lactis* résulterait de la présence d'un composé thermostable de faible poids moléculaire caractérisé comme étant un phosphoglycolipide contenant un noyau aromatique (Coallier-Ascah, 1981).

L'effet de l'AFB1 sur les bactéries lactiques au cours de la fermentation a été étudié aussi. L'activité protéolytique chez *Lactococcus lactis* est inhibée par l'AFB1, l'inhibition est proportionnelle à la concentration de la toxine initiale utilisée (Mohran *et al*, 1984). Ces mêmes auteurs ont conclu qu'il n'y a aucun effet inhibiteur chez *Lc. diacetylactis*, *St. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. casei*.

Lb. casei KC-324 a montré une capacité à inhiber la production de l'AFB1 et la croissance d'*Aspergillus flavus* ATCC 15517 dans un milieu liquide. Le surnageant obtenu à partir de différents milieux de culture a montré une activité antiaflatoxigénique supérieure. Les métabolites antiaflatoxigéniques de *Lb. casei* KC-324 ont été produits dans une large gamme de températures, comprises entre 25°C et 37°C. Cependant, ces métabolites ne sont pas thermostables. L'activité inhibitrice n'a pas été influencée par le changement de pH de surnageant entre 4 et 10. Par contre, l'activité antiaflatoxigénique a été légèrement réduite à pH est égal à 10 (Chang et Kim., 2007).

Gourama et Bullerman (1995) ont montré l'effet inhibiteur de *Lactobacillus* spp. sur la production d'aflatoxine par *A. flavus* subsp. *parasiticus* sans affecter fortement la croissance de la moisissure. Ils ont constaté que, l'aflatoxine B1 et G1 en présence de *Lactobacillus* sont inférieure par rapport au contrôle, avec peu d'inhibition de mycélium.

Gourama (1997) et Gourama et Bullerman (1997) ont rapporté l'activité inhibitrice du surnageant de *Lb. casei* sur la croissance de *Penicillium* spp. et sur la production des toxines (patuline et citrinine), et même l'activité antiaflatoxigénique de *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* sur *A. flavus* subsp. *parasiticus*. Les composés actifs dans le surnageant dans les deux cas ont été trouvés être sensibles à certaines enzymes protéolytiques et à haute température.

L'étude de l'influence des métabolites extracellulaires produits dans le milieu MRS par *Pc. pentosaceus* L006 sur la biosynthèse des fumonisines en milieux liquide a révélé une inhibition de la biosynthèse de ces toxines. L'étude réalisée en milieu solide sur grains de maïs a montré que *Pc. pentosaceus* inoculé directement avec les spores de *Fusarium* n'inhibe pas significativement la production de fumonisines. En revanche, l'utilisation des métabolites extracellulaires produits dans le milieu MRS semble l'inhiber (Dalié *et al.*, 2012). Ces mêmes auteurs, ils ont supposé que la réduction de la FB1 par *Pc. pentosaceus* L006 est un phénomène réversible, de piégeage ou de séquestration qui est affecté par l'évolution du pH du milieu et la température.

I.8.2.3. La dégradation

Les moisissures toxigènes sont souvent capables de dégrader les mycotoxines qu'ils produisent pour les utiliser comme source d'énergie, lorsque les conditions deviennent défavorables, certaines bactéries lactiques sont aussi capables de dégrader les mycotoxines. Les bactéries mésophiles de Leben marocain (*Lactococcus lactis* en culture pure ou combiné avec *Lactococcus diacetylactis*) permettent une destruction totale de l'aflatoxine M1, et une destruction de 58 % seulement par *Lactococcus diacetylactis* (Khaddor *et al.*, 2003). Au cours de la fermentation lactique, plusieurs espèces bactériennes ont montré des capacités dégradatives des aflatoxines. Rasic *et al.* (1991) ont observé une diminution des taux de l'AFB1 dans le yaourt et le lait acidifié. Les taux de l'AFB1 ajoutés au lait avant fermentation à des concentrations allant de 600, 1000 et 1400 µg/kg ont été réduit respectivement de 97, 91 et 90 % dans le yaourt à pH 4.

Lb. acidophilus, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. delbruekii* et *Lb. plantarum* ont été utilisés pour évaluer le potentiel de détoxification de l'AFB1 dans le maïs contaminé. Tous les traitements ont montré des réductions significatives de l'AFB1, une réduction de 44.5 % a été observée dans le maïs contaminé par 50 ng/g, et une réduction de 29.9 % dans le maïs contaminé par 500 ng/g. *Lb. plantarum* est le plus efficace dans la dégradation de l'AFB1 (Oluwafemi *et al.*, 2010). Le niveau de l'OTA est réduit, après 10 heures de fermentation, à 34 % par *Lb. brevis*, à 29 % par *Lb. sanfrancisco* et à 40 % par *Lb. plantarum*, et après 24 heures d'incubation, à 37 % par *Lb. brevis*, à 50 % par *Lb. sanfrancisco* et à 54 % par *Lb. plantarum* (Piotrowska et Zakowska, 2000). L'exposition de la patuline à des cellules de *Lb. plantarum* (10^{10} UFC/ml) ou leur surnageant, conduit à une transformation de 80 % de la patuline à E-ascladiol et Z-ascladiol pour une période d'incubation de 4h à 37°C. Les isomères de l'ascladiol sont ensuite transformés au cours d'une incubation exempt de cellules pour une durée de 4 semaines à 4°C (Hawar *et al.*, 2013).

I.8.2.4. La liaison

I.8.2.4.1. La liaison de l'ochratoxine A

La capacité d'élimination de l'OTA par *Oenococcus oeni* dépend de l'éthanol et la concentration initiale de l'OTA. Le pourcentage d'élimination de la toxine le plus élevé est dans des cultures contenant 5 % d'éthanol et 2 µg de l'OTA/l, *O. oeni* ne peut pas éliminer efficacement l'OTA dans le vin (Mateo *et al.*, 2010).

Le pourcentage de l'OTA éliminé au cours de la croissance bactérienne d'*Oenococcus oeni* RM11, *Lb. plantarum* CECT 748T et *Lb. brevis* RM273 est de 8 à 28 %. L'OTA est partiellement récupérée (31 à 57 %) à partir du culot bactérien. Le surnageant n'a pas pu dégrader l'OTA, et aucun produit de dégradation de l'OTA n'a été détecté, ce qui confirme que, l'élimination de l'OTA par les bactéries lactiques est un phénomène de liaison cellulaire (Prete *et al.*, 2007).

Fuchs *et al.* (2008) ont examiné trente souches de bactéries lactiques pour leur aptitude à éliminer l'OTA, ils ont signalé au moins 95 % d'élimination de l'OTA en milieu liquide par *Lb. acidophilus*.

I.8.2.4.2. La liaison de l'aflatoxine B1

La capacité de bactéries lactiques pour éliminer les toxines *in vitro* et *in vivo* a été étudiée par El-Nezami *et al.* (1998a ; 2000). *In vitro*, *Lb. rhamnosus* est capable d'éliminer environ 80 % de l'AFB1. *In vivo*, 54 % de l'AFB1 ajoutés dans le duodénum de poulet ont été éliminés et l'absorption intestinale a été réduite à 74 %. L'élimination de l'AFB1 par *Lb. rhamnosus* GG réduit sa capacité d'adhésion de 30 % à 5 % (Kankaanpää *et al.*, 2000).

Plusieurs bactéries probiotiques sont capables de lier l'AFB1 *in vitro*, y compris *Lb. rhamnosus* LC-705 et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS. Un mélange de ces deux probiotiques est utilisé dans l'industrie de l'alimentation humaine et animale comme un additif. *In vitro*, 57 à 66 % de l'AFB1 sont éliminés par le mélange probiotique, mais seulement 38 à 47 % pourraient être extraits à partir de la surface de la bactérie. Dans des expériences *ex vivo*, 25 % de l'AFB1 sont liés, et l'absorption tissulaire de l'AFB1 est significativement réduite dans l'anse duodénale. En outre, le mucus intestinal réduit de manière significative la liaison entre l'AFB1 et le mélange probiotique (Gratz *et al.*, 2005).

Afin de déterminer le composant responsable de la liaison, Lahtinen *et al.*, 2004 ont traité *Lb. rhamnosus* LGG par différents traitements enzymatiques et chimiques et Hernandez-Mendoza *et al.*, (2009) ont évalué la capacité de cinq bactéries probiotiques pour lier l'AFB1 et le rôle clé des acides téchoïques dans le mécanisme de liaison. Ils ont constaté que la liaison de l'AFB1 se fait au niveau du peptidoglycane de la paroi cellulaire ou composé étroitement associé au peptidoglycane, les acides téchoïques pourraient être responsables de la liaison (Lahtinen *et al.*, 2004 ; Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009).

La liaison de l'AFB1 par des bactéries lactiques est un processus rapide (pas plus d'une minute) dépend de la souche et du pH, cette liaison implique dans la formation d'un complexe réversible entre la toxine et la surface de la bactérie, sans modification chimique de la toxine par des bactéries viables et non viables (El-Nezami *et al.*, 1998a ; Bueno *et al.*, 2007). *Enterococcus faecium* M74 élimine de 19.3 à 30.5 % de l'AFB1, et *Enterococcus faecium* EF031 élimine de 23.4 à 37.5 % à une période d'incubation de 48h. L'élimination est plus élevée à pH 7.0 (Topcu *et al.*, 2010).

Deux souches de *Lb. rhamnosus* enlèvent environ 80 % de toxine au début de la période d'incubation. Une concentration bactérienne au moins de 2.10^9 UFC/ml incubée à 37°C nécessaire pour élimination des quantités significatives de l'AFB1 (El-Nezami *et al.*, 1998a ; 1998b).

La stabilité du complexe bactérie-toxine est dépendante de la souche bactérienne. Le complexe *Lb. casei* 7R1-aflatoxine B1 a une grande stabilité. *Lb. casei* L30, est moins sensible aux effets inhibiteurs des sels biliaires (Fazeli *et al.*, 2009 ; Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009). Les réactions impliquées dans la liaison (adsorption) et la libération (désorption) de l'AFB1 ont été étudiées chez *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC-705 et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS viables et tués par la chaleur. Les souches ont été incubées en solution saline contenant des concentrations variantes de l'AFB1 (de 0.0017 à 13.3 mg/ml). La désorption est plus élevée chez les bactéries viables que les bactéries tuées par la chaleur. Le traitement thermique semble modifier les propriétés de surface de la bactérie par exposition de nouveaux sites d'adsorption (Lee *et al.*, 2003). Les souches de *Lb. casei* ont présenté différents degrés de liaison de l'aflatoxine ; la souche la plus performante est *Lb. casei* L30, par un pourcentage de liaison de 49.2 % de l'aflatoxine disponible (4.6 µg/ml) et une libération de 0.6 à 9.2 % (Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009). Environ 56 et 61 % de la toxine sont éliminés par *Lb. plantarum* et *Lb. fermentum*, respectivement et une partie de l'AFB1 liée a été libérée dans le milieu par centrifugation répétée (Fazeli *et al.*, 2009).

La température, l'ultrason et le pH n'ont eu aucun effet significatif sur la libération de l'AFB1 liée par *Lb. rhamnosus*, alors que le sel (NaCl et CaCl₂) a montré des effets mineurs et l'urée a eu le plus grand effet, ce qui suggère que des interactions hydrophobes jouent un rôle important dans la liaison (Haskard *et al.*, 2000 ; 2001).

Les cellules mortes par ébullition de *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* se lient de 86.1 et 100 % de l'AFB1 (2 µg) dans une solution de tampon phosphate, respectivement. Alors que les cellules viables des deux souches se lient seulement de 54.35 et 81.0 %, respectivement. Le culot de *Lactococcus lactis* lavé par un tampon, par méthanol et par chloroforme libère de 13.13, 20.0 et 27.5 % de l'AFB1 respectivement. Le tampon et le méthanol ne pourraient pas libérer le complexe formé entre l'AFB1 et les cellules vivantes ou mortes de *Streptococcus thermophilus*, cependant le chloroforme libère de 39.5, 17.0 et 28.12 % de l'AFB1 liée par les cellules vivantes, cellules tuées par ébullition et par autoclavage, respectivement. Les cellules mortes de *Lactococcus lactis* éliminent à 100 % de l'AFB1 (2 µg) dans les huiles de maïs, de tournesol et de soja, tandis que les cellules mortes de *Streptococcus thermophilus* éliminent de 96.8, 81.0 et 96 % de la toxine dans les huiles précédents, respectivement (Shahin, 2007). La viabilité d'*Enterococcus faecium* M74 n'a pas un effet significatif sur la détoxification de l'AFB1 (Topcu *et al.*, 2010).

I.8.2.4.3. La liaison de l'aflatoxine M1

L'aflatoxine M1 (AFM1) est un composé hautement toxique présent dans le lait. *Lb. rhamnosus* GG, qui est capable de lier l'AFB1, B2, G1 et G2, et *Lb. rhamnosus* LC-705, qui est capable de lier l'AFB1, ont également la capacité de réduire significativement la quantité de l'AFM1 dans des milieux liquides (Pierides *et al.*, 2000).

Les bactéries du yaourt n'entraînent qu'une faible élimination de l'AFM1 ajoutée artificiellement au lait à 5 µg/l (19 % pour *Lb. bulgaricus*, 10 % pour *St. thermophilus* et 8 % pour les deux souches combinées) (Khaddor *et al.*, 2003).

Une autre étude, a montré que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH- 2 lie de 18.70 % dans un tampon phosphate et de 27.56 % dans le lait de l'AFM1, tandis que *St. thermophilus* ST- 36 lie de 29.42 % dans un tampon phosphate et de 39.16 % dans le lait (Sarimehmetoğlu et Küplülü, 2004).

La liaison de l'AFM1 par *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (10^8 UFC/ml) viables et tués par la chaleur dans un tampon phosphate est variée entre 10.22 à 26.65 % et 14.04 à 28.97 %, respectivement, et dans le lait reconstitué est variée entre 7.85 à 25.94 % et 12.85 à 27.31 %, respectivement, à une période d'incubation de 4h (Kabak et Var, 2008).

El Khoury *et al.*, (2011) ont observé une liaison de 87.6 % de l'AFM1 après 14h d'incubation pour *Lb. bulgaricus*, 70 % pour *St. thermophilus* et 68 % pour les deux souches en association dans une solution de tampon phosphate.

La liaison de l'AFM1 par *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* et *Bifidobacterium lactis* seules, ou en combinaison avec une souche de *S. cerevisiae* tuée par la chaleur (100°C pendant une heure) dans un lait UHT (ultra-haute température) contaminé par 0.5 ng de l'AFM1/ml a été étudiée par Corassin *et al.*, (2012). La liaison est de 11.5 ± 2.3 % et 11.7 ± 4.4 % pendant 30 min et 60 min en absence de la levure respectivement, en présence de la levure la liaison est de 100 %.

Selon Kabak et Var (2008), la liaison est réversible, et une faible proportion de l'AFM1 est remise dans la solution. La période d'incubation et la concentration de la toxine ne présentent aucun effet sur l'élimination de l'AFM1.

I.8.2.4.4. La liaison de la patuline

L'élimination de la patuline est plus élevée à pH 4.0 et à une période d'incubation entre 24h et 48h par des bactéries viables et non viables (Topcu *et al.*, 2010 ; Hatab *et al.*, 2012). Les souches *Enterococcus faecium* M74 et *Enterococcus faecium* EF031 ont la capacité d'éliminer la patuline. La souche M74 élimine de 15.8 à 41.6 %, et la souche EF031 élimine de 19.5 à 45.3 % (Topcu *et al.*, 2010). L'absorption maximale de la patuline est enregistrée par *B. bifidum* 6071 et *Lb. rhamnosus* 6149 viables (52.9 % et 51.1 %) et non viables (54.1 % et 52.0 %) (Hatab *et al.*, 2012).

Fuchs *et al.* (2008) ont examiné trente souches de bactéries lactiques pour leur aptitude à éliminer la patuline, ils ont signalé que 80 % de la patuline est éliminé par *B. animalis*.

I.8.2.4.5. La liaison de la zéaralénone

L'exposition de *Lb. rhamnosus* à deux toxines à la fois, diminue de manière significative son aptitude à éliminer la zéaralénone et α -zéaralénol dans une solution, ce qui indique que ces toxines ont le même site de fixation sur la cellule bactérienne. *Lb. rhamnosus* (viable et non viable) a été testé pour sa capacité à éliminer ou dégrader la zéaralénone et α -zéaralénol, environ 50 % de la toxine sont liés, la liaison est confirmée par l'absence des produits de dégradation (El-Nezami *et al.*, 2002a).

Les souches sélectionnées par Niderkorn *et al.* (2006) ont également capable d'éliminer jusqu'à 88 % de la zéaralénone. Selon Mokoena *et al.* (2005) la période d'incubation affecte la liaison de la zéaralénone par des bactéries lactiques.

I.8.2.4.6. La liaison de la beauvericine

La beauvericine produite par différentes espèces de *Fusarium* (*proliferatum*, *semitectum* et *subglutinans*), mais la première preuve de production de beauvericine a été détectée chez *Paecilomyces fumosoroseus* et *Beauveria bassiana* d'où cette mycotoxine tire son nom (Logrieco *et al.*, 1998). Une partie de cette mycotoxine est adsorbée par la paroi cellulaire et une partie internalisée par les bactéries. *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. animalis* réduisent de 83.1, 76.5, 77.7 et 78.0 % respectivement (Meca *et al.*, 2012).

I.8.2.4.7. La liaison des trichothécènes et des fumonisines

El-Nezami *et al.* (2002b) ont étudié la capacité des souches de *Lactobacillus* et *Propionibacterium* pour éliminer sept toxines de *Fusarium* (trichothécènes) en milieu liquide. D'après les auteurs, *Lb. rhamnosus* GG et *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS sont capables d'éliminer de 18 à 93 % de déoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, et fusarénone. *Lb. rhamnosus* LC-705 élimine entre 10 et 64 % de déoxynivalénol et diacétoxyscirpénol. Vingt-neuf souches de bactéries lactiques et propioniques ont été testés pour leur capacité à éliminer le déoxynivalénol (DON) et des fumonisines B1 et B2 dans un milieu liquide. Les bactéries lactiques éliminent de 55 % de DON, 82 % de la FB1 et 100 % de la FB2. La liaison n'a pas été affectée par le pH, sauf pour les fumonisines, une diminution de près de 0 % à pH neutre (Niderkorn *et al.*, 2006).

Les bactéries viables de *Lb. plantarum* FB VII et *Lb. plantarum* GT III se lient de 16.41 % et 56.12 % de DON respectivement, *Lb. pentosus* K VI tué par pasteurisation et stérilisation se lie de 35.95 % et 47.48 % de DON respectivement (Franco *et al.*, 2011).

Le peptidoglycane et l'acide tricarballoylique (TCA) sont des éléments importants dans la liaison de la fumonisine B1 et B2 par les bactéries lactiques (Niderkorn *et al.*, 2009).

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage: Trois types d'échantillons ont été utilisés : l'ensilage, la carotte et le lait cru de chamelle.

- **Ensilage :** Conditionnement de l'herbe dans un sachet noir hermétiquement clos, le liquide obtenu durant la fermentation a été utilisé pour l'isolement.
- **Lait de chamelle :** Le lait est prélevé à Bechar (Abadlla) dans des conditions d'hygiène et transporté immédiatement au laboratoire dans des glacières.
- **Carotte :** Un gramme de carotte a été ajouté à 9 ml de milieu MRS (De Man *et al.*, 1960). L'ensemble a ensuite été incubé en anaérobiose dans des jarres (BBL™ GasPak™ Catalyst, Becton Dickinson) à 37°C pendant 24h.

II.2. Isolement des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été isolées des échantillons de lait de chamelle, carotte et ensilage. Des dilutions décimales successives ont été réalisées dans de l'eau physiologie stérile (9 ml) jusqu'à une dilution de l'ordre de 10^{-6} , ensuite 1 ml a été prélevé à partir de la dilution 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} , et ensemencés en profondeur dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MRS plus CaCo₃ (5 g/l). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Après incubation, 10 % des différents types de colonies formées, entourées par un halo clair ont été sélectionnées puis purifiées sur MRS, puis des tests complémentaires notamment le test de catalase et la coloration de Gram ont été réalisés.

II.3. Les souches fongiques

Les souches fongiques utilisées ont été principalement fournies par le laboratoire de parasitologie et mycologie de l'hôpital universitaire à Sidi-Belabess, le laboratoire de microbiologie à l'université de Mascara et le laboratoire de phytopathologie à l'université d'Oran. Les champignons sont les suivants : *Aspergillus* sp., *Fusarium roseum*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. et *Stemphylium* sp.

II.4. La recherche de l'activité antifongique

La recherche de l'activité antifongique a été réalisée en premier lieu par un test qualitatif, puis par un test quantitatif.

II.4.1. Préparation de suspension monosporale

L'*Aspergillus* sp. est cultivé sur extrait de malt agar à 30°C pendant 5 jours, puis 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte, cette suspension est filtrée sur papier Wathman N°= 100 mm et dénombrée par cellule de Malassez.

II.4.2. Test qualitatif : Méthode des stries

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode de double couche ou de recouvrement décrite par Magnusson *et al.* (2003) a été utilisée. Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries sur MRS, puis incubés à 30°C pendant 48h. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar (0.7 % d'agar) contenant 0.1 ml de suspension monosporale (10^3 spores/ml). Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour des stries de bactéries selon les critères suivants : (-) : absence de zone d'inhibition ; (+) : Zone d'inhibition comprise entre 0.1 à 3 % de la surface de la boîte de Pétri ; (++) : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8 % de la surface de la boîte de Pétri ; (+++) : Zone d'inhibition supérieure à 8 % de la surface de la boîte de Pétri. Les tests d'inhibition ont été réalisés en triplicat.

II.4.3. Test qualitatif : Méthode de confrontation

Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries sur MRS ou bien dans toute la surface de la boîte, puis incubés à 30°C pendant 48h, ensuite une bouture de champignon a été déposée au centre de la boîte et incubée à 30°C pendant trois jours, afin de mesurer le diamètre du champignon (Gerbaldo *et al.*, 2012).

II.4.4. Test quantitatif : Méthode des puits

Des puits sont réalisés en utilisant l'emporte pièce sur la boîte de Pétri contenant 10 ml de MRS recouverts par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar contenant la suspension monosporale (10^3 spores/ml), ensuite 100 µl de surnageant des bactéries lactiques sont déposés dans les puits [Les souches lactiques ont été cultivées dans un bouillon MRS à 30°C, après 18h d'incubation, les cellules ont été centrifugées à 8000 gr pendant 10 min. La filtration du surnageant sur filtre Millipore de 0.22 µ est nécessaire pour prévenir la croissance des cellules bactériennes]. Un témoin négatif contenant le milieu de culture non inoculé est réalisé. Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour de chaque puits.

II.5. Conservation des souches

La conservation de courte durée se fait sur gélose MRS inclinée en tube conservé à 4°C, les repiquages se font toutes les deux semaines ; et la conservation de longue durée se fait dans un milieu de culture de conservation qui contient MRS ou lait écrémé avec 30 % de glycérol en tube eppendorf conservé à -18°C.

II.6. Pré-identification des souches

L'identification a été réalisée par des méthodes d'analyses classiques basées sur des critères physiologiques et biochimiques et comparée au tableau d'identification (Carr *et al.*, 2002).

- Le bouillon MRS a été inoculé avec 0.1 ml d'une culture de 18h de la souche lactique. Les cultures ont ensuite été incubées à 45°C pendant 48h pour voir l'influence de la température sur la croissance bactérienne.
- Le bouillon MRS avec glucose et cloche de Durham est utilisé pour mettre en évidence la production du CO₂ et de savoir le type fermentaire des souches.
- La recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH) est étudiée sur le milieu M16 BCP. Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et réalcalinisent le milieu (Srinivasulu Reddy *et al.*, 1969).
- La recherche de la dégradation de la gélatine.
- Pour le profil fermentaire, des solutions de différents sucres à 3 % (glucose, mannitol, mélibiose, rhamnose, arabinose, sucrose, xylose, inositol, lactose, tréhalose, sorbitol, amygdaline, esculine, fructose, maltose et galactose) sont stérilisées par autoclavage à 120°C pendant 10 min. Une solution bactérienne servant à ensemercer les puits contenant les différentes sources de carbone a été préparée. Une culture de 18h de la souche lactique est centrifugée à 8000 gr pendant 10 min. Le culot récupéré est additionné de 1 ml de l'eau distillée stérile, puis recentrifugé pour débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur. A ce culot, 1 ml de milieu MRSBCP-EV [milieu MRS sans extrait de viande et additionné de pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur du pH] est additionné pour former la solution cellulaire ; 100 µl de cette solution bactérienne sont déposés dans chaque puits contenant différentes sources de carbone. La lecture est faite après incubation pendant 48h à 30°C par comparaison au témoin sans sucre.

La fermentation des sucres se traduit par une production d'acide dans le milieu qui vire du pourpre au jaune.

II.7. Détermination du spectre d'inhibition

Les bactéries lactiques ont été testées vis-à-vis de *Fusarium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. et *Stemphylium* sp. par la méthode de confrontation.

II.8. Caractérisation des métabolites antifongiques

II.8.1. L'effet de la température

Les bactéries lactiques ont été ensemencées en deux lignes sur gélose MRS et incubées à 30°C pendant 48h. Ensuite, les boîtes ont été exposées à la vapeur de chloroforme pendant 30 min pour tuer les bactéries, puis incubées à 45, 70, 100 et 120°C pendant 20 min et stockées à 8°C et -18°C pendant 15 jours. Le reste de l'activité antifongique a été évalué par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003).

II.8.2. L'effet des enzymes protéolytiques

L'effet des enzymes protéolytiques a été déterminé selon la méthode décrite par Hirsch (1979), 10 µl de l'enzyme [chymotrypsine ou pepsine (1 mg/ml, préparé dans 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)] ont été appliqués autour des colonies après traitement par le chloroforme. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 4h, puis 10 ml d'extrait de malt agar (0.7 % agar) contenant 0.1 ml de la suspension monosporale (10^3 spores/ml) sont ensuite versés sur la boîte. Les zones d'inhibition ont été évaluées après trois jours d'incubation à 30°C dans les boîtes traitées par les enzymes et une boîte non traitée.

II.8.3. L'effet du pH

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003) avec un changement du pH du milieu d'extrait de malt agar à 2, 3, 4, 5, 6 et 7.

II.8.4. La détection des substances volatiles

La détection des substances volatiles antifongiques a été évaluée selon la méthode décrite par Fiddaman et Rossall (1993). Les souches ont été ensemencées sur gélose MRS et les boîtes sont scellées par du parafilm et incubées à 30°C pendant 24h, en parallèle une bouture de

champignon a été inoculée sur extrait de malt agar et incubée à 30°C pendant 24h, puis un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, les deux boîtes ont été scellées par du parafilm et incubées à 30°C pendant 72h, l'évaluation de l'inhibition a été faite par une comparaison au témoin dont la boîte de MRS exempte de bactérie.

II.8.5. L'effet fongicide ou fongistatique

L'effet fongicide ou fongistatique sur la germination des conidies, a été évalué par le transfert d'un fragment à partir de la zone d'inhibition, à un nouveau milieu d'extrait de malt agar et incubé à 30°C pendant 72h. L'effet fongicide ou fongistatique sur la croissance du mycélium, a été évalué par une inoculation d'une bouture de champignon dans une culture de MRS de la souche inhibitrice, après sept jours d'incubation à 30°C, la bouture a été transférée dans un milieu d'extrait de malt agar et incubée à 30°C pendant 72h.

II.8.6. L'effet du milieu

Une bouture de champignon de 0.5 cm de diamètre a été inoculée dans 1 ml et 10 ml de culture de 24h de la souche inhibitrice, et dans une culture d'acide lactique et acide acétique à des concentrations minimales inhibitrices [CMI a été évaluée par la méthode des puits à différentes concentration de 1 à 30 mg/ml] et incubée à 30°C pendant 1 mois.

Une bouture de champignon de 0.5 cm de diamètre a été déposée au centre de la boîte de Pétri qui contient différents milieux et incubée à 30°C pendant 5 jours, pour évaluer le diamètre du champignon.

- 1- 10 ml d'un surnagent de 24h des souches inhibitrices avec 0.15 g d'agar.
- 2- MRS agar à pH 4, autoclavé une fois et deux fois.
- 3- Extrait de malt agar à pH 4, autoclavé une fois et deux fois.
- 4- MRS agar à pH 3 et 5.
- 5- L'ajout de 5 ml d'extrait de malt agar sur les milieux décrits au point 1 et 2.

II.9. Cinétique de production des métabolites antifongiques

Pour étudier la cinétique de production des métabolites antifongiques, 200 ml de milieu MRS bouillon ont été inoculés avec 2 ml d'une culture jeune de 18h, puis ont été incubés à 30°C pendant 96h. Des aliquotes de 15 ml ont été prélevés à 0h, 3h, 4h, 8h, 12h et 16h, puis à des intervalles réguliers de 24h, pour évaluer le pH du milieu de culture, la croissance cellulaire par la mesure de la densité optique à 600 nm et l'activité antifongique par l'utilisation de

10 ml du surnageant avec 0.15 g d'agar autoclavés à 120°C pendant 20 min, puis coulés dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été ensuite recouvertes par 5 ml de milieu d'extrait de malt agar. A l'aide d'un emporte pièce une bouture de champignon a été déposée au centre de la boîte, puis incubée à 30°C pendant 5 jours pour mesurer le diamètre de croissance par rapport au témoin qui contient deux couches l'une de MRS autoclavé 2 fois et l'autre d'extrait de malt agar. Le pourcentage d'inhibition est exprimé comme suivant : $P_I = 100 - P_c$ et $P_c = D_C.100 / D_T$. P_I : pourcentage d'inhibition ; P_c : pourcentage de croissance de moisissure inhibée ; D_C : diamètre de moisissure inhibée ; D_T : diamètre de moisissure témoin.

II.10. Facteurs affectant la production des substances antifongiques

II.10.1. L'activité antifongique à différentes températures d'incubation

Les bactéries ont étéensemencées en deux lignes sur gélose MRS, puis incubées à 25°C, 30°C et 37°C pendant 48h. Puis les bactéries ont été traitées par chloroforme. Le reste de l'activité antifongique a été évalué par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003).

II.10.2. L'activité antifongique à différentes périodes d'incubation

Les bactéries ont étéensemencées en deux lignes sur gélose MRS, puis incubées à 30°C pendant 24, 48, 72 et 96h. Puis les bactéries ont été traitées par chloroforme. Le reste de l'activité antifongique a été évalué par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003).

II.10.3. L'activité antifongique à différents pH du milieu initial

Les bactéries ont étéensemencées en deux lignes sur gélose MRS à différents pH (3, 4, 5, 6 et 7) et incubées à 30°C, pendant 48h. Le reste de l'activité antifongique a été évalué par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003).

II.10.4. L'activité antifongique sur MRS agar modifié

La composition de la gélose MRS a été modifiée, on utilise MRS sans: extrait de viande, extrait de viande et glucose, extrait de viande et peptone, extrait de viande et extrait de levure, acétate de sodium et un milieu MRS sans extrait de viande, et le glucose est remplacé à chaque fois par un sucre (sucrose, fructose, galactose, mannitol, sorbitol, arabinose, xylose, rhamnose, tréhalose et lactose) pour évaluer l'effet de ces composés sur la production de composés

antifongiques. L'activité antifongique a été évaluée par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003).

II.10.5. L'activité antifongique en présence de glycérol

Pour détecter l'activité antifongique des lactobacilles en présence de glycérol en anaérobiose, deux types de milieux ont été utilisés MRS_a (MRS avec glycérol) et MRS_b (MRS avec glycérol et sans glucose et extrait de viande) [2 ml du glycérol dans 200 ml MRS]. L'activité antifongique a été évaluée sur MRS_a et MRS_b par la méthode décrite par Magnusson *et al.* (2003), et l'effet des enzymes protéolytiques a été évalué sur MRS_a par la méthode décrite par Hirsch (1979).

II.11. L'effet des substances antifongiques sur la morphologie d'*Aspergillus*

L'effet des substances antifongiques a été évalué par une observation microscopique, après coloration par le bleu de méthylène d'un fragment de champignon inhibé par les bactéries lactiques, à partir de la zone blanche et noire apparut sur les boîtes de Pétri, et d'un disque de mycélium qui a été incorporé dans une culture jeune de bactéries lactiques, et dans une solution d'acide lactique et d'acide acétique à des concentrations minimales inhibitrices et incubé à 30°C pendant 5 jours.

II.12. Décontamination

La pâte de l'hydrolysate de la farine (25 g dans 200 ml de l'eau) a été fermentée pendant 6 jours à 30°C par les bactéries lactiques, puis a été cuite au four à 120°C pendant 20 min, ensuite a été contaminée par 0.1 ml de 10³ spores/ml et incubée à 30°C pendant 3 jours.

Les souches lactiques inoculées dans 20 ml de jus d'abricot (62 g dans 500 ml de l'eau + 10 g de glucose ou sans glucose), sont incubées à 30°C pendant 4 jours, puis ce jus a été contaminé par 0.1 ml de 10³ spores/ml et incubé à 30°C pendant 3 jours. L'isolement de champignon du jus d'abricot avec sucre et sans sucre a été réalisé, les échantillons qui montrent 0 UFC/ml ont été incubés au réfrigérateur (8°C) pendant 1 mois pour refaire l'isolement.

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. La recherche de l'activité antifongique des lactobacilles

La production de substances antifongiques envers l'*Aspergillus* sp. a été recherchée par la méthode de double couche chez 54 souches de bactéries lactiques, isolées du lait cru de chamelle, ensilage et du carotte. Les résultats ont montré qu'environ 16.66 % des isolats présentaient une activité antifongique, dont 11.11 % sont des lactobacilles (**Tableau 2**). Les souches d'ensilage et les souches du lait cru de chamelle, avant la purification ont montré une inhibition totale. Après la purification aucun changement dans la zone d'inhibition de la souche isolée du carotte, une seule souche isolée du lait cru de chamelle et 4 souches d'ensilage ont une capacité d'inhiber l'*Aspergillus* sp., mais les zones d'inhibition sont variables selon la souche. Ces résultats confirment la synergie entre les métabolites produits par les souches lactiques.

Dans cette étude, nous avons étudié les propriétés antifongiques de cinq souches de *Lactobacillus plantarum* (LB54, LB52, LB51, LB20 et LB24) et une souche de *Lactobacillus farciminis* (LB53). L'activité antifongique de *Lb. plantarum* a également été rapportée par d'autres auteurs: Laitila *et al.* (2002) ; Sjögren *et al.* (2003) ; Ström *et al.* (2005) ; Sathe *et al.* (2007) ; Delavenne *et al.* (2012).

Les souches de *Lb. plantarum* (LB54, LB52, LB51, LB20 et LB24) et *Lb. farciminis* (LB53) ont inhibé la germination des conidies et la croissance mycélienne, les conidies étaient plus sensibles que le mycélium. Ce résultat est semblable à ceux obtenus par Muhialdin et Hassan (2011). La croissance mycélienne a été inhibée en confrontation directe (deux ligne), et aucune formation de conidies n'a été observée sur le mycélium dans les deux premiers jours d'incubation. Le diamètre vertical et horizontal du mycélium inhibé par les lactobacilles est égal à 3 cm, sauf pour la souche *Lb. plantarum* LB20 est égal à 4.5 et 3.7 cm respectivement. Aucune croissance radiale mycélienne n'a été observée lorsque les bactéries ont été ensemencées sur toute la surface des boîtes, en raison de la présence de forte concentration de substances antifongiques dans le milieu (**Tableau 3, Figure 1**).

Aucune activité antifongique n'a été détectée par le surnageant non concentré de toutes les souches. Miescher Schwenninger et Meile (2004) ; Lan *et al.* (2012) ont rapporté également que l'activité inhibitrice n'a pas pu être observée par des surnageants non concentrés de *Propionibacterium* sp, *Weissella cibaria* 861006 et *W. paramesenteroides* 860509, en parallèle, Ndagano (2011) a suggéré que l'inhibition maximale antifongique, plus de 90 %, a

été observée pour la concentration de 4 fois de composés antifongiques produits par *W. paramesenteroides* LC11, et l'activité inhibitrice d'un concentré de 4 fois de *Lb. plantarum* VE56 est faible, atteignant des valeurs de 21 % pour *A. niger* MUCL 28699 et 15 % pour *A. niger* CWBIF194.

Les substances antifongiques produites par *Lb. plantarum* et *farciminis* inhibent plusieurs champignons tels que *Penicillium* sp., *Fusarium roseum*, *Stemphylium* sp. et *Trichoderma* sp. (Tableau 3).

Tableau 2. Caractérisation phénotypique des isolats des lactobacilles.

Test	Souches et source					
	LB54	LB52	LB53	LB51	LB24	LB20
	Ensilage				Carotte	Lait
Croissance à 45 °C	-	-	-	-	-	-
Production de CO ₂	-	-	-	-	-	-
Dégradation d'ADH	-	-	+	-	-	-
Dégradation de gélatine	-	-	-	-	-	-
	Fermentation des Carbohydrates					
Glucose	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	-	+	+	+	-
Mélibiose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	-	-	-	-
Inositol	-	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	-	+	+
	<i>plantarum</i>	<i>plantarum</i>	<i>farciminis</i>	<i>plantarum</i>	<i>plantarum</i>	<i>Plantarum</i>

Tableau 3. Activité antifongique : par double couche, par confrontation, du surnageant et le spectre d'activité de *Lactobacillus*.

Souches	Méthode						
	2 couches	Confrontation ^a		Spectre d'action			
		2 lignes	La surface	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium roseum</i>	<i>Stemphylium</i>
LB54	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
LB52	++	+	++	+++	+++	+++	+++
LB53	++	+	++	+++	+++	+++	+++
LB51	+++	+	++	+++	+++	+++	+++
LB20	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
LB24	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++

^a - = pas d'inhibition; + = inhibition de mycélium avec formation des spores; ++ = pas de formation des spores; +++ = aucune croissance.

III.2. Caractérisation des métabolites antifongiques

III.2.1. L'effet de la température

Aucune perte d'activité antifongique n'a été observée après traitement des métabolites de *Lactobacillus* par chauffage à 45, 70, 100 et 120°C pendant 20 min (**Tableau 4**). Des résultats similaires ont été rapportés quand le surnageant de *Lb. plantarum* est chauffé à 120°C pendant 15 min et à 80°C pendant 1h ou à 121°C pendant 15 min (Niku-Paavola *et al.*, 1999 ; Rouse *et al.*, 2008). Cependant, Gourama (1997) a montré que l'activité inhibitrice a été perdue lors du traitement du surnageant de *Lb. casei* à 100°C pendant une durée de 10 min.

Aucun changement n'a été observé sur l'activité antifongique des souches après avoir maintenu les boîtes de Pétri contenant les métabolites de *Lactobacillus* à la réfrigération (8°C) pendant 15 jours et même à la congélation (-18°C) (**Tableau 4**).

Le stockage prolongé affecte les métabolites et réduit ou élimine leur effet inhibiteur par une précipitation irréversible ou bien une dénaturation (Magnusson et Schnürer, 2001 ; Falguni *et al.* 2010), cette altération affecte généralement les protéines, ce qui nous a permis de connaître partiellement la nature de la substance inhibitrice.

III.2.2. L'effet des enzymes protéolytiques

Le traitement des substances antifongiques par les enzymes protéolytiques (Pepsine, Chymotrypsine) ne change pas l'activité inhibitrice (**Tableau 4**), ce qui suggère que l'activité antifongique pourrait être due à des composés autres que les protéines. 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. Cependant, la protéinase K élimine l'activité antifongique d'un surnageant concentré de *Lb. plantarum* (Rouse *et al.*, 2008) et le traitement protéolytique du surnageant réduit l'activité antifongique de *Lb. brevis* et *Lb. reuteri* R2 (Mauch *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2011).

Tableau 4. L'effet des enzymes protéolytiques et la température sur les substances antifongiques.

Souches	Enzymes protéolytiques				Températures	
	Contrôle	Pepsine	Chymotrypsine	Chauffage	Réfrigération	Congélation
LB54	+ ^a	+	+	+	+	+
LB52	+	+	+	+	+	+
LB53	+	+	+	+	+	+
LB51	+	+	+	+	+	+
LB20	+	+	+	+	+	+
LB24	+	+	+	+	+	+

^a présence de la zone d'inhibition.

III.2.3. L'effet du pH

Une inhibition totale a été observée à pH 2 pour toutes les souches, hormis la souche *Lb. plantarum* LB52, et une diminution de l'inhibition dans des valeurs de pH 3, 4 et 5 (**Figure 2**), ceux-ci suggèrent la contribution des acides organiques dans l'activité antifongique parce que leur activité dépend fortement du pH et du pKa (Cabo *et al.*, 2002). Les composés protéiques peuvent être aussi éliminés par la neutralisation, par exemple la substance antifongique décrite par Magnusson et Schnürer (2001) est active à un pH entre 3.0 et 4.5. De Muyncka *et al.* (2004) ont suggéré également que la neutralisation du surnageant de *Lb. acidophilus* LMG 9433, *Lb. amylovorus* DSM 20532, *Lb. brevis* LMG 6906 et *Lb. coryniformis* subsp *coryniformis* LMG 9196 à des valeurs de pH de 5.0, 5.5 et 6.0 entraîne une baisse dans

l'activité antifongique. La perte de l'activité inhibitrice par la neutralisation a été aussi prouvée chez *Lb. reuteri* CRL 1100, *Lb. brevis* (CRL 796 et 772), *Lb. plantarum* CRL 778, *Lc. lactis* subsp. *Lactis* CHD-28.3, *P. pentosaceus* L006, *W. cibaria* 861006 et *W. paramesenteroides* 860509 (Roy *et al*, 1996 ; Gerez *et al.*, 2009 ; Dalié *et al.*, 2010a ; Lan *et al.*, 2012). La présence de l'activité antifongique à pH 6 et 7 chez *Lb. plantarum* LB52 et LB20 suggère que l'inhibition est peut-être due aux acides organiques dissociés, et il est rapporté que l'acide sorbique inhibe *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium Cladosporium* et *Ulocladium* dans l'état non dissocié et même dissocié. L'acide dissocié fait plus de 50 % d'inhibition de la croissance de *C. albicans* à pH 6 (Eklun, 1983 ; Skirdal et Eklund, 1993).

III.2.4. Détection des substances volatiles

Aucune inhibition n'a été observée dans les boîtes scellées, le même résultat a été obtenu par Rees (1997).

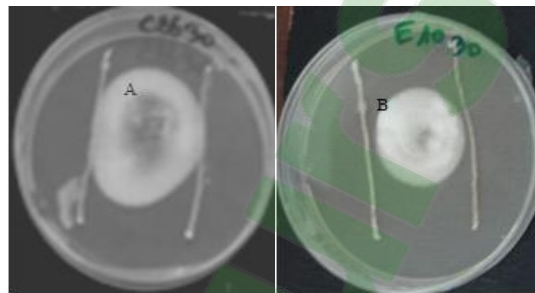


Figure 1. Activité antifongique par confrontation.

(a) *Lb. plantarum* LB20. (b) *Lb. plantarum* LB54.

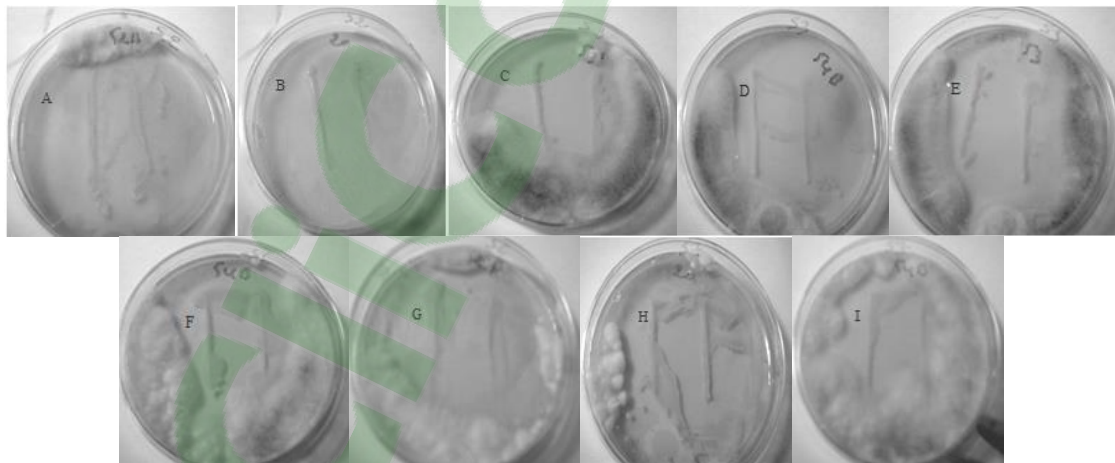


Figure 2. L'effet du pH sur les substances antifongiques produites par les lactobacilles.

pH 2 : (a) *Lb. plantarum* LB52. (b) *Lb. plantarum* LB20. pH 3 : (c) *Lb. plantarum* LB51.

(d) *Lb. plantarum* LB54. (e) *Lb. farciminis* LB53. pH 6 : (f) *Lb. plantarum* LB54.

(g) *Lb. plantarum* LB52. pH 7 : (h) *Lb. plantarum* LB20. (i) *Lb. plantarum* LB54.

III.2.5. L'effet fongicide ou fongistatique

Toutes les souches ont montré un effet fongistatique sur la germination des conidies. *Lb. plantarum* LB20 et LB24 ont montré un effet fongicide sur la croissance du mycélium, cependant, les autres souches ont montré un effet fongistatique (**Tableau 5**). La différence entre l'effet fongistatique et fongicide sur la germination des conidies et la croissance du mycélium peut-être due à l'état de l'eau liée ou libre, ce qui donne une bonne inhibition en milieu liquide par rapport au solide. Aucune croissance du mycélium n'a été observée dans la co-culture, même après sept jours d'incubation. Ces données suggèrent que les composés antifongiques pourraient ne pas être une bactériocine, parce que ce composé est rapidement adsorbé sur les cellules productrices, ou formé des agrégats spontanés ou dégradé par les enzymes protéolytiques, ce qui élimine son effet antifongique (Dalié *et al.*, 2010a ; Falguni *et al.*, 2010), mais on ne peut pas appliquer cette hypothèse pour les souches *Lb. plantarum* LB20 et LB24 puisqu'elles ont montré un effet fongicide.

Tableau 5. L'effet antifongique sur la germination des conidies et la croissance du mycélium.

Souches	Effet fongicide ou fongistatique		
	Co-culture	Mycélium	Conidie
LB54	-	+	+
LB52	-	+	+
LB53	-	+	+
LB51	-	+	+
LB20	-	++	+
LB24	-	++	+

- Pas de croissance ; + Effet fongistatique ; ++ Effet fongicide.

III.2.6. L'effet du milieu

La croissance fongique a été observée après 21 jours d'incubation dans les cultures de 1 ml, par contre aucune croissance dans les cultures de 10 ml et la culture de 5 mg/ml d'acide acétique. La croissance de l'*Aspergillus* sp. dans la culture de 1 ml peut s'expliquer par la faible concentration des métabolites antifongiques par rapport à la concentration dans la culture de 10 ml. Une croissance lente a été observée après 7 jours d'incubation de champignon dans une culture de 28 mg/ml d'acide lactique, la différence entre la CMI des deux acides est due à leurs constantes de dissociations, l'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique parce que à un pH donné la quantité de la forme non dissociée est plus élevée pour l'acide acétique que

l'acide lactique. Aucune croissance n'a été observée sur le milieu préparé à partir des surnageants de 24h, sur MRS agar à pH 4 autoclavé une fois et deux fois et sur MRS agar à pH 3. Aucun retardement de croissance n'a été observée sur l'extrait de malt agar à pH 4 autoclavé une fois et deux fois, MRS agar à pH 5 et sur l'extrait de malt agar ajouté sur MRS agar à pH 4 autoclavé une fois et deux fois. Le diamètre de champignon sur l'extrait de malt agar ajouté sur le milieu préparé à partir de surnageant de 24h des souches inhibitrices est de 1, 3.9, 3.7, 0.5, 3.4 et 2 cm pour les souches *Lb. plantarum* LB54, LB52, LB24, LB51, LB20 et *Lb. farciminis* LB53 respectivement.

Le milieu MRS lui-même inhibe le champignon, par contre l'extrait de malt agar ne provoque aucun retardement de croissance parce que le MRS contient l'agent antifongique, l'acétate de sodium qui inhibe l'*Aspergillus* à pH inférieur à 5, de plus, plusieurs dipeptides cycliques à caractère antifongique récemment ont été détectés dans le milieu MRS acidifié, non fermenté et fermenté par *Lb. brevis* R2Δ (Axel *et al.*, 2014).

III.3. Cinétique de production des métabolites antifongiques

L'étude de la cinétique de production des composés antifongiques réalisée sur une période de 96h à 30°C, a révélé une augmentation de l'activité inhibitrice avec la période d'incubation. L'inhibition a été détectée à 4h dans les cultures de toutes les souches par observation d'un mycélium sans filaments aériens, le diamètre est égale à 9 cm dans le contrôle, et en présence de métabolites de *Lb. plantarum* LB54 et LB52, pour les autres souches, il est égale à 8.5 et 8 cm, ceci suggère que les métabolites inhibiteurs sont des métabolites primaires. À partir de 8h jusqu'à 24h une diminution de diamètre du mycélium avec une augmentation de la densité optique de bactéries lactiques et une diminution du pH du milieu, après 24h jusqu'à 96h aucune diminution de l'accumulation de métabolites n'a été observée puisque toutes les souches ont démontré une inhibition totale (**Figure 3, Figure 4**). Toutes les souches ont montré une augmentation dans l'effet inhibiteur de 0 % à 100 % (**Figure 5**), l'inhibition totale a été observée pour toutes les souches lorsqu'elles sont préalablement cultivées pendant 48h, hormis la souche *Lb. plantarum* LB51 a présenté une inhibition de 100 % lorsqu'elle est préalablement cultivée pendant 24h. Nos résultats sont partiellement en accord avec ceux de Dalié (2010), qui a trouvé que les métabolites antifongiques sont produits après 8h d'incubation et aucune diminution de ces métabolites durant les 120h d'incubation. Cependant Rousse *et al.* (2007), n'ont détecté de métabolites à effet antifongique qu'à partir de 12h et ils ont observé aussi une diminution de l'accumulation à partir de 36h. Il est possible que les substances soient des

acides organiques, cette hypothèse est en accord avec le résultat de Ndagano (2011), qui a rapporté que les bactéries lactiques produisent des acides organiques à effet antifongique au cours de la phase exponentielle de croissance, mais considérés comme des composants des membranes cellulaires des bactéries mortes qui réagissent en synergie avec les autres substances produites au cours de la croissance bactérienne.

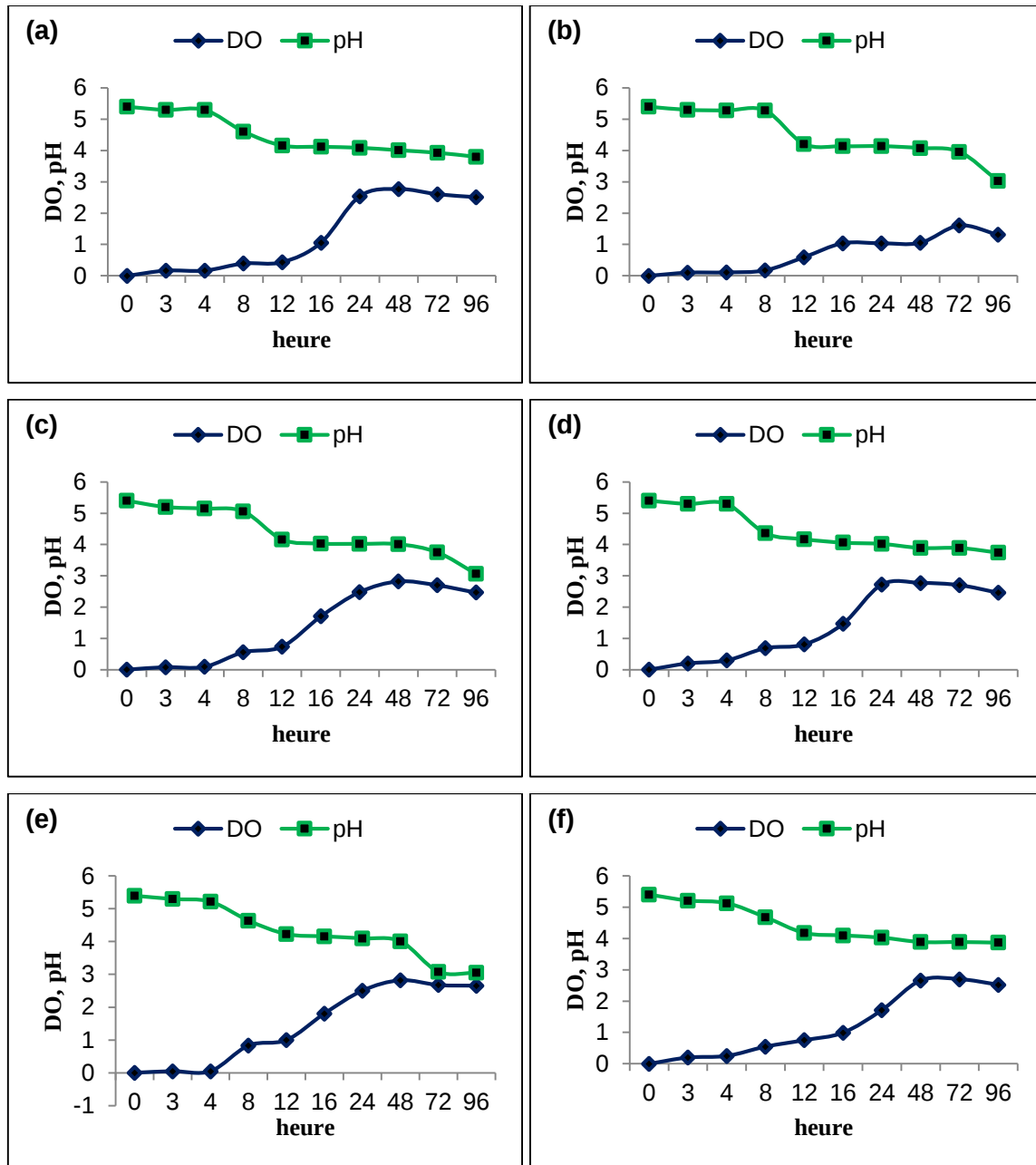
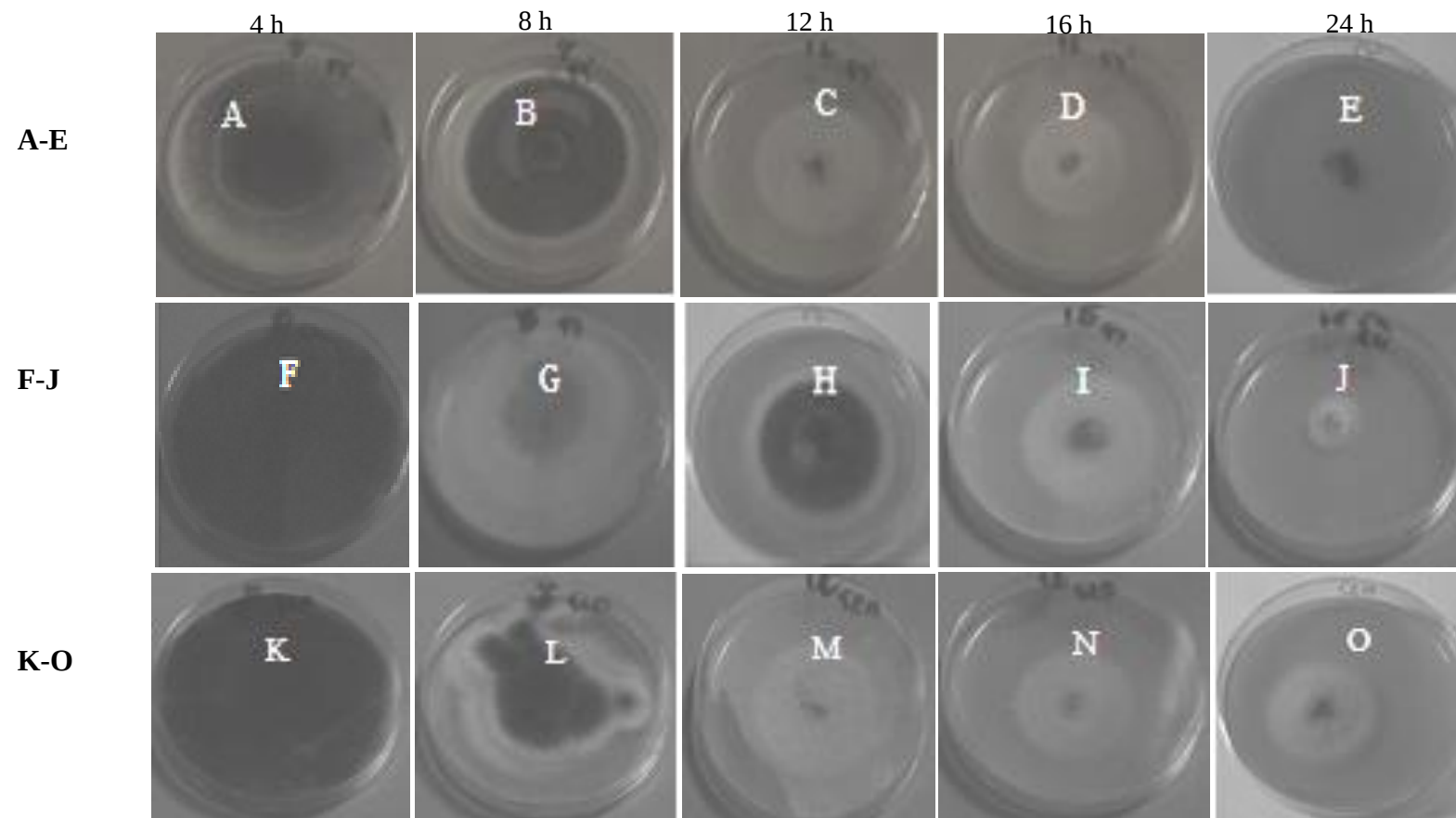


Figure 3. Suivi de la croissance des lactobacilles et du pH dans le milieu MRS. (a) *Lb. plantarum* LB54 ; (b) *Lb. plantarum* LB52 ; (c) *Lb. farciminis* LB53 ; (d) *Lb. plantarum* LB51 ; (e) *Lb. plantarum* LB24 ; (f) *Lb. plantarum* LB20.



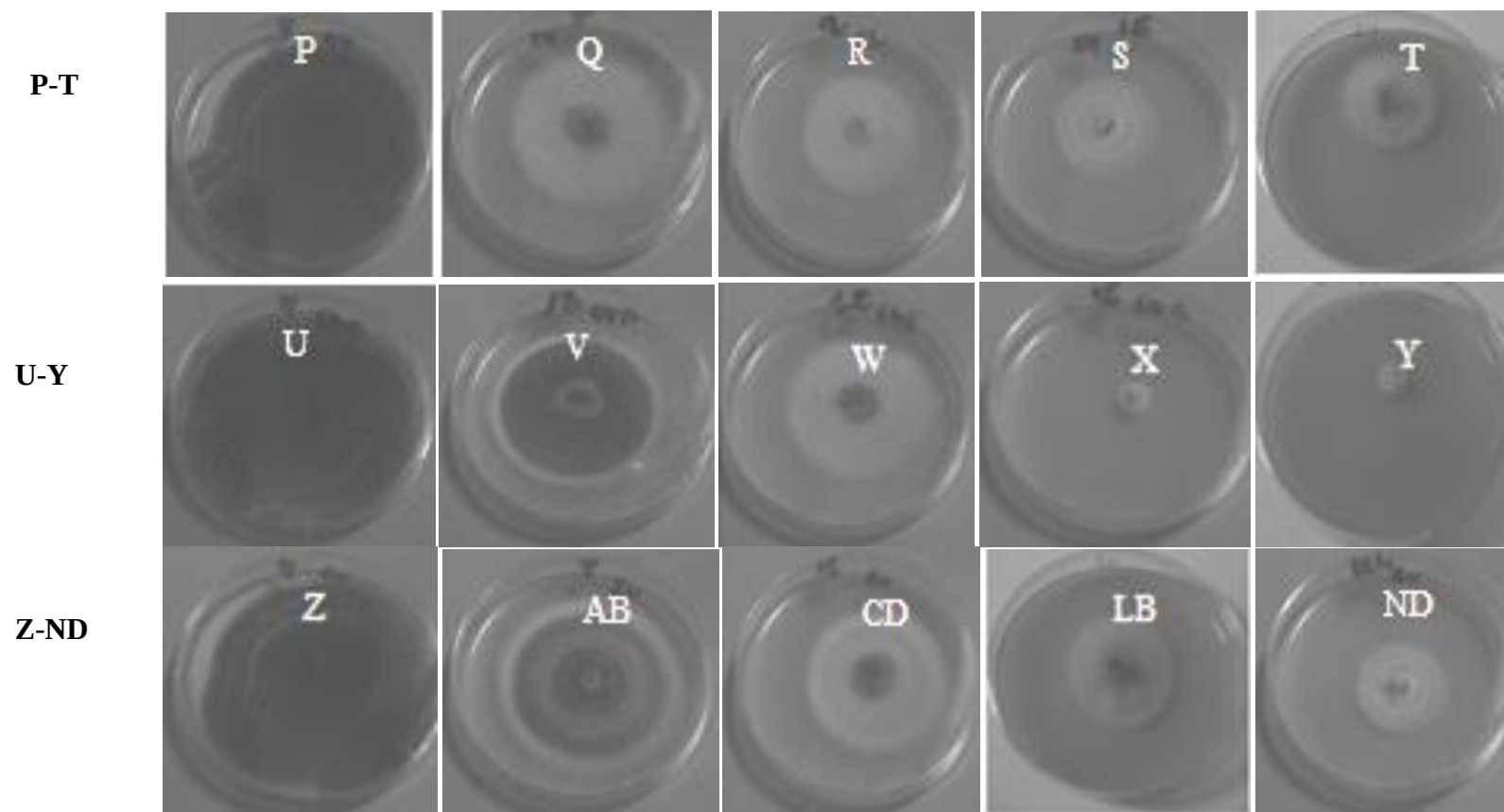


Figure 4. Diamètre de mycélium inhibé par les métabolites des lactobacilles. (A-E) *Lb. plantarum* LB51 ;
(F-J) *Lb. farciminis* LB53 ; (K-O) *Lb. plantarum* LB52 ; (P-T) *Lb. plantarum* LB24 ;
(U-Y) *Lb. plantarum* LB54 ; (Z-ND) *Lb. plantarum* LB20.

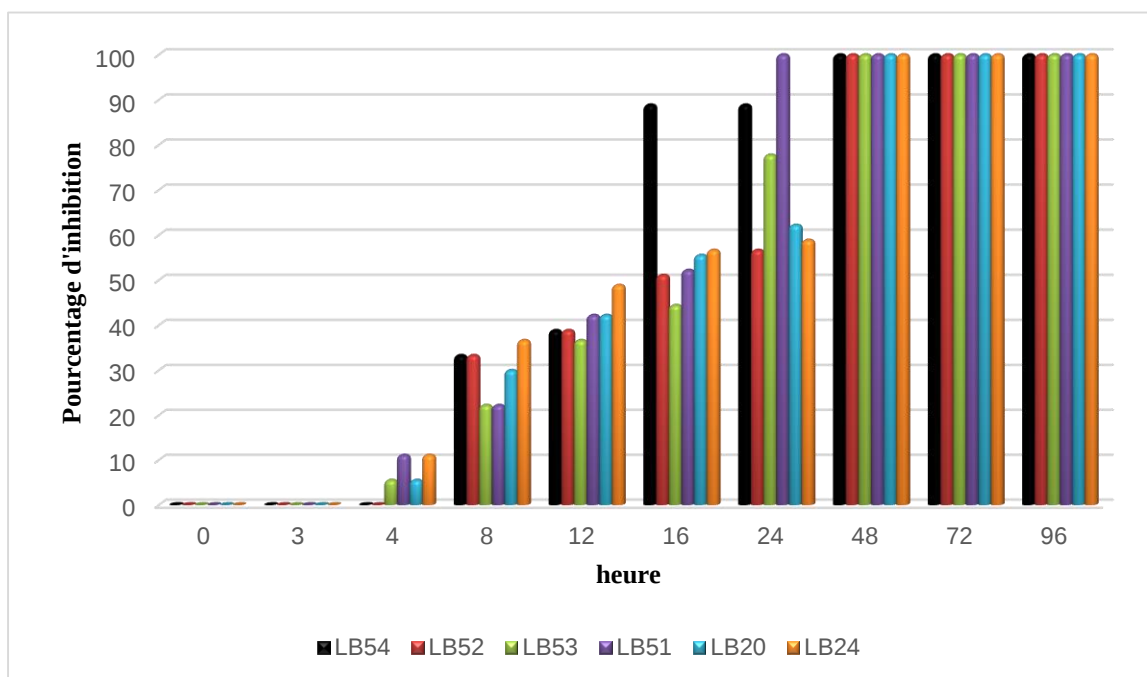


Figure 5. Pourcentage d'inhibition d'*Aspergillus* sp. par les métabolites des lactobacilles.

III.4. Facteurs affectant la production des substances antifongiques

III.4.1. L'activité antifongique à différentes températures

La température d'incubation influe sur le métabolisme de *Lb. plantarum* LB54 et LB52 qui ont montré une production maximale de composés antifongiques lorsqu'elles sont cultivées à 37°C, ce résultat est similaire à ceux obtenus par Falguni *et al.* (2010) quand *Lb. brevis* NCDC est incubé à 37°C. Une grande zone d'inhibition a été observée pour *Lb. farciminis* LB53, *Lb. plantarum* LB51 et LB20 à 25°C, le pourcentage d'inhibition par ces souches est de 38.29 %, 72.34 % et 79.78 % respectivement. Le même pourcentage d'inhibition de 53.19 % a été observé à des températures de 25°C et 37°C chez *Lb. plantarum* LB24 (**Tableau 6, Figure 6**). Zhao (2011) a observé que l'activité antifongique est maximale pour les souches de *Lb. plantarum* NB, *Lb. plantarum* DC2 et *Lb. plantarum* DTS à 25°C, 37°C et 45°C. Aucune formation de conidies n'a été observée quand les lactobacilles ont été incubés à 30°C (**Figure 6**), elle est la meilleure température pour la production de composés antifongiques par rapport aux autres températures. Une Température similaire a été suggérée comme température idéale pour la production de composés antifongiques chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Roy *et al.*, 1996), *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* (Maganusson et Schnuürer, 2001) et *Lb. plantarum* (Rouse *et al.*, 2008 ; Bianchini, 2011).

III.4.2. L'activité antifongique à différentes période d'incubation

Aucune inhibition n'a été observée dans le premier jour d'incubation, par contre toutes les souches montrent une zone d'inhibition après 2 jours d'incubation (**Tableau 7**). Seulement la souche *Lb. farciminis* LB53 indique une zone d'inhibition après 3 jours d'incubation (33.33 ± 5.55 %) est plus élevée que celle observée au deuxième jour (7.97 ± 0 %). Après 4 jours d'incubation, la moisissure inhibée par *Lb. plantarum* LB24 a été poussée au niveau de la strie bactérienne (**Figure 7**), cela peut-être dû à l'uniformité de diffusion des substances, puisque la boîte est incubée pendant 7 jours à 30°C, ce qui provoque une dessiccation de la gélose MRS. Ces résultats sont en accord avec ceux de Florianowicz (2001), qui a conclu que l'activité inhibitrice engendrée par *Lb. casei* et *Lc. lactis* vis-à-vis de *P. expansum* dépendait de leur stade de croissance. Ces souches seraient plus efficaces lorsqu'elles sont préalablement cultivées pendant 24 et 72h respectivement.

Tableau 6. Activité antifongique à différentes températures d'incubation

Températures	Souches					
	LB54	LB52	LB53	LB51	LB20	LB24
	Zone d'inhibition par pourcentage (%)					
25°C	21.27±0	4.25±0	38.29±0	72.34±0	79.78±0	53.19±0
30°C	27.65±0	6.38±0	7.97±0	14.89±0	31.91±0	42.55±0
37°C	71.27±0	25.53±0	21.27±0	21.27±0	12.76±0	53.19±0

Tableau 7. Activité antifongique à différentes périodes d'incubation

Incubation	Souches					
	LB54	LB52	LB53	LB51	LB20	LB24
	Zone d'inhibition par pourcentage (%)					
1 jour	0	0	0	0	0	0
2 jours	27.65±0	6.38±0	7.97±0	14.89±0	31.91±0	42.55±0
3 jours	27.65±0	6.38±0.02	33.33±5.55	14.89±0.1	31.91±0	42.55±0
4 jours	77.77±2	61.11±4.52	44.44±0.1	85.55±7.77	44±0	72.22±0

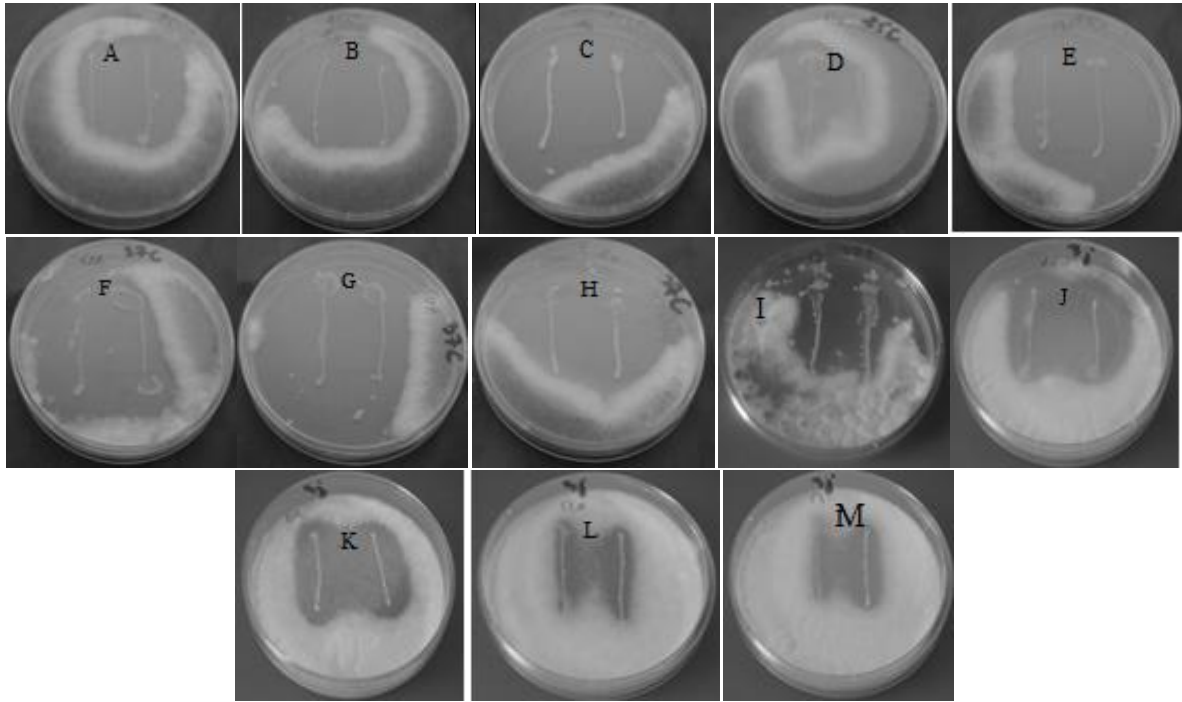


Figure 6. Activité antifongique à différentes températures. (à 25°C : *Lb. plantarum* (A) LB54, (B) LB24, (C) LB20, (D) LB52, (E) LB51 ; à 37°C : *Lb. plantarum* (F) LB52, (G) LB54, (H) LB24, (I) *Lb. farciminis* LB53 ; à 30°C : *Lb. plantarum* (J) LB20, (K) LB24, (L) LB52, (M) *Lb. farciminis* LB53).

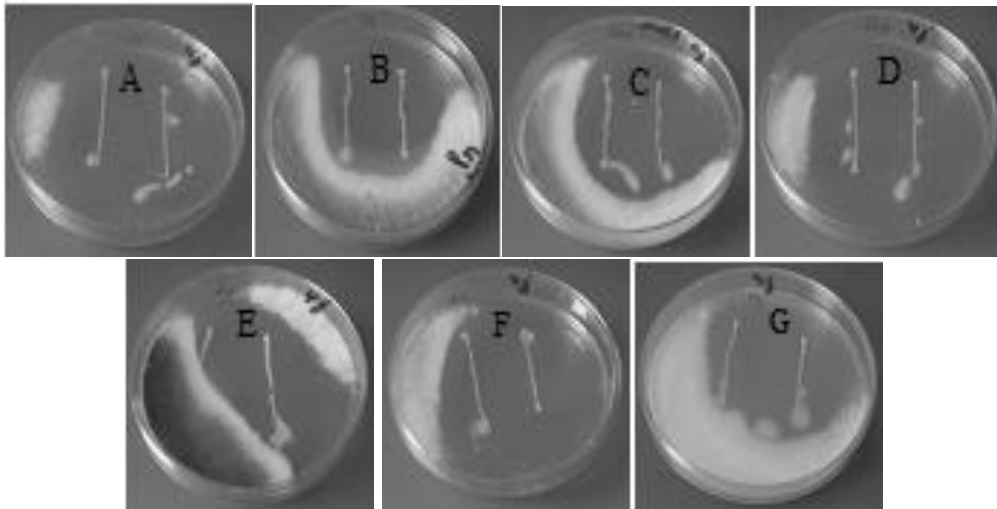


Figure 7. Activité antifongique à différentes périodes d'incubation. à 4 jours d'incubation : *Lb. plantarum* (A : LB51, C : LB52, D : LB54, E : LB20, F : LB24) ; *Lb. farciminis* (B : LB53) ; à 3 jours d'incubation (G : *Lb. farciminis* LB53).

III.4.3. L'activité antifongique à différents pH du milieu initial

Toutes les souches montrent une forte activité antifongique à pH 3 et 4 et une diminution à pH 5 et 6. Le meilleur pourcentage d'inhibition a été observé à pH 5 est de 42.55 % chez *Lb. plantarum* LB20 et LB24, et même pour le pH 6 chez *Lb. farciminis* LB53 et *Lb. plantarum* LB24 (**Figure 8**).

Rouse *et al.* (2008) ont indiqué que la souche *Lb. plantarum* produit des composés antifongiques dans la gamme de pH plus bas. Cependant, Maganusson et Schnürer (2001) ont indiqué que la souche *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*, produit des composés antifongiques à pH élevé.

L'isolat *Lb. plantarum* LB51 perd son activité antifongique à pH 7, bien que l'activité antifongique de *Lb. plantarum* LB54, LB52 et *Lb. farciminis* LB53 est maximale dans ce pH. *Lb. plantarum* isolé par Bianchini (2011) a montré une bonne inhibition à pH 5 et 7. Dalié (2010) a observé également une bonne inhibition de *Fusarium* par *Pc. pentosaceus* L006 à pH 5 et 7 et Falguni *et al.* (2010) ont suggéré que la production maximale de composés antifongiques par *Lb. brevis* NCDC a été faite à pH 6 et 7.

III.4.4. L'activité antifongique sur MRS modifié

Tous les isolats ont la capacité de se développer sur MRS agar sans extrait de viande et en présence de différentes sources de carbone (sucrose, fructose, galactose, mannitol, sorbitol, arabinose, xylose, rhamnose, tréhalose et lactose). La meilleure inhibition a été observée quand le glucose est remplacé par le sorbitol, ou le mannitol ou le tréhalose, et la zone d'inhibition la plus élevée à atteindre jusqu'à 93.61 % en présence de tréhalose pour *Lb. plantarum* LB52 (**Figure 9**). Des résultats similaires ont été obtenus par Klewicka (2007), il a signalé que les polyols comme le glycérol, le lactitol, l'érythritol, le sorbitol et le mannitol ont induit une activité antifongique par *Lactobacillus* spp. envers différentes espèces de champignons, et la meilleure inhibition a été faite par le sorbitol.

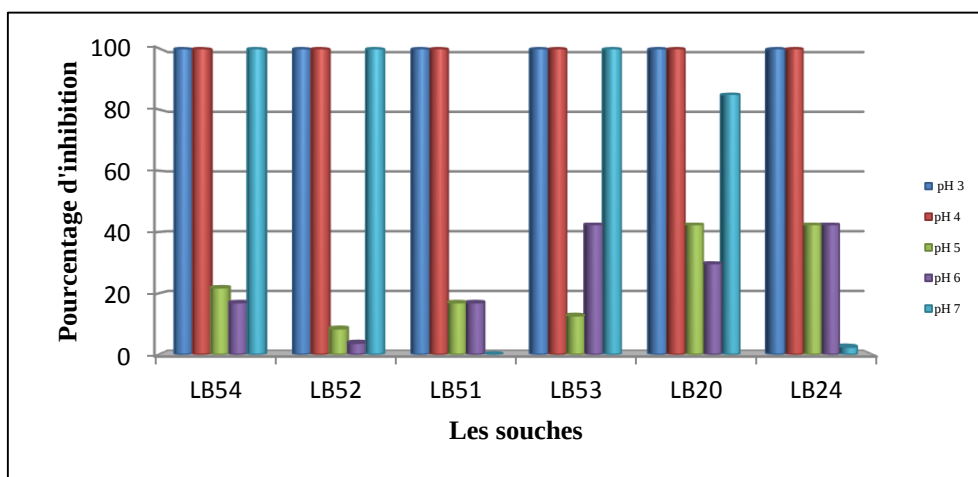
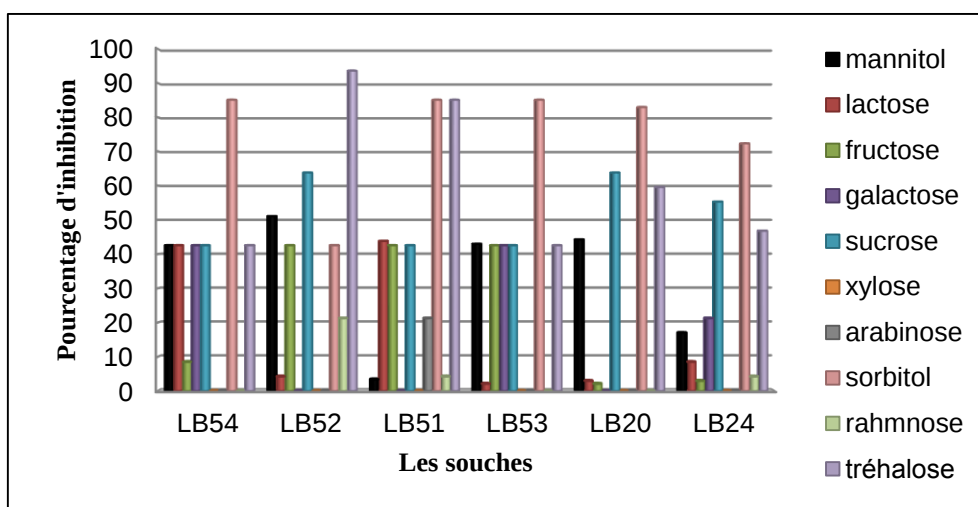
Aucune inhibition n'a été observée pour tous les isolats quand le glucose est remplacé par le xylose, car la plupart de ces bactéries ne le fermentent pas.

Rouse *et al.* (2008) ont étudié l'effet inhibiteur de *Lb. plantarum* en présence de différentes sources de carbone (glucose, saccharose, lactose, fructose et sorbitol), la bonne inhibition contre *Penicillium notatum* est trouvée en milieu équivalent au milieu MRS préparé avec glucose.

On observe une zone d'inhibition pour tous les isolats sur milieu MRS sans: extrait de viande, extrait de viande et peptone, extrait de viande et extrait de levure (**Tableau 8**). Batish *et al.* (1990) ont observé également la présence de composés antifongiques, en absence d'extrait de levure (7.50 unité/ml), d'extrait de boeuf (21.50 unité/ml) et de tryptone (5.00 unité/ml). L'absence de peptone et extrait de levure a une influence considérable sur l'activité antifongique de *Lb. plantarum* LB52, LB51 et *Lb. farciminis* LB53, par une augmentation de l'inhibition jusqu'à 63.82 %, ces données sont corroborées par les résultats de Zalán *et al.* (2010) qui ont trouvé une différence dans l'inhibition fongique par les lactobacilles selon les milieux utilisés et la quantité des acides organiques produits dans ces milieux, de plus ils ont trouvé que les lactobacilles changent leur profile fermentaire en fonction de constituants de milieu de culture, nos résultats sont en accord aussi avec ceux de Roy *et al.* (1996) et Batish *et al.* (1990). Ces derniers ont rapporté que le milieu de culture modifiait de façon significative le métabolisme de *Lc. Lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* qui produisent plus de métabolites antifongiques dans le bouillon Elliker que dans le milieu MRS. Aucune inhibition n'a été observée sur MRS sans glucose et extrait de viande, il est possible que les substances produites varient en fonction de la source de carbone. *Aspergillus* sp. a une capacité de croître sur gélose MRS à pH 5.4 avec d'acétate de sodium, ce qui suggère que l'acétate de sodium n'inhibe pas sa croissance à cette concentration utilisée dans le milieu MRS, ce résultat est similaire à ceux obtenus par Stiles *et al.* (2002). La même zone d'inhibition a été observée en présence et en absence d'acétate de sodium. *A. repens* NRRL 13, *A. versicolor* M 1069 et *A. candidus* C 25, ont été complètement inhibée par *Lb. rhamnosus* VT1 sur gélose MRS sans acétate de sodium (Stiles *et al.*, 2002). Schillinger et Villarreal (2010) ont observé aussi de grandes zones d'inhibition sur gélose MRS avec acétate de sodium, par contre les souches lactiques ont été incapables de produire des substances antifongiques sur MRS sans acétate de sodium. *Propionibacterium jensenii* donne aussi une bonne inhibition contre *A. fumigatus* sur MRS avec acétate de sodium (Lind *et al.*, 2005).

Tableau 8. Activité antifongique sur MRS modifié.

MRS sans	Souches					
	LB54	LB52	LB53	LB51	LB20	LB24
	Zone d'inhibition par pourcentage (%)					
Extrait de viande	27.65±0	6.38±1.64	7.97±0	14.89±2.13	31.91±0	42.55±0
Extrait de viande et glucose	0	0	0	0	0	0
Extrait de viande et peptone	21.27±0	42.55±0	42.55±0	63.82±0	21.27±0	42.55±0
Extrait de viande et extrait de levure	21.27±0	21.27±1.27	10.63±0	42.55±0	42.55±2.28	21.27±0
Acétate de sodium	27.65±0	6.38±0	7.97±0	14.89±0	31.91±0	42.55±0

**Figure 8.** Activité antifongique à différents pH.**Figure 9.** Activité antifongique en présence de différentes sources de carbone.

III.4.5. Production des substances antifongiques en présence de glycérol

Certains lactobacilles utilisent le glycérol dans la production de 3-hydroxypropionaldéhyde (reutéline) (Lind, 2010). La dégradation du glycérol généralement faite en condition d'anaérobiose et lorsqu'il y a une faible concentration de glucose ou fructose (Ribéreau-Gayon, 2006 ; Garai-Ibabe *et al.*, 2008).

Lb. plantarum LB54, LB52 et LB51 ont montré une inhibition plus élevée sur gélose MRS avec glycérol par rapport au MRS sans glycérol (**Tableau 9**).

Klewicka (2007) a indiqué que *Lactobacillus* spp. a une capacité de produire des composés antifongiques sur MRS avec glycérol, et Lind *et al.* (2005) ont indiqué également que l'ajout de glycérol dans le milieu a un effet visible sur l'inhibition fongique pour certaines bactéries propioniques.

Seulement la souche *Lb. plantarum* LB54 a synthétisé des substances antifongiques sur MRS avec glycérol et sans glucose et extrait de viande, elle utilise le glycérol comme seule source de carbone, Alvarez *et al.* (2004) ont trouvé que *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 est capable d'utiliser le glycérol comme seule source d'énergie mais dans des conditions d'aérobioses. La production de lactate, acétate et diacétyle par la fermentation du glucose et glycérol a été détectée chez *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 (Alvarez *et al.*, 2004). L'utilisation du glucose avec glycérol comme source de carbone par *Lb. plantarum* LB54 et LB52 montre qu'il y a une production de substances antifongiques dont la nature est différente. Une diminution de la zone d'inhibition de la souche *Lb. plantarum* LB54 de 63.82 % à 28 % et 42.55 % lors du traitement par la chymotrypsine et la pepsine respectivement, et de 46.80 % à 42.55 % et 21.27 % pour la souche *Lb. plantarum* LB52. Aucun effet sur la zone d'inhibition de la souche LB51.

Tableau 9. Activité antifongique en présence de glycérol

Souches	Zone d'inhibition par pourcentage (%)			
	Glucose avec glycérol	Glycérol	Chymotrypsine	Pepsine
LB54	63.82±0	6.76±6	28±0.2	42.55±0
LB52	46.80±1	0	42.55±0	21.27±0
LB51	21.27±2	0	21.27±1.2	21.27±1
LB53	7.98±0.1	0	-	-
LB20	31.91±0	0	-	-
LB24	42.55±0	0	-	-

- : non traitée.

III.5. L'effet des substances antifongiques sur la morphologie d'*Aspergillus*

L'observation macroscopique montre que l'*Aspergillus* sp. pousse rapidement sur les milieux extrait de malt agar à pH 5.5, et MRS agar à pH 5.4, les colonies sont blanches au début, puis elles deviennent noires. Microscopiquement l'*Aspergillus* sp. est caractérisé par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une tête conidienne de forme radiées sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes. L'observation macroscopique du champignon inhibé par les souches lactiques par la méthode de recouvrement montre une absence du mycélium aérien, et présence de deux zones l'une blanche et l'autre noire, l'observation microscopique (**Figure 10**) des zones indique qu'il y a une malformation dans le mycélium qui est dépourvu de la tête aspergillaire au niveau de la zone blanche, par contre la tête est présente au niveau de la zone noire mais elle est aussi déformée. Ces résultats semblent apparemment en contradiction avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont trouvé que les substances antifongiques produites par les bactéries lactiques n'affectent pas la morphologie d'*A. nomius* VSC 23 (Muñoz *et al.* 2010).

L'utilisation du MRS bouillon à pH 5.4 comme contrôle pour l'observation microscopique, indique que le milieu lui-même affecte un peu les spores qui ont la forme généralement globuleuses, mais on trouve quelques spores cubiques. Une malformation au niveau du conidiophore, et certaines spores ont la forme cubique par les métabolites de toutes les souches. Turgescence du thalle par les métabolites du *Lb. plantarum* LB54. Changement dans la forme de la tête conidienne par les métabolites du *Lb. plantarum* LB24, LB20, LB52, LB54, LB51, et l'acide lactique et acétique. Le mycélium et la spore sont dépourvus leur capacité de coloration par le bleu de méthylène par les métabolites du *Lb. plantarum* LB24. Un rétrécissement du conidiophore par les métabolites du *Lb. plantarum* LB54. La taille de la spore a été réduite par l'acide lactique et acétique. Le nombre des spores a été réduit par les métabolites de toutes les souches, et même par l'acide lactique et acétique, les résultats de Gourama et Bullerman (1995) et Mandal *et al.* (2013) sont concordants avec nos résultats. Ils ont constaté que le pH acide avec les métabolites inhibiteurs de *Lactobacillus* sp. réduisent la longueur du tube germinatif d'*A. flavus*, le mycélium d'*A. parasiticus* traité par les substances antifongiques produites par *P. acidilactici* LAB 5 est dépourvu sa forme, il y a moins de ramification par rapport au contrôle et un rétrécissement au niveau de la spore.

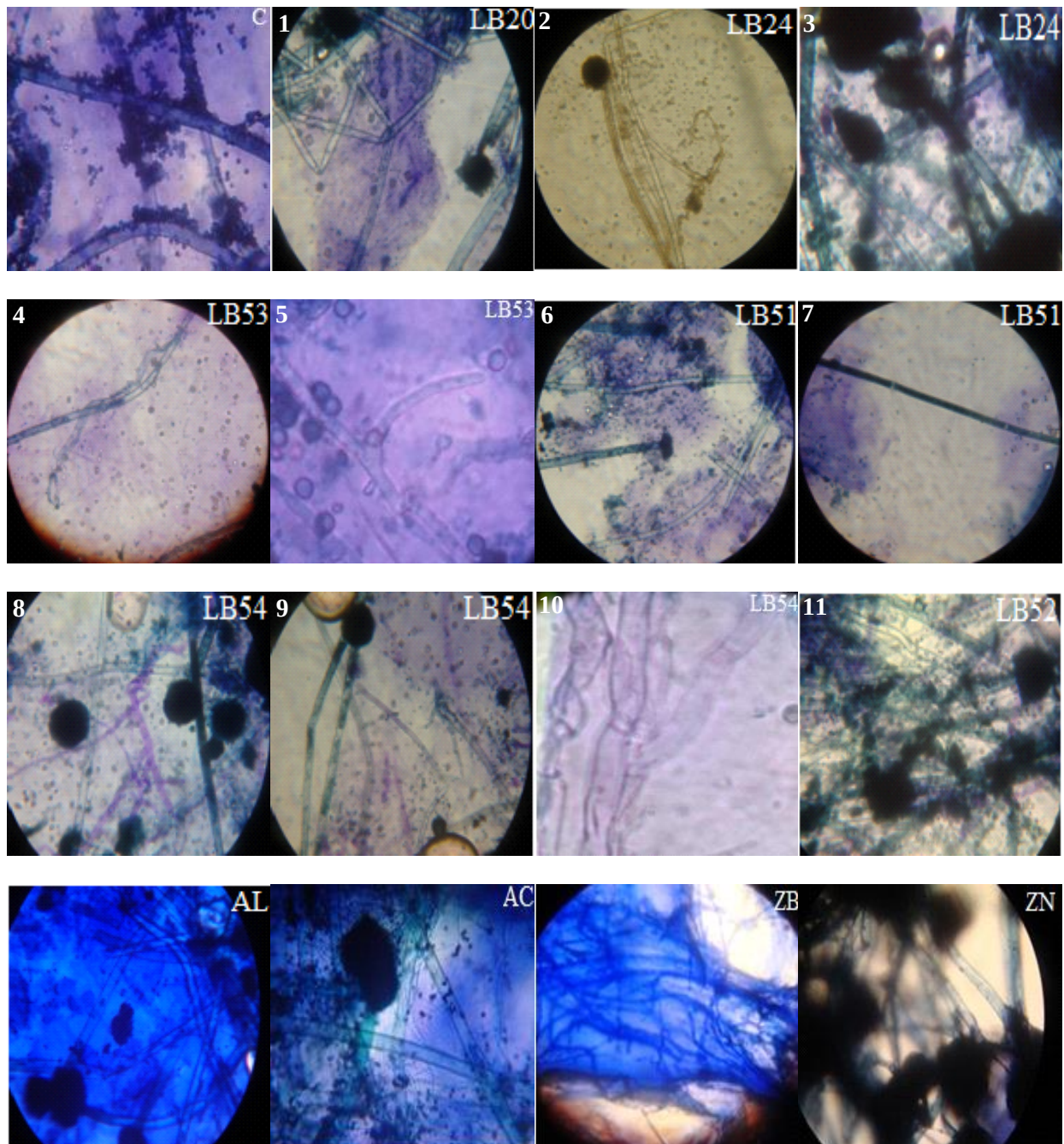


Figure 10. Observation microscopique de l'effet des substances antifongiques sur la morphologie d'*Aspergillus* sp. (C : contrôle ; 1 : *Lb. plantarum* LB20, 2,3 : *Lb. plantarum* LB24 ; 4,5 : *Lb. farciminis* LB53 ; 6,7 : *Lb. plantarum* LB51 ; 8,9,10 : *Lb. plantarum* LB54 ; 11 : *Lb. plantarum* LB52 ; AL : acide lactique AC : acide acétique ; ZB : zone blanche ; ZN : zone noire).

III.6. Décontamination

L'isolement d'*Aspergillus* sp. à partir de jus d'abricot contaminé par 10^3 spores/ml montre la présence de 10^6 UFC/ml dans le jus sans sucre, et 10^5 UFC/ml dans le jus avec sucre après trois jours d'incubation.

Toutes les souches inhibent la croissance d'*Aspergillus* sp. dans les deux types de jus d'abricot (**Figure 11, Tableau 10**). Dans le jus sans sucre, les souches *Lb. plantarum* LB20 et *Lb. farciminis* LB53 ont exercé les meilleures inhibitions, et après une période d'incubation d'un mois dans le réfrigérateur (8°C) la population fongique augmente jusqu'à 8.10^5 et 11.10^6 UFC/ml, respectivement. Dans le jus avec sucre, les souches *Lb. plantarum* LB20 et LB51 ont exercé les meilleures inhibitions avant et après réfrigération par zéro UFC/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux de Crowley *et al.* (2012) qui ont trouvé que *Lb. plantarum* 16 est le meilleur agent de protection contre *Rhodotorula mucilaginosa* dans du jus d'orange conservé à 25°C et 4°C pendant 30 jours.

Aucune inhibition d'*Aspergillus* sp. n'a été observée sur le pain, parce que la nature biochimique de l'aliment influence sur la production de substances antifongiques, et d'après les résultats obtenus dans l'effet de facteurs abiotiques et biotiques sur l'activité de ces souches indiquent que la source de carbone est la principale clé dans l'effet inhibiteur, de plus les meilleures inhibitions ont été trouvées en milieu liquide, ce qui corrobore les résultats de décontamination que ce soit dans le jus ou dans le pain, et selon Miescher Schwenninger et Meile (2004) l'activité antifongique d'une souche lactique ou propionique augmentait dans une matrice en gel, et Perrier *et al.* (2009) ont trouvé que la souche *Lb. casei* ssp. *paracasei* ne produit des substances antifongiques que dans un milieu à base de lait.

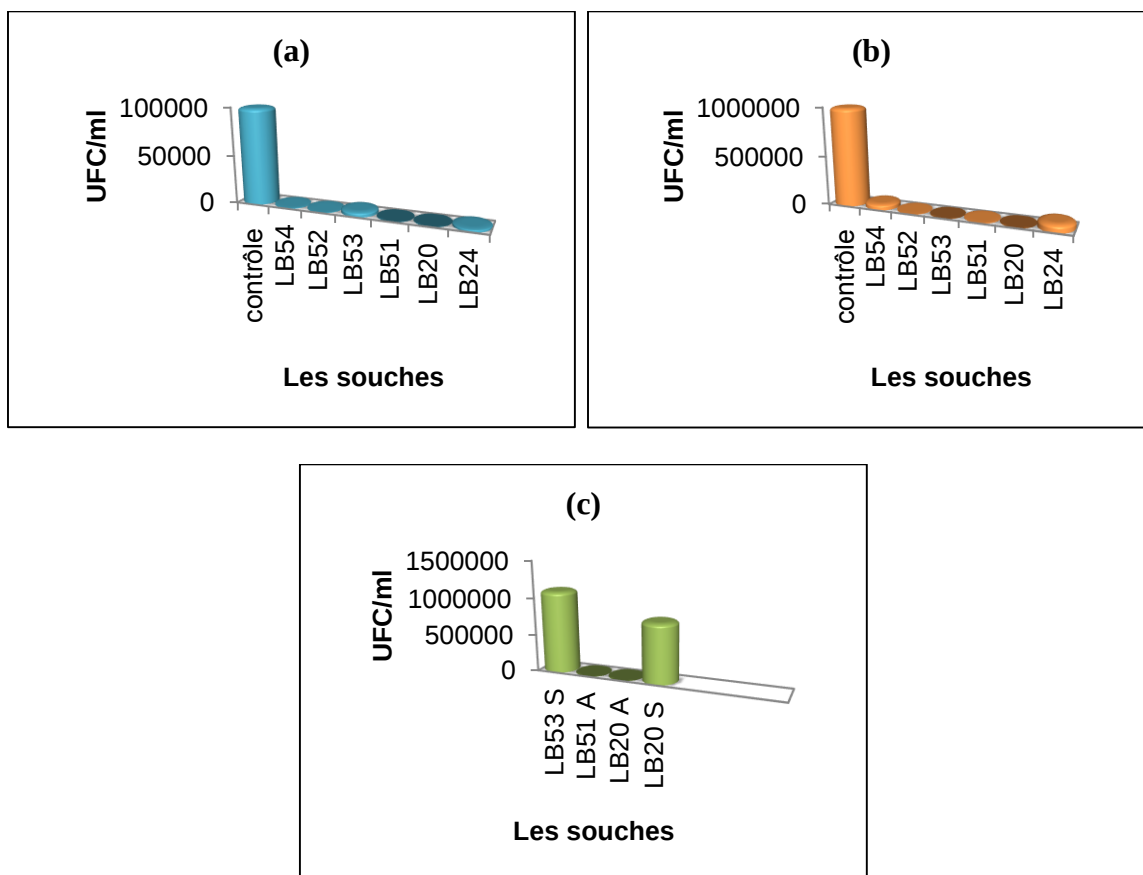


Figure 11. Décontamination de jus d'abricot. (a) sans sucre ; (b) avec sucre ; (c) conservé au réfrigérateur.

Tableau 10. Décontamination de jus d'abricot.

Les souches	Avec sucre / Réfrigération	Sans sucre / Réfrigération
Contrôle	10^5	10^6
LB54	10^3	6.10^4
LB52	7.10^2	5.10^3
LB53	5.10^3	0 / 11.10^6
LB51	0 / 0	8.10^3
LB20	0 / 0	0 / 8.10^5
LB24	3.10^3	8.10^4

Discussion générale

Discussion générale

Plusieurs champignons sont considérés comme agents de contamination dans la quasi-totalité des produits alimentaires. La lutte contre ces pathogènes, est un réel besoin dans le domaine agroalimentaire et le développement de nouvelles stratégies telles que la biopréservation qui constitue une approche très prometteuse (Stile, 1996 ; Magnusson et Schnürer, 2001 ; Kim, 2005).

La sélection effectuée sur un total de 54 souches lactiques isolées du lait cru de chamelle, ensilage et du carotte, a permis d'isoler 6 lactobacilles appartenant aux espèces *plantarum* (LB54, LB52, LB51, LB20 et LB24) et *farciminis* (LB53), dont les colonies inhibaient des moisissures du genre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stemphylium* et *Penicillium*. Une différence de sensibilité de cible fongique (*Aspergillus* sp.) aux différentes souches antifongiques, ces dépendances étaient fort probablement liées à la sensibilité aux différents métabolites produits par les bactéries lactiques ainsi que leur concentration. Les zones d'inhibition sont variables, malgré que cinq souches font parties de la même espèce, il appert que l'activité inhibitrice était souche-dépendante.

L'étude de la cinétique de production des métabolites antifongiques dans le milieu MRS a révélé une production majeure de ces métabolites pendant la phase de croissance exponentielle et stationnaire. En outre, aucune diminution de l'accumulation de ces métabolites n'a été observée au-delà de la phase stationnaire. L'activité de chaque souche étudiée était liée à leur capacité de croissance, et à leur propriété acidifiante.

Une étude de la nature biochimique des métabolites a montré que ces métabolites sont stables à la température, à certains traitements enzymatiques, et leur activité diminue avec l'augmentation du pH du milieu de culture, beaucoup de travaux ont trouvé des résultats similaires (Rouse *et al.*, 2008 ; Gerez *et al.*, 2009 ; Dalié *et al.*, 2010a).

Le milieu MRS contenant l'acétate de sodium, qui est un agent antifongique, de plus Axel *et al.* (2014) ont détecté des dipeptides cycliques à caractère antifongique dans le milieu MRS non fermenté par les bactéries lactiques. En outre, l'extrait de levure joue un rôle important dans l'inhibition, par une diminution de l'effet des acides organiques et il a un même rôle que la catalase qui est l'élimination de l'effet de peroxyde d'hydrogène. Il est difficile de préciser la nature des métabolites inhibiteurs et de conclure pour l'agent responsable de l'inhibition, due à la complexité du milieu MRS.

La nature des substrats présents (glucose, extrait de viande, extrait de levure ... etc.) et le pH du milieu MRS ont une influence considérable sur l'activité. La température et la période d'incubation influencent le métabolisme bactérien ainsi que le type du milieu, liquide ou bien solide, et par conséquent la production de molécules antifongiques et la diffusion à la cible fongique. Mandal *et al.* (2013) ont trouvé que la production est meilleure dans un milieu solide que liquide, dans notre étude on a trouvé que l'inhibition est meilleure dans un milieu liquide par rapport au solide.

Les tests de sensibilité de champignon aux acides montrent bien l'effet antifongique des acides lactique et acétique, et plus particulièrement de l'acide acétique. Ces acides et les métabolites antifongiques provoquent des malformations au niveau du mycélium, conidie et conidiophore. Les bactéries lactiques de par leur innocuité, leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes, et plus particulièrement celles du genre *Lactobacillus*, semblent être de bonnes candidates pour la biopréservation des produits alimentaires. L'utilisation des bactéries lactiques comme culture protectrice apparaît comme une solution parfaitement envisageable pour augmenter la DLC et remplacer les conservateurs chimiques dans les produits alimentaires. Le pain et le jus d'abricot, dont la production peut être facilement reproduite en laboratoire, ont été choisis comme modèle d'étude afin de répondre à notre objectif principal qui était d'obtenir une culture protectrice. Les différences de nutriments disponibles peuvent induire des différences dans la croissance des souches et dans les substances qu'elles produisent, de ce fait les souches utilisées ne présentent aucun effet antifongique dans le pain, il est donc difficile de prédire l'efficacité, au sein d'un produit, d'une souche qui avait présenté des activités antifongiques en milieu de culture.

Les souches utilisées dans cette étude nécessitent une période d'incubation pour être capables d'inhiber la croissance fongique, donc pour être plus efficace contre la croissance d'*Aspergillus* sp. dans les denrées alimentaires, il faut les utiliser avant la contamination parce que, une fois que la moisissure est établie, il est difficile de la contrôler, même à l'aide de bactéries lactiques à caractère antifongique.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a pour objectif de prévenir la croissance d'*Aspergillus* sp. par l'utilisation des bactéries lactiques, dont l'activité antibactérienne et l'innocuité sont largement décrites. L'activité antagoniste de six souches de lactobacilles, isolés du lait cru de chamelle, du carotte et d'ensilage vis-à-vis d'*Aspergillus* sp. par la méthode de double couche et confrontation, à démontrer une bonne inhibition fongique, par contre aucune inhibition n'a été détectée par le surnageant. Les substances produites par *Lb. plantarum* (LB54, LB52, LB51, LB24 et LB20) et *Lb. farciminis* (LB53), résistent aux enzymes protéolytiques et à la température, montrent une forte activité à pH 2 et inhibent d'autres champignons tels que *Fusarium roseum*, *Stemphylium* sp. *Trichoderma* sp. et *Penicillium* sp.

Les substances produites par les six souches sont des métabolites primaires synthétisées au cours de la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, et aucune diminution de ces métabolites au-delà de la phase stationnaire n'a été enregistrée. L'activité de chaque souche étudiée était liée à leur capacité de croissance, et à leur propriété acidifiante.

Les facteurs abiotiques et biotiques tels que la température et la période d'incubation ainsi que la composition de milieu MRS et son pH, modulent la production des substances antifongiques. L'observation microscopique de moisissure inhibée, dans un milieu liquide et solide, illustre bien le mode d'action des métabolites produits par les six souches qui affectent la conidie, le conidiophore et le mycélium.

La germination des conidies est la phase la plus sensible à l'inhibition, en revanche, la croissance mycélienne est la phase la plus difficile à inhiber. Une bonne inhibition fongique a été faite en milieu liquide par rapport au solide, en parallèle, les six souches montrent un effet protecteur dans le jus d'abricot, et aucun effet dans le pain, dû à la différence biochimique de la matrice alimentaire.

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 biopréservation, il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à décontaminer et de rechercher d'autres genres et espèces des bactéries lactiques à caractère antifongique. Plusieurs lactobacilles ont été jugés capables de lier les mycotoxines, donc il serait intéressant d'étudier l'activité antimycotoxine de nos souches.

Références bibliographiques

Clicours.COM

Références bibliographiques

- Adebayo C.O, Aderiye B.I., 2011**, Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*, Food Control, 22, 1814-1820.
- Ahmad Rather I, Seo B.J, Kumar V.J.R, Choi U.H, Choi K.H, Lim J.H, Park Y.H., 2013**, Isolation and Characterization of a Proteinaceous Antifungal Compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and Its Application as a Food Preservative, Letters in Applied Microbiology, 57, 69-76.
- Ahmad Rather I, Seo B.J, Kumar V.J.R, Choi U-H, Choi K-H, Lim J, Park Y-H., 2014**, Biopreservative Potential of *Lactobacillus plantarum* YML007 and Efficacy as a Replacement for Chemical Preservatives in Animal Feed, Food Science and Biotechnology, 23, 195-200.
- Alvarez M, Medina R, Pasteris S.E, Strasser de Saada A.M, Sesma F., 2004**, Glycerol Metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: Cloning and Expression of Two Glycerol Kinase Genes, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 7,170-181.
- Ammor M.S, Belen Florez A, Mayo B., 2007**, Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria, Food Microbiology, 24, 559-570.
- Armaforte E, Carri S, Ferri G, Caboni M.F., 2006**, High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth, Journal of Chromatography A, 1131, 281-284.
- Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarrrondo M, Chobert J.M, Dousset X, Ivanova I, Haertlé T., 2003**, Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3, International Journal of Food Microbiology, 87, 63-73.
- Axel C, Zannini E, Arendt E.K, Waters D.M, Czerny M., 2014**, Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 2433-2444.
- Baek E, Kim H, Choi H, Yoon S, Kim J., 2012**, Antifungal Activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in Rice Cakes, Journal of Microbiology, 50, 842-848.
- Batish V.K, Lal R, Grover S., 1990**, Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R, Food Microbiology, 7, 199-206.
- Batish V.K, Roy U, Lal R, Grover S., 1997**, Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria - A Review, Critical Reviews in Biotechnology, 17, 209-225.
- Bayrock D.P, Ingledew W.M., 2004**, Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity?, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31, 362-368.
- Belguesmia Y, Choiset Y, Rabesona H, Baudy-Floc'h M, Le Blay G, Haertlé T, Chobert J.M., 2012**, Antifungal properties of durancins isolated from *Enterococcus durans* A5-11 and of its synthetic fragments, Letters in Applied Microbiology, 56, 237-244.
- Belz M.C.E, Mairinger R, Zannini E, Ryan L.A.M, Cashman K.D, Arendt E.K., 2012**, The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread, Applied Microbiology and Biotechnology, 96,493-501.
- Benfeldt C, Morgenstern H.U., 2013**, Strains of *Lactobacillus* with antifungal properties, World Intellectual Property Organization, WO2013174792A.
- Benomar L., 2005**, Recherche d'activité antifongique chez les Bactéries Lactiques (LAB) du genre *Lactobacillus*, mémoire de master, université des sciences et technologies de Lille I, France.
- Bianchini A., 2011**, Antifungal activity of lactic acid bacteria: Factors affecting production and stability of Antifungal compounds of *Lactobacillus plantarum* and effects of the antifungal compounds on growth and Aflatoxin production by *Aspergillus* spp, Ph.D, Thesis, Nebraska University.

- Black B.A, Sun C, Zhao Y.Y, Gänzle M.G, Curtis J.M., 2013a**, Antifungal Lipids Produced by Lactobacilli and Their Structural Identification by Normal Phase LC/Atmospheric Pressure Photoionization–MS/MS, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 5338-5346.
- Black B.A, Zannini E, Curtis J.M, Gänzle M.G., 2013b**, Antifungal hydroxy-fatty acids produced during sourdough fermentation: microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread, *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2899-2905.
- Blagojev N, Škrinjar M, Veskoviaemoračanin S, Šošo V., 2012**, Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites, *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7219-7226.
- Broberg A, Jacobsson K, Ström K, Schnürer J., 2007**, Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5547-5552.
- Brosnan B, Coffey A, Arendt E.K, Furey A., 2012**, Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2983-2995.
- Bueno D.J, Casale C.H., Pizzolitto R.P, Salvano M.A, Guillermo O., 2007**, Physical Adsorption of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A Theoretical Model, *Journal of Food Protection*, 70, 2148-2154.
- Cabo M.L, Braber A.F, Koenraad P.M., 2002**, Apparent Antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* Is due to acetic acid in the medium, *Journal of Food Protection*, 65, 1309-1316.
- Carr F.J, Chill D, Maida N., 2002**, The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- Chang I, Kim J.D., 2007**, Inhibition of Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus casei*, *Mycobiology*, 35, 76-81.
- Chapeland-Leclerc F, N Papon, T Noel, J Villard., 2005**, Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses), *Revue Française des Laboratoires*, 373, 61-66.
- Chen C, Chen X, Jiang M, Ru X, Li W, Dong M., 2014**, A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (Nanx Wudl), *Food Control*, 42, 116-124.
- Choi H, Kim Y.W, Hwang I, Kim J, Yoon S., 2012**, Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough, *Food Chemistry*, 134, 2208-2216.
- Chung T, Axelsson C, Lindgren L.S.E, Dobrogosz W.J., 1989**, In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*, *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2, 137-144.
- Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E., 2013**, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread, *Food Control*, 31, 539-545.
- Coallier-Ascah J, 1981**, Effect of interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on the production of aflatoxin, ph.D thesis, Montréal, Québec, Canada
- Coallier-Ascah J, Idziak E.S., 1985**, Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on Production of Aflatoxin, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 163-167.
- Coda R, Cassone A, Rizzello C.G, Nionelli L, Cardinali G, Gobbetti M., 2011**, Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3484-3492.
- Coda R, Rizzello C.G, Nigro F, De Angelis M, Arnault P, Gobbetti M., 2008**, Long-Term Fungal Inhibitory Activity of Water-Soluble Extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. *Pinto* and Sourdough Lactic Acid Bacteria during Bread Storage, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7391-7398.

- Collins E.B, Hardt P., 1980**, Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*, Journal of Dairy Science, 63, 830-832.
- Condon S., 1987**, Responses of lactic acid bacteria to oxygen, FEMS Microbiology Reviews, 46, 269-280.
- Corassin C.H. F. Bovo, R.E. Rosim, Oliveira C.A.F., 2012**, Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk, Food Control, 31, 80-83.
- Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J, Damiani P., 1998**, Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 253-256.
- Corsetti A, Valmorri S., 2011**, Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 111-118.
- Crowley S, Mahony J, Van Sinderen D., 2012**, Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bio-protectants in refrigerated foods, Journal of Applied Microbiology, 113, 1417-1427.
- Crowley S, Mahony J, Van Sinderen D., 2013**, Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models, Folia Microbiologica, 58, 291-299.
- Dal Bello F, Clarkea C.I, Ryana L.A.M, Ulmera H, Schobera T.J, Ström K, Sjögren J., Van Sinderenb D, Schnürer J, Arendt E.K., 2007**, Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7, Journal of Cereal Science, 45, 309-318.
- Dalié D, Pinson-Gadais L, Atanasova-Penichon V, Marchegay G, Barreau C, Deschamps A, Richard-Forget F., 2012**, Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*, Food Control, 23, 405-411.
- Dalié D.K.D, Deschamps A.M, Atanasova-Penichon V., 2010a**, Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf To Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth, Journal of Food Protection, 73, 1129-1137.
- Dalié D.K.D, Deschamps A.M, Richard-Forget F., 2010b**, Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, Food Control, 21, 370-380.
- Dalié D.K.D., 2010**, Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs, Thèse doctorat, université Bordeaux I.
- De Man J.C, Rogosa M, Sharpe M.E., 1960**, A medium for the cultivation of lactobacilli, Journal of Applied Microbiology, 123, 130-135.
- De Muyncka C, Leroya A.I.J, De Maeseneire S, Arnautb F, Soetaerta W, Vandamme E.J., 2004**, Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites, Microbiological Research, 159, 339-346.
- Delavenne E, Ismail R, Pawtowski A, Mounier J, Barbier G, Le Blay G., 2013**, Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures, Food Control, 30, 206-213.
- Delavenne E, Mounier J, D'eniél F, Barbier G, Le Blay G., 2012**, Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period, International Journal of Food Microbiology, 155, 185-190.
- Delavenne E., 2012**, Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus, Thèse Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dielbandhoesing S.K, Zhang H, Caro L.H.P, Van Der Vaart J.M., Klis F.M, Verrips C.T, Brul S., 1998**, Specific Cell Wall Proteins Confer Resistance to Nisin upon Yeast Cells, Applied and Environmental Microbiology, 64, 4047-4052.
- Digaitiene A, Hansen Å.S, Juodeikiene G, Eidukonyte D, Josephsen J., 2012**, Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocinlike inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi, Journal of Applied Microbiology, 112, 732-742.

- Dijksterhuis J, Samson R.A., 2007**, Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food, Taylor & Francis Group, 424 pp.
- Djossou O, Perraud-Gaime I, Lakhal Mirleau F, Rodriguez-Serrano G, Karou G, Niamke S, Ouzari I, Boudabous A, Roussos S., 2011**, Robusta coffee beans post harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. As potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*, Anaerobe, 17, 267-272.
- Dobrogosz W.G, Lindgren S.E., 1994**, Method of determining the presence of an antibiotic produced by *Lactobacillus reuteri*, United States Patent Application, US5352586A.
- Dragacci S, Grosso F, Frémy J.M., 2005**, Analyse et détection des mycotoxines, Technique de l'ingénieur.
- Driehuis F, Oude Elferink S.J.W.H, Spoelstra S.F., 1999**, Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability, Journal of Applied Microbiology, 87, 583-594.
- Eklun T., 1983**, The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels, Journal of Applied Bacteriology, 54, 383-389.
- El Khoury A, Atoui A, Yaghi J., 2011**, Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry, Food Control, 22, 1695-1699.
- El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J., 1998a**, Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1, Food and Chemical Toxicology, 36, 321-326.
- El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J., 1998b**, Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media, Journal of Food Protection, 61, 466-468.
- El-Nezami H, Polychronaki N, Salminen S, Mykkänen H., 2002a**, Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3545-3549.
- El-Nezami H.S, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S, Mykkänen H., 2002b**, Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*, Food Additives and Contaminants, 19, 680-686.
- El-Shafei K, Abd El-Gawad M.A.M, Dabiza N, Sharaf O.M, Effat B.A., 2008**, A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* p-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in kareish cheese, polish journal of food and nutrition sciences, 58, 433-441.
- Falguni P, Shilpa V, Mann B., 2010**, Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02, International Journal of Dairy Technology, 63, 70-76.
- Fazeli M.R, Hajimohammadali M., Moshkani A, Samadi N, Jamalifar H, Khoshay M.R, Vaghari E, Pouragahi S., 2009**, Aflatoxin B1 Binding Capacity of Autochthonous Strains of Lactic Acid Bacteria, Journal of Food Protection, 72, 189-192.
- Fiddaman P.J, Rossall S., 1993**, The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*, Journal of Applied Bacteriology, 74, 119-126.
- Florianowicz T., 2001**, Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*, European Food Research and Technology, 212, 282-286.
- Franco T.S, Garcia S, Hirooka E.Y, Ono Y.S, Santos J.S.D., 2011**, Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification, Journal of Applied Microbiology, 111, 739-748.
- Freitas D.A, Leclerc S, Miyoshi A, Oliveira S.C, Sommer P.S.M, Rodrigues L, Correa Junior A, Gautier M, Langella P, Azevedo V.A, Le Loir Y., 2005**, Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*, Brazilian journal of medical and biological Research, 38, 1585-1592.

- Fuchs S, Sontag G, Stid R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S., 2008**, Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1398-1407.
- Gajbhiye M, Prakash D, Jagdale S, Ahiwale S, Patil N, Kapadnis B., 2012**, Pomegranate Borne Fungicidal Lactic Acid Bacteria and their Biodiversity, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82, 413-419.
- Ganesan B, Seefeldt K, Koka R.C, Dias B, Weimer B.C., 2004**, Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli, *International Dairy Journal*, 14, 237-246.
- Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi I, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A, Dueñas M.T., 2008**, Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 253-261.
- Garcha S, Natt N.K., 2012**, In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291, *Journal of Food Science and Technology*, 49, 643-648.
- Garofalo C, Zannini E, Aquilanti L, Silvestri G, Picariello O.F.G, Clementi F., 2012**, Selection of Sourdough Lactobacilli with Antifungal Activity for Use as Biopreservatives in Bakery Products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 7719-7728.
- Gerbaldo G.A, Barberisa C, Pascuala L, Dalceroa A, Barberisa L., 2012**, Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiology Letter*, 332, 27-33.
- Gerez C.L, Carbajo M.S, Rollan G, Torres Leal G, De Valdez G.F., 2010**, Inhibition of citrus fungal pathogens by using Lactic acid bacteria, *Journal of Food Science*, 75, 354-359.
- Gerez C.L, Torino M.I, Rollan G, De Valdez G.F., 2009**, Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, *Food Control*, 20, 144-148.
- Gerez C.L, Torres M.J, Font de Valdez G, Rollán G., 2012**, Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria, *Biological Control*, 64, 231-237.
- Gould G.W., 2000**, Preservation: past, present and future, *British Medical Bulletin*, 56, 84-96.
- Gourama H, Bullerman L.B., 1995**, Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species, *Journal of Food Protection*, 58, 1249-1256.
- Gourama H, Bullerman L.B., 1997**, Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei Pseudopantarum*, *International Journal of Food Microbiology*, 34, 131-143.
- Gourama H., 1991**, Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in the presence of *Lactobacillus* species, Ph.D, Thesis, Nebraska University.
- Gourama H., 1997**, Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species, *LWT Food Science Technology*, 30, 279-283.
- Grattepanche F, Miescher Schwenninger S, Meile L, Lacroix C., 2008**, Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities, *Dairy Science & Technology*, 88, 421-444.
- Gratz S, Mykkänen H., El-nezami H., 2005**, Aflatoxin B1 Binding by a Mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *In Vitro* Versus *Ex Vivo*, *Journal of Food Protection*, 68, 11, 2470-2474.
- Guillo N., 1958**, Élaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*, *Annales de l'institut Pasteur*, 95, 194-207.
- Guo J, Brosnan B, Furey A, Arendt E.K, Axel C, Coffey A., 2014**, Anti-oomycete potential of *Lactobacillus amylovorus* JG2 against the potato blight pathogen *Phytophthora infestans*, *international Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 630-647.
- Guo J, Mauch A, Galle S, Murphy P, Arendt E.K, Coffey A., 2011**, Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*, *Journal of Applied Microbiology*, 2111, 474-483.

- Gupta R, Srivastava S., 2014**, Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage, *Food Microbiology*, 42, 1-7.
- Haskard C, Binnion C, Ahokas J., 2000**, Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, *Chemico-Biological Interactions*, 128, 39- 49.
- Haskard C.A, El-Nezami H.S, Kankaanpää P.E, Salminen S, Ahokas J.T., 2001**, Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3086-3091.
- Hassan Y.I, Bullerman L.B., 2008**, Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 112-115.
- Hatab S, Yue T, Mohamad O., 2012**, Reduction of Patulin in Aqueous Solution by Lactic Acid Bacteria, *Journal of Food Science*, 77, M238-M241.
- Hawar S, Vevers W, Karieb S, Ali B.K, Billington R, Beal J., 2013**, Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*, 34, 502-508.
- Hernandez-Mendoza A, Garcia H.S, Steele J.L., 2009**, Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1, *Food and Chemical Toxicology* 47, 1064-1068.
- Hirsch P.R., 1979**, Plasmid-determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum*, *Journal of General Microbiology*, 113, 219-228.
- Hyun-Min J, Kyung-Ah K, Kil-Sun M, Young-Tae A, Jung-Hee L, Chul-Sung H, Myung J.H, Dong-Hyun K., 2012**, *Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting fungal growth and NF-kB activation, *International Immunopharmacology*, 14, 39-46.
- Kabak B, Var I., 2004**, The effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains on the growth and AFB1 production of *Aspergillus flavus*, *Acta Alimentaria*, 33, 371-376.
- Kankaanpää P, Tuomola E, El-Nezami H, Ahokas J, Salminen S.J., 2000**, Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model, *Journal of Food Protection*, 63, 412-414.
- Kantachote D, Prachyakij P, Charernjitrakul W, Ongsakul M, Duangjitcharoen Y, Chaiyasut C, Nitoda T, Kanzaki H., 2010**, Characterization of the antiyeast compound and probiotic properties of a starter *Lactobacillus plantarum* DW3 for possible use in fermented plant beverages, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, 1-15.
- Karimi R, Sohrabvandi S, Mortazavian A.M., 2012**, Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 437-452.
- Khaddor M, Tantaoui-Elaraki A, Behajib A, Lamarti A, Ezziyyani M, Candela Castillo M.E, Badoc A, 2003**, Destruction de l'aflatoxine m1 par les bactéries lactiques du lben marocain et du yaourt, *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 142, 101-112.
- Klaenhammer T.R., 1993**, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Klewicka E, Motyl I, Libudzisz Z., 2004**, Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp, *European Food Research and Technology*, 218,178-183.
- Klewicka E., 2007**, Antifungal activity of lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus* sp. in the presence of polyols, *Acta Alimentaria*, 36, 495-499.
- Kumar N, Narayanan R, Kavitha N, Dhanalakshmi B., 2010**, Plasmid profile of lactic acid bacteria with antifungal properties, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3, 229-235.
- Kuwaki S, Ohhira I, Takahata M, Hirota A, Murata Y, Tada M., 2004**, Effects of the fermentation product of herbs by lactic acid bacteria against phytopathogenic filamentous fungi and on the growth of host plants, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98,187-192.

- Kuwaki S, Ohhira I, Takahata M, Murata Y, Tada M., 2002**, Antifungal activity of the fermentation product of herbs by lactic acid bacteria against tinea, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 401-405.
- Kwak M-K, Liu R, Kim M-K, Moon D, Kim A.H, Song S-H, Kang S-O., 2014**, Cyclic Dipeptides from Lactic Acid Bacteria Inhibit the Proliferation of Pathogenic Fungi, *Journal of Microbiology*, 52, 64-70.
- Lahtinen S.J, Haskard C.A, Ouwehand A.C, Salminen S.J, J. Ahokas T., 2004**, Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, *Food Additives and Contaminants*, 21, 158-164.
- Laitila A, Alakomi H.L, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Haikara A., 2002**, Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 566-576.
- Laitila A, Sweins H, Vilpola A, Kotaviita E, Olkku J, Home S, Haikara A., 2006**, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* Starter Cultures as a Tool for Microflora Management in Malting and for Enhancement of Malt Processability, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 3840-3851.
- Lan W, Chen Y, Wu H.C, Yanagida F., 2012**, Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd, *Folia Microbiologica*, 57, 99-105.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M., 2000**, Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4084-4090.
- Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A., 2003**, Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 634-640.
- Le Lay C, Akerey B, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M., 2008**, Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1630-1639.
- Lee H, Lee M-Y, Chang H-C, Lee J-J., 2013**, Repeated-dose oral toxicity study of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 in rats, *Korean journal of food preservation*, 20, 394-403.
- Lee Y.K., El-Nezami H, Haskard C.A, Gratz S, Puong K.Y, Salminen S, Mykkanen H., 2003**, Kinetics of Adsorption and Desorption of Aflatoxin B1 by Viable and Nonviable Bacteria, *Journal of Food Protection*, 66, 426-430.
- Li H, Liu L, Zhang S, Cui W, Lv J., 2012**, Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18, *Current Microbiology*, 65, 156-161.
- Li H-j, Liu L, Zhang S-W, Kong F-P, Sun Z, Lü J-P., 2011**, The Antifungal Properties of *Lactobacillus casei* AST18 and Its Application as Adjunct Culture in Yogurt, *Scientia Agricultura Sinica*, 44, 4050-4057.
- Lind H, Jonsson H, Schnürer J., 2005**, Antifungal effect of dairy propionibacteria contribution of organic acids, *International Journal of Food Microbiology*, 98, 157-165.
- Lind H., 2010**, Antifungal properties of dairy propionibacteria, Ph.D, Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Logrieco A, Moretti A, Castella G, Kosteci M, Golinski P, Ritieni A, Chelkowski J, 1998**, Beauvericin Production by *Fusarium* Species, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3084-3088.
- Lou X, Zhang C, Zhang X, Shen L, Gu Q., 2013**, Isolation and identification of the strain of lactic acid bacteria inhibiting *Aspergillus fumigatus* and its properties, *Acta agriculturae zhejiangensis*, 25, 176-181.

- Luchese R.H, Harrigan F., 1990**, Growth of, and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 512-519.
- Mäeyräe-mäekinen A, Suomalainen T., 1994**, A novel microorganism strain, bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeast and moulds, European States Patent Application, EP0576780A2.
- Magnusson J, Schnürer J., 2001**, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5.
- Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjogren J, Schnürer J., 2003**, Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129-135.
- Magnusson J., 2003**, Antifungal activity of lactic acid bacteria, Ph.D, Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Mailänder-Sánchez D, Mailänder-Sánchez, J.W, Schaller M., 2012**, Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis, *Mycoses*, 55, 17-26.
- Mandal V, Kumar Sen S, 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.
- Marco M., 2011**, *Lactobacillus plantarum* in Foods, *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*, Taylor & Francis.
- Marth E.H, Hussong R.V., 1963**, Effect of skim milks cultured with different strains of *Leuconostoc citrovorum* on growth of some bacteria and yeasts, 46, 1033-1037.
- Martín R, Olivares M, Mariñ M.L, Xaus J, Fernández L, Rodríguez J.M., 2005**, Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 104, 267- 277.
- Mateo E.M, Medina Á, Mateo R, Jiménez M., 2010**, Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media, *Food Control*, 21, 935-941.
- Mauch A, Dal Bello F, Coffey A, Arendt E.K., 2010**, The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 116-121.
- Meca G, Ritieni A., Mañes J., 2012**, Reduction in vitro of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin employing different strains of probiotic bacteria, *Food Control*, 28, 435-440.
- Melin P, Sundh I, Håkansson S, Schnürer J., 2007**, Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects, *Biotechnology Letters*, 29, 1147-1154.
- Miao J, Guo H, Ou Y, Liu G, Fang X, Liao Z, Ke C, Chen Y, Zhao L, Cao Y., 2014**, Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China, *Food Control*, 42, 48-53.
- Miescher Schwenninger S, Meile L, Lacroix C, Zurich E.T.H, Switzerland., 2011**, Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation, In: C. Lacroix, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation, Woodhead Publishing, 489 pp.
- Miescher Schwenninger S, Meile L., 2003**, Mixtures of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus* sp. with antimicrobial activities for use as a natural preservation system, European States Patent Application, EP1308506A1.

- Miescher Schwenninger S, Meile L., 2004**, A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts, *Systematic Applied Microbiology*, 27, 229-237.
- Mohran M.A, Megalla E .S, Said M.R., 1984**, Effect of aflatoxin B-1 on the proteolytic activity of some lactic-acid bacteria, *Mycopathologia*, 86, 99-101.
- Mokoena M.P, Chelule P.K., Gqaleni N., 2005**, Reduction of Fumonisin B1 and Zearalenone by Lactic Acid Bacteria in Fermented Maize Meal, *Journal of Food Protection*, 68, 2095-2099.
- Mollapour M, Piper P.W., 2008**, Weak Organic Acid Resistance of Spoilage Yeasts, In: S.V. Avery, M. Stratford, P. Van West, *British Mycological Society Symposia Series*, Elsevier, 290 pp.
- Morgan J, Vivier M.A, Pretorius I.S, Du Toit M., 2003**, Screening, isolation and characterisation of antimicrobial / antifungal peptides produced by lactic acid bacteria isolated from wine, 1st FEMS Congress / Posters, 103-505.
- Mu W, Yu S, Zhu L, Zhang T, Jiang B., 2012**, Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound, *Applied Microbiology Biotechnology*, 95, 1155-1163.
- Muhialdin B.J, Hassan Z, Sadon S.K., 2011**, Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on selected foods, *Journal of Food Science*, 76, 493-499.
- Muhialdin B.J, Hassan Z., 2011**, Screening of Lactic Acid Bacteria for Antifungal Activity against *Aspergillus oryzae*, *American Journal of Applied Sciences* 8, 447-451.
- Muñoz R, Arena M.E, Silva J, González S.N., 2010**, Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1019-1026.
- Nakata H, Hasegawa H, Sakurai H, Tamura M., 2010**, Distinctive Flavor and Strong Antifungal Activity in a Sourdough Bread Made Using Unique Lactic Acid Bacteria Obtained from a Sugar Factory, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 57, 85-90.
- Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P., 2011**, Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food, *Journal of Food Science*, 76, 305-311.
- Ndagano D., 2011**, Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires fermentés et caractérisation de leurs métabolites inhibiteurs, Ph.D, Thèse, Université de Liège.
- Ngondet B.P.A., 2008**, Implications de la nisine Z, de la pédiocine PA-1 et des cellules gingivales dans le contrôle de la pathogénie de *Candida albicans* (étude *in vitro*), Mémoire maître ès sciences (m. se.), Université Laval, Québec.
- Niderkorn V, Boudra H, Morgavi D.P, 2006**, Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*, *Journal of Applied Microbiology*, 101, 849-856.
- Niderkorn V, Morgavi D.P, Aboab B, Lemaire M, Boudra H., 2009**, Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 977-985.
- Niku-Paavola M.G, Laitila A, Mattial-Sandholm T, Haikara A., 1999**, New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29-35.
- Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen H.S, Kristiansen P.E., 2010**, Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins, *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 2, 52-60.
- Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegård C, Haugen H.S, Kristiansen P.E., 2009**, Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 19-37.

- Noda F, Hayashi K, Takeji M., 1980**, Antagonism Between Osmophilic Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Brine Fermentation of Soy Sauce, *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 452-457.
- O’Keeffe T, Hill C., 1999**, BACTERIOCINS | Potential in Food Preservation, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 183-191.
- Okkers D.J, Dicks L.M.T, Silvester M, Joubert J.J, Odendaal H.J., 1999**. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*, *Journal of Applied Microbiology*, 87, 726-734.
- Oluwafemi F, Kumar M, Bandyopadhyay R, Ogunbanwo T, Ayanwande., 2010**, Bio-detoxification of aflatoxin B1 in artificially contaminated maize grains using lactic acid bacteria, *Toxin Reviews*, 29, 115-122.
- Osuntoki A.A, Gbenle G.O, Olukoya D.K., 2003**, Evidence for Chromosomal Determination of Fungicidal Activity in Strains of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum* Isolated from Fermented Foods, *Folia Microbiologica*, 48, 56-58.
- Pascual L.M, Daniele M, Giordano W, Pa’jaro M, Barberis I.L., 2008**, Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23, *Current Microbiology*, 56, 397-402
- Pawlowska A.M, Zannini E, Coffey A, Arendt E.K., 2012**, “Green Preservatives”:Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria, In: H. Jeyakumar, *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, 244 pp.
- Perrier L, Loysance-Paroux C, Tirilly Y, Fuhrmann B., 2009**, Use of *L. casei* ssp. *paracasei* as antifungal agent, *World Intellectual Property Organization*, WO2009098411A2.
- Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S, Ahokas J., 2000**, Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M1 in Food Model, *Journal of Food Protection*, 63, 645-650.
- Piotrowska M, Zakowska Z., 2000**, The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast, *Progress in Biotechnology*, 17, 307-310.
- Prete V.D, Rodriguez H, Carrascosa A.V., DE Las Rivas B, E Garcia-Moruno, Munõz R., 2007**, In Vitro Removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria, *Journal of Food Protection*, 70, 2155-2160.
- Rasic J.R, Skrinjar M, Markov S., 1991**, decrease of aflatoxin B1 in yoghurt and acidified milks, *Mycopathologia*, 113, 117-119,
- Rees T., 1997**, The development of a novel antifungal silage inoculant. Ph.D, Thesis, Cranfield University.
- Rib’ereau-Gayon, 2006**, Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications, John Wiley & Sons, 512 pp.
- Rizzo A, Losacco A, Caterina R.C., 2013**, *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human defensins 2 and 3, *Immunology Letters*, 156, 102-109.
- Ross R.P, Morgan S, Hill C., 2002**, Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D., 2008**, Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923.
- Roy U, Batish V.K, Grover S, Neelakantan S., 1996**, Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3, *International Journal of Food Microbiology*, 32, 27-34.
- Roy U, Kaushik J.K, Grover S, Batish V.K., 2009**, Partial purification of an antifungal protein produced by *Enterococcus faecalis* CHD 28.3, *Annals of Microbiology*, 59, 279-284.

- Ryan L, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P, Arendt E., 2011**, *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products, *Journal of Food Microbiology*, 146, 276-283.
- Ryan L.A.M, Dal Bello F, Arendt E.K., 2008**, The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread, *International journal of food microbiology*, 125, 274-278.
- Ryu E.H, Yang E.J, Woo E.R, Chang H.C., 2014**, Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi, *Food Microbiology*, 41, 19-26.
- Sangmanee P, Hongpattarakere T., 2014**, Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Food Control*, 40, 224e233.
- Sarimehmetoğlu B, Ö Küplülü., 2004**, Binding ability of aflatoxin M₁ to yoghurt bacteria, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51, 195-198.
- Sathe S.J, Nawani N.N, Dhakephalkar P.K, Kapadnis B.P., 2007**, Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622-2628.
- Schillinger U, Villarreal J.V., 2010**, Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods, *Food Control*, 21, 107-111.
- Schnürer J, Magnusson J., 2005**, Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 70-78.
- Shahin, 2007**, Removal of Aflatoxin B1 from Contaminated Liquid Media by Dairy Lactic Acid Bacteria, *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 71-75.
- Sharma A, Srivastava S., 2014**, Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action, *Fungal Biology*, 118, 264-275.
- Shekh R, Upadhyay K, Singh S.M, Roy U., 2009**, Inhibition of *Candida albicans* and two selected Gram-negative pathogens by Polar *Enterococcus faecalis* and *Carnobacterium* sp., *Research Journal of Microbiology*, 4, 138-142.
- Shekh R.M, Roy U., 2012**, Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*, *BMC Microbiology*, 12, 132.
- Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L., 2003**, Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7554-7557.
- Sjögren J., 2005**, Bioassay-guided isolation and characterisation of antifungal metabolites, *Doctoral Thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Skirdal I.M, Eklund T., 1993**, Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at different pH levels, *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 191-195.
- Smaoui S, Elleuch L, Bejar W, Karray-Rebai I, Ayadi I, Jaouadi B, Mathieu F, Chouayekh H, Bejar S, Mellouli L., 2010**, Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1132-1146.
- Smit G, Smit B.A, Engels W.J.M., 2005**, Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591-610.
- Srinivasulu Reddy M, Vedamuthu E. R, Washam C. J, Reinbold G.W., 1969**, Differential Agar Medium for Separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*, *Journal of Applied Microbiology*, 18, 755-759.

- Stiles J, Penkar S, Plockova M, Chumchalova J, Bullerman L.B., 2002**, Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*, *Journal of Food Protection*, 65, 1188-1191.
- Stiles M.E, Holzapfel W.H., 1997**, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Stiles M.E., 1996**, Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.
- Stoyanova L.G, Ustyugova E.A, Netrusov A.I., 2012**, Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 229-243.
- Stoyanova L.G, Ustyugova E.A, Sultimova T.D, Bilanenko E.N, Fedorova G.B, Khatrukha G.S, Netrusov A.I., 2010**, New Antifungal Bacteriocin-Synthesizing Strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as the Perspective Biopreservatives for Protection of Raw Smoked Sausages, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, 477-485.
- Ström K, Schnurer J, Melin P., 2005**, Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression, *FEMS Microbiology Letters*, 246, 119-124.
- Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J., 2002**, *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4322-4327.
- Ström K., 2005**, Fungal inhibitory lactic acid bacteria, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko P.B., 2005**, The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 13, 69-75.
- Tailliez P., 2004**, Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine, *Antibiotiques*, 6, 35-41.
- Talarico T.L, Dobrogosz W.J., 1989**, Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 33, 674-679.
- Topcu A, Bulat T, Wishah R, Boyac I.H., 2010**, Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 139, 202-205.
- Trias R, Bañeras L, Montesinos E, Badosa E., 2008**, Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi, *International Microbiology*, 11, 231-236.
- Valan Arasu M, Jung M-W, Ilavenil S, Jane M, Kim D-H, Lee K-D, Park H-S, Huh T-Y, Choi G-J, Lim Y-C, Al-Dhabi N.A., Choi K-C., 2013**, Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties, *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1172-1185.
- Valerio F, Favilla M, DeBellis P, Sisto A, De Candia S, Lavermicocca P., 2009**, Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 438-448.
- Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, Visconti A., 2004**, Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation, *FEMS Microbiology Letters*, 233, 289-295.
- Vandenbergh P.A, Kunka B.S., 1989**, Antifungal product, United States Patent Application, US4877615.
- Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopoulos P, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N., 2010**, Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products, *Food Control*, 21, 136-142.
- Wang H, Sun Y, Chen C, Sun Z, Zhou Y.C, Shen F, Zhang H, Dai Y., 2013**, Genome shuffling of *Lactobacillus plantarum* for improving antifungal activity, *Food control*, 23, 341-347.

- Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W., 2012**, Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014, PLoS ONE, 7, e29452, doi:10.1371/journal.pone.0029452.
- Ward F, 1976**, The effect of gram-positive cocci on aflatoxin production, master thesis, Montréal, Québec, Canada.
- Ward O.P, Qin W.M, Dhanjoon J, Ye J, Singh A., 2005**, Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*, In: A.I. Laskin, J.W. Bennett, G.M. Gadd, S. Sariaslani, Advances in Applied Microbiology, Elsevier, 270 pp.
- Wiseman D.W, Marth E.H., 1981**, Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*, Mycopathologia, 73, 49-56.
- Yang E, Chang H., 2010**, Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi, International Journal of Food Microbiology, 139, 56-63.
- Yang E.J, Kim Y.S, Chang H.C., 2011**, Purification and Characterization of Antifungal δ -Dodecalactone, Journal of Food Protection, 74, 651-657.
- Zalán Z, Huda'ček J, Jir'í S, Chumchalová J, Hala'sz A, 2010**, Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media, European Food Research and Technology, 230, 395-404.
- Zhang C, Brandt M.J, Schwab C, Gänzle M.G., 2010**, Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough, Food Microbiology, 27, 390-395.
- Zhao D., 2011**, Isolation of antifungal lactic acid bacteria from food sources and their use to inhibit mold growth in cheese, Masters Thesis, San Luis Obispo University, California, USA.

Annexe

Annexe

Eau physiologique

Chlorure de sodium 8.5 g

Peptone 0.5 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7

Autoclavage : 120 °C, 20 minutes.

Lait écrémé

Lait écrémé 100 g

Extrait de levure 3 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7

Autoclavage : 120 °C, 10 minutes.

Milieu à esculine

Peptone 10 g

Esculine 1g

Citrate de fer ammonical 1g

Agar 20 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7.4

Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.

Milieu Extrait de malt agar

Extrait de malt 30 g

Agar 15 g

pH = 5.5

Eau distillée 1000 ml

Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.

Milieu MRS-BCP sans extrait de viande

MRS sans extrait de viande (1000 ml)

Pourpre de Bromocrésol 0.025 mg

pH = 7

Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.

Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Glucose 20 g

KH₂PO₄ 2 g

MgSO₄ 0.25 g

MnSO₄ 0.05 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 5.4

Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.

Milieu M16 BCP

Extrait de levure 2.5 g

Extrait de viande 5 g

Lactose 2 g

Biopolytone 5 g

Peptone papainique de soja 5 g

Acide ascorbique 0.5 g

Acétate de sodium 1.8 g

L-Arginine 4 g

Pourpre de bromocrésol 0.05 g

Agar 10 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 6.5

Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.