



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم. الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Biotechnologie Fongique /Option : Fermentation et production de substances
fongiques**

Intitulé :

Recherche de bactéries lactiques à activité Antimycotoxinogène isolées à partir du lait caillé

Présenté et soutenu par : HADEF Amira

Le 24 /06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me}Mihoubi I. (Prof. UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Kacem chaouche N. (Prof. UFM Constantine).

Examineur : M^{elle}Bataiche I . (Dr . UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم. الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Biotechnologie Fongique /Option : Fermentation et production de substances
fongiques**

Intitulé :

Recherche de bactéries lactiques à activité Antimycotoxinogène isolées à partir du lait caillé

Présenté et soutenu par : **HADEF Amira**

Le **24 /06/2015**

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me}Mihoubi I. (Prof. UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Kacem chaouche N. (Prof. UFM Constantine).

Examineur : M^{elle}Bataiche I . (Dr . UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

Je remercie **Dieu** le généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et de m'avoir donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Je remercie mon encadreur Monsieur **KACEM CHAOUCH**, N Professeur à UFM Constantine pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce mémoire et de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM) ainsi que pour son soutien scientifique, Mon sincère remerciement,

Un grand merci à madame **kara ali** qui m'a gentiment consacré du temps et a suivi et guidé la réalisation de ce travail pour sa disponibilité, son âme ,

Très sincères remerciements à madame **Mihoubi I**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury
Mes remerciements à madame **Bataïche I**, qui a accepté d'examiner ce travail,

Merci à toute l'équipe du laboratoire de mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM) de m'avoir aidé très sincères remerciements,

Je voudrais aussi remercier les professeurs qui m'ont formés au long de mon parcours universitaire,

A Nesrine et Hadjer je vous remercie avec ma dernière énergie, Grâce à vous ces années ont été ponctuées de moments d'évasion,

Je remercie aussi les étudiants de ma promotion de la spécialité Biotechnologie des champignons.

.

Dédicaces

Avec un énorme plaisir. Un cœur ouvert et une immense joie. Que je dédie ce modeste travail
à mes chers et magnifiques **Parents** pour m'avoir toujours entourée d'affection,
Soutenue, rassurée et aidée, merci pour tant de patience et de force.

A mes grands parents paternels et maternels qui m'ont appris des choses sur la vie .

A mes frères **Mouhamed** et **Haroun**

En leurs souhaitant beaucoup de sucée dans la vie

A ma petite fleur **Aya**

A mes amies

Sara, Houda, Nesrine, Hadjer, Wafa, Sana, Mina.

Table des matières

1-Introduction	1
2- Revue bibliographique	3
2.1- Le lait.....	3
2.1.1- Généralités.....	3
2.1.2- Propriétés physico-chimiques.....	3
2.1.2.1- Le pH	3
2.1.2.2- L'acidité titrable.....	3
2.1.2.3- La densité.....	3
2.1.2.4- Température de congélation.....	3
2.1.2.5- Potentiel d'oxydo-réduction.....	4
2.1.3- Composition chimique du lait.....	4
2.1.4- La microflore du lait	5
2.1.4.1- La microflore indigène ou originelle	5
2.1.4.2- La microflore contaminante	5
2.2- Les bactéries lactiques.....	5
2.2.1- Généralités sur les bactéries lactiques	5
2.2.2- Habitat.....	6
2.2.2.1- Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement.....	6
2.2.2.2- Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte.....	7
2.2.3- Culture des bactéries lactiques.....	7
2.2.4- Propriété métabolique	7
2.2.4.1- Le métabolisme des sucres.....	7
2.2.4.2- Le métabolisme du citrate.....	9
2.2.5- Classification	10
2.2.5.1- Les coques lactiques.....	10
2.2.5.2- Les Lactobacillus.....	11
2.2.5.2.1- Métabolisme des Lactobacillus	11
2.3- Les moisissures.....	12
2.3.1- Définition.....	12

2.3.2- Spores et cycle de vie des moisissures.....	12
2.3.3- Les moisissures alimentaires	13
2.3.3.1.Le genre <i>Aspergillus</i>	13
2.4- Les mycotoxines.....	13
2.4.1- Définition	13
2.4.2- Importance des mycotoxines	14
2.4.3- Les différentes mycotoxines	14
2.4.3.1- Les Aflatoxines	13
2.4.3.2- Structures des aflatoxines.....	15
2.4.4- Facteurs de la contamination mycotoxique par les <i>Aspergillus</i>	15
2.5- La biopréservation	16
2.5.1- Définition.....	16
2.5.2- Technique traditionnelle de la biopréservation.....	16
2.5.3- Rôle des bactéries lactiques en biopréservation.....	17
2.6- Activité antifongique des bactéries lactiques	17
2.6.1- Historique	17
2.6.2 - Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action	18
2.6.3- Les composés antimycotoxinogène des bactéries lactique.....	18
2.6.4- Mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactiques.....	19
3- Matériel et méthodes	20
3.1- Échantillonnage	20
3.1.1- Origine des échantillons du lait	20
3.1.2- Origine des échantillons d'arachide (recherche de mycètes mycotoxinogène).....	20
3.2- Isolement des moisissures.....	20
3.2.1- Isolement des bactéries lactiques	21
3.2.1.1- Dilutions.....	21
3.2.1.2- Ensemencement.....	21
3.2.2- Isolement des moisissures.....	22
3.3- Purification.....	21

3.3.1- Purification des bactéries lactiques.....	21
3.3.2- Purification des moisissures.....	21
3.4- Identification des moisissures.....	22
3.5- Sélection des isolats bactériens à effet antifongique.....	23
3.6- Identification de l'isolat bactérien sélectionné.....	23
3.6.1- Observation macroscopique.....	23
3.6.2- Observation microscopique.....	23
3.6.3- Tests biochimiques.....	24
3.7- Étude de l'effet antimycotoxinogène.....	26
3.7.1- Effet sur la croissance fongique	27
3.7.2- Effet sur la mycotoxinogène.....	27
Résultats	
4- Résultats.....	28
4.1- Isolement et purification des bactéries lactiques.....	28
4.2- Isolement et identification des moisissures.....	30
4.3- Sélection des isolats bactériens à effet antifongique.....	31
4.4- Identification de l'isolat bactérien sélectionné.....	33
4.4.1- Observation macroscopique et microscopique.....	33
4.4.2- Tests biochimiques.....	34
4.5- Étude de l'effet antimycotoxinogène.....	37
4.5.1- Effet antifongique.....	37
4.5.2- Effet antimycotoxinogène.....	38
5- Discussion.....	39
6-Conclusion et perspectives.....	41
7-Résumé.....	42
8-Abstract.....	43
9-المخلص	44
10-Références	45
11- Annexe	

Liste des figures

Figure 1 Aspect microscopique des bactéries lactiques observé au microscope électronique.....	6
Figure 2 La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques	8
Figure 3 Le métabolisme de citrate chez les bactéries lactiques.....	9
Figure 4 Caractères morphologiques des Aspergillus (a) monosérié (b) bisérié.....	13
Figure 5 Structure chimique de quelque aflatoxines.....	15
Figure 6 Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model.....	19
Figure 7 Les échantillons du lait caillé	20
Figure 8 Echantillon de grain d'arachide.....	21
Figure 9 Aspect macroscopique des 6 isolats bactériens sur milieu MRS.....	28
Figure 10 Aspect microscopique des 6 isolats bactériens sur milieu MRS.....	29
Figure 11 Test de catalase.....	34
Figure 12 Test nitrate pour la souche B6.....	35
Figure 13 Test de production d'indole.....	35
Figure 14 Détermination de la voie d'attaque des glucides.....	36
Figure 15 Test KIA de la bactérie B6.....	36
Figure 16- Effet antimycotoxinogène.....	38

Liste des tableaux

Tableau 1 Composition moyenne du lait entier.....	4
Tableau 2 Les différents genres de bactéries lactiques	10
Tableau 3 Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS.....	29
Tableau 4 Aspect microscopique des isolats sur milieu MRS.....	30
Tableau 5 Aspect macroscopique de l'isolat fongique sélectionné.....	30
Tableau 6 Aspect microscopique de l'isolat fongique (M1).....	31
Tableau 7 Effet antimycotoxinogène de bactéries lactiques sélectionnées.....	32
Tableau 8 Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat sélectionné B6.....	33
Tableau 9 Récapitulatif des résultats obtenus pour la <i>bactobacillus sp</i>	37
Tableau 10 Effet antifongique de <i>Lactobacillus sp</i>	38

1- Introduction

La préservation des aliments se base essentiellement sur la prévention ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants. Les méthodes physico-chimiques de préservation provoquent des altérations de qualité nutritionnelle, et organoleptique des aliments, et une diminution de leurs utilités suite au développement des résistances par les microorganismes contaminants pathogènes. Cette résistance est attribuée 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 approche qui est la biopréservation (Gould, 2000).

La recherche des bactéries lactiques, qui ont un rôle dominant dans la production de beaucoup de produits laitiers fermentés, avance avec une vitesse très impressionnante développant une alternative dans le domaine de l'alimentation (Caplice et Fitzgerald, 1999).

En effet, les scientifiques exploitent, actuellement, les interactions microbiennes et les potentialités des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles pour la santé. Des efforts considérables ont été consacrés pour affermir la compréhension de la physiologie, la biochimie, la génétique des bactéries lactiques car, en plus de l'effet protecteur des acides organiques de ces bactéries, la découverte des bactériocine a donné un élan incroyable pour l'assurance d'une qualité sanitaire meilleure des aliments (Collins et *al.*, 1989 ; Axelsson, 2004 ; Djadouni et Kihal, 2012).

Les mycotoxines forment un problème majeur et incontournable pour la santé du consommateur et la recherche de méthodes de prévention et /ou d'élimination des ses substances constitue un objectif à atteindre. Les bactéries lactiques peuvent former le socle de cette recherche vu, ces capacités de résistance et d'attaque.

C'est sur cette logique que décolle le but de ce travail qui vise à mettre mise en évidence de l'activité antimycotoxinogènes et par conséquent l'activité antifongique des bactéries lactiques.

Pour ce faire, plusieurs approches sont développées comme modèle de protocoles expérimentaux en particulier, la recherche de la moisissure susceptible d'élaborer des mycotoxines dans les conditions de stockage. En signalant que ce travail est une nouvelle vision dans le domaine de la mycotoxinologie.

Divers éléments sont abordés en étapes de recherche :

- Isolement et purification des bactéries lactiques et du champignon mycotoxinogène ;
- Identification des ces microorganismes ;
- Préparation des milieux de fermentations liquides pour la production des substances antifongiques et antitoxinogènes des bactéries lactiques ;
- Préparation de milieu PDA à base de filtrat des fermentations de bactéries lactiques pour tester l'effet des bactéries envers le champignon et ces métabolites. .

2- Revue bibliographique

2.1- Le lait

2.1.1- Généralités

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles. Plus jaunâtre s'il s'agit de colostrum, mais dans ce cas il n'est pas apte à la consommation humaine. En effet, le colostrum est le produit sécrété par la mamelle pendant la première semaine post-partum, il est de couleur jaune, possède un goût salé et amer ainsi qu'une odeur marquée, critères qui le distinguent nettement du lait (Alves, 2006 ; Fredot, 2006).

2.1.2- Propriétés physico-chimiques

2.1.2.1- Le pH

Le pH du lait de vache varie habituellement entre 6,5 et 6,7 à 20°C : il est donc légèrement acide (Luquet, 1985 ; Wattiaux, 1997).

2.1.2.2- L'acidité titrable

Exprimée en degrés DORNIC, elle correspond à une quantité d'acide lactique que l'on neutraliserait avec de la soude en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré, de telle sorte qu'1°D équivaldrait à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait (Laure, 2007).

2.1.2.3- La densité

Cette valeur correspond au rapport de la masse d'un volume de lait à une température donnée sur celle du même volume d'eau à la même température. Le lait de vache est généralement compris entre 1,028 et 1,036 (Wattiaux, 1997).

2.1.2.4- Température de congélation

Elle varie entre -0,51 et -0,55°C, selon les conditions zootechniques. Si elle tend vers 0°C, cela peut permettre de détecter une adjonction d'eau, ou mouillage (Luquet, 1985; Wattiaux, 1997).

2.1.2.5- Potentiel d'oxydo-réduction

Il varie de +0,10 à +0,20V (Luquet, 1985).

2.1.3- Composition chimique du lait

Le lait est une source importante de protéines, de lipides, de glucides. Selon Pougheon et Goursaud (2001), les principaux constituants du lait par ordre décroissant sont :

- L'eau, très majoritaire ;
- Les glucides principalement représentés par le lactose ;
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

La composition moyenne du lait entier est représentée dans le (tableau 1).

Tableau 1 Composition moyenne du lait entier (Fredot, 2006)

Composants	Teneurs (g/100g)
Eau	89.5
Dérivés azotés	3.44
Protéines	3.27
Caséine	2.71
Protéines solubles	0.56
Azote non protéique	0.17
Matières grasses	3.5
Lipides neutres	3.4
Lipides complexes	<0.05
Composés liposolubles	<0.05
Glucides	4.8
Lactose	4.7

2.1.4- La microflore du lait

Les microorganismes du lait sont répartis en deux grandes classes :

2.1.4.1- La microflore indigène ou originelle

Ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces microorganismes dépendent de l'alimentation, de la race et d'autres facteurs. Les genres dominants sont principalement des microorganismes mésophiles (*Micrococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus* ou *Lactococcus* et les bactéries à gram négatif) (lamontagne et al., 2002).

2.1.4.2- La microflore contaminante

Ensemble des microorganismes ajoutés au lait de la récolte jusqu' à la consommation, elle peut se composer d'une flore d'altération qui cause des défauts sensoriels ou qui réduit la durée de conservation des produits et d'une flore pathogène :

- **La microflore d'altération** : responsable de diverses dégradations du produit au niveau du goût, de l'arome, de l'apparence ou de la texture. Les principaux microorganismes d'altération sont : *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, Coliformes, principalement *E. coli*, *Enterobacter*, les sporulés tels que les *Bacillus sp.*, *Clostridium* et certaines levures et moisissures (lamontagne et al., 2002).
- **La microflore pathogènes** : sa présence dans le lait est due à l'animale, à l'environnement ou à l'Homme. Ces bactéries sont infectieuses ou toxigènes responsables des affections liées a la santé des manipulateurs et des consommateurs (Lamontagne et al., 2002).

2.2- Les bactéries lactiques

2.2.1- Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de *cocci* et de *bacilli* (figure 1). Ce sont des bactéries à Gram positif et généralement sont immobiles (Pringsulaka et al., 2011). Ces bactéries ont la capacité de fermenter certains sucres comme le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose et le lactose en acide lactique (Kandler et Weiss, 1986). Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Aguirre et Collins, 1993 ; Adams et Marteau,

1995). Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

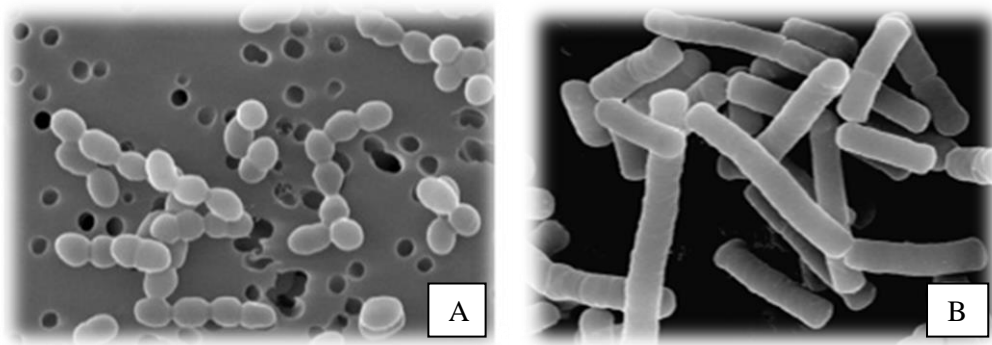


Figure 1 Aspect microscopique des bactéries lactiques observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) : (A), *Lactobacillus Rosell-11*; (B), *Leuconostoc lactis* (http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).

2.2.2- Habitat

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

2.2.2.1- Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, etc.). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (starter culture) par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, etc.). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Gálvez et *al.*, 2011). Les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (*Li. monocytogenes*). Cette espèce bactérienne pathogène présente

dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'Homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (Gálvez et al., 2011).

2.2.2.2- Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale (Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et al., 2009) et/ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Pirota et al., 2004 ; Falagas et al., 2006).

2.2.3- Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hammes et Hertel, 2006). Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) (Annexe1). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.

2.2.4- Propriété métabolique

2.2.4.1- Le métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide Lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces. Elles s'utilisent la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD⁺ à partir du NADH formé auparavant. Dans cette dernière étape les bactéries font intervenir une lactate-déhydrogénase. Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose-6-phosphate, de la

Glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose (figure 2) (Desmazeud, 1996).

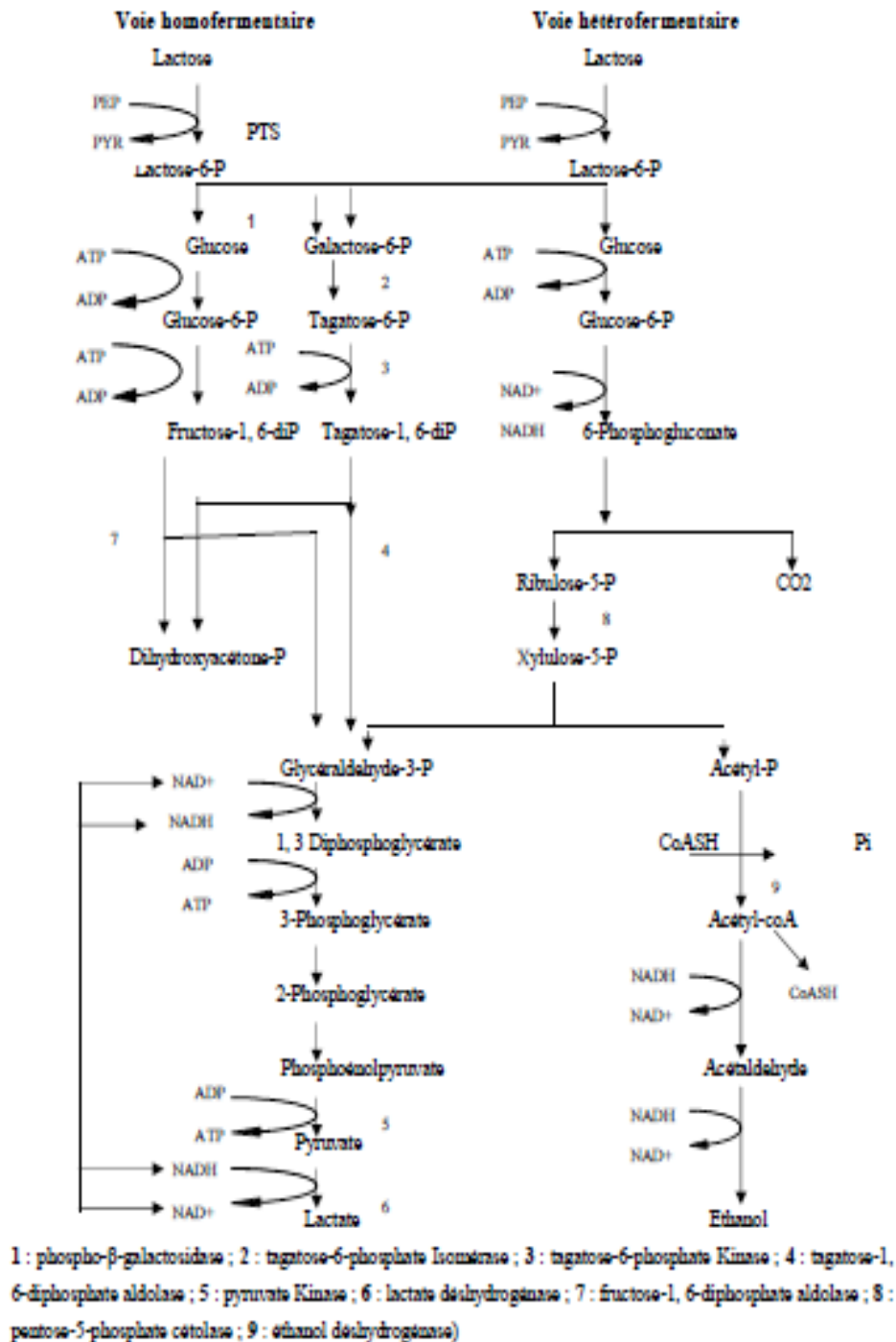


Figure 2 La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie Homofermentaire et voie Hétérofermentaire (Leveau et Bouix, 1993).

2.2.5- Classification

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994; Holzapfel *et al.*, 2001). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers., 2002). Ces études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces en coques lactiques et en bacilles (Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer, 1986 ; Farrow *et al.*, 1989) (tableau 2).

Tableau 2 Les différents genres de bactéries lactiques

Genres	Cellules		Fermentation	ADN G-C (%)	Références
	Forme	Arrangements			
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaînes	Homolactiques	34 - 46	SCHLEIFER, 1986
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaînes	Hétérolactiques	36 - 43	FARROW <i>et al.</i> , 1989
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34 - 42	SCHLEIFER, 1986
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaînes	Homolactiques et Hétérolactiques	32 – 53	KANDLER et WEISS, 1986a et b

2.2.5.1- Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

2.2.5.2- Les *Lactobacillus*

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries Lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Axelsson, 1993). Orla-jensen (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium*.

2.2.5.2.1- Métabolisme des *Lactobacillus*

- **Les Lactobacilles homofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégrade les hexoses en acide lactique.
- **Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂. Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate.
- **Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** regroupent les espèces de l'ancien sous Genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Weiss, 1986).

L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes (Schleifer et Ludwig, 1995). Selon Atlan (2000), ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par Orla-Jensen (1919).

- Le groupe *delbrueckii* comprend les espèces : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helvetis*, *Lb. crispatus*, d'autres lactobacilles homofermentaire et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lb. acetotolerans* et *Lb. hamsteri*).
- Le groupe *casei-Pediococcus* est le groupe le plus large car il regroupe de très nombreux *lactobacillus* homofermentaires stricts (*Lb. avarius*, *Lb. salivarius*), hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*) et des hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. parakefir*). Ce groupe contient aussi la plupart des souches de *Pediococcus* (*Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*).
- Le groupe *Leuconostoc* comprend les Lactobacilles heterofermentaires stricts et les espèces du genre *Leuconostoc* (*Ln. amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) ainsi que le genre *Weissella* dans lequel sont regroupés plusieurs Lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. confusus*, *Lb. viridescence*, *Lb. halotolerans*) et *Ln. paramesenteroides*. La taxonomie moléculaire a différencié *Leuconostoc oenos* en un nouveau genre bactérien : *Oenococcus oeni* (Atlan, 2000).

2.3- Les moisissures

2.3.1- Définition

Les moisissures sont des micro-organismes eucaryotes, sporogènes, non chlorophylliens, formant une structure mycélienne et des thalles constitués par de nombreux filaments ramifiés (Cooney et Emerson 1965; Bocquet 1993; Hassouni, 2007). Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes (Botton et al., 1990). Il existe différents groupes de champignons filamenteux : les zygomycètes les ascomycètes et les deutéromycètes. Leur différenciation se fait alors à l'aide de leurs formations conidiennes. On va pouvoir trouver dans ce groupe de nombreux contaminants des matières premières alimentaires telles que les céréales, le café ou les fruits (Samson et al., 1996).

2.3.2- Spores et cycle de vie des moisissures

Les conidiospores, appelées également spores, sont les formes de reproduction asexuée des champignons filamenteux. Elles vont germer et émettre un filament qui va croître et se ramifier lorsque les conditions environnementales sont favorables et qu'il y aura une source

d'alimentation disponible. Elles forment alors un nouveau mycélium, puis des conidiophores dans le cas d'un deutéromycète (D'Enfer, 1997).

2.3.3- Les moisissures alimentaires

Les moisissures présentes sur les aliments se classent en deux groupes: Les moisissures bénéfiques impliquées dans la fermentation et la production d'antibiotiques (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*), et les moisissures nuisibles responsables d'altération des denrées (*Alternaria solani* sur la tomate, *Fusarium* sur le maïs, *Aspergillus flavus* sur l'arachide), d'allergies et produisant des mycotoxines.

2.3.3.1- Le genre *Aspergillus*

Il comprend quatre groupes ou sections qui sont: la section *Circumdati* représenté par *Aspergillus ochraceus*, la section *Fumigati* représenté par *Aspergillus fumigatus*, la section *Flavi* représenté par *Aspergillus flavus* et la section *Nigri* représentée par *Aspergillus niger* (Samson et al., 2006). La figure 4 montre les caractères morphologiques des *Aspergillus*

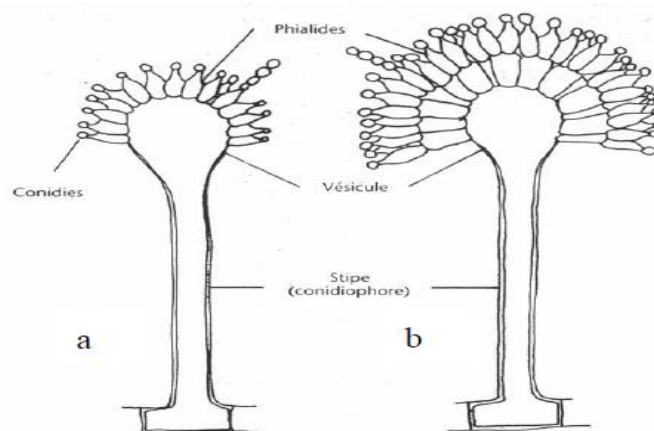


Figure 4 Caractères morphologiques des *Aspergillus* (a) monosérié (b) bisérié (Olga, 2011).

2.4- Les mycotoxines

2.4.1- Définition

Le terme mycotoxine vient du grec «*mycos*» qui signifie champignon et du latin «*toxicum*» qui signifie poison. Il désigne les substances chimiques issues du métabolisme secondaire des

champignons filamenteux ou moisissures et qui causent une mycotoxicose lorsqu'ils sont ingérés par l'homme ou l'animal (Bhatnagar et *al.*, 2004). Ces molécules toxiques, produites naturellement ne sont pas nécessaires au développement du champignon, mais pourraient constituer un système de défense contre les autres microorganismes présents dans l'environnement de la moisissure. Les principaux genres de moisissures mycotoxinogènes sont: *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium*, *Fusarium* (Le Bars, 1998).

La présence des mycotoxines dans les aliments dépend de plusieurs facteurs comme : l'espèce fongique, les conditions climatiques, les techniques de culture et de stockage des produits agricoles (Castegnaro et Pofhl-Leszkowicz, 2002).

2.4.2- Importance des mycotoxines

Les mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicité aiguë et chronique allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil pulmonaire, ainsi que sur le système digestif et rénal (Pitt, 2000). Elles peuvent avoir également des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppressives. Certaines mycotoxines ont le pouvoir d'affaiblir les réactions immunitaires, et ainsi de réduire la résistance aux infections, ce qui est aujourd'hui considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (Yiannikouris et Jouany, 2002).

2.4.3- Les différentes mycotoxines

Il existe de nombreuses mycotoxines produites par différentes moisissures contaminant les matières premières en général. Les mycotoxines couramment retrouvées dans les aliments sont: les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichotécènes, la zéaralénone, la citrinine et la patuline (Castegnaro et Pofhl-Leszkowicz, 2002).

Pour le cas des grains d'arachide on rencontre essentiellement les aflatoxines. Nous développerons uniquement ce type de mycotoxine.

2.4.3.1- Les Aflatoxines

Les Aflatoxines sont produites essentiellement par *Aspergillus flavus*, et apparaissent sur de nombreux produits crus tels que les céréales, les épices, les figues et les olives (Roussos et *al.*, 2006). Parmi la vingtaine d'aflatoxines recensées, quatre seulement se retrouvent dans les Aliments (Aflatoxines B1, B2, G1, G2) dont B1 (AFB1) est la mycotoxine la plus étudiée.

Les aflatoxines M1 et M2, dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces toxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait "Milk" des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Jaquet *et al.*, 1982). L'aflatoxine M1 peut contaminer le lait maternel humain (El-nezami *et al.*, 1995; Galvano *et al.*, 1996). Les Aflatoxines sont à l'origine de nombreuses pathologies dont le cancer du foie, l'hépatite chronique, la jaunisse et la cirrhose. Il existe aujourd'hui dans la plupart des pays des contrôles réguliers et systématiques de la teneur en aflatoxines des principaux produits primaires (céréales, fruits secs...). Le lait et la viande sont également très contrôlés. (Le Bars, 2000).

2.4.3.2- Structures des aflatoxines

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique (figure 5). L'AFB1 est un composé thermorésistant stable même à des températures de 250 °C pendant 30 minutes à l'état cristallisé. L'aflatoxine en présence des rayons UV émet une fluorescence bleue (AFB1 et AFB2) ou verte (AFG1 et AFG2). Par contre l'AFM1 émet une fluorescence bleue violette (Abdellah, 2004).

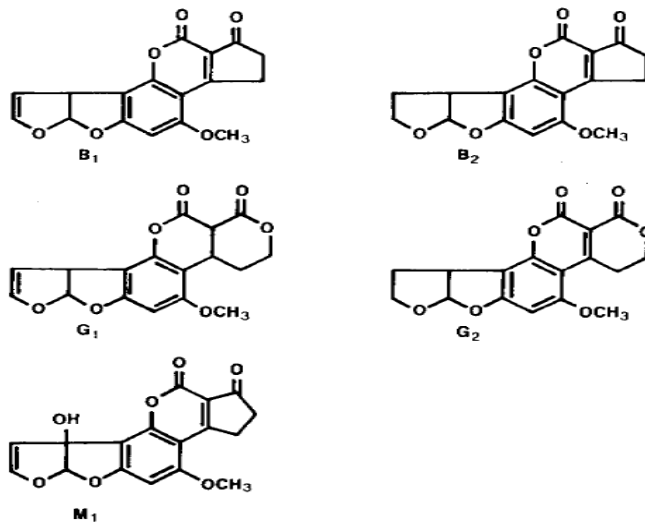


Figure 5 Structure chimique de quelques aflatoxines (Abdellah, 2004).

2.4.4- Facteurs de la contamination mycotoxique par les *Aspergillus*

La production des mycotoxines est consécutive ou couplée à la croissance fongique dans certaines limites de variations de certains paramètres qui sont l'activité en eau (A_w), la température, le pH, la pression d'oxygène, la teneur en eau de l'aliment, la nutrition, etc.

(Steyn, 1998). En terme de A_w , on peut considérer que les seuils nécessaires à la croissance des champignons filamenteux se situent à environ 0,95 et 0,68 respectivement pour les organismes hydrophiles et xérophiles (Le Bars, 2000). *Aspergillus ochraceus* est un microorganisme dont la croissance optimale, en culture de laboratoire, nécessite des niveaux de A_w légèrement inférieures à l'eau pure qui correspondent à des solutions contenant environ 20% de sucre. La production de mycotoxines est liée à la croissance, mais les limites pour exprimer ce phénotype biochimique sont plus étroites que celles concernant la croissance elle-même. Des études de laboratoire ont montré que les valeurs limites d' A_w , pour que *A.ochraceus* produise de l'OTA, se situent entre 0,82 et 0,80, la valeur limite pour la croissance étant d'environ 0,78 (Le Bars, 1998).

Pour *Aspergillus carbonarius*, la valeur minimum d' A_w pour la production d'OTA est d'environ 0,92, alors que la croissance du mycélium persiste jusqu'à une A_w de 0,85. Des études sur l'effet d' A_w n'ont pas été réalisées pour *Aspergillus niger*, étant donné la rareté d'isolats productifs et de leur capacité généralement faible à produire de l'OTA (Le Bars *et al.*, 1998).

En ce qui concerne l'effet de la température sur la production de l'OTA, la plupart des *Aspergillus* mésophiles (*A. carbonarius* et *A. ochraceus*) produisent l'OTA à 25°C. (Le Bars et Le Bars, 1998).

2.5- La biopréservation

2.5.1- Définition

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

2.5.2- Technique traditionnelle de la biopréservation

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

Certains antibiotiques comme la natamycine sont très efficaces contre les moisissures et les levures. Ils sont utilisés comme conservateur à la surface des fromages (Davidson, 2001). Récemment la réglementation de l'Union Européenne 95/2/CE a réduit les concentrations des conservateurs chimiques dans les produits de boulangerie (Union Européenne, 2005) dans un souci de préserver la santé du consommateur. Dans cette optique la biopréservation a acquis un intérêt croissant dans l'industrie agro-alimentaire grâce à l'introduction de substances naturelles d'origines animales (lyzosome, lactoferrin, magainins, etc.), végétales (phytoalexines, herbes et épices) et microbiennes (antibiotiques, bacteriocins, peroxyde d'hydrogène, acides organiques) (Gould, 1996).

2.5.3- Rôle des bactéries lactiques en biopréservation

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

2.6- Activité antifongique des bactéries lactiques

2.6.1- Historique

Les moisissures constituent une flore d'altération naturellement présentes sur les aliments tels que les produits laitiers, le fromage, le pain, les produits agricoles en stockage et les ensilages (Bullerman 1977; Moon, 1983 ; Bonestroo et al., 1993 ; Filtenborg et al., 1996). Les genres les plus courants sont *Penicillium* et *Aspergillus* sur le café, le cacao, l'arachide, les fruits secs, les fruits frais, et les légumes et *Fusarium* sur les céréales (Filtenborg et al., 1996 ; Jefca, 2001).

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

2.6.2 - Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action

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

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

2.6.3- Les composés antimycotoxigène des bactéries lactique

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

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

2.6.4- Mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactiques

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

2.6.4.1- Mode d'action des bactériocines

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

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

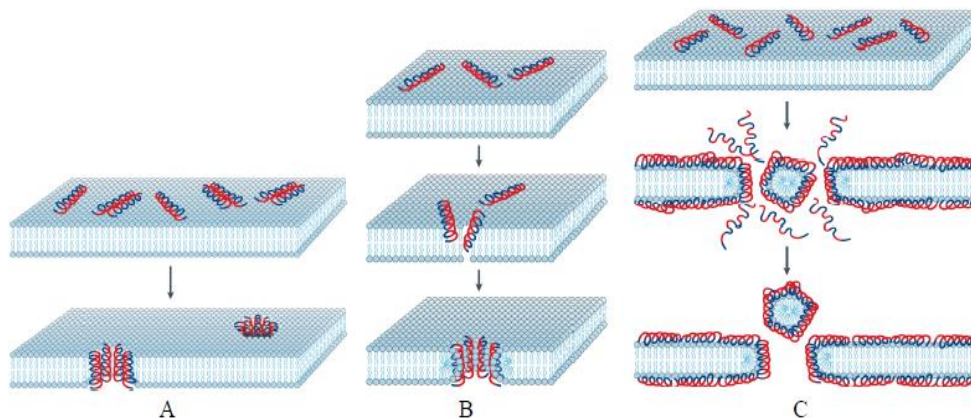


Figure 6 Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model

A: Barelle-stave ; B: Toroidal ; C : Wormhole (Brogden,2005).

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur la mise en évidence des bactéries lactiques isolées à partir des laits caillés de vache et sur leur activité antifongique et antimycotoxinogène.

La partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri, Constantine.

Le travail s'intéresse à deux volets axiaux en l'occurrence la recherche de bactéries susceptibles de développer une activité antifongique et antimycotoxinogène d'une part et la recherche de mycètes secrétant de mycotoxines d'autre part.

3.1- Échantillonnage

3.1.1- Origine des échantillons du lait

Les échantillons du lait caillé de vache proviennent des fermes d'élevage, se situant dans la région d'**Ibn ziad** et **Guetar el Aich** dans la wilaya de Constantine. Les prélèvements sont réalisés dans des conditions aseptiques, et les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles de 250 mL (figure 7).



Figure 7 Les échantillons du lait caillé

3.1.2- Origine des échantillons d'arachide (recherche de mycètes mycotoxinogène)

L'échantillon de grain d'arachide est récupéré du marché de la région de Constantine (figure 8). Les prélèvements sont effectués dans des conditions d'asepsie en utilisant des sacs en papier stériles.



Figure 8 Échantillon de grains d'arachide

3.2- Isolement de microorganismes

3.2.1- Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries nécessitent l'emploi de milieux sélectifs (Guiraud, 1998). Le milieu de cultures le plus utilisé pour l'isolement des bactéries lactiques est le milieu gélosé MRS à pH= 6,8 (Annexe 1).

3.2.1.1- Dilutions

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du lait en mettant 1ml du lait dans 9 mL d'eau physiologique stérile, suivie d'une agitation pendant 3 min en suite, la préparation est laissée se décanter. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-6} (Jerome *et al.*, 2004).

3.2.1.2- Ensemencement

En surface

Un volume de 0.1 mL de chacune des dilutions indiquées est déposée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé MRS, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 heures, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches bactériennes (Tortora *et al.*, 2003).

□ **En masse**

Un volume de 1 mL de chacune des dilutions précédentes est déposée sur des boîtes de Pétri vides ensuite le milieu MRS est ajouté, l'homogénéisation est effectuée par un mouvement rotatif. Cette méthode est la plus utilisée pour la croissance de la microflore lactique totale (De Man *et al.*, 1960).

3.2.2- Isolement des moisissures

Les grains d'arachide sont désinfectés en surface dans une solution chlorée (0,4) pendant une minute suivi de deux rinçage dans l'eau distillée stérile ensuite les grains sont séchés avec du papier filtre stérile. Des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA (Annexe 2) sontensemencées par 3 grains et ce, à l'aide d'une pince stérile puis l'incubation est réalisée à 28°C pendant 3 jours (Pacin *et al.*, 2002 ; Ghiasian *et al.*, 2004).

3.3- Purification

3.3.1- Purification des bactéries lactiques

Après développement des colonies, les bactéries isolées sont repiquées dans le même milieu de culture MRS. La purification est effectuée par la méthode des stries qui consiste à tracer des stries avec l'anse contenant la bactérie sur la surface d'une gélose neuve dans des boîtes de Pétri. La colonie parfaitement isolée, est ensuite, prélevée et transférée, toujours au moyen d'une anse de platine sur le même milieu mais dans de nouvelles boîtes de Pétri. L'incubation de toutes les boîtes est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (Prescott *et al.*, 2007).

3.3.2- Purification des moisissures

La purification des moisissures est effectuée par piqûre centrale à partir des boîtes d'isolement, cette purification est réalisée sur milieu PDA, l'incubation des boîtes est faite à 28°C pendant 3 jours (Guiraud, 2003).

3.4- Identification des moisissures

Dans le but d'identifier les différentes moisissures, plusieurs caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) ont été pris en compte en utilisant des clés

d'identification. L'observation macroscopique des isolats fongiques est effectuée après ensemencement sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, et après une incubation à 28°C pendant 3 jours, l'aspect cultural des colonies est observé et le diamètre est mesuré chaque 24h d'incubation (Botton et *al.*, 1990; Samson, 2007). L'observation microscopique est effectuée par la technique de Scotch, Cette technique consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénool (Chabasse et *al.*, 2002).

3.5- Sélection des isolats bactériens à effet antifongique

Afin de mettre en évidence l'activité anti mycotoxinogène, une fermentation est réalisée dans des fioles de 250 mL contenant 100 mL du bouillon nutritif (Annexe 3). Les fioles sont ensuite, inoculées avec 9 mL de la suspension bactérienne (10^7 cellules/mL) de chaque isolat sélectionné (B1, B2, B3, B4, B5, B6). Les fioles sont incubées à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24h. Après la durée d'incubation, la culture est filtrée et le filtrat a servi comme source de substances actives de bactéries.

3.6- Identification de l'isolat bactérien sélectionné

L'identification de l'isolat bactérien sélectionné a été effectuée par observation macroscopique, microscopique et des tests biochimiques:

3.6.1- Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu de la taille (petite, moyenne, grande), la forme de la colonie (ronde, irrégulière, etc.), transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (Camille, 2007).

3.6.2- Observation microscopique

➤ Observation à l'état frais

Cette technique permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie. Il est souvent possible de visualiser si, les cellules sont mobiles ou non. La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, apporter un prélèvement bactérien de la colonie à identifier et la dissocier dans la goutte d'eau physiologique, ensuite recouvrir la lame par une

lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) (Singleton, 2005).

➤ ***Coloration de Gram***

Cette technique est l'une des méthodes de coloration la plus utile, elle permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Tortora *et al.*, 2003).

Cet examen a été effectué selon la méthode classique suivante : les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propre. Les lames sont ensuite, séchées à l'air à proximité d'un bec Bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux à trois fois sur la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 1 minute au cristal violet, qui est un colorant basique, ils sont ensuite, rincés rapidement par une solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) qui agit comme un mordant, c'est-à-dire, il augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrastée. Sans rincer en inclinant les lames à 45°C, les frottis sont ensuite décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone (1 à 3 secondes). Juste après, la décoloration est arrêtée rapidement par lavage à l'eau du robinet.

Dans la dernière étape, les frottis sont soumis à une contre-coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée. Après un bref rinçage, les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement X100) (Camille, 2007; Madigan et Martinko, 2007).

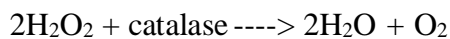
La couleur violette due au cristal violet est l'aspect caractéristique des bactéries à coloration Gram positive, les bactéries Gram négative se colorent en rose par la fushine (Tortora *et al.*, 2003).

3.6.3- Tests biochimiques

➤ ***Test catalase***

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste, essentiellement, à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène, la

présence de catalase se manifeste par la formation de bulles (oxygène). Dans la version traditionnelle du test, un prélèvement bactérien est transféré au moyen d'une boucle dans une goutte de peroxyde d'hydrogène est déposé sur une lame. Avec cette technique, si le test est positif, les bulles en éclatant donnent naissance à un aérosol. Pour éviter la contamination de l'environnement par des aérosols, une autre méthode est utilisée : en plaçant une petite quantité de culture bactérienne dans une boîte de Pétri sans ergot, vide et propre, ensuite, deux gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées à proximité de l'échantillon bactérien, la boîte de Pétri bien fermée et est inclinée de manière à ce que le peroxyde d'hydrogène et l'échantillon puissent réagir ensemble. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Singleton, 2005). Une troisième technique a été appliquée et qui consiste à prélever 1ml d'une solution d'eau oxygénée 3 % (Prescott *et al.*, 2007) et à le déposer dans un petit tube contenant une solution d'eau physiologique stérile et une colonie de la souche à tester (Guiraud, 1998). Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Singleton, 2005).



➤ **Test de réduction du nitrate**

Ce test sert à déterminer si les bactéries possèdent l'enzyme nitrate réductase servant à réduire le nitrate en nitrite (Camille, 2007). La technique consiste à cultiver les souches bactériennes à tester pendant un ou plusieurs jours dans des tubes contenant du bouillon nitraté (Annexe 4), et les incubés à 28°C. Le milieu est alors examiné pour savoir s'il y a réduction du nitrate. Pour détecter le nitrite, 0,5 mL du réactif « A » (Annexe 5) et 0,5 mL du réactif « B » (réactifs de nitrite) (Annexe 6) sont ajoutés à la culture. Ces réactifs se combinent à tout nitrite présent pour former un colorant rouge azoïque soluble. L'absence de coloration rouge peut signifier, soit que le nitrate n'a pas été réduit, soit que le nitrite s'est formé mais a été ensuite réduit, par exemple, en azote et ammoniac. Pour distinguer entre ces deux possibilités, on teste le milieu pour la présence de nitrate en ajoutant une trace de poudre de zinc qui réduit le nitrate en nitrite. Si il y a du nitrate (n'a pas été réduit par l'organisme testé), l'addition de zinc fera apparaître une coloration rouge parce que le nitrite nouvellement formé se combinera avec les réactifs du milieu (Singleton, 2005).

➤ **Test indole**

Le test d'indole permet de savoir si un organisme peut produire d'indole à partir de tryptophane, il consiste à faire croître l'organisme étudié dans l'eau peptonée pendant 48 h à

27C° ensuite de l'incubation, 3 gouttes du réactif de Kovac sont ajoutées et la réaction est lue immédiatement après agitation, la présence d'un anneau rouge en surface indique la formation d'indole, et si l'anneau est brunâtre (couleur du réactif), la réaction d'indole est considérée négative (Singleton, 2005).

➤ **Détermination de la voie d'attaque des glucides**

Ce test permet de connaître également la voie d'attaque des sucres par les bactéries, soit par voie oxydative ou par voie fermentative (Guiraud, 1998).

La technique consiste à ensemencer deux tubes contenant le milieu MEVAG (Annexe 7), l'un recouvert d'une couche de paraffine et ce, par piqure central avec un fil de platine chargé de semence prélevée d'une culture de 18 à 24 heures. Après incubation, trois catégories de bactéries sont distinguées: les bactéries fermentatives, qui donnent une acidification rapide et égale dans les deux milieux qui deviennent jaunes en 24h sur toute la hauteur de la piqure d'inoculation. Dans le cas où il y a production de gaz, celui-ci est visible sous la couche d'huile. Les bactéries oxydatives, qui révèlent dans le tube fermé peu ou pas de culture et pas d'acidification (après plusieurs jours, même en l'absence de culture visible, la couleur du milieu peut virer vers des couleurs orangées si l'huile utilisée est acide, quant au tube ouvert il y a acidification modérée et assez lente, débutant à la surface, en 24-48 heures ou parfois d'avantage, jamais de gaz. Enfin, pour les bactéries inactives, il y a peu ou pas de culture dans le tube fermé, quand au tube ouvert, il y a culture sans modification du pH (pas d'acidification) ou avec une alcalinisation plus ou moins forte en surface (virage au rouge violet) (Singleton, 2005).

➤ **Test d'utilisation des sucres (Glucose et Lactose) sur milieu K.I.A**

Ce test permet de savoir si les bactéries ont le pouvoir d'utiliser le Glucose et le Lactose. La gélose Kligler Iron Agar (K.I.A) (Annexe 8) est une gélose en tube additionnée de fer et ayant séchée en pente. A l'aide d'une anse de platine, toucher légèrement la colonie à identifier et ensemencer le fond du tube (culot) en piquant verticalement la gélose puis, ensemencer la pente par des stries en zigzag. Incuber pendant 24h à 72h (Guiraud, 1998).

3.7- Étude de l'effet antimycotoxigène

Cette étude repose sur le test de production de substances antifongiques par les bactéries lactiques sélectionnées sur milieu submergé. Cette technique permet à la fois de voir l'effet

des bactéries, et sur le développement de la moisissure et sur sa capacité à produire de mycotoxines.

3.7.1- Effet sur la croissance fongique

Le filtrat supposé contenir les différents métabolites des isolats bactériens obtenus. Un volume de 50mL de chaque filtrat a servi pour la préparation du milieu PDA, une fois préparé le milieu est ensuite stérilisé à 121°C pendant 20 min.

Le milieu est coulé en boîtes et ensemencé par pique centrale par le champignon sélectionné. Avec la même technique, le champignon est cultivé sur milieu PDA ordinaire (sans le filtrat) pour comparaison. L'incubation est effectuée à 28°C pendant 3 jours.

3.7.2- Effet sur la mycotoxinogène

A partir des colonies fongiques obtenues dans le test précédent des disques contenant la colonie sont prélevés et ensuite, ensemencés sur une gélose contenant des bactéries test en l'occurrence ; *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas syringae*. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures. Le développement de l'activité est détecté par la présence d'une zone claire autour des disques.

4- Résultats

Le présent travail porte sur la mise en évidence des bactéries lactiques isolées à partir des laits caillés de vache et sur leur activité antifongique et antimycotoxinogène.

4.1- Isolement et purification des bactéries lactiques

18 isolats bactériens ont été obtenus à partir du lait caillé de vache. Après la purification, seulement 6 isolats bactériens (B1, B2, B3, B4, B5, B6) ont fait l'objet de complément d'étude. Le développement des isolats sur milieu MRS, a abouti à des colonies de diverses formes et de tailles (grandes, moyennes, petites), de reliefs variés (planes, élevées) et de couleurs multiples (blanches,) (figure 9) et (tableau 3).

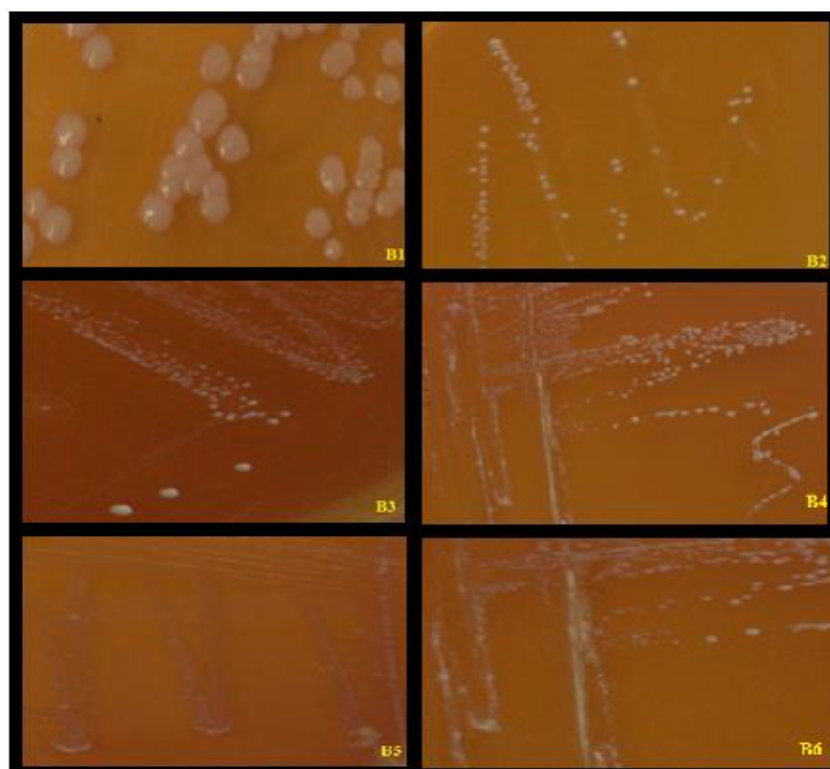


Figure 9 Aspect macroscopique des 6 isolats bactériens sur milieu MRS

Tableau 3 Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS

Les isolats bactériens	Taille	Forme	Relief	Couleur
B1	Grande	Ronde	Elevé	Blanche brillante
B2	Petite	Ronde	Elevé	Blanche
B3	Moyenne	Ronde	Elevé	Blanche
B4	Petite	Ronde	Elevé	Blanche
B5	Très petite	Ronde	Plane	Blanche à beige
B6	Moyenne	Ronde	Plane	blanche

L'aspect microscopique de l'ensemble des isolats obtenus ainsi que la coloration de Gram est présentée dans la figure (10) et le tableau (4).

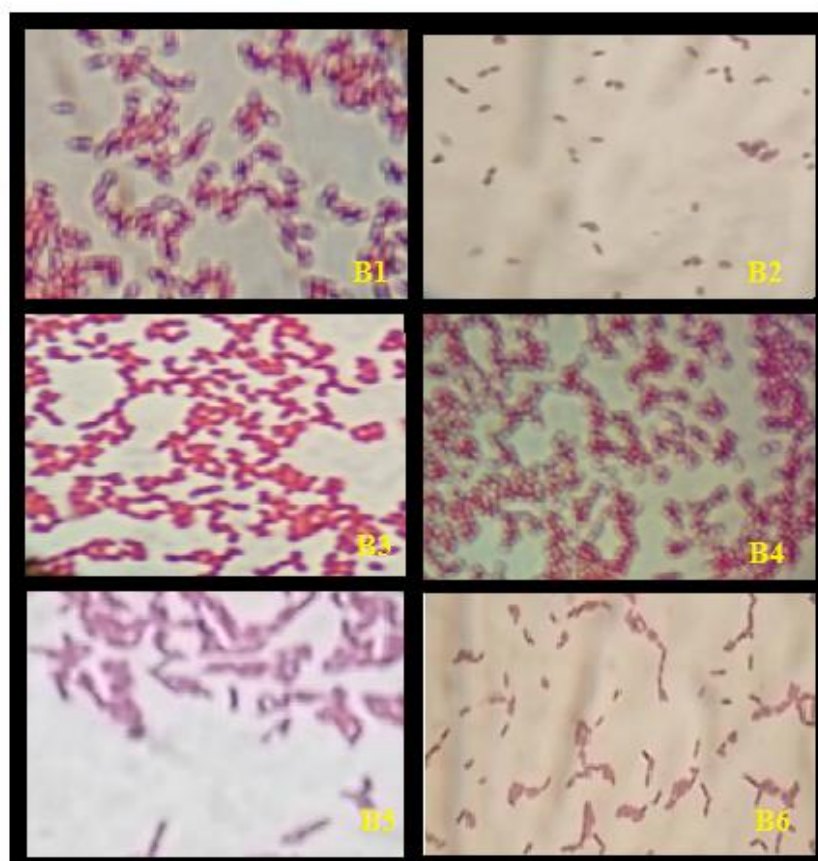


Figure 10 Aspect microscopique des 6 isolats bactériens sur milieu MRS

Tableau 4 Aspect microscopique des isolats sur milieu MRS

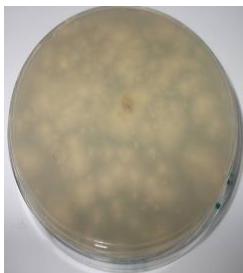
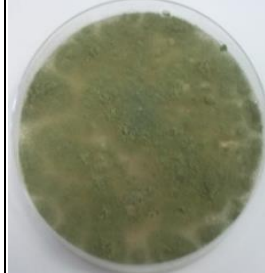
Les isolats bactériens	Aspect cellulaire	Mobilité
B1	cocci	immobile
B2	cocci	immobile
B3	cocci	immobile
B4	cocci	immobile
B5	bacille	immobile
B6	bacille	immobile

4.2- Isolement et identification des moisissures

L'isolement des moisissures sur milieu PDA a permis l'obtention de 2 isolats fongiques (M1 et M2) dont, un seul isolat est purifié pour le complément travail.

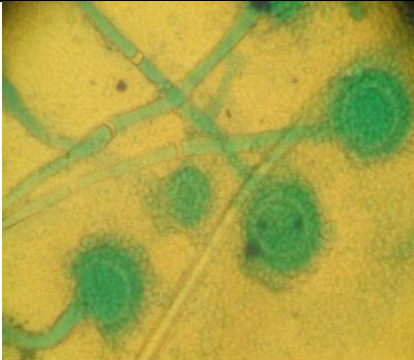
Les caractères macroscopiques de l'isolat sélectionné sont étudiés sur le milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau 5 montre l'aspect macroscopique de la colonie, de la surface, de la couleur et de la vitesse de croissance de la souche en question.

Tableau 5 Aspect macroscopique de l'isolat fongique sélectionné

code de l'isolat	Relief	Couleur	Vitesse de croissance	Texture	Revers	Face
M1	Plane	Verte	Rapide (72h)	Poudreux		

L'étude microscopique a porté sur l'observation des structures caractéristiques de l'isolat fongique sélectionné (ref). Le tableau 7 montre les caractères microscopiques de l'isolat fongique (M1).

Tableau 6 Aspect microscopique de l'isolat fongique (M1)

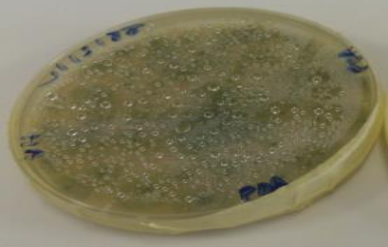
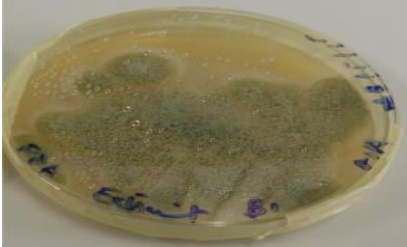
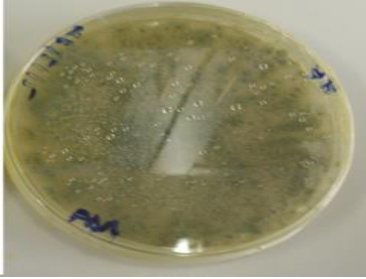
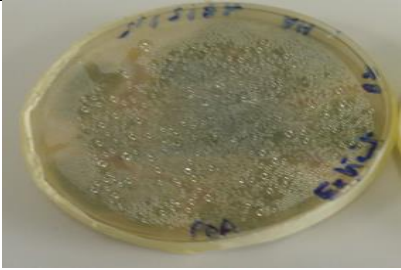
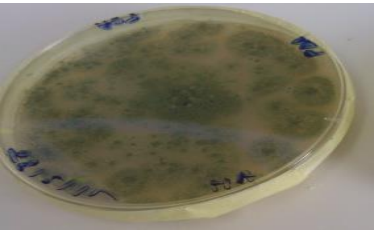
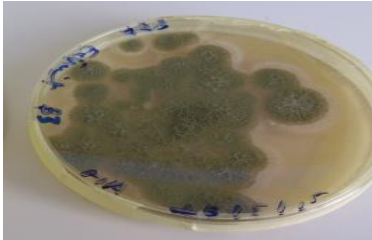
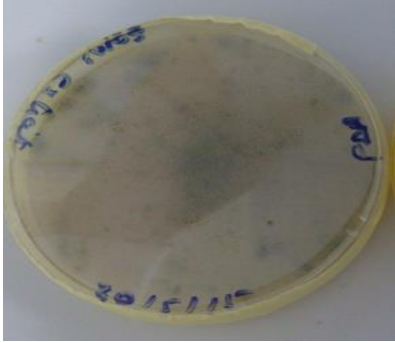
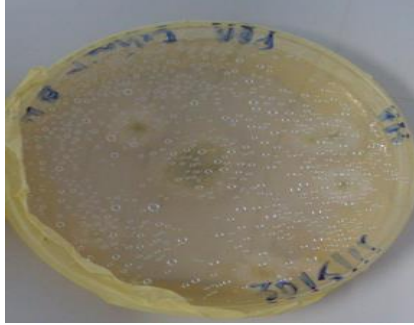
Code de l'isolat	Caractères microscopique	Genre	Aspect microscopique observé
M1	<ul style="list-style-type: none"> • Mycélium cloisonné. • Conidies : Pluricellulaires et rondes. • Présence d'une tête aspergillaire. 	<p><i>Aspergillus</i> <i>flavus</i></p>	





D'après les caractères macroscopiques et microscopiques observés, l'isolat M1, peut appartenir au genre *Aspergillus*. La couleur et la texture de cette moisissure nous ont orientés vers l'espèce *A. flavus*.

4.3- Sélection des isolats bactériens à effet antifongique

La production de substances actives par les bactéries lactiques obtenues révèle que ces bactéries sont capables d'inhiber la croissance de la moisissure *Aspergillus flavus* (tableau 7).

Tableau 7 Effet antimycotoxinogène de bactéries lactiques sélectionnées

Bactéries	Milieu de culture PDA		Diamètre de colonie
	Sans filtrat	Avec filtrat	
B1			7,4cm
B2			6,5cm
B3			7cm
B4			2cm

B5			2,5cm
B6			1,5cm



Par leur forte capacité à inhiber le développement de la souche fongique susceptible de produire de mycotoxine (tableau 7), l'isolat B6 a été sélectionné pour la suite du travail.

4.4- Identification de l'isolat bactérien sélectionné

4.4.1- Observation macroscopique et microscopique

L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat sélectionné B6 est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8 Aspect macroscopique et microscopique de l'isolat sélectionné B6

Isolat	Observation macroscopique	Observation microscopique
B6	 <p>Taille : moyenne Forme : ronde Relief : élevé Couleur : blanche</p>	 <p>Forme : bâtonnets Gram : -</p>

4.4.2- Tests biochimiques

➤ Le test de catalase

Ce test a montré que la souche B6 ne présente aucune formation des bulles après le dépôt de l'eau oxygénée (H_2O_2), signifiant qu'elle est catalase négatif, prétendant qu'elle ne possède pas l'enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 11).



Figure 11 Test de catalase

➤ Test de réduction du nitrate

Le test de nitrate réductase révèle que la souche B6 possède une nitrate réductase car après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess, une couleur rouge orange apparaît, ce qui signifie la présence d'ions nitrites combinés aux réactifs (figure 12).



Figure 12 Test nitrate pour la souche B6

➤ ***Test indole***

Le test de production d'indole a révélé un résultat négatif après l'ajout du réactif de Kovac, montrant que la bactérie B6 ne produit pas de l'indole à partir du tryptophane (figure 13).



Figure 13 Test de production d'indole

➤ **Détermination de la voie d'attaque des glucides**

Le test de la détermination de la voie d'attaque des glucides a révélé que la bactérie B6 possède un métabolisme fermentaire traduit par une acidification rapide et un changement du couleur vers le jaune avec production de gaz sous la couche de l'huile (figure14).

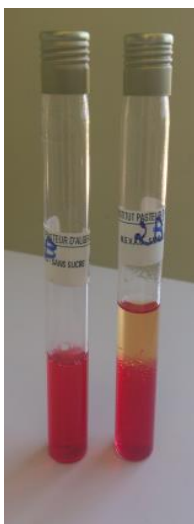


Figure 14 Détermination de la voie d'attaque des glucides

➤ **Test d'utilisation des sucres (Glucose et Lactose) sur milieu K.I.A**

La culture de la souche bactérienne sur milieu K.I.A a donné un résultat positif (modification de la couleur en jaune orange tout au long de la gélose) ce qui signifie l'utilisation du Glucose et du Lactose (figure 15).



Figure 15 Test KIA de la bactérie B6

L'identification du genre de la souche bactérienne (B6), est basée d'abord sur la détermination du genre selon les clefs proposée par Guiraud (1998). L'analyse des résultats macroscopiques, microscopiques ainsi que les tests biochimiques récapitulés dans le tableau 9 de la bactérie B6 laissent présumer que l'isolat bactérien sélectionné appartient au Genre : *Lactobacillus sp.*

Tableau 9 Récapitulatif des résultats obtenus pour la *bactobacillus sp.*

Caractères	Résultats de la bactérie
Forme de la cellule	Bacille
Mobilité	Immobile
Gram	-
Catalase	-
Nitrate réductase	+
la voie d'attaque des glucides	Métabolisme fermentaire
Indole	-
Test d'utilisation des sucres (Glucose et Lactose) sur milieu K.I.A	Fermentation du glucose et lactose



(+) : test positif, (-) : teste négatif

4.5- Étude de l'effet antimycotoxinogène

4.5.1- Effet antifongique

Le tableau ci-après révèle un effet considérable de *Lactobacillus sp.* sur *Aspergillus flavus*. Cet effet se montre par le freinage de la croissance de la moisissure sur gélose avec filtrat de la culture de *Lactobacillus sp.*

Tableau 10 Effet antifongique de *Lactobacillus sp.*

Isolat	Sans filtrat	Avec filtrat
B6		
Diamètre	Toute la boîte	1,5cm

4.5.2- Effet antimycotoxinogène

Le test réalisé par la souche fongique *Aspergillus flavus* vis-à-vis de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* et *Pseudomonas syringae.*, n'a révélé aucune activité anti-bactérienne (Figure 16).

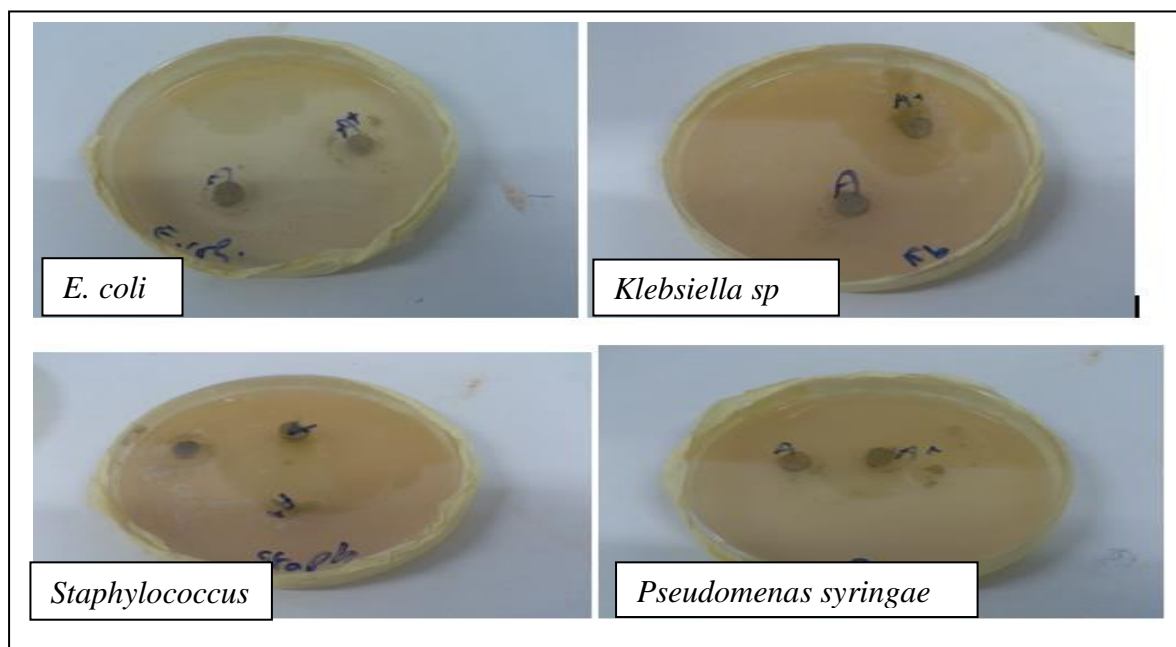


Figure 16 Effet antimycotoxinogène

5- Discussion

Beaucoup d'agents antimicrobiens sont souvent présentés comme moins toxiques, plus écologiques et plus naturels. C'est pourquoi la découverte et le développement de nouveaux agents antimicrobiens sont grandement recherchés par les scientifiques.

De ce fait, le présent travail est amorcé par les points de recherche suivants :

1. Sélection des isolats bactériens à partir du lait caillé de vache ;
2. Recherche de mycètes sécrétant de mycotoxines ;
3. Identification de l'isolat bactérien le plus performant à sécréter des substances antifongique et anti mycotoxinogène ;
4. Teste d'activité antifongique.

La sélection des microorganismes isolés partir des laits caillés et d'arachide de la région de Constantine, a été réalisée d'une façon sélective, sur milieu MRS pour les bactéries ce qui a abouti à six isolats bactériens sécrétant des substances antifongique dont une, jugée plus performante contre le développement d'un isolat fongique susceptible de produire des mycotoxines, ce dernier est isolé de l'arachide sur milieu PDA.

L'identification macroscopique des isolats bactériens B1, B2, B3, B4, montre que la forme des colonies est ronde, de couleur blanchâtre et une topographie élevée, l'identification microscopique quant à elle, montre que ce sont des cocci immobile, gram négative ; ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Badis et *al.*, 2005.

La caractérisation macroscopique et microscopique de l'isolat B5 a révélé des colonies rondes, avec un contour régulier, planes de couleur beige et des cellules bacilloformes, immobiles, à gram négatif. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Tabak et *al.*, 2011 qui ont isolé des bactéries à partir du lait développant les mêmes caractéristiques.

L'identification macroscopique de l'isolat B6 a montré des colonies de forme lenticulaire, de couleur blanchâtre, une surface lisse et un contour régulier avec un diamètre de 0.5 cm et une topographie élevée. Ces résultats sont en pleine conformité avec ceux obtenus par Mami, 2013. L'observation microscopique a révélé des bactéries immobiles gram négatif, en outre, les teste biochimiques, appliquées sur cette souche qui développe plus d'effet inhibiteur sur la moisissure, ont montré que l'isolat est indole négatif, a un métabolisme fermentaire, capable

de fermenter le glucose, catalase négatif et possèdent une nitrate réductase. Ces résultats sont en conformité avec ceux trouvés par (Bergey's M, 2004) qui ont montré que ces caractères laissent supposer que la bactérie en question peut appartenir au genre *Lactobacillus sp.*

Par ailleurs et concernant la moisissure, l'observation microscopique a révélé des têtes conidiennes d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes, les conidiophores sont verruqueuses, les vésicules sont sub-globuleuses, les phialides sont insérées directement sur la vésicule. Considérant sa croissance rapide sur PDA donnant une pigmentation jaunâtre puis verte il ressort que l'isolat est supposé appartenir au genre *Aspergillus* et l'espèce la plus prononcée est *A. flavus*. Une étude menée sur ce même milieu et dans les mêmes conditions a donné des résultats similaires (Gacem, 2012).

Le test effectué pour l'étude de l'effet antimycotoxinogène a permis d'affirmer la capacité des isolats bactériens à produire des substances anti fongique dans le milieu submergé, cependant, la souche B6 est la plus efficace, freinant d'une manière considérable la croissance de la moisissure (un diamètre de colonie estimé 1.5 cm après 72 h d'incubation à 28C°). L'inhibition de la croissance fongique est due à la sécrétion de bactéries des molécules antifongiques et pas à l'acidification du milieu car les champignons tolèrent les pH acides.

Les résultats obtenus après les essais de l'activité antifongique contre les bactéries *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas syringae* sont négatif attestant que la moisissure n'a pas secrété de substances antibactériennes ce qui laisse supposer que le *Lactobacillus* produit des métabolites à effet antimycotoxinogène néanmoins, ce travail nécessite une confirmation.

6- Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour objectif de prévenir la croissance de champignons mycotoxinogènes *Aspegillus sp* par l'utilisation des bactéries lactiques, dont l'activité antifongique et l'innocuité sont largement décrites.

La recherche des bactéries lactiques productrices des substances antifongiques est effectuée. De ce fait, plusieurs isolats bactériens sont obtenus répondant aux formes cocci et bacilles à Gram (-), ont été sélectionnés dans ce travail par rapport à leurs activités antifongiques.

Dans cette étude une nouvelle approche est développée pour tester l'effet bactérien vis-à-vis de champignons mycotoxinogènes. En effet, les isolats bactériens sont ensemencés dans un milieu submergé pendant 24 heures, la culture est, ensuite, filtrée et le filtrat a servi pour préparer le milieu PDA pour tester le développement de la moisissure mycotoxinogènes. Il a été conclu que lorsque les bactéries secrètent des substances antifongiques dans le milieu ceci freine la croissance de la moisissure. L'isolat bactérien B6 isolé du lait caillé de vache a été sélectionné pour son inhibiteur vis-à-vis de la moisissure. Son identification par diverses techniques a montré qu'elle appartienne au genre : *Lactobacillus*.

Il a été conclu en outre, que les colonies fongiques faiblement développées sur le milieu PDA contenant le filtrat de la culture bactérienne *Lactobacillus sp.* ont développé un effet faible ou pas sur les bactéries test ce qui laisse supposer que la toxicité des cette moisissure a été inhibée par *Lactobacillus sp.* néanmoins ce travail nécessite une confirmation.

A cet effet, et au terme de cette recherche, nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- Identifier par voie moléculaire des souches sélectionnées;
- étudier de la nature de la substance synthétisée par *Lactobacillus sp*;
- Rechercher les mécanismes d'inhibition de l'effet mycotoxinogène ;
- Développer un bioconservateur.

7-Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la biopréservation des aliments grâce à leur production des acides organiques et d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines qui inhibent certaines souches fongiques. Ce genre de bactérie peut être isolé de grande variété d'aliment tel que le lait fermenté, le yaourt et le fromage.

La contamination des aliments par les moisissures mycotoxinogènes est un problème majeur pour le consommateur. Pour lutter contre ces dernières plusieurs approches sont évoquées en particulier la lutte biologique.

Six isolats bactériens ont été isolés à partir du lait caillé de vache dans la région de Constantine.

Le test de sélection des isolats bactériens à effet antifongique a permis de sélectionner un seul isolat B6, qui possède un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis d'*Aspergillus flavus*. L'identification préliminaire de l'isolat bactérien B6 basé sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que, les tests biochimiques a révélé que la souche appartenant au genre *Lactobacillus*. En effet, la souche B6 freine d'une manière appréciable la croissance de la moisissure (un diamètre de colonie ne dépassant pas 1.5 cm après 72 h d'incubation à 28C°). L'inhibition de la croissance fongique est due à la sécrétion de bactéries des molécules antifongiques et pas à l'acidification du milieu étant donné qu'*Aspergillus flavus* est une souche acidotolérante.

Les résultats obtenus après les essais de l'activité antifongique contre les bactéries *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas syringae* ont été négatifs attestant que la moisissure n'a pas secrété de substances antibactériennes ce qui laisse supposer que le *Lactobacillus* produit des métabolites à effet antimycotoxigène néanmoins, ce travail nécessite une confirmation.

Mots clés : Bactéries lactiques, antifongique, antimycotoxinogène, *Lactobacillus*, *Aspergillus*.

8- Abstract

Lactic bacteria are used in fermentation and food bio-preservation through their production of organic acids and other antimicrobial substances like the bacteriocins which restrain certain fungal strains. This category of bacteria can be isolated from range of food such as fermented milk, yogurt and cheese.

Food contamination by mold mycotoxinogènes is a chief problem for consumers. In order to fight against the later, several approaches are discussed mainly the biological resistance.

Six bacterial isolates were isolated from sour-milk which was derived from cows in the region of Constantine.

The selection test of the bacterial isolates to antifungal effect was designed for selecting a particular B6 isolate, which has a significant inhibitory effect vis-à-vis the *Aspergillus flavus*. Based on a study of a macroscopic, microscopic and so biochemical tests, the preliminary identification of the bacterial isolate B6 revealed that the strain belonging to the genus *Lactobacillus*. In fact, the B6 strain considerably slows the growth of mold (diameter of colony not exceeding 1.5 cm after 72 h of incubation at 28C °). The inhibition of fungal growth was due to the secretion of bacteria antifungal molecules, but not to the acidification of the biological environment since the *Aspergillus flavus* is a acidotolérante strain.

The results obtained after testing the antifungal activity against *E. coli* bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas syringae* were negative, attesting that the mold is not of antibacterial substances secreted which suggests that *Lactobacillus* product antimycotoxigène effect of metabolites .However, this work requires confirmation.

Keywords: Lactic bacteria, antifungal, antimycotoxinogene, *Lactobacillus*, *Aspergillus*.

9 - ملخص

عزل البكتيريا الحليب ذات مضادات للميكروبات المنتجة للسموم الفطرية

تستعمل بكتيريا الحليب في التخمرات و الحفاظ البيولوجي للأغذية نتيجة إنتاجها للأحماض العضوية ومركبات أخرى مضادة للبكتيريا ' هذه المجموعة من البكتيريا يمكن عزلها من أغذية مختلفة مثل الحليب و الحليب المخمر والياغورت و الجبن. يعتبر حضور الفطريات المفرزة للسموم في الأغذية مشكلة لصحة المستهلك وهناك عدة طرق للحيلولة دون ذلك ومنها المقاومة البيولوجية.

6 عزلات بكتيرية يتم الحصول عليها من حليب البقرة الرائب يتم اختبار عزلة واحدة لقدرتها على تثبيط نمو *Aspergillus flavus* .

التعريف الأولي للعزلة بدراستها ماكروسكوبيا و ميكروسكوبيا وبيوكيميائيا بين أنها تنتمي إلى *Lactobacillus*

تم بالفعل كبح نمو الفطر تحت تأثير السلالة السابقة حيث لم يعطي نموه إلا مستعمرة صغيرة لا يتعدى قطر 1.5 سم بعد 72 ساعة من النمو على 28 درجة مئوية.

هادا التثبيط راجع إلى إفراز البكتيريا لمركبات مضادة للفطريات ولم يرجع ذلك إلى تحميض الوسط لان هادا النوع من الفطريات متسامح للحامضة.

النتائج المتحصل بعد اختبار النشاطية فطر مع بكتيريا تبين أن الفطر لم يؤثر على نمو البكتيريا وذلك راجع لعدم إفرازها لسموم الفطرية.

Mots clés : *Lactobacillus*, *Aspergillus*, مضاد سموم فطرية , السموم الفطرية, البكتيريا الحليب.

10- Références bibliographiques

- Abdellah, Z. (2004)** .Determination des Mycotoxines dans les Aliments et Etude de la reduction des Aflatoxines par les Bacteries Lactiques isolees des ferments panaires traditionnels
- Adams, M. R., Marteau, P. (1995)**On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int JFood Microbiol.***27**: 263-264.
Adresse URL : <http://www.vet-lyon.fr/ens/nut/webbromato/cours/cmlait/cmsomlai.html>
- Aguirre, M., Collins, M. D. (1993)** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *JAppl Bacteriol.***75**: 95-107.
- Alves de Oliveira, L.** (Page consultée le 30 septembre 2006), *Site de l'Ecole*
- Ammo, M.S., Mayo, B. (2007)** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76, 138–146.
- Atlan, D., Aubel, D., Gilbert, C. (2000)**. La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases. *Science des aliments*, **20**, (01), pp: 5-17.
- Axelsson, L. (1993)**. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid
- Axelsson, L. (2004)**. Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3ed edition) Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I., Hugas, M. (2000)** Bacteriocin producing *lactobacilli* in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17: 33–45.
- bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food. Control*: 23: pp547-551.
- bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
- Bacus, J. (1984)** Update: meat fermentation. *Food Technology*. 38: 59-63.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005)**. Phenotypic characterization of isolated from raw goat's milk from two local goat populations "Arabia and Kabyle" lactic acid bacteria. *Sci. Technol. C* No. 23, June (2005). pp. 30-37.
- Bhatnagar, D., Payne, G.A., Cleveland, T.E. Robens, J.F. (2004)**Mycotoxins: current issue in USA. In H. Barug, H.P. van Egmond, R. Lopez-Garcia, W.A. van Osenbruggen and

A. Visconti (eds). Meeting the mycotoxin menace, pp. 17–47. Wageningen, the Netherlands, Wageningen Academic Publisher.

-Björkroth, J., Holzapfel, W. (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological*

-Bocquet, J. (1993). Généralités sur les microorganismes. En 'Biotechnologie'. Ed. R. Scriban. Tec. Doc. Lavoisier. Paris. 38-46.

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

-Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P.,

-Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.

-Brogden, KA. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250.

-Brul, S., Coote, P. (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.

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

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

-Cahagnier, B., Richard-Molard, D. (1998). Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, Paris p.140-158.

-Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2002) Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. Moll. & Moll. (Eds). La sécurité alimentaire du consommateur. Lavoisier, Tec doc.

-Chabasse, D. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.

- citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *International Journal of*
- Cogan, T.M.(1982).** Acetoin production and citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Food Science and Technology*, 6, pp: 69-78.
- Collins, A., Brown, J.S., Newman, S.E. (1989).** Cognitive apprenticeship: Teaching the craft of reading writing and mathematics. In L.B. Resnick (Ed.), *Knowing, learning, and instruction: Essays in honor of Robert Glaser*. Hillsdale, NJ: Erlbaum
Community (3rd edition). Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.
- Cooney, G.D., Emerson, R. (1965).** Thermophilic fungi. W. H. FREEMAN AND COMPANY. San Francisco et London. 3-28.
- Davidson, M. P. (2001)** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 593–627). Washington: ASM press
- De Castro, R.D., Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 18: 175-199.
- De Hoog, G.S., Guarro, J. (1995).** Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23, 130–135.
- De Roissart, H., Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994)** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.),
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P : 128,
- Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines :
- Djamel, D. (2009).** Hervé prévest ,*bactérie lactique*, Ed.Economica 49,rue Hericart, 75015Paris, Np=421
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds).
- El-nezami, H., Kankaapä. P., Salminen. S., Ahokas, J. (1998)** Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J Food Prot*, 61: 466-468.

- El-nezami, HS., Nicoletti, G., Neal, GE., Donohue, DC., Ahokas, J . (1995)** AflatoxinM1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food ChemToxicol*, 33:173-179.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2006)** Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*.58: 266-272.
- Farkas, J.(2001)** Physical methods for food preservation. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*.pp. 567–592.
- Farrow, J.A.E., Facklam, R.C., Collins, M.D. (1989).** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostoc*s and description of *Leuconostoc*
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U. (1996)** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 85–102.
- Fredot, E. (2005).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 (397 pages).
- FREDOT, E., (2005).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 (397 pages).
- Gacem, M.A., Ould El Hadj, K.A., Gacemi, B. (2012).** Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Alg.J.Env*. p :67-76.
- Galvano, F., Galofaro, F., Galvano, G. (1996).** Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products : a worldwide review. *J Food Prot*, 59: 1079- 1090.
- Galvano, F., Galofaro, F., Galvano, G. (1996)** Occurrence and stability of aflatoxin
- Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., and Lucas, R. (2011)** Food Applications and
- Gevers, D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- Ghiasian, S.A., Bacheh, P. K., Rezayat, S. M., Maghsood, A. H., Taherkhani, H. (2004).** Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia* 158: 113–121.
- Gould, G. W. (1996)** Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal Food Microbiology*. 33, 51–64.
- Gould, I.M. (2000).** A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43, 459–465.
- Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie alimentaires. (edn) Dunod. Paris.p : 651

- Guiraud, J.P., (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod
- Hammes, W. P., Hertel, C. (2006)**The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In:
- Hassouni, H. (2007).** Physiologie de la sporulation des champignons filamenteux pour la production de spores et d'enzymes en fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, 165 pages.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73(suppl)**: 365S–73S.
- http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg.**
- Image:(http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).**
- Jaquet, J., Lafont, J., Lafont, P. (1982)** .Sur la contamination du lait par lesaflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67
- Jaquet, J., Lafont, J., Lafont, P., (1982)** Sur la contamination du lait par lesaflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67
- Jefca, (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2001)** Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, WHO, Geneva, Switzerland, p. 366.
- Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L. (2004).** *Microbiologie*. Ed. Dunod. Paris.P 479.
- Kandler, O., Weiss, N. (1986).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (8nd ed.). Baltimor. pp 208-1234.
- Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S.(2009).** Isolation and partial characterization of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strains. Botany Department Scien. Alexandria. Egypt. 8 (3): 242-250.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998)** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* **41**: 103-125
- Kunz, B. (1989)** Aspects in the use of starter cultures in meat products. Co MST-89: 176–180.

- Lamontagne Michel Claud P., Champagne J., Reitz A., Sylvain M., Nancy G., Maryse L., Julie J., Ismail, F.** (2002) . Microbiologie de lait .Science et technologie de lait. Ecole polytechnique de Montréal.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M.** (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum strain 21B*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4084–4090.
- Le Bars, J., Le Bars, P. (1998)** Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing in Mycotoxins in Food chain, (Le Bars, J., Galtier, P., eds), Revue Méditerranéenne Vétérinaire.149: 493-500.
- Le Bars, J., Le Bars, P. (1998)** Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing in Mycotoxins in Food chain, (Le Bars, J., Galtier, P., eds), Revue Méditerranéenne Vétérinaire.149: 493-500.
- Le Bars, J., Le Bars, P. (2000)** Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: Coffee Biotechnology and Quality, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 355-368.
- Le Bars, J., Le Bars, P. (2000)** Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: Coffee Biotechnology and Quality, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 355-368.
- Legan, J.D. (1993)** Moulds spoilage of bread: the problem and some solutions. International Biodeterioration. Biodegradation. 32:33–53.
- Leveau, J.Y., Bouix, M. (1993).** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990)** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149–164.
- Luquet, F.M. (1985)** .Lait et produits laitiers : vache-brebis-chèvre, voll : Les laits de la mamelle à la laiterie, Lavoisier TEC et DOC, Paris, 397p.
- Luquet, M.F., Linczowski B.T., Keilling, J., Wilde, R. (1985).** Laits et produits laitiers ,vache.brebis.chevre. société scientifique d'hygiène alimentaire. Lavoisier ; pages 3
- M1 in milk and milk products : a worldwide review. *J Food Prot*, 59: 1079- 1090.
- Madigan, M., Martinko, J. (2007).** Brock-Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition.

-Mami, A. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxico-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat, Oran, 161 pages.

micro-organismes d'intérêt industriel. Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.

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

Nationale Vétérinaire de Lyon, [en ligne]

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

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

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

-Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen. I Komision Hos Ejnar Munksgaard.

-Pacin, A.M., González, H.H.L., Etcheverry, M., Resnik, S.L., Vivas, L., Espin, S.(2002). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* 156: 87–92
Pearson Education. France. 1047p.

-Peberby, J.F. (1990). Fungal cell walls-a review. In: P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey and L.G. Copping (Eds) *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi*, Springer, Berlin, PP.5-30.

-Pirota, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, P., Hurley, S., and Garland, S. (2004) Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ*. 329: 548.

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

-Pougheon, S., Goursaud, J. (2001) Le lait caractéristiques physicochimiques *In Debry G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).*

-Prescott, H., Klein. (2007) .Microbiologie .2e édition française. P 806

- Pringsulaka O., Thongnam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K., Rangsiruji A., (2011)**- Partial characterization of bacteriocin produced by lactic acid Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.
- Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhe, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C., Ismaili-Alaoui, M. (2006)** Characterization of filamentous fungi isolated from olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6): 500-506.
- Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhe, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C., Ismaili-Alaoui, M. (2006)**. Characterization of filamentous fungi isolated from olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6): 500-506.
- Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., Barberis, I. L. (2009)** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.* 59: 497-501.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., (1996)**. Introduction to food borne fungi. 4e édition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, 1-232p.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. (2007)**. Diagnostic tools to identify black *Aspergillus*. *Study Mycology.*; 59: 129–145.
- Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau P. (1990)**. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p :34-428.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, W.H. (1996)** Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science Technol.* 71: 158-164.
- Schillinger, U., Lucke F.K. (1989)** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schleifer, K., Ludwig, W. (1995)**. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, pp: 461-467.
- Schleifer, K.H. (1986)**. Gram-positive cocci. Dans: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams et Wilkins, Baltimore, 2, pp: 999-1002.

- Singleton, D.R., Powell, S.N., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L.M., Aitken, M.D. Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:1202
- Steyn, P.S. (1998) The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.*, 149: 469-478.
- Stiles, M., Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.
- Stroim, K., Sjögren, J., Broberg, A., Schnurer, 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 phenyl lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4322–4327. *Systematic Bacteriology*, **39**, pp: 279-283.
- Tabak, S., Bensoltane, A. (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales p.73
- Taxonomic outline of the prokaryotes bergey's manual of systematic Bacteriology, Second Edition Release 5.0 May 2004
The prokaryotes, Vol. (4). Springer Science and Business Media. New York, USA. Pp320-403.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition d'un nouveau pédagogique. Canada. 945p.
- Union Européenne (2010/5) Règlement (CE) N° 1881/2006 ; N°105/2010 Teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A. *Journal Officiel de l'Union Européenne*.
utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, **5**, pp: 331-343.
- Valerio F., DeBellis, S.L., Lonigro, A., Visconti, L., Lavermicocca P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* spoilage, *Int. J. Food Microbiol.* 122 328–332.
- Wattiaux, M.A. (1997) *Dairy essentials (1st edition) : Nutrition and feeding*, The Babcock Institute Publications, University of Wisconsin-Madison, 1-28
- Weiss, N., Kandler, O. (1986b). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 1209-1234.

-Yiannikouris A, Jouany J.P. (2002) Mycotoxins in feeds for ruminants; fate and effects on animals. INRA Production Animales. 15, 3-16.

Annexe 1

Milieu MRS

Peptone.....	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Tween	80mL
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium	2 g
Sulfate de manganèse.....	0,005g
Agar-agar.....	5 g
Eau distillée	1000 mL

pH= 6,5

Annexe 2

Milieu PDA

Pomme de terre	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,3

Autoclavage 120C°, 15min

Annexe 3

Bouillon nutritif

Peptone	15g
Yeast extract.....	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml

Le pH est ajusté à 7,4

Annexe 4

Bouillon nitraté

Bouillon nutritif additionné de nitrate de sodium NaNO_3 1 g / 100 mL**Annexe 5**

Réactif « A »

Acide sulfamique 0.8 g
 Acide acétique 5N 100ml

Annexe 6

Réactif « B »

Alpha-Naphthylamine 0.5 g
 Acide acétique 5N 100ml

Annexe 7

Milieu MEVAG

Macération de viande (1 kg / l) 25ml
 Chlorure de sodium 5.2g
 Agar 3,12g
 Rouge de phénol 0,035ml
 Eau distillée 1000 mL

Annexe 8

Milieu (K.I.A)

Peptone 23g
 Yeast extract 3g
 Glucose 1g
 Lactose 10g
 Iron (II) sulfate 0.2g
 Sodium chloride 5g
 Sodium thiosulphate 0.3g

Phenol red.....	0.05ml
Agar	7g
Eau distillée	1000 mL

Nom : HADEF Prénom : Amira	Date de soutenance : 24/06/2015
Thème : Recherche de bactéries lactiques à activité Antimycotoxinogène isolées à partir du lait caillé	
<p>Résumé :</p> <p>Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la biopréservation des aliments grâce à leur production des acides organiques et d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines qui inhibent certaines souches fongiques. Ce genre de bactérie peut être isolé de grande variété d'aliment tel que le lait fermenté, le yaourt et le fromage.</p> <p>La contamination des aliments par les moisissures mycotoxinogènes est un problème majeur pour le consommateur. Pour lutter contre ces dernières plusieurs approches sont évoquées en particulier la lutte biologique.</p> <p>Six isolats bactériens ont été isolés à partir du lait caillé de vache dans la région de Constantine. Le test de sélection des isolats bactériens à effet antifongique a permis de sélectionner un seul isolat B6, qui possède un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis d'<i>Aspergillus flavus</i>. L'identification préliminaire de l'isolat bactérien B6 basé sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que, les tests biochimiques a révélé que la souche appartenant au genre <i>Lactobacillus</i>. En effet, la souche B6 freine d'une manière appréciable la croissance de la moisissure (un diamètre de colonie ne dépassant pas 1.5 cm après 72 h d'incubation à 28C°). L'inhibition de la croissance fongique est due à la sécrétion de bactéries des molécules antifongiques et pas à l'acidification du milieu étant donné qu'<i>Aspergillus flavus</i> est une souche acidotolérante.</p> <p>Les résultats obtenus après les essais de l'activité antifongique contre les bactéries <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella sp.</i>, <i>Pseudomonas syringae</i> ont été négatifs attestant que la moisissure n'a pas secrété de substances antibactériennes ce qui laisse supposer que le <i>Lactobacillus</i> produit des métabolites à effet antimycotoxigène néanmoins, ce travail nécessite une confirmation.</p>	
Mots clés : Bactéries lactiques, antifongique, antimycotoxinogène, <i>Lactobacillus</i> , <i>Aspergillus</i> .	
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne, Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. UFM Constantine	
Membres de jury : Présidente : M ^{me} Mihoubi I. (Prof. UFM Constantine). Rapporteur : Mr Kacem chaouche N. (Prof. UFM Constantine). Examinatrice : M ^{elle} Bataïche I . (Dr. UFM Constantine).	

