



Faculté des sciences  
Département : Biologie

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**En vue de l'obtention du diplôme de Master II**

**Filière : Sciences biologiques.**  
**Spécialité : Biochimie appliquée.**

**THEME :**

**Biocontrôle des mycotoxines par les bactéries lactiques**

**(Cas de lutte contre les aflatoxines et l'ochratoxine A)**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> BENAISSA Lamia

M<sup>elle</sup> BOUMEDINE Nawel

Soutenu le 10 /09/2020 devant les membres de jury :

**M<sup>r</sup> Amghar Fateh**

**Professeur (UMBB)**

**Président**

**M<sup>me</sup> Ait Kaki Asma**

**M.C.A (UMBB)**

**Examinatrice**

**M<sup>r</sup> Riba Amar**

**Professeur (UMBB)**

**Encadreur**

## ***Dédicaces***

*À mes très chers parents et grands parents, pour leurs efforts et leurs sacrifices durant toute ma vie, leur encouragements, conseils et soutiens pour persévérer jusqu'à l'aboutissement de ce travail. Qu'ils retrouvent dans ce travail l'expression de ma gratitude et toute ma reconnaissance. Que puisse Dieu le tout puissant vous procurer santé, bonheur et longue vie.*

*À mes chers frères El Hadi et Sofiane, a ma petite sœur Lina et mes belles sœurs Mouna et Chirine. Vous avez été pour moi une source d'espoir et de motivation, c'est un moment de plaisir de dédier cette œuvre en signe d'amour de reconnaissances et de gratitude pour le dévouement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuve a mon égard.*

*Une spéciale dédicace a cette personne qui compte déjà énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup d'amour, de tendresse et de respect. A toi Sammy.*

*À mon binôme Nawel, à toutes les personnes qui ont participé a l'élaboration de ce travail et a tous ceux que j'ai omis de citer.*

*Lamia*

## *Dédicaces*

*À mes chers parents, sachez qu'aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.*

*Puisse dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*À mon frère Karim, à ma tante Saleha, à toute ma famille, merci d'être là et de me soutenir dans chaque pas que je fais.*

*À la mémoire de Papa-Hamid, à ma grand mère chérie qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie, santé et paix.*

*À mes amis que j'affectionne particulièrement, qui ont supporté mes râlements et m'ont encouragé du début, à vous mes choux : Meriem, Celia, Wissem, Maya, Ahlem, Ihab, Mami.*

*À mon binôme Lamia, à toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail à tous ceux que j'ai omis de citer.*

*Nawel*

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre promoteur Mr Riba. Nous vous remercions de la confiance que vous avez portée en nous pour effectuer ce modeste travail et de l'avoir dirigé avec rigueur, merci pour vos conseils et vos directives.*

*Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury pour leur disponibilité et pour leur amabilité d'avoir accepté de juger notre travail, Mr Amghar en tant que président et Mme Ait Kaki en tant qu'examinatrice.*

*Merci à l'ensemble des enseignants de notre formation pour lesquels nous exprimons toute notre gratitude, en occurrence : M<sup>me</sup> Fazouane, M<sup>me</sup> Ait kaki, M<sup>me</sup> Rahim, M<sup>me</sup> Lahiani, M<sup>me</sup> Ourari, M<sup>r</sup> Adjlane, M<sup>r</sup> Amghar, M<sup>r</sup> Halet, M<sup>r</sup> Boudjema, M<sup>me</sup> Nouredine, M<sup>me</sup> Hamdouche, M<sup>me</sup> Mizab et M<sup>me</sup> Laoufi.*

*Nous n'oublierons pas de remercier aussi Mr Zitouni directeur du laboratoire LBSM de l'ENS Kouba. Merci de nous avoir si bien accueilli au laboratoire dans lequel nous avons pu contre toute attente effectuer une petite partie de notre travail. Nous remercions aussi Mme Bouti pour sa gentillesse et son aimabilité.*

*En fin, nous tenons à adresser nos sincères remerciements à toutes les personnes qui par leur conseils et leur critiques ont guidé nos réflexions pour la réalisation de ce mémoire.*

## Résumé

Les mycotoxines sont des composés issus du métabolisme secondaire des espèces de moisissures toxigènes appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Elles sont dotées d'un potentiel toxique délétère à l'égard de l'homme et de l'animal en contaminant différentes denrées alimentaires notamment les céréales (blé, maïs, orge, riz), et ce avant, pendant, ou après la récolte.

L'objectif de notre travail est de faire un état des lieux sur la lutte biologique contre les champignons toxigènes et leurs métabolites toxiques, particulièrement les aflatoxines et l'ochratoxine A classées parmi les plus nocives pour la santé. Les stratégies utilisées pour réduire et maîtriser la contamination des aliments par les moisissures toxigènes et les mycotoxines reposent avant tout sur la prévention en pré- et post-récolte.

Cependant des méthodes de détoxification (physiques, chimiques...etc) ont été développées et testées, car la présence des mycotoxines ne peut être évitée. Plusieurs études ont mis en évidence la capacité des bactéries lactiques (LAB) à inhiber la croissance fongique et/ou la production de mycotoxines, et/ou à biodégrader et/ou à séquestrer les mycotoxines. Par la suite, les scientifiques ont pensé à développer des procédés plus sains pour la santé et les aliments, durables et respectueux pour l'environnement. La lutte biologique est une nouvelle méthode de détoxification qui a été intégrée aux méthodes précédentes. Elle consiste en l'utilisation de différents agents de biocontrôle dont les bactéries lactiques reconnues comme GRAS (Generally Recognized As Safe) qui se sont révélées efficaces en agissant selon trois principaux mécanismes, sécrétion d'acide organique et de composés antagonistes et compétition pour les nutriments du milieu.

Une étude bibliographique de quatre articles relatifs au biocontrôle nous a permis d'affirmer l'efficacité des LAB contre plusieurs souches fongiques contaminants différentes denrées notamment dans les grains et épis de maïs, les grains de café et le vin.

*Mots clés* : mycotoxines, biocontrôle, ochratoxine A, aflatoxines, bactérie lactique.

## ملخص

السموم الفطرية هي مركبات مشتقة من الأيض الثانوي لأنواع العفن التوكسينوجين التي تنتمي إلى الأجناس الرشاشيات والبنسليوم والفيوزاريوم. لها قدرة سامة ضارة بالنسبة للإنسان والحيوان من خلال تلويث العديد من المواد الغذائية ، لا سيما الحبوب (القمح والذرة والشعير والأرز) ، قبل الحصاد وأثناءه وبعده.

الهدف من عملنا هو تقييم المكافحة البيولوجية ضد الفطريات السامة ومستقلباتها السامة ، المصنفة من بين الأكثر ضررا بالصحة خاصة الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين أ وتعتمد الاستراتيجيات المستخدمة للحد من التلوث الغذائي بواسطة العفن السمية والسموم الفطرية والتحكم فيه في المقام الأول على الوقاية قبل الحصاد وبعده.

قد تم تطوير واختبار طرق إزالة السموم (الفيزيائية والكيميائية وما إلى ذلك)، لأنه لا يمكن تجنب وجود السموم الفطرية. أظهرت العديد من الدراسات قدرة بكتيريا حمض اللاكتيك على تثبيط نمو الفطريات و / أو إنتاج السموم الفطرية و / أو التحلل البيولوجي و / أو عزل السموم الفطرية. بعد ذلك ، فكر العلماء في تطوير عمليات أكثر صحة وأكثر أماناً للغذاء واستدامة واحتراماً للبيئة. المكافحة البيولوجية هي طريقة جديدة لإزالة السموم تم دمجها مع الطرق السابقة ، تتألف من استخدام عوامل بيوكونترول مختلفة بما في ذلك بكتيريا حمض اللاكتيك المعترف بها بشكل عام على أنها آمنة، والتي ثبت أنها فعالة من خلال العمل وفقا لثلاث آليات رئيسية ، وهي إفراز الأحماض العضوية والمركبات المضادة والمنافسة على العناصر الغذائية للوسط.

سمحت لنا دراسة بيليوغرافية لأربع مقالات تتعلق بالسيطرة الحيوية بتأكيد فعالية بكتيريا حمض اللاكتيك ضد العديد من السلالات الفطرية التي تلوث الأطعمة المختلفة ، لا سيما في حبوب الذرة و عرانييس الذرة وحبوب البن والنبيد.

الكلمات المفتاحية : السموم الفطرية ، المكافحة الحيوية ، الأوكراتوكسين أ ، الأفلاتوكسين، بكتيريا حمض اللاكتيك.

## **Abstract**

Mycotoxins are derived compounds from the secondary metabolism of toxinogenic mold species belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. They have a deleterious toxic potential toward humans and animals by contaminating various foods, especially cereals (wheat, corn, barley, rice) and that, before, during or after harvesting.

Our work's objective is to draw up an inventory on the biocontrol of toxinogenic fungi and their toxic metabolites, particularly aflatoxins and ochratoxin A, which are ranked among the most harmful substances to health. The strategies used to reduce and control food contamination by toxinogenic molds and mycotoxins are primarily based on pre- and post-harvest prevention.

However, detoxification methods (physical, chemical, etc.) have been developed and tested, because the presence of mycotoxins cannot be avoided. Several studies have demonstrated the ability of lactic acid bacteria (LAB) to inhibit fungal growth and/or the production of mycotoxins, and/or to biodegrade and/or to sequester mycotoxins. Subsequently, the scientists thought of developing safer processes for health and food, sustainable and respectful of the environment. Biological control is a new method of detoxification which has been integrated into previous methods. It consists in the use of different biocontrol agents including lactic acid bacteria recognized as GRAS (Generally Recognized As Safe) which have been shown to be effective by acting according to three main mechanisms; secretion of organic acid and antagonist compounds and competition for nutrients from the environment.

A bibliographic study of four articles relating to biocontrol allowed us to confirm the effectiveness of LABs against several fungal strains that contaminate various foods, particularly in kernels and corncobs, coffee beans and wine.

*Key words:* mycotoxins, biocontrol, ochratoxin A, aflatoxins, lactic acid bacteria.

## Liste des figures

Figure 1 : Classification des Mycètes (Blackwell et al., 1998).....	3
Figure 2: Cycle de vie des champignons (Roquebert 2002, modifié).....	4
Figure 3: Schéma d'un pénicille (Visagie et al., 2014).....	5
Figure 4: Schéma d'une tête aspergillaire (Meghazi, 2015). ....	6
Figure 5: Schéma d'un Fusarium (a) Microconidie; (b) Chlamidospores (Meghazi, 2015).....	6
Figure 6: Structure des aflatoxines, B1, B2, G1, G2 (S. Firmin., 2011).....	12
Figure 7: Structures chimiques des ochratoxines A, B et C (Alban G., 2016). ....	14
Figure 8: Etapes d'ensemencement des spores. ....	19
Figure 9: (a) Aspect macroscopique d' <i>A. carbonarius</i> après incubation. (b) Aspect macroscopique <i>A. carbonarius</i> sous lampe UV (absence de fluorescence).....	20
Figure 10: (a) Aspect macroscopique d' <i>A. flavus</i> après incubation. (b) Aspect macroscopique <i>A. flavus</i> après incubation sous lampe UV (Absence de fluorescence).....	20
Figure 11: (a) Aspect macroscopique d' <i>A. parasiticus</i> après incubation.(b) Aspect macroscopique d' <i>A. parasiticus</i> après incubation sous lampe UV (Fluorescence bleu autour du mycélium et verte au milieu).....	21
Figure 12: (a) Aspect macroscopique d' <i>A. alliaceus</i> après incubation. (b) Aspect macroscopique <i>A. alliaceus</i> après sous lampe UV (Florescence verte au milieu de la colonie mycélienne). ....	21
Figure 13: Représentation schématique du mode d'action des acides organiques sur une cellule fongique.....	26
Figure 14: Types d'inhibition contre <i>A. carbonarius</i> après trois jours.....	37

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Principales Mycotoxines retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich, 2003).....	8
<b>Tableau 2:</b> Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).....	9
<b>Tableau 3:</b> Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leurs occurrences dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST, 2003; AFSSA, 2009).....	16

## Liste des abréviations

**A** :Aspergillus

**AF/ AFL** : Aflatoxines

**AFB1**: Aflatoxine B1

**API** : Appareils et Procédés d'Identification

**CAM** : Coconut Agar Medium

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CFS**: Cell-free supernatant

**CIRC**: Centre international de recherche sur le cancer

**CYA** : Czapek Yeast Extract Agar

**DLC** : Date limite de conservation.

**DON**:Déoxynivalénol

**ELISA**: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**FB1** : Fumonisine B1

**HPLC**:High performance liquid chromatography

**ID** :Diamètre d'inhibition

**IF** : Inhibition fongique

**LAB**: Bactéries lactiques

**LC-MS-MS** : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

**MC**: Moisture content

**MFC**: Concentration minimale fongicide

**MIC** : Concentration minimale inhibitrice

**MRS** : Man, Rogosa et Sharpe (Bouillon de culture)

**OCH**:Ochratoxines

**OTA** :Ochratoxines A

**OTB**: Ochratoxines B

**OTC**:Ochratoxines C

**OT $\alpha$** :Ochratoxine alpha

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase

**PDA** :Potato dextrose Agar

**PDB**: Potato dextrose broth

**PIF** : Pourcentage d'inhibition fongique

**Rpm**:Rotation par minute

**ZEA**:zéaralénone



## Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 1

### Chapitre I : Généralités sur les moisissures

I.1. Les moisissures et leurs caractéristiques..... 2

I.2. Classification des moisissures..... 2

I.3. Reproduction des moisissures..... 3

I.4. Les moisissures comme contaminants..... 4

I.5. Principales moisissures d'altération..... 4

I.5.1. Genre *Penicillium*..... 4

I.5.2. Genre *Aspergillus*..... 5

I.5.3. Genre *Fusarium*..... 6

I.6. Mycoflore du blé..... 6

I.6.1. Champignons dits « de champ »..... 7

I.6.2. Champignons de stockage..... 7

### Chapitre II : Mycotoxines

II.1. Définition et caractérisation des mycotoxines..... 9

II.2. Origine biosynthétique des mycotoxines..... 9

II.3. Facteurs influençant la production de mycotoxines..... 10

II.3.1. Facteurs biotiques..... 10

II.3.2. Facteurs abiotiques..... 10

II.3.2.1. Température..... 10

II.3.2.2. Activité de l'eau..... 11

II.3.2.3. pH..... 11

II.3.2.4. Composition gazeuse..... 11

II.3.2.5. Nature du substrat..... 11

II.4. Les aflatoxines .....	12
II.4.1. Structure des aflatoxines .....	12
II.4.2. Origine et conditions de production des aflatoxines .....	12
II.4.3. Propriétés physico-chimiques des aflatoxines.....	13
II.5. L'ochratoxine A (OTA).....	13
II.5.1. Structure de l'ochratoxine A.....	13
II.5.2. Origine et conditions de production de l'ochratoxine A.....	14
II.5.3. Propriétés physico-chimiques de l'ochratoxine A .....	14
II.6. Toxicité de l'Ochratoxine A et de l'Aflatoxine.....	15
II.6.1. Mécanisme d'action de l'aflatoxine.....	17
II.6.2. Mécanisme d'action de l'ochratoxine A .....	17
II.7. Méthode de dosage des aflatoxines et de l'ochratoxine A .....	17
II.7.1. Méthodes physico-chimiques.....	18
II.7.2. Méthodes immunochimiques .....	18
II.8. Méthode rapide de détection de l'aflatoxine et de l'ochratoxine A .....	18
II.8.1. Préparation du milieu de culture .....	19
II.8.2. Repiquage des souches .....	19
II.8.3. Visualisation des mycotoxines.....	20
II.8.4. Résultats et discussion .....	21
 <b>Chapitre III: Lutte biologique contre les mycotoxines</b>	
Introduction .....	23
III.1. Lutte biologique et bioconservation des aliments .....	24
III.2. Les bactéries lactiques en tant que bioconservateurs .....	24
III.3. Pouvoir antifongique des bactéries lactiques .....	25
III.3.1. Acides organiques.....	25
III.3.2. Composés antagonistes.....	26
III.3.3. Compétition pour les nutriments .....	26
III.4. Facteurs influençant l'activité antifongique des LAB.....	27
III.4.1. Période et température d'incubation.....	27
III.4.2. pH .....	27
III.4.3. Effet du milieu de culture .....	27

## **Chapitre IV :Etat de l'art sur le biocontrôle des mycotoxines**

Introduction .....	29
IV.1.Articles 01 : Lactic acid bacteria as functional probioticisolates for inhibiting the growth of <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. niger</i> and <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	30
IV.2. Article 02 : Potential Application of Lactic Acid Bacteria to Reduce Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 Occurrence on Corn Kernels and Corn Ears.....	32
IV.3.Article 03 :Robusta coffee beans post-harvest microflora: <i>Lactobacillus plantarum sp.</i> As potential antagonist of <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	35
IV.4. Article 04 : In Vitro Removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria.....	38
<b>Discussion et conclusion</b> .....	41

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

---

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Le blé est la céréale la plus cultivée et la plus consommée dans les pays du Maghreb (Doukani *et al.* 2013). En Algérie, le blé est l'aliment de base de la population et occupe une place stratégique dans l'économie nationale (Djermoun, 2009).

Cependant, de la matière première au consommateur, les aliments peuvent être contaminés par différents microorganismes d'altération ou pathogènes, notamment les moisissures. Ces dernières retiennent de plus en plus l'attention dans le monde entier en raison de l'impacte qu'engendre leur prolifération sur le blé. En effet les moisissures sont à l'origine de trois principales conséquences, l'altération de la qualité du grain (modification de la qualité organoleptique comme la couleur, le goût, la texture et l'odeur), la production de mycotoxines provoquant des allergies et intoxications humaines et animales plus ou moins graves, et à cela s'ajoute les problèmes économiques dus aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés (Pitt et Hocking, 1991) (Gacem, 2012).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produites par certaines espèces de moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, capables de se développer avant, pendant ou après la récolte (Reboux, 2006). Une trentaine de ces mycotoxines possèdent des caractéristiques toxiques préoccupantes pour la santé (El Khoury *et al.* 2010). Parmi ces dernières, on retrouve l'ochratoxine A (OTA) et les aflatoxines.

Afin de minimiser le risque sanitaire tout en préservant les qualités organoleptiques des denrées alimentaires, plusieurs moyens de conservation ont été développés, en passant par des méthodes physiques ou chimiques qui se sont avérées plus tard néfastes et moins efficaces que les techniques de lutte biologiques développées ultérieurement, utilisant des probiotiques antifongiques, notamment les bactéries lactiques (LAB) considérées par la « Food and Drug Administration » comme microorganismes GRAS (Generally Recognized As Safe).

Dans ce contexte, nous avons prévu de réaliser un travail expérimental traitant l'effet des bactéries lactiques contre quatre espèces de champignons toxigènes, *Aspergillus flavus*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus* et *A. parasiticus*, isolées à partir du blé. Ce travail rentre dans le cadre d'un projet de recherche « Recherche des mycotoxines dans les aliments, évaluation des risques et stratégies de lutte ».

Suite à la crise sanitaire actuelle qui a touché le monde entier et aux décrets ministériels obligeant la fermeture des lieux de stages pratiques, nous avons orienté notre travail à l'étude bibliographique relative au biocontrôle.

# Chapitre I

## Généralités sur les moisissures

---

## Chapitre I : Généralités sur les moisissures

### I.1. Les moisissures et leurs caractéristiques

Les moisissures sont des champignons microscopiques, pluricellulaires (Guiraud, 1998), à croissance filamenteuse de texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, qui peuvent être retrouvées dans l'air, le sol, l'eau et sur de nombreux substrats d'origine végétale (Tabuc, 2007). Elles sont caractérisées par leur appareil végétatif appelé « thalle », dépourvu de véritables tissus, ne comportant ni racine, ni tige, ni feuille, à l'inverse des plantes (Tony Basset et Caroline Laffont, 2011).

Ce thalle est constitué de deux parties : Le mycélium et les spores.

- Le mycélium est un ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes, dont chacun mesure 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre possédant un cytoplasme commun (Ait Abdelouahab, 2001). Les hyphes peuvent être divisés par des cloisons et sont donc appelés hyphes segmentés ou septés, c'est le cas de la plupart des moisissures, mais peuvent aussi ne pas contenir de cloisons et prendre l'aspect de longues cellules continues à noyaux multiples et sont dans ce cas appelés cénocytes (Tortora *et al.*, 2003).
- Les spores sont des particules produites durant la phase reproductive, de taille très réduite de quelques microns qui assure leur dispersion dans l'air permettant une colonisation de substrats très hétérogènes regroupant des milliers d'espèces (Carlile et Watkinson, 1994). Elles sont entourées de parois protectrices qui leur confèrent une très grande résistance, de ce fait elles peuvent rester inertes pendant plusieurs années jusqu'à leur germination aussitôt que les conditions environnementales leur sont propices (Tony Basset et Caroline Laffont, 2011).

Les moisissures sont des organismes chimiotrophes qui puisent leur énergie du carbone organique (Carlile et Watkinson, 1994) produisant une grande variété de métabolites secondaires. Certaines d'entre elles sont très utiles à l'homme et présentent des intérêts considérables dans différents domaines, mais d'autres constituent un agent de détérioration très important car elles peuvent devenir "opportunistes" en parasitant l'organisme hôte.

### I.2. Classification des moisissures

Les champignons possèdent un certain nombre de caractéristiques permettant de les classer dans le cinquième règne, celui des « Mycètes » ; parmi celles-ci, on distingue l'absence du caractère de mobilité et l'existence de deux types cellulaires possédant leur matériel génétique confiné dans un noyau, des cellules de structure simples, et des cellules spécialisées donnant naissance à des spores constituées d'une paroi cellulosique et chitineuse avec absence totale de chlorophylle (Kendrick, 1999).

La classification des moisissures, est quant à elle basée sur le mode de reproduction. Le critère de reproduction sexuée «champignons téléomorphes » définit quatre des cinq ordres des mycètes, soit les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes (Marie-Alix d'Halewyn, M. SC. *et al.*, 2002); le cinquième ordre ayant une reproduction asexuée « champignon anamorphe » regroupe les Deutriomycètes ou *Fungi imperfecti* ( Marcel Lecomte, 2014).

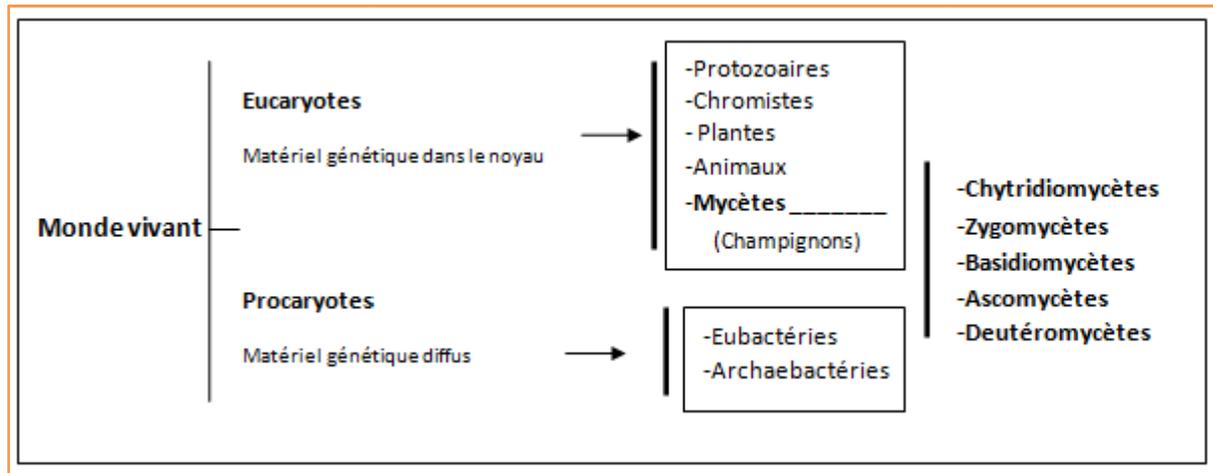


Figure 1 : Classification des Mycètes (Blackwell et al., 1998).

### I.3.Reproduction des moisissures

Une fois le champignon bien développé, il va se reproduire comme tout être vivant et va donc se propager, entraînant la colonisation de nouveaux milieux (Roquebert, 1997). Les champignons se reproduisent selon deux modes, sexué et asexué. Le mode sexué comprend un stade hétérocaryote puis une plasmogamie et en fin une caryogamie aboutissant à un zygote diploïde (2n) donnant à son tour un appareil sporifère haploïde. Les mycéliums apparaissent après germination des spores (Jean pierre Courtin, 2012). La reproduction asexuée est beaucoup plus répandue que la précédente et ne fait pas intervenir de transformations génétiques. Elle se fait, soit par une fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées. Ce type de reproduction permet une grande dissémination des espèces (Branger *et al.*, 2007).

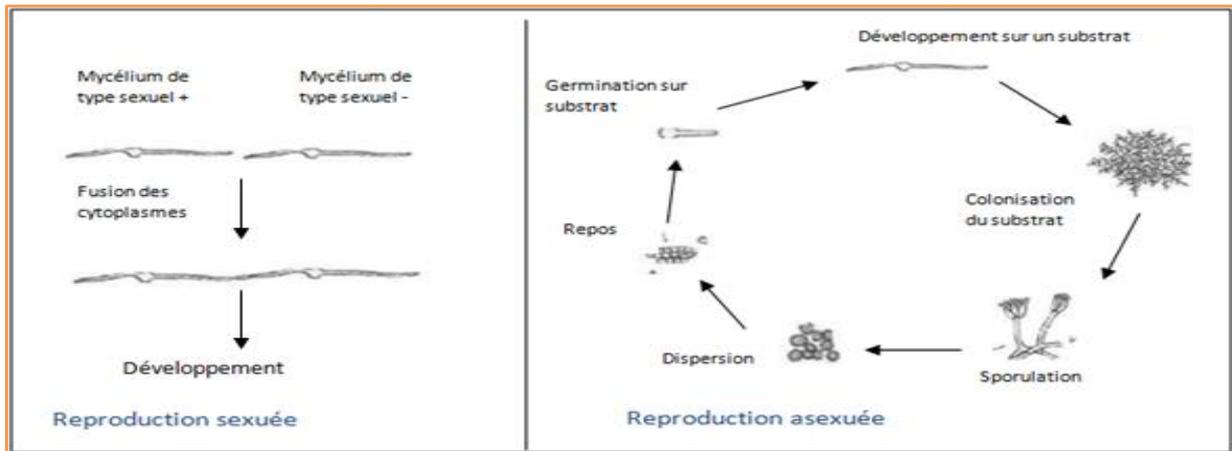


Figure 2: Cycle de vie des champignons (Roquebert 2002, modifié).

## I.4. Les moisissures comme contaminants

Étant des organismes hétérotrophes et ubiquitaires, les moisissures peuvent être aussi néfastes que bénéfiques; parmi les souches contaminants les aliments considérés comme milieux favorables à leur développement, on retrouve *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Doyle *et al.*, 1998). Ces dernières entraînent de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, l'altération des qualités organoleptiques, la réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés. Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques (Pitt *et al.*, 2000).

Plus de 300 métabolites secondaires sont produits par les moisissures (Bhatnagar *et al.*, 2002), parmi ceux-là on retrouve les mycotoxines possédant des propriétés toxiques influant négativement la santé humaine et animale (Watson *et al.*, 1984 ; Hsieh *et al.*, 1992). Le choix de l'étude s'est porté sur ces mycotoxines, principalement les aflatoxines et l'ochratoxine A en raison de leur contamination d'un grand nombre de produits végétaux, notamment les céréales dont le blé contribuant à environ 50% à l'exposition de l'homme à l'ochratoxine A (Canadas, 2006).

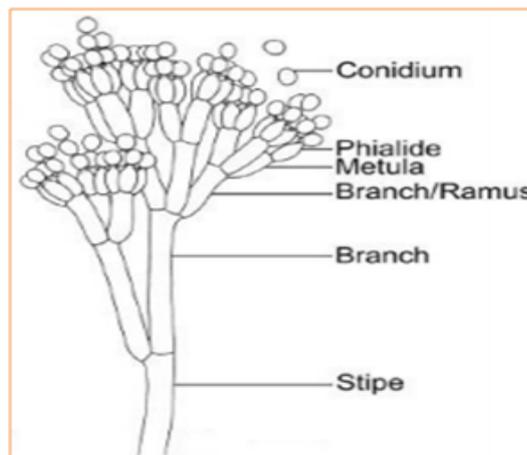
## I.5. Principales moisissures d'altération

### I.5.1. Genre *Penicillium*

Le pénicille se distingue par son organisation en pinceau, suite à l'aspect du conidiophore qui est divisé en articles (Champion, 1997).

Ce genre est le plus ubiquitaire comportant plus de 200 espèces qui se rencontrent partout, de l'équateur aux pôles (Reboux *et al.*, 2010). Il est moins fréquent avant la récolte mais croît rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Ce dernier, se développe lorsque la teneur en eau est au dessus d'un seuil de 14% environ et un taux d'humidité de 75% (Neergaard, 1977 ; Boudreau et Ménard G., 1992), cependant à la récolte, les graines peuvent ne présenter aucun symptôme et se dégrader pendant la conservation (Champion, 1997).

Les espèces les plus communes sont essentiellement : *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium frei*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium crustosum* (Dijksterhuis et Samson, 2007).



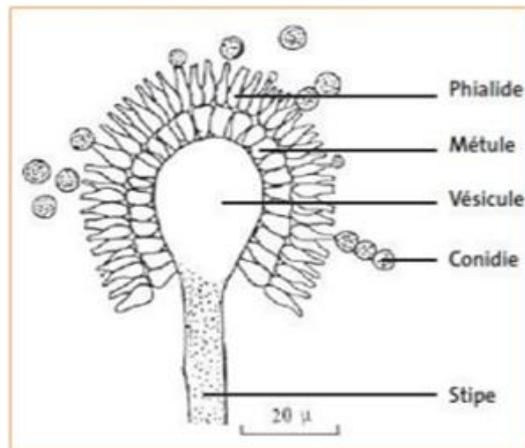
**Figure 3:** Schéma d'un pénicille (Visagie et al., 2014).

### **I.5.2. Genre *Aspergillus***

Ce genre est souvent associé aux penicilliums en raison de leur ressemblance morphologique, il est caractérisé par l'aspect des conidiophores qui ont une extrémité en tête renflée (Champion, 1997).

Les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000). De ce fait, quand les grains sont récoltés humides, insuffisamment séchés ou lorsqu'ils prennent de l'humidité pendant le stockage, les *Aspergillus* peuvent évoluer rapidement et se transformer de saprophytes en parasites entraînant une baisse importante de la faculté germinative sur les semences (Champion, 1997).

Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (Mathew *et al.*, 2011).

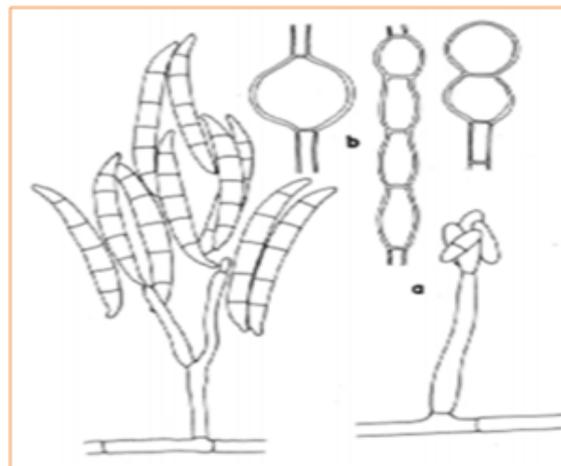


**Figure 4:** Schéma d'une tête aspergillaire (Meghazi, 2015).

### I.5.3. Genre *Fusarium*

Le nom *Fusarium* vient de « fusus » qui signifie fuseau décrivant la forme de ses macroconidies fusiforme et cloisonnées (Gelinas, 1995).

A un taux d'humidité élevé, les *Fusariums* croient et produisent des mycotoxines qui réduisent le rendement et la qualité des céréales et compromettent la valeur boulangère du blé (Abramson *et al.*, 2001).



**Figure 5:** Schéma d'un *Fusarium* (a) Microconidie; (b) Chlamidospores (Meghazi, 2015).

### I.6. Mycoflore du blé

Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamel *et al.*, 2010).

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène (Reboux, 2006), de ce fait, selon les conditions de culture, une

même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines, cas de production de dioxynivalénol ou de zéaralénone par certaines souches de *Fusarium graminearum* (Duverger *et al.*, 2011), de même une seule mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes, cas de l'ochratoxine A produite par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (Mitchell *et al.*, 2004).

Du point de vue écologique, il existe deux groupes de champignons toxigènes (Jarvis et Miller, 2005) :

### **I.6.1. Champignons dits « de champ »**

Ils contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte dans les régions à climat chaud, leurs spores envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage (Dendy *et al.*, 2000).

Parmi les genres les plus rencontrés, on retrouve les genres *Fusarium* et *Alternaria*. Ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou survivre pendant de longues périodes à de basses températures et à de faibles niveaux d'humidité (Roberts, 2005).

### **I.6.2. Champignons de stockage**

Ils contaminent les produits agricoles pendant leur stockage, notamment le blé stocké dans lequel ils sont présents sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou sous forme de spores en dormance sur la surface du grain, proliférant pendant le stockage dans des conditions favorables. Parmi les genres les plus rencontrés, on retrouve les genres *Penicillium* et *Aspergillus*.

**Tableau 1:** Principales Mycotoxines retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich, 2003).

Mycotoxines	Champignons	Denrées
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomenus</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i>	Arachides, céréales, graines de coton, épices et fruits
Ochratoxine A, B, C.	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>penicillium viridicatum</i>	Légumes, céréales et graines de café
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i> et <i>F. sporotrichoides</i>	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>	Maïs, et autres céréales
Trichothécènes (toxines T-2, DON, NIV)	<i>Fusarium spp</i>	Maïs et blé
Alcaloïde de l'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> et <i>C. paspali</i>	Blé et dérivés et seigles
Patuline	<i>Aspergillus spp.</i> et <i>Penicillium spp.</i>	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).
Citrinine	<i>P.rubrum</i> , <i>P.purpurogenum</i> , <i>P.viridicatum</i> , <i>P.citrinum</i> et <i>A.ochraceus</i>	Orge, blé, riz, soja et seigle

# Chapitre II

## Les mycotoxines

---

## Chapitre II : Les mycotoxines

### II.1. Définition et caractérisation des mycotoxines

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin *toxicum* signifiant poison (Reboux *et al.*, 2006).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits à la fin de la phase stationnaire et au début de la phase de déclin, de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 1000 Da (Betina, 1994), qui ont pour la plupart une structure hétérocyclique avec des doubles liaisons (C=C) qui sont à l'origine de leurs propriétés toxiques et carcinogènes (Bennet et Klich, 2003).

En raison de leurs structures chimiques, les mycotoxines sont considérées comme stables et en particulier thermostables (Bullerman et Bianchini, 2007), ils résultent de la dégradation des métabolites primaires rassemblant les sucres, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques qui participent à la nutrition et à la croissance des souches productrices (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Présentes dans de nombreux produits de l'alimentation humaine et animale, les principales mycotoxines ayant une importance sur le plan sanitaire et agroéconomique sont les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certaines trichothécènes, les zéaralénones et les patulines (Hussein et Brasel, 2001). Selon le type et la dose ingérée, elles induisent un effet toxique sur la santé (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002) (Reboux *et al.*, 2006).

### II.2. Origine biosynthétique des mycotoxines

Les voies biosynthétiques des mycotoxines sont très hétérogènes selon le substrat utilisé; ce dernier peut être des acides aminés, des polycétoacides, des dérivés terpéniques, mais aussi des dérivés d'acides gras (fumonisine, alternariol) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

**Tableau 2:** Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées des polycétoacides	Mycotoxines dérivées des terpènes
Alcaloïdes de l'ergot. Acide cyclopiazonique (CPA). Acide aspergillique. Fumitrimorgines. Gliotoxine. Roquefortine. Slaframine. Sporodesmine, etc.	Aflatoxine. Acide pénicillique. Citrinine. Ochratoxines. Patuline. Rubratoxines. Stérigmatocystine. Zéaralénone, etc.	Diacétoxyscirpénol (DAS). Déoxynivalénol. Fusarénone. Roridines. Toxine T2. Verrucarines, etc.

### II.3.Facteurs influençant la production de mycotoxines

La biosynthèse des mycotoxines par les moisissures dépend de plusieurs facteurs biotiques (liés à la souche fongique) et abiotiques (conditions environnementales).

#### II.3.1.Facteurs biotiques

Appelés aussi facteurs biologiques, ces derniers peuvent exercer un effet stimulant ou bien rédhibitoire sur la production des mycotoxines. L'effet stimulant se résume au transport des spores par des prédateurs (insectes, acariens) et à leur introduction dans les graines par des lésions qu'ils créent (Murphy *et al.*, 2006).L'effet rédhibitoire quant à lui, est provoqué d'une part par la compétition avec des microorganismes préexistantsréduisant la croissance des moisissures et donc de la production de mycotoxines(Weidenböner, 2001), et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Le Bars J et Le Bars P, 1987).

#### II.3.2.Facteurs abiotiques

Le développement des moisissures et donc de la production des mycotoxines est étroitement lié aux facteurs environnementaux et aux conditions physico-chimiques du milieu de croissance notamment :

##### II.3.2.1.Température

Bien qu'il existe des champignons psychrophiles et psychrotolérantes, la plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant entre 25°C et 35°C (El khoury, 2007).

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais le plus souvent, légèrement supérieure ; c'est le cas pour la production des aflatoxines par *A. flavus*, et de l'ochratoxine A par *A. ochraceus* (Reiss *et al.*, 1998 ).

On remarque que *A. flavus* se développe dès 20°C, produit l'aflatoxines à partir de 25°C et atteint une production optimale à 30°C (Gqaleni *et al.*, 1997), tandis qu'*A. ochraceus* se développe dès 25°C, et nécessite une température de 28°C pour une production optimale d'OTA (Trenk *et al.*, 1991 ). Généralement les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-42°C avec un optimum entre 24-28°C (Reiss *et al.*, 1998 ).

### II.3.2.2. Activité de l'eau

Symbolisée par le sigle  $a_w$ , elle est définie comme étant le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit ( $p$ ) sur la pression de vapeur de l'eau pure ( $p_0$ ), à une température donnée (Pitt J.I., et Hocking A.D., 1985), elle varie entre 0 et 1 (Tabuc C., 2007).

L'activité de l'eau optimale nécessaire à la toxigenèse est généralement supérieure à celle qui est nécessaire pour la croissance fongique et la germination des spores. Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une  $a_w$  de 0,85, par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l' $a_w$  est  $\geq 0.85$  (Cairns-Fuller *et al.*, 2005), de même Pitt et Miscamble (1995) rapportent un minimum de 0,83 pour le développement de la moisissure et de 0,87 environ pour la production d'aflatoxine.

### II.3.2.3. pH

La majorité des champignons se développent dans une gamme de pH allant de 4 à 9 avec un optimum entre 4.5 et 6.5, ainsi la production de mycotoxines a lieu au voisinage des pH optimums de croissance (Weidenborner, 1998).

### II.3.2.4. Composition gazeuse

Les moisissures sont des organismes aérobies (Tabuc C., 2007). De ce fait une concentration en oxygène inférieure à 1% et une teneur élevée de  $CO_2$  empêchent l'élaboration des mycotoxines (Cairns-Fuller *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 1997).

Toutefois, la majorité des moisissures peuvent se développer et donc produire des mycotoxines même si la teneur en oxygène est dix fois plus faible que celle de l'atmosphère. Par exemple, *Aspergillus flavus* peut se développer dans une atmosphère contenant une faible concentration d' $O_2$  (0,5%) ou une forte concentration en  $N_2$  (99%) mais 80% de  $CO_2$  inhibe sa croissance. Il en est de même pour *A. ochraceus* (Pfohl-leszkowicz, 2001).

### II.3.2.5. Nature du substrat

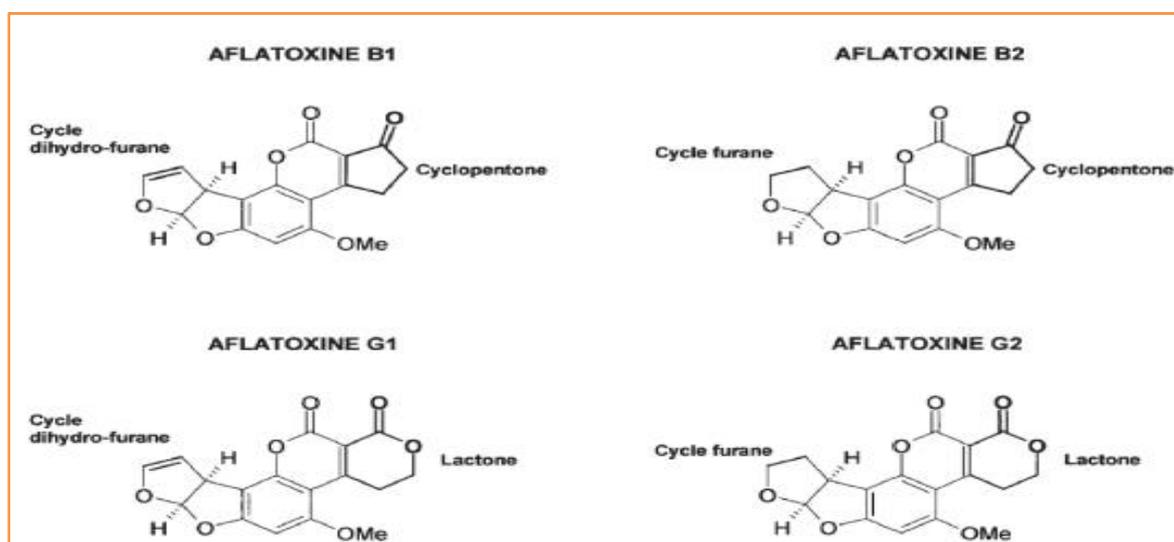
La toxicogénèse dépend étroitement de la denrée sur laquelle les moisissures se développent ; en général, la biogénèse des aflatoxines et de l'OTA, est favorisée tout d'abord par la présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin la présence des protides (Lund *et al.*, 2003). La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*, alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

## II.4. Les aflatoxines

La « maladie X du dindon », qui a sévi en Angleterre au début des années 1960, a permis de mettre en lumière l'existence des toxines de moisissures présentes dans les farines d'arachides importées d'Amérique latine (Austwick, 1978), habituellement consommées par les volailles et contaminées par des souches d'*Aspergillus*. Le terme d'aflatoxine (AFL) a été attribué à ces toxines en référence à *Aspergillus flavus* considéré comme premier champignon identifié responsable de leur sécrétion (Asao T., et al., 1965).

### II.4.1. Structure des aflatoxines

Les Aflatoxines forment un groupe de 18 composés structurellement proches, dont quatre sont les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments. Il s'agit des aflatoxines B1, B2, G1, G2 ainsi que M1 dans le lait (Yannikouris et Jouany, 2002). Ce groupe de toxines est issu de la voie des polycétoacides. Les AFLs sont constituées d'un cycle coumarinique et de deux furanes, auxquels peuvent être accolés un cycle pentone (Aflatoxines B et M) ou un cycle lactone hexagonal (Aflatoxines G). Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base.



**Figure 6:** Structure des aflatoxines, B1, B2, G1, G2 (S. Firmin., 2011).

### II.4.2. Origine et conditions de production des aflatoxines

Il existe trois principales souches productrices d'aflatoxines, appartenant toutes au genre *Aspergillus*, on en cite *A. flavus*, *A. nomius* et *A. parasiticus* (Castegnaro M., et Pfohl-Leszkoicz A., 2002). *Aspergillus flavus* produit essentiellement les Aflatoxines du groupe B (Wicklów D.T., et Shotwell O.L., 1983), quant à *Aspergillus parasiticus*, et *A. nomius*,

elles sécrètent les quatre principales aflatoxines appartenant aux groupes B et G (Dorner J.W., *etal.*, 1984 ; Creppy, 2002).

La production d'aflatoxines se manifeste à des activités de l'eau ( $a_w$ ) élevées de 0.93 à 0.98, ce qui signifie que l'humidité excessive des grains favorise leur production (Gelinas, 1995), toute fois, la sécheresse et les températures élevées contribuent également à la toxigenèse (Pfohl-Leszkowicz A, 1999).

#### **II.4.3. Propriétés physico-chimiques des aflatoxines**

Les aflatoxines sont des molécules de faibles poids moléculaires (312 à 330 g/mol) de nature non protéique très résistantes aux procédés de transformations alimentaires tels la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin *et al.*, 2013). Elles sont très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants apolaires et très solubles dans les solvants polaires comme le chloroforme et le méthanol (Pfohl-Leszkowicz A., 1999). Elles présentent aussi une forte résistance aux traitements thermiques comme la congélation, la pasteurisation ou encore la stérilisation. La température minimale de décomposition s'élève à 237°C et peut atteindre 299°C pour les structures les plus thermostables telles que les aflatoxines M (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

### **II.5. L'ochratoxine A (OTA)**

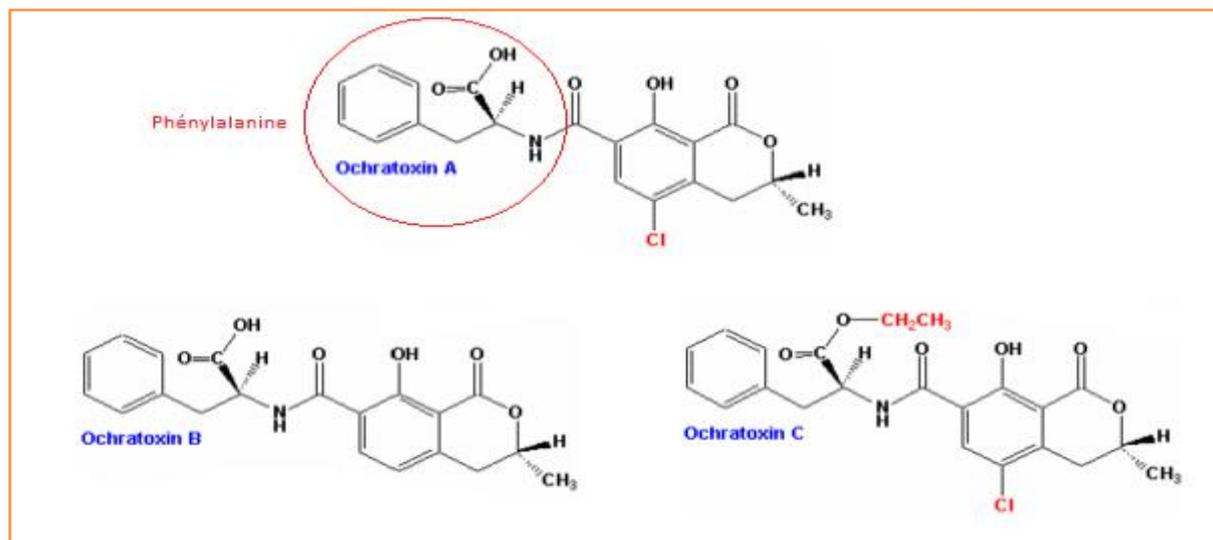
C'est en 1969 que l'ochratoxine A fut isolé pour la première fois par des chercheurs sud-africains à partir de souches d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe K.J, Steyn P.S., *et al.*, 1965). À ce jour, neuf ochratoxines ont été identifiées. De toutes les ochratoxines, c'est l'OTA qui est la plus abondante mais aussi la plus toxique (Brochard G et Le Bacle C., 2009).

Chez l'homme, l'OTA est associée à la survenue d'une pathologie nommée néphropathie endémique des balkans (Mally *et al.*, 2007). Cela consiste en une très forte anémie puis une insuffisance rénale.

#### **II.5.1. Structure de l'ochratoxine A**

De formule brute  $C_{20}H_{18}ClNO_6$  (Weidenburner M., 2001). L'Ochratoxine A est un métabolite secondaire constitué d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydrocoumarine couplée, par une liaison peptidique à la L-phénylalanine (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

Cependant, il existe d'autres ochratoxines comme l'OTB qui est le dérivé non chloré de l'OTA et l'OTC qui est son ester éthylique (Weidenburner, 2001), ce qui caractérise l'OTA est sa toxicité étant supérieur à celle de l'OTB, et inférieur à celle de l'OTC (Cole *et al.*, 2003).



**Figure 7:** Structures chimiques des ochratoxines A, B et C (Alban G., 2016).

### II.5.2. Origine et conditions de production de l'ochratoxine A

L'OTA est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.).

Le genre *Aspergillus* s'adapte aux climats chauds contaminant les oléagineux et les céréales. En effet, l'OTA est produite de manière optimale par *Aspergillus ochraceus* à une température de 28°C, qui peut toutefois s'abaisser à 15°C, et à une  $a_w$  de 0,79 (Trenk H.L et Butz M.E, 1991), alors que *Penicillium* se développe dans les climats tempérés, *Penicillium viridicatum* a la possibilité de produire de l'OTA dans un large intervalle de températures allant de 4 à 30°C, et pour une  $a_w$  allant de 0,83 à 0,90 (Mislivec P.B., et Tuite J., 1970) (Norholt M.D., et Van Egmond H.P., 1979).

### II.5.3. Propriétés physico-chimiques de l'ochratoxine A

L'OTA est un acide organique faible de pKa égal à 7,1 se présentant sous forme d'un cristallin blanc ayant une masse molaire de 403,8 g/mol (Pohland A.E, Schüller P.L, *et al.*, 1982), elle possède une propriété de résistance face aux procédés industriels de transformation en raison de la stabilité de sa structure chimique (Müller H.M., 1982), et est complètement dégradée par un excès d'hypochlorite de sodium NaClO 4% (Castegnaro M., Berek J., *et al.*, 1991). Lorsqu'elle est sous forme cristallisée dans le benzène, son point de fusion est de 90°C, et il est de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène (Pohland A.E., Schüller P.L., Steyn P.S., *et al.*, 1982).

## **II.6. Toxicité de l'Ochratoxine A et de l'Aflatoxine**

Parmi les mycotoxines identifiées et répertoriées, seulement une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes pour l'homme sur les points de vue agro-alimentaire et sanitaire faisant l'objet d'une surveillance régulière, les plus importantes sont les aflatoxines, les ochratoxines, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, la patuline, les trichotécènes et aussi le déoxynivalénol (Bennett et Klich, 2003).

Les effets des mycotoxines sur la santé humaine et animale sont variés, cependant certaines exercent un effet cancérigènes (aflatoxines, patuline , ochratoxines) , d'autres se révèlent hépatotoxiques (aflatoxines, fumonisine) , immunotoxique (aflatoxines, ochratoxines, fumonisines, trichotécènes) , oestrogéniques (Zéaralénone), neurotoxiques (trichotécènes) , et même néphrotoxiques ( ochratoxines ) (CAST, 2003; AFSSA, 2009)

**Tableau 3:** Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leurs occurrences dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST, 2003; AFSSA, 2009)

<b>Mycotoxines</b>	<b>Effets possibles pour la santé humaine</b>	<b>Denrées alimentaires</b>
<b>Aflatoxines</b> (Lunn <i>et al.</i> , 1999; Leonget <i>al.</i> , 2010)	Maladies reliées au foie (hépatotoxique, hépatocancérogène), effets cancérigènes et tératogène, hémorragies (tractus intestinal, rénal), répressions immunitaire.	Arachides, noisettes, céréales (maïs), lait, épices
<b>Fumonisines</b> (Chu and Li, 1994; Edrington <i>et al.</i> , 1995)	Œdèmes pulmonaires, néphro- et hépatotoxique, répressions immunitaires.	Maïs
<b>Tricothécènes</b> (Arunachalam and Doohan, 2013; Pettersson, 1995)	Dérèglements digestifs (vomissements, diarrhées), perte de masse, hémorragies (estomac, cœur, intestin, poumons, vessie), lésions orales, dermatite, infertilité, dégénérescence de la moelle osseuse, répressions immunitaires.	Céréales (blé, orge)
<b>Zéralénone</b> (Maragos, 2010; Zinedine <i>et al.</i> , 2007)	Œstrogéniques, œdème de la vulve, prolapsus du vagin, élargissement de l'utérus, atrophie des testicules, atrophie des ovaires, infertilité, avortement.	Maïs, blé
<b>Ergot alcaloïdes</b> (Baconet <i>et al.</i> , 1986; Alderman <i>et al.</i> , 1998)	Gangrènes, hallucinations, convulsions	Seigle
<b>Patuline</b> (Cano-Sancho <i>et al.</i> , 2009; Mahfoud <i>et al.</i> , 2002)	Mutagéniques, génotoxiques, carcinogéniques	Fruit (pommes, poires)
<b>Ochratoxines</b> Heussner and Bingle, 2015 Studer-Rohr <i>et al.</i> , 1995)	Néphrotoxiques, carcinogéniques, répressions immunitaires	Céréales (blé, maïs), vin, raisin, jus de raisin

### **II.6.1. Mécanisme d'action de l'aflatoxine**

L'aflatoxine B1 est considérée comme la plus toxique des mycotoxines ayant pour cible principale le foie (Sudakin, 2003). Elle est responsable donc, en partie, du cancer du foie (Jackson et Groopman, 1999). D'après Yiannikouris et Jouany (2002), à ce niveau, L'AFB1 est transformée en 8 métabolites généralement moins toxiques que leurs précurseurs, ces derniers vont ensuite, soit interagir en tant qu'intercalant en se liant avec des liaisons covalentes aux acides nucléiques (Bren *et al.*, 2007) entraînant la formation de cellules cancéreuses, soit ils seront conjugués à des nucléophiles solubles afin d'être excrétés en dehors de l'organisme.

### **II.6.2. Mécanisme d'action de l'ochratoxine A**

L'ochratoxine A est d'abord absorbée au niveau de l'estomac et peut être hydrolysée en :  
Dérivés non toxiques tels que l'OTA<sub>α</sub> généré par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine au niveau de l'intestin (Jard, 2009).

Dérivés toxiques tels que le O-CH<sub>3</sub>-OTA et les dérivés quinones OTAQ/OTAHQ issus de l'oxydation chimique et enzymatique (essentiellement par le système microsomal à cytochrome P450) au niveau hépatique, qui sont impliqués dans la toxicité de l'OTA par induction de stress oxydant causant soit des dommages oxydatifs cellulaires directs suite à la génération excessive de radicaux libres (radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle), soit une réduction de la transduction des signaux cellulaires et la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans la promotion de l'apoptose (Abidellah N. *et al.*, 2011).

De plus l'ochratoxine A affecte la synthèse des macromolécules cellulaires telles les acides nucléiques mais principalement la synthèse protéique ; en effet, l'OTA perturbe la synthèse protéique chez les procaryotes et les eucaryotes par inhibition compétitive de la partie phénylalanine d'une enzyme « Phe-tRNA Phesynthase » impliquée dans la réaction d'aminacylation du « tRNA<sup>Phe</sup> », ainsi, l'élongation peptidique est bloquée et la synthèse protéique est arrêtée au niveau post-transcriptionnel (Abidellah N. *et al.*, 2011).

L'inhibition de la synthèse protéique, à elle seule, ne peut pas expliquer la diversité des effets toxiques de l'OTA à savoir la peroxydation lipidique, les dommages d'ADN et la perturbation de l'homéostasie calcique (Abidellah N. *et al.*, 2011).

## **II.7. Méthode de dosage des aflatoxines et de l'ochratoxine A**

L'identification et la quantification des aflatoxines dans les denrées alimentaires constituent un défi majeur pour garantir la sécurité sanitaire des aliments. Par conséquent, le développement

de méthodes analytiques réalisables, sensibles et robustes est primordial pour l'identification et la quantification des mycotoxines présentes en faibles concentrations dans les aliments. Avant le dosage, trois étapes préliminaires (extraction, purification et concentration) sont indispensables afin d'assurer un dosage correcte.

### **II.7.1. Méthodes physico-chimiques**

On retrouve la chromatographie sur couche mince CCM pour une caractérisation qualitative et semi-quantitative (Par mesure de la grosseur de la tache). Elle comprend une phase stationnaire, constituée d'une couche mince de matériel absorbant (gel de silice), qui est plongée dans une phase mobile liquide (éluant), composée d'un solvant qui va obliger les molécules à se séparer le long de la phase stationnaire. Cette méthode est fondée sur les différences d'affinité des composés vis-à-vis des deux phases.

La CCM a ensuite été remplacée par la chromatographie liquide de haute performance HPLC qui est plus spécifique et plus sensible où l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire de faible granulométrie. L'augmentation de la pression dans le système est due au fort débit d'écoulement de l'éluant. La HPLC est préférée à la CCM en raison de ses bons facteurs de sensibilité, détectabilité et spécificité ; En revanche, elle reste la méthode chromatographique la plus coûteuse (Jeunot B., 2005).

### **II.7.2. Méthodes immuno-chimiques**

On retrouve la méthode Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) reposant sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la mycotoxine recherchée. Cette méthode peut créer des faux positifs qui entraînent une surestimation des résultats (Barna-Vetro *et al.*, 1994).

On voit actuellement se développer une technique de détection plus coûteuse, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La chromatographie en phase gazeuse est surtout utilisée pour la détection de molécules du groupe des trichothécènes dans les céréales, avec détection par capture d'électrons ou spectrométrie de masse.

## **II.8. Méthode rapide de détection de l'aflatoxine et de l'ochratoxine A**

Le présent travail a été initié et réalisé dans le laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS Kouba, suivant la méthode décrite par Riba (2008).

Il porte sur la vérification de production des mycotoxines appartenant à la collection des souches du laboratoire LBSM, isolées à partir des grains de blé, produites par 2 types de souches :

- Souches productrices d'aflatoxines : *A. parasiticus* et *A. flavus*.
- Souches productrices d'ochratoxine A: *A. alliaceus* et *A. carbonarius*.

### II.8.1. Préparation du milieu de culture

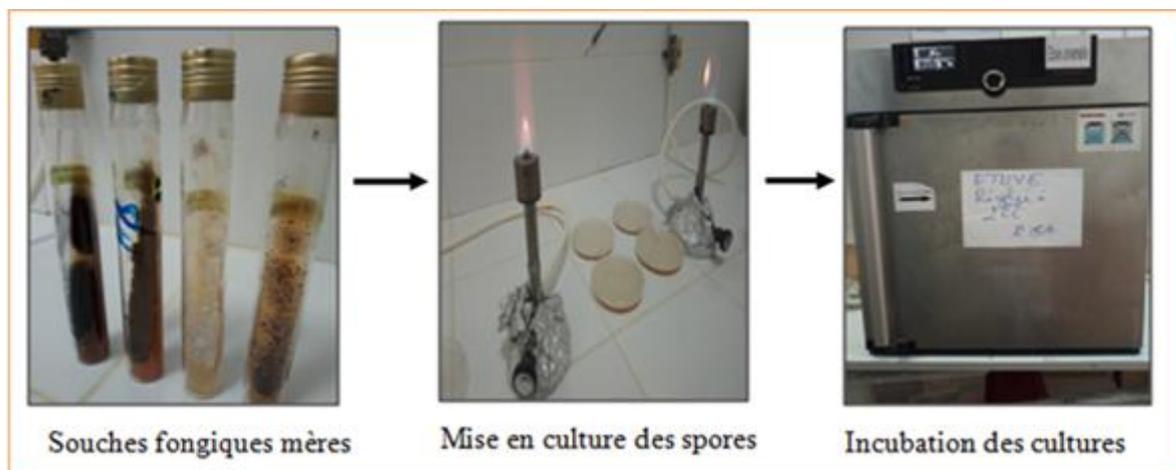
Pour cette expérience, le milieu CAM (coconut agar medium) a été choisi suivant la méthode décrite par Riba (2008). 50 g de noix de coco râpées ont été portées à ébullition dans 200 ml d'eau distillée, ensuite la solution a été filtrée à l'aide d'une compresse stérile. Le filtrat est supplémenté de 4 g d'agar (20 g /litre). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à 121°C/15 minutes. Le pH final est de 7.

### II.8.2. Repiquage des souches

Dans un environnement stérile entre deux becs benzène, à l'aide d'une anse préalablement flambée, nous avons prélevé une fraction de spores dans le cône stérile à partir de chaque souche fongique mère déjà enculture dans des tubes à essai séparément.

Par la suite, nous avons procédé à l'ensemencement de ces spores, en piquant l'anse au centre de chaque boîte Pétri, précédemment préparée avec le milieu CAM et étiquetée pour chaque espèce.

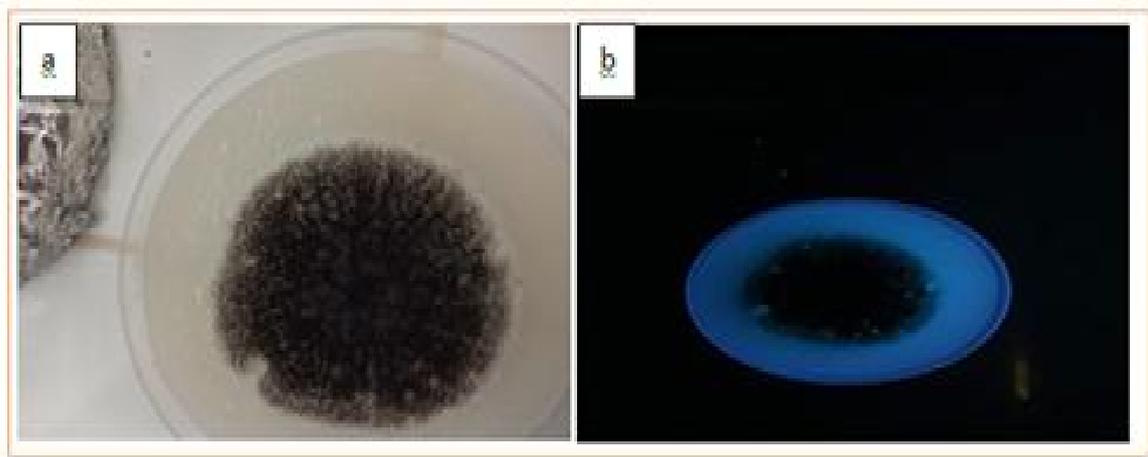
Une fois les boîtes bien fermées, nous les avons mises en incubation dans l'étuve à 28°C pendant 6 jours.



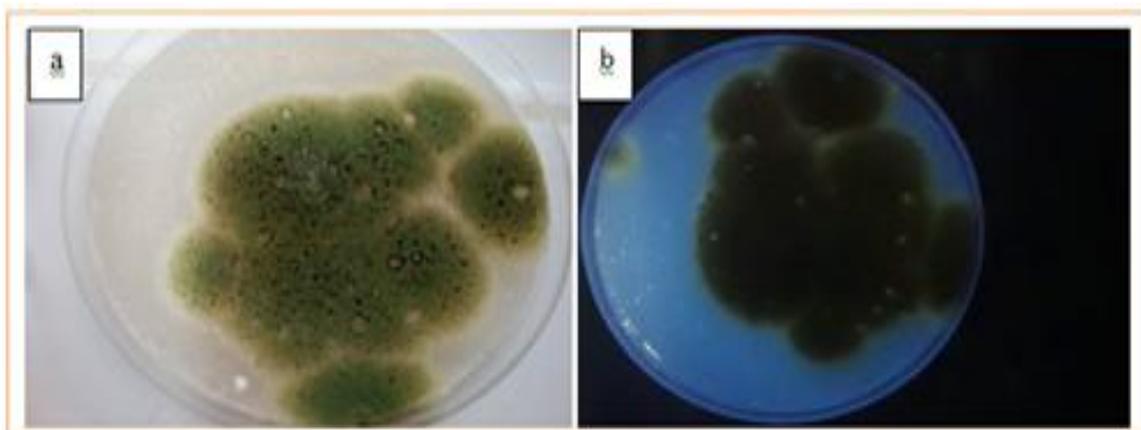
**Figure 8:** Etapes d'ensemencement des spores.

### II.8.3. Visualisation des mycotoxines

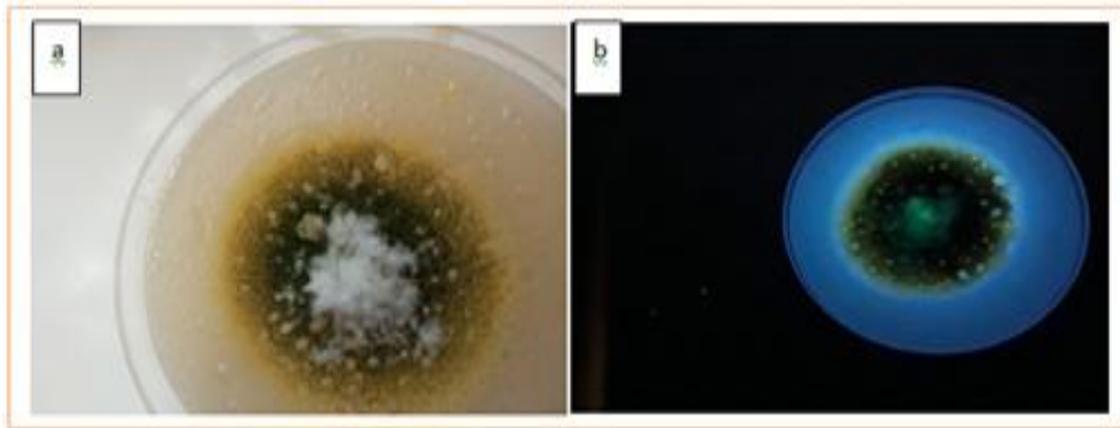
Nous avons préalablement stérilisé la chambre de l'appareil avec de l'alcool puis introduit séparément nos boîtes fermées que nous avons ouvert une fois à l'intérieur pour éviter toute contamination externe, afin de vérifier la fluorescence des mycotoxines produites à une longueur d'onde de 365 nm.



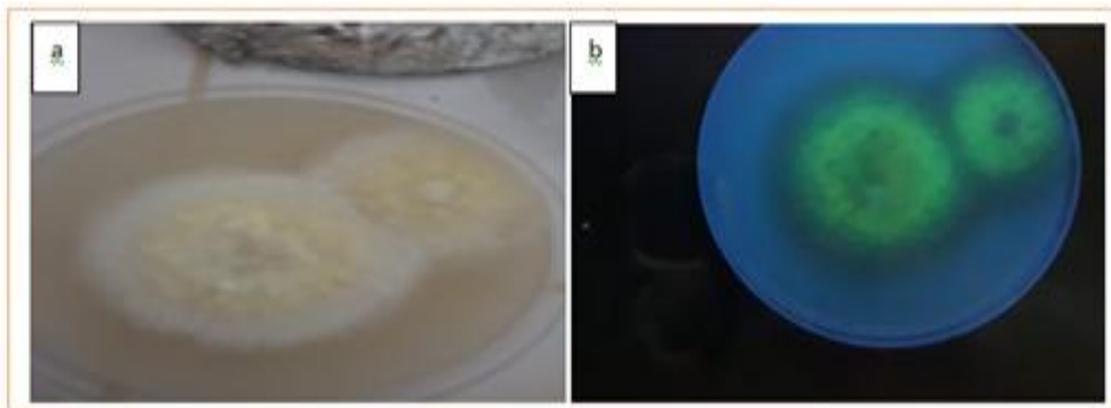
**Figure 9:** (a) Aspect macroscopique d'*A. carbonarius* après incubation. (b) Aspect macroscopique *A. carbonarius* sous lampe UV (absence de fluorescence).



**Figure 10:** (a) Aspect macroscopique d'*A. flavus* après incubation. (b) Aspect macroscopique *A. flavus* après incubation sous lampe UV (Absence de fluorescence).



**Figure 11:** (a) Aspect macroscopique d'*A. parasiticus* après incubation. (b) Aspect macroscopique d'*A. parasiticus* après incubation sous lampe UV (Fluorescence bleue autour du mycélium et verte au milieu).



**Figure 12:** (a) Aspect macroscopique d'*A. alliaceus* après incubation. (b) Aspect macroscopique *A. alliaceus* après sous lampe UV (Fluorescence verte au milieu de la colonie mycélienne).

#### II.8.4. Résultats et discussion

Les deux souches *A. alliaceus* et *A. parasiticus* montrent des résultats concluants correspondant à une fluorescence verte et bleue respectivement, ce qui indique la production d'ochratoxine A et d'aflatoxines B et G respectivement. Les deux autres souches, *A. carbonarius* et *A. flavus* ne présentent aucune fluorescence.

Parmi les aspergillus, on retrouve celles qui ne produisent que des aflatoxines B notamment *A. flavus*, et celles qui produisent les deux types d'aflatoxines B et G, comme *A. parasiticus* (Dorner J.W., Cole R.J., Diener U.L., 1984). Les aflatoxines B émettent de manière intense une fluorescence bleue, tandis que les aflatoxines G émettent une fluorescence verte sous lumière UV à 365 nm (Asao Tet al., 1965). Ceci correspond au résultat obtenu lors de notre

visualisation d'*A. parasiticus* ayant émis une légère fluorescence bleu autour de la culture, et une fluorescence verte au centre, affirmant que cette espèce produit les deux aflatoxines B et G.

L'ochratoxine A exposée aux rayons UV, émet une fluorescence caractéristique verte (Azemar B., 2001), en effet dans notre expérience *A. alliaceusa* émis une fluorescence verte au centre de la colonie mycélienne sous lampe UV à 350 nm.

En ce qui concerne les souches *A. flavus* et *A. carbonarius* qui n'ont pas montré de fluorescence, nous suggérons que les souches ont perdu leur pouvoir de production de mycotoxines à cause d'une longue conservation ou à cause des repiquages répétés de la souche. Il est connu que le pouvoir de production des mycotoxines peut être diminué sensiblement ou perdu complètement à cause de repiquages et de conservation à +4°C. L'idéale est de conserver la souche au congélateur dans du glycérol à 30%.

## Chapitre III

# Lutte biologique contre les mycotoxines

---

## Introduction

Étant donné leur effet toxique important sur la santé humaine et animale, plusieurs méthodes ont été utilisées afin de diminuer le risque de prolifération des moisissures et la production des mycotoxines après la récolte, à commencer par des stratégies préventives, évitant la contamination des futures cultures par la gestion des résidus de culture précédentes (Barrier-Guillot *et al.*, 2007), en effet, le tri et l'élimination des grains contaminés permet d'éviter la propagation des toxines ; puis par des stratégies d'élimination comprenant des méthodes chimiques et physiques (Schnürer et Magnusson, 2005). Parmi ces méthodes, on peut citer :

- Les méthodes physiques
  - Les radiations : utilisées par exemple pour la diminution du taux de l'AFB1, en cause de sa sensibilité aux ultraviolets, rayons x et rayons  $\gamma$  (Afifi *et al.*, 2003).
  - Dégradation thermique par extrusion : ce procédé implique le passage de la denrée contaminée à plus de 150°C entraînant des modifications moléculaires qui gélatinisent l'amidon, dénaturent les protéines, et de ce fait inhibent les activités enzymatiques, cependant cette technique permet d'éliminer les aflatoxines, le DON, la ZEA et la FB1, notamment dans le maïs (Voss *et al.*, 2008).
- Les méthodes chimiques
  - Les conservateurs chimiques acides : tels que les acides sorbique, benzoïque et propionique...etc(Gould, 1996). Selon Davidson (2001), le benzoate et le benzoate de sodium sont principalement utilisés comme des agents antifongiques efficaces.
  - Les conservateurs chimiques basiques : tels que l'ammoniaque particulièrement efficace contre l'AFB1 lors de son utilisation simultanée à de hautes températures et de hautes pressions; en plus de la détérioration de la qualité sanitaire de l'aliment, cette spécificité représente un point négatif pour son utilisation (Huwig *et al.*, 2001).
  - Les agents oxydants : ozone, peroxyde d'hydrogène, eau oxygénée...etc, l'étude de Canadas (2006) portée sur l'efficacité du procédé Oxygreen® permettant d'obtenir un grain plus sain en utilisant de l'ozone sur des céréales contaminées par de l'OTA, a permis de conclure que ce produit ne peut pas donner un blé sain à partir d'un blé contaminé, en raison des effets secondaires qui peuvent survenir, comme l'apparition d'adduits à l'ADN.
  - Les agents réducteurs tel que le bisulfite de sodium qui permet de réduire le taux de mycotoxines (AFB1, DON) dans certains aliments (Kabak *et al.*, 2006).

Il s'est avéré qu'aucune des stratégies citées n'a encore été capable de réduire la présence de mycotoxines complètement car certaines moisissures ont acquis une résistance aux traitements chimiques (Davidson, 2001).

Selon des recherches faites par plusieurs auteurs, on a pu conclure que certaines de ces techniques, pourraient faire plus de mal que de bien pour la santé (Quillien, 2002), c'est pour cette raison que le règlement européen interdit les décontaminations chimiques pour les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine (Fangeat Loïc, 2008).

### III.1. Lutte biologique et bioconservation des aliments

L'amélioration de la qualité sanitaire des aliments est rendue envisageable par l'utilisation de microorganismes « détoxifiants », il s'agit de la « Bioconservation » où un organisme est utilisé afin de contrôler un autre organisme (Magnusson *et al.*, 2003). Cette méthode consiste à inoculer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit (Rodgers, 2001).

De nos jours, la lutte biologique se fait grâce à l'utilisation de probiotiques telles que les bactéries lactiques, en vue d'augmenter la durée limite de conservation (DLC) et de lutter contre les pathogènes dans différentes denrées alimentaires (Ross *et al.*, 2002), notamment :

- Les céréales et ses dérivés : selon Muhialdin *et al.* (2011), *Ln. fermentum* Te007, *PC. pentosaceus* et *Lb. Pentosus*G004 sont des souches capables d'inhiber la germination des conidies d'*A. niger* pour une durée de 12, 16, 21 jours respectivement dans le pain.
- Les produits laitiers : Li H-jet *et al.* (2011) ont trouvé que l'ajout de 2% de la souche *Lb. casei* AST18 inhibe la croissance de *Penicillium sp.* dans le yaourt, et d'après les expériences de Crowley *et al.* (2012), les souches *Lb. plantarum* 16 et 18 maintiennent un effet fongistatique dans le yaourt à 4°C pendant 30 jours.
- Les viandes et leurs dérivés : les viandes sont un excellent substrat pour les champignons toxigènes suite à leur altération précoce (Dijksterhuis et Samson, 2007), la souche *Lb. acidophilus* NCDC 291 est utilisée comme bioconservateur pour la viande de poulet car elle est capable d'éliminer *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium* (Garcha S. et Natt N.K., 2012).

### III.2. Les bactéries lactiques en tant que bioconservateurs

Parmi les antagonistes biologiques naturels, on retrouve les bactéries lactiques qui aujourd'hui sont très utilisées dans plusieurs procédés de fermentation.

Elles sont non pathogènes et comptées pour la majorité parmi les microorganismes « GRAS » par la « Food and Drug Administration » (Trias *et al.*, 2008). Elles peuvent aussi représenter une alternative intéressante aux méthodes physiques et chimiques, de plus elles sont connues pour leurs fortes activités antimicrobiennes.

Cependant, l'activité antifongique des souches lactiques reste à être élucidée. Un nombre limité de rapports ont montré qu'une bonne sélection de LAB pourrait permettre de contrôler la croissance des moisissures et donc de la production des mycotoxines, permettant d'améliorer la durée de conservation de nombreux aliments (Gourama et Bullerman, 1995).

### III.3. Pouvoir antifongique des bactéries lactiques

Les mécanismes d'action des substances antimicrobiennes des bactéries lactiques sont peu connus à cause de leurs complexités, des interactions qui existent entre différents composés (Niku-Paavola *et al.*, 1999) et de la sensibilité de la majorité des moisissures aux produits de fermentation tels que l'acide lactique et l'acide acétique (Bonestroo *et al.*, 1993; Lindgren et Dobrogosz, 1990 ; Piard et Desmazeaud, 1992).

Selon Magnusson *et al.* (2003), trois mécanismes peuvent expliquer l'efficacité antifongique des LAB : un rendement intéressant en acide organique, la production de composés antagonistes et la compétition pour les nutriments.

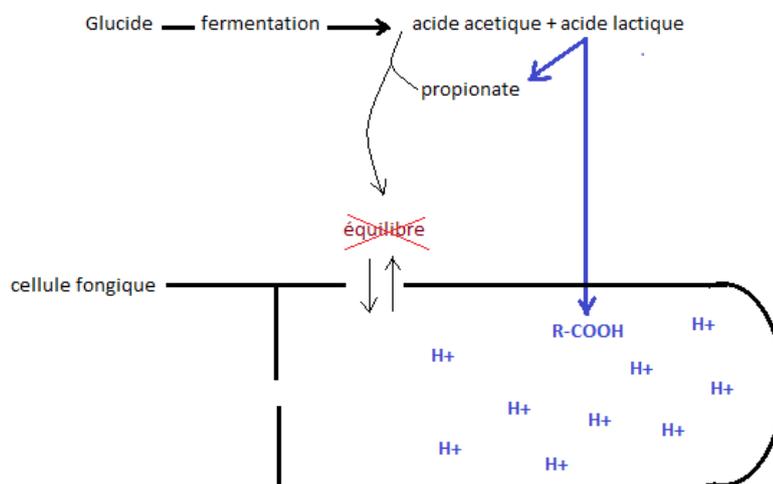
#### III.3.1. Acides organiques

Suite à la fermentation des glucides par les LAB, il y a production de deux principaux acides, l'acide lactique ( $C_3H_6O_3$ ), et l'acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ) (Dalié *et al.*, 2010)(Makhloufi, 2011) ; Ces deux acides vont causer la réduction du pH, induisant l'inhibition de la prolifération de nombreux micro-organismes toxigènes (Eklund, 1989). Dans le cas des LAB hétérofermentaires dites propioniques, une partie de l'acide lactique est convertie en propionate et acétate accompagné d'une production de  $CO_2$  (Reis *et al.*, 2012).

La diffusion du lactate sous forme non dissocié à travers la membrane, et sa dissociation à l'intérieur de la cellule va libérer des ions  $H^+$  qui vont acidifier le cytoplasme (Piard et Desmazeaud, 1991), la cellule va dans ce cas utiliser son énergie pour essayer de rétablir l'équilibre en créant un gradient de protons au travers de la membrane cytoplasmique, de ce fait la croissance bactérienne sera fortement réduite (Charlier *et al.*, 2009).

Le propionate et l'acétate interagissent avec la membrane fongique en neutralisant le gradient électrochimique des protons, provoquant une répression de la croissance des cellules cibles. Ces deux acides dépendent souvent de la diminution du pH causée par l'acide lactique (Eklund, 1989; Freese, Sheu, et Galliers, 1973). Cependant l'acide propionique réduit la croissance des champignons, particulièrement à des pH bas (Woolford, 1984a), et affecte les membranes fongiques à des pH inférieurs à 4,5 (Hunter et Segel, 1973). Ces deux acides ont un effet inhibiteur sur l'absorption des acides aminés et donc du développement des cellules (Eklund, 1989; Freese *et al.*, 1973). Les sels d'acide propionique, tels que le propionate de sodium et le propionate d'ammonium, ont un effet similaire contre les levures et les moisissures filamenteuses

à un pH faible (Woolford, 1984b). Néanmoins, plusieurs LAB possèdent un système de tolérance à l'acidité « Acid Tolerance Response » qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner leur métabolisme (Van de Guchte *et al.*, 2002).



**Figure 13:** Représentation schématique du mode d'action des acides organiques sur une cellule fongique.

### III.3.2. Composés antagonistes

Auparavant, on pensait que les acides organiques étaient les principaux agents antifongiques en raison de l'abaissement du pH. Entre autre, les auteurs ont montré que l'activité antifongique de ces composés seuls était trop faible pour expliquer pleinement l'activité antifongique observée (Niku-Paavola, M.L *et al.*, 1999) (Ndagano, D ., 2011). De ce fait, d'autres métabolites ont été désignés comme source d'activité antifongique, incluant les composés protéiques, les acides gras, les composés phénoliques, le peroxyde d'hydrogène (Broberg, A *et al.*, 2007)(Sadiq, F.A *et al.*, 2019)ainsi que la reutérine (Nakanishi *et al.*, 2002).

### III.3.3. Compétition pour les nutriments

La compétition pour les nutriments est expliquée par le fait de la forte exigence nutritionnelle des bactéries lactiques, qui envahissent tout le milieu et limitent ainsi la multiplication des autres micro-organismes (Castellano *et al.*, 2008). Les champignons sont très sensibles à cette concurrence car des nutriments externes sont nécessaires à la germination des conidies, à la croissance du tube germinatif et à la réussite de l'infection (Elad et Stewart, 1970).

Un autre processus a été prouvé comme étant efficace permettant une immobilisation des substances mycotoxiques, il s'agit du phénomène d'adsorption. En effet, certaines mycotoxines vont se lier au peptidoglycane qui est attaché à la paroi cellulaire des bactéries lactiques par des

composés d'adhésion tels que l'acide téichoïque. (Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009). Ce phénomène est illustré dans l'étude faite par (Del Prete V *et al.*, 2007) dans la partie « Etat de l'art sur le biocontrôle des mycotoxines ».

### **III.4. Facteurs influençant l'activité antifongique des LAB**

Afin de bien sélectionner les LAB ayant un fort potentiel antifongique, il est nécessaire d'avoir des connaissances approfondies sur les paramètres qui modulent leur activité antifongique. Dans le but de son optimisation, plusieurs paramètres sont pris en compte, y compris la température, le temps d'incubation, le pH et le milieu de croissance (Batish *et al.*, 1997).

#### **III.4.1. Période et température d'incubation**

L'activité antifongique de la souche *Lb. acidophilus* était maximale à 30°C après 48 h d'incubation, l'augmentation de cette période a entraîné une diminution considérable des métabolites antifongiques. Cette diminution a été imputée à une métabolisation des composés actifs ou à leur dégradation enzymatique (Batish, Lal, et Grover, 1990).

Ces deux facteurs sont essentiels et complémentaires, ils permettent de moduler la croissance de la bactérie lactique et donc d'affecter de manière significative la quantité des métabolites antifongiques produits (Batish *et al.*, 1997).

#### **III.4.2. pH**

Le pH est un paramètre clé de la production de métabolites antifongique. Ainsi la souche *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* atteint une production optimale de substances antifongique à pH 6,8, et poursuit leur production mais à des quantités moins importantes dans une gamme de pH assez étroite de 5,5-7 (Batish *et al.*, 1997; Sathe *et al.*, 2007).

#### **III.4.3. Effet du milieu de culture**

Batish *et al.* (1990), ont démontré que *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* pouvait produire un maximum de métabolites antifongiques dans le bouillon Elliker que dans d'autres milieux de culture tels que le bouillon MRS, bouillon nutritif, ou bien dans du bouillon dextrose où la production était négligeable à inexistante. Le bouillon Elliker s'est aussi avéré être le meilleur milieu pour la production de composés antifongiques par la souche *Lc. lactis* subsp. *lactis* CHD 28.3 contre *A. flavus* IARI, comparé aux milieux M17 et MRS (Batish *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 1996).

La présence de composés nutritionnels est considérée aussi comme un facteur influençant la production de composés antifongiques. Effat *et al.* (2001) ont étudié l'influence de ce facteurs sur la production de métabolites antifongiques par *Lb. rhamnosus* et *Pc. acidilactici*, ils ont alors

indiqué que l'extrait de levure et le glucose, ainsi que le NaCl et le CaCl<sub>2</sub> modulaient la production de ces substances.

La supplémentation du bouillon avec du CaCl<sub>2</sub> a augmenté la production de substances antifongiques. Un rendement maximal a été alors observé lorsque la concentration de CaCl<sub>2</sub> est passée de 0,05% à 0,15%.

Selon les expériences faites par Gourama et Bullermnan (1997), il s'est avéré que les facteurs cités précédemment sont dépendants l'un de l'autre, du fait qu'un changement de pH par exemple pourrait affecter l'activité antifongique même si les autres facteurs sont optimaux.

# Chapitre IV

## Etat de l'art sur le biocontrôle des mycotoxines

---

## **Introduction**

Depuis leur découverte en 1960, les mycotoxines sont devenues le sujet d'interaction multidisciplinaire des scientifiques du monde entier. Dès lors, de nombreuses mycotoxines potentiellement dangereuses pour l'homme et l'animal ont été découvertes (Richard, 2007).

La présence des mycotoxines sur de nombreux produits agricoles justifie l'attention croissante qui leur est portée. Ce chapitre est consacré à rapporter quelques travaux de recherches réalisés dans le domaine du biocontrôle des mycotoxines en utilisant les LAB, afin de répondre à notre problématique.

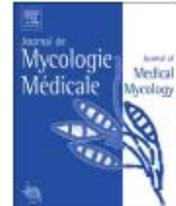
## IV.1. Articles 01 : Les bactéries lactiques en tant qu'agents probiotiques inhibiteurs de la croissance d'*Aspergillus flavus*, *A. niger* et de *Penicillium chrysogenum*.

Journal de Mycologie Médicale (2015) 25, 263–267



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

### Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*



*Les bactéries lactiques en tant qu'agents probiotiques pour l'inhibition de la croissance d'Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. niger et de Penicillium chrysogenum*

S. Abbaszadeh <sup>a</sup>, R. Tavakoli <sup>b</sup>, A. Sharifzadeh <sup>c</sup>, H. Shokri <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>b</sup> Health School, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>c</sup> Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>d</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, 24th aftab, Imam Khomeini Street, P.O. box 46168–49767, Amol, Iran

Received 27 May 2015; received in revised form 21 October 2015; accepted 21 October 2015

Available online 17 November 2015

#### KEY-WORDS

Antifungal activity;  
Probiotic;  
*Lactobacillus*;  
*Bifidobacterium*;  
*Aspergillus*;  
*Penicillium*

#### Summary

**Objective.** – The aim of this study was to assess the potential of lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium bifidum* to inhibit the outgrowth of some common food-spoiling fungi including *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus* and *Penicillium chrysogenum*.

**Methods.** – Bacterial isolates were cultured on Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth and liquid cultures and supernatants were prepared. The antifungal activity was tested using the agar well diffusion method.

**Results.** – Both liquid culture and supernatant of *L. casei* isolate exhibited high antifungal activity, followed by *L. acidophilus* and *L. paracasei* isolates. The least activity was recorded for the isolates *B. bifidum*, while the isolate *L. rhamnosus* was moderately active against tested fungi. The antifungal activity of the supernatants obtained from all probiotic isolates against fungi was significantly less than that of liquid cultures ( $P < 0.05$ ). Antifungal activity evaluation

\* Corresponding author.

E-mail address: hshokri@ausmt.ac.ir (H. Shokri).

- **Résumé**

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel des bactéries lactiques (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*) à inhiber la croissance de quelques champignons d'altération comme *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus* et *Penicillium chrysogenum*.

- **Méthode suivie**

Test de l'activité antifongique :

- Culture des isolats sur milieu MRS à 37°C pendant 48h dans des conditions aérobies pour les *Lactobacillus* et anaérobie pour *B.bifidum* puis centrifugation des bouillons MRS à 11500 ×g pendant 10 min à 4°C pour l'obtention du CFS et stérilisation en utilisant des filtres à 0.45 µm.
- L'activité antifongique des CFS a été évaluée par la méthode de diffusion de puits d'agar, une suspension fongique est ajustée à 10<sup>5</sup> conidies/ml avec la cellule de comptage de Neubauer puis inoculée dans un milieu MRS solide.
- Réalisation de puits de 5mm de diamètre à l'aide des pipettes Pasteur, remplissage avec 20 µl de MRS. Ajout d'un volume de 100 µl de suspension de LAB et de leurs surnageants aux puits. Incubation à 30°C pendant 5 jours. Le PIFa été déterminé en mesurant la zone d'inhibition entourant chaque puits.

- **Résultats**

L'efficacité des souches de LAB et de leur CFS a été évaluée en mesurant le pourcentage d'inhibition fongique (IF) ainsi que le diamètre d'inhibition (ID). Selon les résultats, l'activité inhibitrice des surnageants est variable avec une moyenne de 24.8% et des zones d'inhibition allant de 11.2 à 16.7 mm pour la souche *L.casei* qui semble présenter la meilleure activité.

L'activité inhibitrice la plus faible est enregistrée pour *B. bifidum*, soit 7.8% avec une zone d'inhibition allant de 1.5 à 6mm. Ces résultats sont compatibles à ceux rapportés par (El Demerdash et Mostafa, 2008). Il a été déterminé que l'activité inhibitrice des surnageants d'isolats testés est inférieure contre les champignons par rapport à celle obtenue par la suspension de LAB. La culture liquide et le surnageant de *L. casei* ont montré la plus forte activité antifongique suivie par *L. acidophilus* et *L. paracasei*. De ce fait les souches, *L.rhamnosus*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.paracasei*, *B.bifidum*, montrent une inhibition plus élevée pour *A.parasiticus* produisant des aflatoxines de (14.5% ,22.9%, 24.1% ,20% ,2.6%) respectivement en suspension liquide et de (12.2% ,21.4% ,19.7% ,17.1% ,1.4%) respectivement en utilisant le CFS. Des résultats similaires ont été observés par (Denkova *et al.*, 2013).

On conclut de cette étude que l'inhibition des souches de *Lactobacillus* n'est pas seulement en raison de la formation des acides abaissant le pH, mais elle est due aussi à la compétition pour les nutriments ainsi qu'à la production de métabolites à effet antimicrobien.

## IV.2. Article 02 : Etude des potentialités des bactéries lactiques pour réduire la contamination par l'aflatoxine B1 et la fumonisine B1 des grains et épis de maïs.



Article

### Potential Application of Lactic Acid Bacteria to Reduce Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> Occurrence on Corn Kernels and Corn Ears

Tiago de Melo Nazareth <sup>1,2,\*†</sup>, Carlos Luz <sup>1,†</sup>, Raquel Torrijos <sup>1</sup>, Juan Manuel Quiles <sup>1</sup>, Fernando Bittencourt Luciano <sup>2</sup>, Jordi Mañes <sup>1</sup> and Giuseppe Meca <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain; carlos.luz@uv.es (C.L.); raquel.torrijos@uv.es (R.T.); juan.quiles@uv.es (J.M.Q.); jorge.manes@uv.es (J.M.)

<sup>2</sup> School of Life Sciences, Pontificia Universidade Católica do Paraná, st. Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, PR, Brazil; fernando.luciano@pucpr.br

\* Correspondence: tiago@uv.es (T.d.M.N.); giuseppe.meca@uv.es (G.M.); Tel.: +34-963-544-288 (T.d.M.N.); +34-963-544-959 (G.M.); Fax: +34-963-549-54 (T.d.M.N. & G.M.)

† Authors have contributed equally to the study and should be considered co-first authors.

Received: 29 November 2019; Accepted: 28 December 2019; Published: 31 December 2019

**Abstract:** Fungal spoilage is an important issue for the food industry, leading to food sensory defects, food waste, economic losses and public health concern through the production of mycotoxins. Concomitantly, the search for safer natural products has gained importance since consumers began to look for less processed and chemically treated foods. In this context, the aim of this study was to evaluate the antifungal and antimycotoxigenic effect of seven strains of *Lactobacillus plantarum*. Lactic acid bacteria (LAB) were grown on Man Rogosa Sharpe (MRS) broth at 37 °C in anaerobic conditions. After that, the cell-free supernatant (CFS) were recovered to determine its antifungal activity by halo diffusion agar test. In addition, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) was determined for each *L. plantarum* CFS by 96-well microplates method. Additionally, CFS was used as a natural biocontrol agent on corn kernels and corn ears contaminated with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*, respectively. The *L. plantarum* CECT 749 CFS showed the highest antifungal effect against all essayed strains. Moreover, the employment of this CFS in food reduced the mycotoxin production at a percentage ranging from 73.7 to 99.7%. These results suggest that the *L. plantarum* CECT 749 CFS could be promising for the biocontrol of corn.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; aflatoxin B<sub>1</sub>; fumonisin B<sub>1</sub>; biopreservation

**Key Contribution:** In vitro analyses showed that *Fusarium* spp. was more susceptible to *L. plantarum* spp. CFS treatment than *Aspergillus* spp. In situ, the CFS treatment did not completely avoid the fungal growth but in both cases, on corn kernel and corn ears, the content of mycotoxin was significantly reduced.

#### 1. Introduction

Filamentous fungi contaminate several types of food such as cereals, fruits and vegetables, dried fruits, feed products, dried spices, dried cured meats, and bread, among others [1–9].

*Aspergillus* and *Fusarium* are the major fungal genera associated with corn contamination [10]. Indeed, many *Aspergillus* and *Fusarium* species are considered common contaminants of food and

- **Résumé**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'emploi d'un surnageant exempt de cellules bactériennes (CFS) de sept souches de *Lactobacillus plantarum* comme agent de lutte biologique afin de réduire la croissance des souches d'*Aspergillus flavus* et de *Fusarium* sur les grains et épis de maïs en utilisant la méthode de confrontation et en mesurant le diamètre des zones d'inhibition, la concentration minimale fongicide MFC ainsi que la concentration minimale inhibitrice MIC pour chaque lactobacille par la méthode des microplaques à 96 puits. Le CFS des *Lactobacillus* a ensuite été utilisé comme agent de biocontrôle en utilisant des grains et des épis de maïs inoculés par des souches d'*A. flavus* ISPA 8111 et *F. verticillioides* CECT 2982 productrices respectivement d'AFB1 et de fumonisine B1.

- **Méthode suivie**

1. Préparation de surnageant exempt de cellules (CFS):
  - Incubation des LAB à 37°C pendant 12h dans un bouillon MRS.
  - Transfert de 10 ml du bouillon MRS à raison de 10<sup>7</sup> CFU/ml dans des tubes Falcon contenant 40 ml de bouillon MRS stérile.
  - Centrifugation à 4000 ×g pendant 10 min. Le surnageant CFS a été récupéré et conservé pendant 24h à -80°C.
2. Confrontation LAB/souches fongiques :
  - Repiquage des spores fongiques dans des boîtes contenant un milieu PDA à partir d'autres boîtes pétri remplies avec un milieu PDA contaminé avec les spores fongiques des 12 souches appartenant au genre *Aspergillus* et *Fusarium*.
  - Réalisation de puits de 10 mm de diamètre et remplissage avec 50µl de suspension de CFS précédemment lyophilisée, puis incubation de ces boîtes à 25°C pendant 72h.

L'effet antifongique a été déterminé en mesurant la zone d'inhibition autour des puits, si le diamètre est supérieur à 7 mm, le test est considéré comme positif.
3. Détermination des MIC et MFC :
  - 100 µl de PDB contenant les CFS lyophilisés à des concentrations croissantes ont été ajoutés aux 96 puits de la microplaque stérile.
  - Ajout de 100 µl de milieu PDB contenant 5x10<sup>3</sup> de spores dans chaque puits, incubation de la microplaque à 25°C pendant 3 jours.
  - Le MIC a été défini dans les puits qui présentent une très faible ou inexistante croissance fongique visible.
  - Le CFS a été déterminé après prélèvement de 10 µl de la concentration correspondant à la MIC et des concentrations supérieures dont la croissance est inexistante.
4. Étude de la biopréservation dans les grains et épis de maïs par *L. plantarum* CECT 749 :
  - Pulvérisation de 10 ml de CFS sur 50 g de grains de maïs puis séchage dans un incubateur à 50°C pendant 30 min avant inoculation avec 1ml de suspension d'*A. flavus* ISPA 8111 à raison de 10<sup>3</sup> spores/g.

Un groupe témoin a subi les mêmes étapes en remplaçant le CFS par 10ml d'eau stérile.

- Pulvérisation de 6 ml de CFS sur 200 g d'épis de maïs à raison de 1.6 CFS lyophilisé/g de maïs puis contamination avec 1ml de suspension de *F. verticillioides* CECT 2982 à une concentration de  $10^3$  spores/g et séchage dans un incubateur à 105°C pendant 24h.

La valeur MC a été mesurée avec des méthodes gravimétriques.

- **Résultat**

Les résultats de l'activité antifongique des surnageants de la souche *Lactobacillus plantarum* cultivée sur un milieu PDA (voir annexe 01, tableau 01) exercent plus ou moins un effet antifongique. Cependant, *L. plantarum*CECT 748 et *L. plantarum*CECT 749 semblent les seuls à avoir une activité antifongique contre toutes les souches de *Fusarium* et *Aspergillus*. *L. plantarum*CECT 749 reste la meilleure souche révélant les plus faibles concentrations inhibitrices et fongicides minimales contre toutes les souches, notamment pour *A. flavus*ISPA 8111 avec une MIC de 62g de CSF/l et une MFC de 125g de CFS/l (voir annexe 01, tableau 02), ce qui suggère son éventuelle utilisation comme moyen de lutte antifongique. Par ailleurs, les résultats de cette étude montrent que les souches *Fusarium* semblent être plus sensibles à l'effet du surnageant que les souches *Aspergillus*.

La durée de vie des deux échantillons pulvérisés avec le CFS a été prolongée de 8 jours dans les grains de maïs contaminés par *A. flavus* et de 2 jours dans les épis de maïs contaminés par *F. verticillioide*(voir annexe 01, tableau 03). Cette différence de retard est due probablement au MC, avec des pourcentages de 18% et de 20% dans les grains et épis de maïs respectivement. De plus, la pulvérisation avant contamination réduit la teneur en AFB1 de 99.7% en 25 jours et de 90.6% pour la FB1 en 7 jours. L'effet inhibiteur du CFS diminue au fil des jours et devient 97.5% au 40<sup>ème</sup> jour pour l'AFB1 et 73.7% au 15<sup>ème</sup> jour pour la FB1. Cette diminution de l'effet antifongique est peut-être due au retard de la croissance fongique et par conséquent du début du métabolisme secondaire.

### IV.3. Article 03 : Microflore des grains de café Robusta post-récolté : *Lactobacillus plantarum* sp. en tant que potentiel antagoniste d'*Aspergillus carbonarius*.

Anaerobe 17 (2011) 267–272



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anaerobe](http://www.elsevier.com/locate/anaerobe)



Pathogenesis and Toxins

#### Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*

Olga Djossou<sup>a</sup>, Isabelle Perraud-Gaime<sup>a</sup>, Fatma Lakhel Mirleau<sup>a</sup>, Gabriela Rodriguez-Serrano<sup>b</sup>, Germain Karou<sup>c</sup>, Sebastien Niamke<sup>c</sup>, Imene Ouzari<sup>d</sup>, Abdellatif Boudabous<sup>d</sup>, Sevastianos Roussos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institut Méditerranéen d'Écologie et de Paléocécologie (IMEP, UMR CNRS/IRD 6116), Laboratoire d'Écologie Microbienne et Biotechnologies, FST St Jérôme, Université Paul Cézanne, 13397 Marseille Cedex 20, France

<sup>b</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Fermentación en Medio Sólido, Avenida San Rafael Atlixo 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 D.F. México, Mexico

<sup>c</sup>Université de Cocody, UFR Biosciences, 22 B.P. 582, Abidjan 22, Cote d'Ivoire

<sup>d</sup>Laboratoire de Microbiologie et Biomolécules actives, Université de Tunis El Manar, Faculté des sciences de Tunis, Tunisia

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 28 January 2011  
Received in revised form  
24 March 2011  
Accepted 30 March 2011  
Available online 7 April 2011

##### Keywords:

Coffee robusta  
*Aspergillus carbonarius*  
Lactic acid bacteria  
Antagonism

#### ABSTRACT

Coffee contamination by ochratoxigenic fungi affects both coffee quality as well as coffee price with harmful consequences on the economy of the coffee exporting countries for whom which is their main source of income. Fungal strains were isolated from coffee beans and identified as black *Aspergilli*. Ochratoxigenic moulds like *Aspergillus carbonarius* were screened and selected for detailed studies. Also lactic acid bacteria (LAB) were isolated from silage coffee pulp and their antifungal activity was tested on dual-culture agar plate. Ten of the isolated LAB demonstrated antifungal effect against *A. carbonarius*. API 50 CH and APIZYM were used to perform phenotypic identification. 16S rDNA sequencing was made to confirm the results.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Food-borne fungi, both yeasts and moulds, cause serious problems during food storage. Moulds may produce mycotoxins, e.g. aflatoxins, trichothecenes, fumonisin, ochratoxin A and patulin [1]. According to statistic 5–10% of the world food production is lost due to fungal deterioration [2]. For that reason, several techniques are being used for the preservation of food and feeds: drying, freeze-drying, cold storage, modified atmosphere storage, and heat treatments [3]. Several chemical additives are being used as preservatives even though the exact mechanisms of their action are not known. For instance benzoic acid and sodium benzoate are used primarily as antifungal agents. The natamycin, produced by *Streptomyces natalensis*, is effective against yeasts and moulds and a common preservative on hard cheese surfaces [4]. An increasing number of microbial species is becoming resistant to antibiotics. Furthermore, yeasts and moulds are becoming resistant to preservatives such as

sorbic and benzoic acid, as well as to chemical treatment with cleaning compounds [5]. There exists a great risk that the resistant phenomenon will increase in future due to more frequent use of antibiotics and preservatives [6]. Filamentous moulds are common spoilage organisms of coffee cherries and grains during both post-harvest treatment and storage [7]. Fungal toxins (poly-peptides) produced are thermostable and consistently remain in roasted coffee. Both unroasted and roasted coffee may contain ochratoxin A (OTA), and in a lesser amount aflatoxin, which are produced by *Aspergillus* sp. [8]. OTA is usually produced during the growth phase under certain environmental conditions by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* and some strains of *Aspergillus niger*. The presence of this toxin requires the prior presence of a significant amount of OTA-producing fungal biomass [9]. Therefore inhibiting fungal growth can prevent OTA production in coffee. In another point of view, it appears cheaper and easier to prevent fungal growth on a raw material than trying to degrade OTA in food or product. Also, consumer demands on minimally processed foods and reduced use of chemical preservatives have stimulated research on biological (green) preservation methods. Antagonist microorganisms or their metabolic products can inhibit or destroy undesired microorganisms in food and agricultural products particularly mycotoxinogenic

\* Corresponding author. Tel.: +33 491289103; fax: +33 491288668.

E-mail addresses: [olgitha@yahoo.fr](mailto:olgitha@yahoo.fr) (O. Djossou), [gmsr@xanum.uam.mx](mailto:gmsr@xanum.uam.mx) (G. Rodriguez-Serrano), [s.roussos@univ-cezanne.fr](mailto:s.roussos@univ-cezanne.fr) (S. Roussos).

- **Résumé**

Cet article traite le potentiel antifongique des bactéries lactiques isolées à partir de la pulpe du café d'ensilage identifiées phénotypiquement par test API 50 CH et APIZYM, et génotypiquement par séquençage de l'ARNr 16S, contre deux souches ochratoxinogènes *Aspergillus carbonarius* (souches Ac 162 et Ac 164) isolées à partir des grains de café, en suivant la méthode de superposition.

- **Méthode suivie**

1. Sélection des meilleures souches productrices d'OTA :

Deux cent dix-huit souches fongiques ont été isolées du café et cultivées sur milieu PDA, puis ont subi une identification phénotypique en les comparant à des souches de référence.

Les champignons producteurs d'OTA ont été cultivés sur milieu CYA, ensuite la concentration d'OTA a été quantifiée par HPLC. Seulement deux souches d'*A. carbonarius* ont été retenues (souches Ac 162 et Ac 164).

2. Isolement et sélection préliminaire des bactéries lactiques :

Un échantillon de 1 g de café a été prélevé et mis en suspension dans 9 ml de bouillon MRS, ensuite incubé à 30°C pendant 24 h.

Des dilutions au dixième de cette culture ont été préparées et 0,1 ml de chaque dilution a été étalée sur des plaques d'agar MRS. Après incubation en aérobie à 30°C pendant 48 h, les cultures bactériennes ont été purifiées par transfert sur gélose MRS en les étalant en stries.

Une sélection au hasard de ces LAB a été faite. Ces dernières ont été conservées dans un bouillon MRS à 4°C à des fins de caractérisation.

Les souches précédemment sélectionnées ont été conservées à -20°C dans un bouillon MRS avec 20% de glycérol pour les expériences ultérieures.

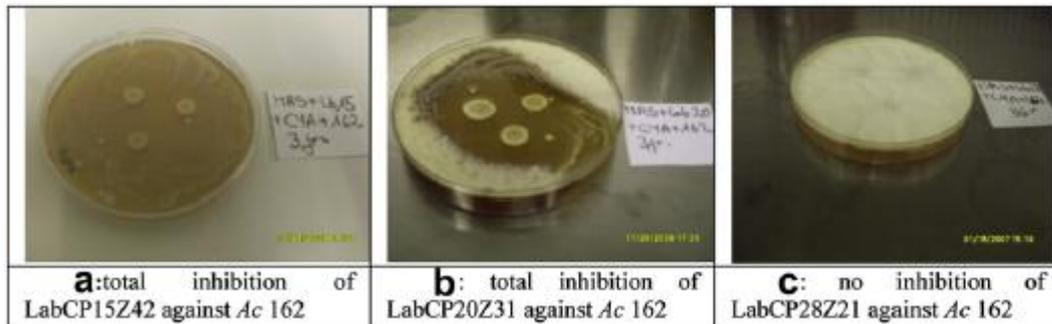
3. Test antifongique (méthode de superposition) :

- Des plaques de gélose MRS ont été incubées pendant une nuit à 30°C, puis inoculées avec 5ml des suspensions de LAB précédemment cultivées dans un bouillon MRS, puis incubation des plaques pendant 24 h à 30°C dans des conditions aérobies.
- Les plaques contenant des colonies LAB bien développées furent recouvertes de 10 ml de milieu CYA (0,8% d'agar) ayant un nombre de  $10^4$  spores/ml provenant d'*A. carbonarius* (souches Ac 162 et Ac 164) capable de produire près de 10 mg d'OTA par gramme de PDA.
- Les plaques de co-culture seront incubées à 25°C.

- **Résultat**

Il s'avère que pratiquement toutes les souches LAB isolées malgré leurs différents métabolismes, ont eu un effet antifongique prouvé par le diamètre d'inhibition (totale : zone claire + diffusion ; partiel : zone claire + croissance apparente de mycélium ; pas d'inhibition :

pas de zone claire). Ces niveaux d'inhibition sont dus à l'effet des différentes bactéries envers différentes physiologies de champignons.



**Figure 14:** Types d'inhibition contre *A. carbonarius* après trois jours

Selon les tests API CH50, et APIZYM concernant la production des enzymes toutes les souches sont similaires à *L. plantarum*, même si la concentration des enzymes est différente, ce qui s'est expliqué par la présence de 2 groupes distincts de *L. plantarum*. Cette proposition a été encore confirmée après test PCR. De ce fait on conclut que la souche *L. plantarum* a un réel effet antifongique et pourrait être utilisé dans la bioconservation.

## IV.4. Article 04 : Élimination de l'Ochratoxine A par les bactéries lactiques du vin in vitro

2155

*Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 9, 2007, Pages 2155–2160  
Copyright ©, International Association for Food Protection

### In Vitro Removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria

VINCENZO DEL PRETE,<sup>1</sup> HECTOR RODRIGUEZ,<sup>2</sup> ALFONSO V. CARRASCOSA,<sup>2</sup> BLANCA DE LAS RIVAS,<sup>2</sup>  
EMILIA GARCIA-MORUNO,<sup>1\*</sup> AND ROSARIO MUÑOZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti, Italy; and <sup>2</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

MS 06-569; Received 7 November 2006/Accepted 15 January 2007

#### ABSTRACT

A study was carried out to determine the in vitro interaction between ochratoxin A (OTA) and wine lactic acid bacteria (LAB). Fifteen strains belonging to five relevant oenological LAB species were grown in liquid synthetic culture medium containing OTA. The portion of OTA removed during the bacterial growth was 8 to 28%. The OTA removed from the supernatants was partially recovered (31 to 57%) from the bacterial pellet. Cell-free extracts of three representative strains were produced by disrupting cells in a French pressure cell. The ability of crude cell-free extracts to degrade OTA was studied. OTA was not degraded by cell-free extracts of wine LAB strains, and no degradation products of OTA were detected in the high-performance liquid chromatograms of the methanol extract of the bacterial pellet. On the basis of these results, we conclude that OTA removal by wine LAB is a cell-binding phenomenon. The chemistry and the molecular basis of OTA binding to wine LAB remains unknown.

Mycotoxins are toxic metabolites produced by filamentous fungi, and these toxins have been detected in several food commodities. Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced primarily by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA has been widely detected in various vegetable products, such as cereals, green coffee, spices, cocoa, and beverages such as beer, coffee, and wine (19, 36, 38, 41, 43, 45). The presence of OTA in grape juices and wines was reported for the first time in 1995 by Zimmerli and Dick (50). Later surveys were carried out to evaluate the concentrations of OTA in grape juices and wines in Europe and South Africa. OTA has been found in wine up to 7.0 µg/liter and higher concentrations have been found in red wine produced in Europe and South Africa (6, 7, 33, 38, 39, 42). The occurrence of OTA in wine is linked to the presence of molds on grapes. Some researchers have reported that *Aspergillus carbonarius* is the most important OTA-producing fungal species in grapes (1, 26).

OTA is suspected to be nephrotoxic, teratogenic, hepatotoxic, and carcinogenic (25) and has been detected in human blood after the consumption of contaminated foods (32). To protect consumer health from the risk of exposure to this mycotoxin, reliable methods to reduce OTA levels are highly desirable. In the vineyard, the use of pesticides on vines, the time and conditions (relative humidity and temperature) of grape harvest, and drying and handling conditions for different sorts of cultivars can influence *Aspergillus* growth and the accumulation of OTA (26, 30). By elucidating the mycobiota of grapes, mycotoxin hazards can be predicted and the appropriate control measures implemented, such as hazard analysis critical control point programs (8). Several studies have focused on the reduction of

OTA in musts and wines in the winery, and decontamination procedures based on physical, chemical, or biological removal have been proposed (10, 15, 20, 21). Biological removal of OTA by microorganisms has been observed in milk and grape juices (5, 40). Different mechanisms of mycotoxin removal by microorganisms, such as degradation (23, 28, 44, 47) or adsorption (5, 18), have been reported.

During grape must fermentation, OTA concentration decreased as a result of the action of yeast, depending on the yeast strain involved (11). The microbial ecology of wine fermentation is more complex than that of alcoholic fermentation, often involving malolactic fermentation, i.e., the conversion of L-malic acid (one of the principal organic acids in wine) to the softer monocarboxylic L-lactic acid by the action of lactic acid bacteria (LAB). *Oenococcus oeni* was identified as the principal organism involved in the process, but different species of LAB, such as species of *Lactobacillus* and *Pediococcus*, have been isolated from wine (3, 16).

Because biological decontamination of mycotoxins using microorganisms is one of the well-know strategies for the management of mycotoxins in foods, the aim of this work was to assess the efficiency of removal of OTA from laboratory medium by different oenological LAB strains and to examine the OTA removal mechanism, either adsorption or degradation.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** OTA standard with a known analytical concentration of 50 µg/ml was purchased from Supelco (Bellefonte, Pa.). The required organic compounds (ultrahigh-pressure liquid chromatography [HPLC] grade and HPLC gradient grade) were purchased from J. T. Baker (Deventer, The Netherlands), and inorganic (reagent grade) compounds were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Chemical Co (Poole, Dorset,

\* Author for correspondence. Tel: +39 0141 433818; Fax: +39 0141 436829; E-mail: e.garciamoruno@isenologia.it

- **Résumé**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet antifongique des bactéries lactiques œnologiques sur l'OTA in vitro et la distinction du mécanisme de son élimination. Plusieurs espèces de LAB œnologiques ont été utilisées notamment celles appartenant aux espèces, *plantarum*, *brevis*, *oeni*, *mesenteroides* et *acidilactici*.

- **Méthode suivie**

1. Préparation des souches œnologiques :

Culture des souches d'*O. oeni* sur un milieu MLO complété avec 10% de jus de tomate. Les autres LAB testées ont été cultivées en milieu basal. Toutes les bactéries ont été incubées à 30°C.

2. Test d'adsorption de l'OTA par les LAB :

- 2.1. Préparation de la solution mère d'OTA :

L'OTA appartenant à la souche *Aspergillus ochraceus* a été dissoute dans du méthanol à raison de 1g/ml puis diluée dans une solution tampon phosphate à 50 mM de pH 6.5 pour atteindre une concentration finale de 5g/ml.

- 2.2. Ensemencement des LAB :

En conditions aérobies les souches LAB ont été ensemencées dans 400 ml de milieu MLO contenant la solution mère d'OTA (5g/l) et incubées à 30°C jusqu'à une phase de croissance exponentielle, puis, divisées en deux aliquotes; Le premier a subi une centrifugation afin de récupérer le surnageant exempt de cellules (40ml) et le culot bactérien séparément. Le deuxième aliquote a été traité de la même manière mais les bactéries en culot ont été lavées 3 fois dans 200 ml de tampon phosphate avant l'analyse.

Les surnageant et les bactéries en culot ont été maintenus à -70° C jusqu'à l'analyse pour l'OTA.

- 2.3. Etude du mécanisme d'élimination de l'OTA :

- Culture de trois souches de LAB en condition aérobie dans 800ml de milieu MLO basale contenant 5ug/l d'OTA et incubation à 30°C
- Récupération des cellules par centrifugation et lavage trois fois avec 800ml de solution tampon de phosphate (50mM, pH 6.5).
- Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans 40ml dans le même tampon puis désintégrées dans une presse
- Centrifugation de la suspension désintégrée à 12000 xg pendant 20min à 4°C.
- Récupération du surnageant puis filtration. Un volume de 20ml a été récupéré puis incubé pendant 48h à 30°C avec une concentration initiale de 5ug/l d'OTA.

- 2.3. Analyse de l'OTA :

La concentration en OTA dans les surnageants et solutions de lavage des culots bactériens a été déterminée en utilisant une méthode qui consiste en un nettoyage initial des échantillons avec une colonne d'immunoaffinité suivie d'une analyse HPLC.

Les culots bactériens ont été remis en suspension deux fois dans 2 ml de méthanol pendant 1h pour extraire l'OTA puis centrifugés à 3000 xg pendant 15min à 20°C, les surnageants méthanoliques ont été séparés, recueillis dans des flacons de 5ml et évaporés à sec avec de l'azote. Les résidus secs ont été reconstitués avec la phase mobile au moment de l'analyse chromatographique pour déterminer la concentration d'OTA.

- **Résultat**

Initialement, deux souches LAB (*O. oeni* ISE 5001 et *L. Brevis* ISE 5197) ont été cultivées dans un milieu de culture synthétique liquide MLO en additionnant de l'OTA pour étudier leur effet sur cette mycotoxine. La concentration en OTA a été mesurée à différents stades d'incubation.

Les résultats montrent une diminution de la concentration d'OTA dans le surnageant des cultures par rapport à la densité optique (DO) à 600 nm, et montrent une corrélation négative entre la concentration de l'OTA et la biomasse bactérienne. Les résultats de cette expérience ont permis aux expérimentateurs d'étendre leur étude et de lancer une culture de plusieurs autres espèces de LAB œnologiques en présence d'OTA.

Les résultats (voir annexe 02, tableau 01) montrent une réduction de l'OTA variant entre 8.23% et 28.09% et de 17,35 à 28,09% pour des souches de LAB œnologiques commerciales dans le milieu de cultures. Ceci suggère donc que ces concentrations varient en fonction des souches utilisées.

Concernant l'expérience menée ayant pour but la détermination du mécanisme d'élimination de l'OTA, trois souches ont été exploitées *O. oeni* RM11, *L. plantarum* CECT 748T, et *L. brevis* RM273. La concentration des protéines extraites du surnageant des cellules LAB désintégrées a été ajustée à une concentration égale pour les trois souches puis incubées pendant 48h avec de l'OTA. Les concentrations d'OTA mesurées à  $t_0$  et  $t_{48h}$  sont les mêmes indiquant que les protéines de ces trois bactéries ne sont pas impliquées dans la dégradation de l'OTA. De ce fait le mécanisme de dégradation a été écarté.

À partir des expériences précédentes la diminution de l'OTA pourrait s'expliquer par un mécanisme d'adsorption. L'extraction de l'OTA faite avec du méthanol ainsi qu'avec un tampon de lavage a donné les mêmes proportions ce qui explique qu'une partie de l'OTA est faiblement lié aux bactéries, et que la partie restante présente une forte liaison avec les LAB.

Les résultats de la présente étude, suggèrent la participation des peptidoglycanes et des polysaccharides dans la liaison aux toxines. Haskard *et al.* (2000) ont étudié le mécanisme de liaison entre les aflatoxines et *Lactobacillus rhamnoseus* et ont conclut que cette liaison se produit principalement avec les glucides et avec certaines protéines de la paroi cellulaire. Ils ont également mis en évidence le rôle majeur des interactions hydrophobes dans la liaison et ont constaté que les interactions électrostatiques ne jouent qu'un rôle mineur dans cette liaison. L'OTA liée aux bactéries ne peut être retirée entièrement après les lavages suggérant une forte liaison de la portion non retirée. En plus du mécanisme d'adhésion, Piotrowska et Zakowska (2005) suggèrent que des mécanismes inconnus pourraient être aussi impliqués.

## Discussion et conclusion

---

Les mycotoxines constituent un important problème de régulation internationale à cause de leurs effets toxiques et cancérigène à l'égard de l'homme et de l'animal, en plus des pertes économiques importantes qui ont été enregistrées. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 25% des denrées alimentaires sont éliminés chaque année suite à leur contamination par les mycotoxines.

Afin de pallier à ce problème, différentes méthodes de préventions physiques et chimiques ont été élaborées mais leur utilisation est remise en question suite à la conscience des risques qu'ils génèrent pour l'environnement et la santé humaine (Haidar *et al.*, 2016). La production d'une alimentation de qualité demeure un défi majeur, et il devient évident que ce but ne saurait être atteint sans le développement de moyens de lutte biologique respectant non seulement la nature, mais aussi la santé humaine et animale.

Dans ce contexte, les différents travaux de recherches consultés mentionnent l'utilisation de bactéries lactiques comme alternative potentielle aux fongicides toxiques et aux procédés physiques et chimiques. Les bactéries lactiques étant considérées comme non pathogènes sont consommées quotidiennement et en grande quantité par des populations très importantes. Dans les yaourts, par exemple, on trouve deux espèces de bactéries lactiques « probiotiques » (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) ainsi que dans la fabrication des vins d'ensilage, pain ...etc. En plus de leur action bénéfique sur la santé, les LAB ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple) et trouvent un regain d'intérêt auprès des scientifiques montrant des résultats concluants prouvant leurs efficacités comme agent de lutte biologique, notamment par l'augmentation de la durée de conservation dans les aliments comme le démontrent (Nazareth TM *et al.*, 2019) ou l'augmentation de la durée de conservation des grains et épis de maïs par l'utilisation du CFS des souches *L.platarum* contre *Aspergillus* et *Fusarium* a été prouvée en identifiant des acides phénoliques en plus des composés protéiques, peptidiques et d'autres acides ayant des effets antifongiques. Dans une autre étude élaborée par (S. Abbaszadeh *et al.*, 2015), les suspensions bactériennes de *L.acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* et *Bifidobacterium bifidum* semblent être plus efficaces que leurs CFS, suggérant le phénomène de compétition pour les nutriments et la présence d'autres éléments antifongiques. En plus de ces deux derniers phénomènes, (Del Prete *et al.*, 2007) démontrent l'importance du mécanisme d'adsorption de l'OTA aux cellules bactériennes grâce aux peptidoglycanes et polysaccharides de la paroi bactérienne.

Sur la base des données bibliographiques disponibles, il s'avère que les bactéries lactiques sont un réel outil pour contrer le développement des souches mycotoxiques. Les bactéries lactiques, selon les souches, peuvent produire de nombreux autres métabolites comme l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), la reutérine et le diacétyle. Ces métabolites jouent un rôle dans la compétitivité

des bactéries lactiques, en perturbant ou en inhibant la croissance des autres microorganismes vivant dans les mêmes écosystèmes. L'effet inhibiteur des bactéries lactiques par les différentes substances produites est un mécanisme complexe, et la plupart des études, n'ont pu caractériser que partiellement ces substances, ce qui laisse place à d'autres études, afin de comprendre le mécanisme de production et le mode d'action des composés inhibiteurs.

Cependant, l'application des bactéries lactiques comme agent antifongique se heurte à certains obstacles, Premièrement, les LAB sont des organismes exigeants du point de vue nutritionnel et physiologiques ; dans certains cas il est difficile de réunir toutes ces exigences en même temps , deuxièmement , malgré leur classification parmi les organismes non pathogènes, il est à noter que quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes.

Il est aussi important de prendre en considération le choix de la souche à utiliser et les conditions de son utilisation, car comme le montre l'étude de Del Prete *et al.* (2007), une diminution d'OTA par les LAB est en fonction de la souche utilisée. Il est clair que certaines espèces sont plus efficaces que d'autres contre le même agent pathogène. L'utilisation des LAB pour le biocontrôle peut se faire de deux manières différentes : Pulvérisation de leur CFS ou utilisation des cellules complètes fournissant aussi des résultats différents ; avec des pourcentages d'inhibition fongique variables en fonction de la technique utilisée (S. Abbaszadeh *et al.*, 2015).

Enfin, il y'a l'enjeu technologique pour les pays moins développés ainsi que l'acceptabilité par les consommateurs de nouveaux aliments fonctionnels influencée par la culture, l'éthique ou la religion. On espère que lorsque certains de ces obstacles seront surmontés, davantage d'applications biotechnologiques devraient être à l'horizon.

Aujourd'hui, il est nécessaire de réaliser davantage d'études sur les propriétés antifongiques des LAB et sur leur mode d'action, ce qui permettra de mieux comprendre les nouvelles compétences de manipulation et leur applicabilité dans les secteurs de la nutrition et de la santé.

Des découvertes intéressantes sur le mode d'action des LAB peuvent-elles donner de nouvelles perspectives sur leur utilisation possible dans le biocontrôle ? D'autres études *in vivo* émergeront-elles, montrant des corrélations plus directes entre les composés synthétisés par les LAB et leur suppression de l'apparition de mycotoxines ou même des champignons toxigènes pathologiques prédisposant? Nous espérons que l'avenir le plus proche répondra à ces questions et à bien d'autres car de telles études pourraient dévoiler de nouveaux mécanismes d'action, de nouvelles molécules antifongiques et une meilleure compréhension des facteurs affectant leur production. En fin, les bactéries lactiques montrent une réelle possibilité d'application pour la biopréservation, il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à décontaminer.

## Références bibliographiques

---

---

## Références bibliographiques

- ❖ **A.F.S.S.A., (2009).** (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). **In** : Mayssa Arfaoui, (2019). Lutte biologique contre les moisissures toxigènes. Thèse de doctorat. Université Tunis EL Manar – Tunisie.
- ❖ **Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A, Shokri H., (2015).** Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. *J Mycol Med*; 25(4):263-267.
- ❖ **Abidellah Nadia, Dib Nadjat, Karoune Naziha, (2011).** Les mycotoxines et stress oxydatif. Mémoire de fin d'étude. Université 8 mai 1945 Guelma.
- ❖ **Abramson D., Demianyk C. J., Fields P. G., Jayas D. S., Mills J. T., Muir W.E., Timlick B., White N.D.G., (2001).** Protection des céréales, des oléagineux et des légumineuses à grains entreposés à la ferme contre les insectes, les acariens et les moisissures. Ed. Centre de recherche sur les céréales. 58 p.
- ❖ **Abrunhosa L, Inês A, Rodrigues AI, et al., (2014).** Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *Int J Food Microbiol* 188:45-52.
- ❖ **Afifi A.F., Foad M.A., Fawzi E.M., (2003).** Effect of gamma irradiation on elimination of aflatoxins produced by apple mycoflora in apple fruits. *Acta Microbiol. Pol.* 52, 379-86.
- ❖ **Ait Abdelouahab N., (2001).** Microbiologie alimentaire. Office des publications. **In** : Tikour Senouci, (2018). Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien Kristel et Stidia. Mémoire de fin d'étude. Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem.
- ❖ **Alban Gauthier, (2016).** Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.
- ❖ **Asao T., Buchi G., Abdelkader M.M., et al., (1965).** The Structures of Aflatoxins B and G1. *J Am. Chem. Soc.* 87, 822-826.
- ❖ **Austwick, P K C, (1978).** Mycotoxicoses in Poultry. pp 279-301. **In**: *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An Encyclopedic Handbook. Volume 2: Mycotoxicoses of Domestic and Laboratory Animals, Poultry, and Aquatic Invertebrates and Vertebrates.* Wyllie, T D and Morehouse, L G (eds). Marcel Dekker, Inc, New York, US.
- ❖ **Azemar B., (2001).** Etude du rôle de l'Ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaire impliqué. Thèse universitaire Toulouse. **In** : Alban Gauthier, (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.
- ❖ **Barna-Vetro I., Gyongyosi A., Solti L., (1994).** Monoclonal antibody-based enzymelinked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 729-731.
- ❖ **Barrier-Guillot B., Pons B., Delambre L., Gouet H., (2007).** Effet des pratiques culturales sur le niveau de production de DON sur blé : synthèse de trois années d'enquêtes. Congrès Mycotoxines fusariennes des céréales. **In** Gwénaëlle Jard, (2009).

---

Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique – Toulouse.

- ❖ **Batish V. K., Lal R., Grover S., (1990).** Effect of nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* biovar. *Diacetylactis*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 74–76. **In :** D.K.D. Dalié , A.M. Deschamps et F. Richard-Forget . (2010). *Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review*. *Food control* 21, 370–380.
- ❖ **Batish V. K., Roy U., Lal R., Grover S., (1997).** Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 2009–2225.
- ❖ **Bennett J.W., Klich M., (2003).** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16, 497–516.
- ❖ **Betina V, (1994).** Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *Progress in industrial microbiology*. **In :** Kheira Hadjeba Medjdoub, (2012). *Risque de multicontaminations en mycotoxines et moyens de désactivation par les parois de levures et levures enrichies en glutathion ou sélénométhionine*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique – Toulouse.
- ❖ **Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich K. C., (2002).** Toxins of filamentous fungi. *Chemistry and Immunology*, 81, 167–206.
- ❖ **Blackwell M., R. Vilgalys, J.W. Taylor, (1998).** Fungi, Eumycota. **In :** Tikour Senouci, (2018). *Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien* Kristel et Stidia. Mémoire de fin d'étude. Université Abdelhamid Ibn Badis -Mostaganem.
- ❖ **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.
- ❖ **Boudreau A., Ménard G., (1992).** *Le blé : Eléments fondamentaux et transformation*. Presses de l'Université Laval .Paris. p: 439.
- ❖ **Branger M., Bresler G., Vaamonde G., Degrossi C., Pinto V. F., (2007).** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Française des Laboratoires*. p : 373.
- ❖ **Bren U., Guengerich F.P., Mavri J., (2007).** Guanine alkylation by the potent carcinogen aflatoxin B1: quantum chemical calculations. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1134-1140.
- ❖ **Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J.,(2007).** Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5547–5552.
- ❖ **Brochard G., Le Bacle C., (2009).** Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. Document pour le médecin du travail, DMT n°129.
- ❖ **Bullerman L.B., Bianchini A., (2007).** Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal Food Microbiology* 119:140 -146.
- ❖ **C.A.S.T (Council for Agricultural Science. and Technology), (2003).** *Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Task force report. 139, ISBN N° 1–887383–22–0, pp 200, Ames IOWA, USA. **In :** Amar Riba, (2008). Thèse de doctorat.

---

Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière blé en Algérie. Université Mouloud Mammeri - Tizi Ouzou.

- ❖ **Cairns-Fuller, V., Aldred, D., et Magan, N., (2005).** Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
- ❖ **Canadas D., (2006).** Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués ?. Thèse de Doctorat, 232p. INP/ENSA. Toulouse. France.
- ❖ **Carlile M.J., Watkinson S.C., (1994).** *The Fungi*. (Academic Press eds). **In :** Tikour Senouci, (2018). Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien Kristel et Stidia. Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem.
- ❖ **Castegnaro M, Barek J, Frémy J.M, et al., (1991).** Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some Mycotoxins. Lyon : IARC, SCI. Publ 113, p. 63.
- ❖ **Castegnaro M., and Pfohl-leszkowicz A., (2002).** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. Sécurité alimentaire du consommateur, 2ème édition ; Moll, M. ; Moll, L., Editions TEC&DOC, Lavoisier. **In** Kheira Hadjeba Medjdoub, (2012). Risque de multicontaminations en mycotoxines et moyens de désactivation par les parois de levures et levures enrichies en glutathion ou sélénométhionine. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique – Toulouse.
- ❖ **Castellano P., Belfiore C., Fadda S., Vignolo G., (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483–499.
- ❖ **Champion R., (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. Ed. Editions Quae, France, 398 p.
- ❖ **Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y., (2009).** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*, 131, 30–39.
- ❖ **Cole R.J, Jarvis B.B., Schweikert M.A., (2003).** Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press (Elsevier Science), USA, Volume III: 615-624. **In :** M. Nguyen Minh Tri, (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique - Toulouse.
- ❖ **Creppy E.E., (2002).** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1): p. 19-28.
- ❖ **Crowley S, Mahony J, Van Sinderen D., (2012).** Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bio-protectants in refrigerated foods, *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1417-1427.
- ❖ **Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F., (2010).** Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370–380.

- 
- ❖ **Davidson M.P., (2001).** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. **In:** D.K.D. Dalié , A.M. Deschamps et F. Richard-Forget . (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control* 21 (2010) 370–380.
  - ❖ **Del Prete V, Rodriguez H, Carrascosa AV, de las Rivas B, Garcia-Moruno E, Muñoz R., (2007).** **In :** vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *J Food Prot.* 70(9):2155-2160.
  - ❖ **Dendy D.A.V., Dobraszczyk., (2000).** Cereals and Cereal Products: Technol.Chemistry. Springer. p: 370. **In :** Belmehdi Sara et Beddar Ghania, (2019). Étude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de fin d'étude. Université Mohamed el Bachir El Ibrahim.
  - ❖ **Denkova R, Denkova Z, Yanakieva V, Blazheva D., (2013) .** Antimicrobial activity of probiotic lactobacilli, bifidobacteria and propionic acid bacteria, isolated from different sources. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science technology and education*, Vol. 2 p. 857—64. **In :** Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A, Shokri H. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. *J Mycol Med.* 2015;25(4):263-267.
  - ❖ **Dijksterhuis J, Samson R.A., (2007).** *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, Taylor & Francis Group, 424 pp. **In :** LAREF Nora. (2014) . L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus* sp. Thèse de doctorat. Université Ahmed Benbella – Oran.
  - ❖ **Dijksterhuis J., Samson Robert A., (2007).** *Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food.* CRC Press; p: 403. **In :** Belmehdi Sara et Beddar Ghania, (2019). Étude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de fin d'étude. Université Mohamed el Bachir El Ibrahim.
  - ❖ **Djermoun A., (2009).** La production céréalière n Algérie : les principales caractéristiques, *Revue Nature et Technologie*, N°1, 45-53
  - ❖ **Dorner J.W., Cole R.J., Diener U.L., (1984).** The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, 87, 13-15.
  - ❖ **Doukani K., Tabak S., Gourchala F., Mihoub F., Ounes M., Benbaguara M., (2013) .** Caractérisation physico-chimique du blé fermenté par stockage souterrain (Matmora), *Revue Ecologie-Environnement* (9).
  - ❖ **Doyle M.P., Beuchat L. R., Montville T.J., (1998).** *Food microbiology: Fundamentals and frontiers.* ASM press. Washington D.C.
  - ❖ **Duverger F., Bailly S., Querin A., Pinson, Gadais L., Guerre P., and Bailly J., (2011).** Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. *Revue Méd. Vét* 162 :93–97.
  - ❖ **Effat B.A., Ibrahim G.A., Tawfik N.F., Sharaf O.M., (2001).** Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 29, 251–262. **In:** D.K.D. Dalié , A.M. Deschamps et F. Richard-Forget . (2010). Lactic

---

acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food control 21 (2010) 370–380.

- ❖ **Eklund T., (1989).**, Organic acids and esters. **In** : Johan Schnürer and Jesper Magnusson . (2005) .Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives .Trends in Food Science & Technology 16 (2005) 70–78.
- ❖ **El Demerdash H, Mostafa H., (2008).** Antimicrobial activity of lactobacilli and bifidobacteria isolates. J Genet Eng Biotechnol;6:9—14. **In** : Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A, Shokri H. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. J Mycol Med. 2015;25(4):263-267.
- ❖ **Elad, Yigal, Stewart, Alison, (1970).** Microbial Control of *Botrytis* spp. 10.1007/978-1-4020-2626-3\_13.
- ❖ **Fangeat Loïc, (2008).** Les mycotoxines chez les bovins. Thèse de doctorat .Universite Claude-Bernard - Lyon I.
- ❖ **Feillet P., (2000).** Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris. p: 308. **In** Belmehdi Sara et Beddar Ghania, (2019). Étude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de fin d'étude. Université Mohamed el Bachir El Ibrahimi.
- ❖ **Freese E., Sheu C.W., Galliers E., (1973).** Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, 241, 321–325.
- ❖ **Garcha S., Natt N.K., (2012).**In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291, Journal of Food Science and Technology, 49, 643-648.
- ❖ **Gelinas P., (1995).** Répertoire des micro-organismes pathogènes transmis par les aliments, Edisem, St Hyacinthe, Québec. **In** : Meghazi Nassima, (2015). Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. Magistère. Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harache.
- ❖ **Gould, G.W., (1996).** Methods for preservation and extension of shelf life. International Journal of Food Microbiology 33, 51–64.
- ❖ **Gourama H., Bullerman, L.B., (1997).** Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. International Journal of Food Microbiology, 34, 131–143.
- ❖ **Gourama, H., Bullerman L.B., (1995).** Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. Journal of Food Protection, 58, 1249–1256.
- ❖ **Gqaleni N., Smith J.E., Lacey, J., Gettinby G., (1997).** Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Applied and environmental microbiology, 63 (3) : 1048–1053.
- ❖ **Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 7-9, 98-100 p. **In** : REDOUANE-SALAH Sara, (2016). Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé. Thèse de doctorat.Université des Frères Mentouri - Constantine.

- 
- ❖ **Gwénaëlle Jard, (2009).** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique - Toulouse.
  - ❖ **Haidar R., Roudet J., Bonnard O., Dufour M. C., Corio-Costet M. F., Fert M., Fermaud M., (2016).** Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research*, 192, 172–184.
  - ❖ **Haskard C., C. Binnion, J. Ahokas., (2000).** Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem. Biol. Interact.* 128:39–49.
  - ❖ **Hernandez-Mendoza A., Garcia H.S., Steele J.L., (2009).** Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1, *Food and Chemical Toxicology* 47, 1064-1068.
  - ❖ **Hsieh D.P.H., Atkinson D.N., Zhao M.S., (1992).** Aflatoxin–DNA adducts and P53 gene alterations in human liver. Abstracts. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxms, Mexico City, p.36. **In : Riba Amar, (2008).** Recherches sur les champignons producteurs d'Aflatoxine et d'Ochratoxines A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques. *Université Mouloud Mammeri - Tizi-Ouzou.*
  - ❖ **Hunter D.R., Segel I.H., (1973).** Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *Journal of Bacteriology*, 113, 1184–1192.
  - ❖ **Hussein H. S., Brasel J. M., (2001).** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101–134.
  - ❖ **Huwig A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H., (2001).** Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Letters*, 122, 179-188.
  - ❖ **Jackson P.E., Groopman J.D., (1999).** Aflatoxin and liver cancer. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 13, 545-555.
  - ❖ **Jarvis B.B., Miller J.D., (2005).** Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 67–372.
  - ❖ **Jean-pierre Courtin, (2012).** L'homme et les lois de la nature 2. Précis de culture générale scientifique. tome 2. biologie, ingénierie, sociologie.
  - ❖ **Jeunot B., (2005).** Les fusariotoxines sur céréales, détection, risque et nouvelle réglementation. Sous la direction de Benizri E. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré de Nancy : 125.
  - ❖ **Kabak B., Dobson A.D., Var I., (2006).** Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 593-619.
  - ❖ **Kahina Maya Makhloufi, (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE.
  - ❖ **Keller S.E., Sullivan T.M., Chirtel S., (1997).** Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1 : oxygen and pH. *Indust. Microbiology, Biotechnology*, 19, 305-309. **In : Bennoudia omar, (2016).** Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes contaminant la

---

farine de blé tendre commercialisées en Algérie. Mémoire de fin d'étude. Université Saad Dahlab – Blida.

- ❖ **Kendrick B., (1999).** The fifth kingdom. 2nd édition. Mycologue Publications.
- ❖ **Le Bars J., Le Bars P., (1987).** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse. **In :** Belmehdi Sara et Beddar Ghania, (2019). Étude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de fin d'étude. Université Mohamed el Bachir El Ibrahim.
- ❖ **Li H-j Liu L., Zhang S-W., Kong F-P., Sun Z., Lü J-P., (2011).** The Antifungal Properties of *Lactobacillus casei* AST18 and Its Application as Adjunct Culture in Yogurt, *Scientia Agricultura Sinica*, 44, 4050-4057. **In :** Laref Nora, (2014) . L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus* sp. Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bella – Oran.
- ❖ **Lindgren S.E., Dobrogosz W. J., (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 149–164.
- ❖ **Lund F., Frisvad J.C., (2003).** *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117-1123.
- ❖ **Magnusson J., Strö, K., Roos, S., Sjögren J., Schnürer J., (2003).** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 129–135.
- ❖ **Marcel Lecomte, (2014).** Réédition du Tome III "Manuel de Microscopie".
- ❖ **Marie A., Jean M-L., Norman K., Marcel B., Michel L. et Yves F., (2002).** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut National de Santé Publique Quebec. P : 3-19.
- ❖ **Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V., (2013).** Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- ❖ **Mathew S., Thomas G., Tufail A., (2011).** An Evaluation of the fungi isolated from subepidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal.J.Biotechnol., Microbiol.* p :131–138.
- ❖ **Meghazi Nassima, (2015).** Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. Diplôme de magistère. Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach.
- ❖ **Mislivec P.B., Tuite J., (1970).** Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dentcorn kernels. *Mycologia* Vol. 62, No. 1 ,pp. 75-88.
- ❖ **Mitchell D., Parra R., Aldred D., Magan N., (2004).** Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97:439–445.
- ❖ **Muhaladin B.J, Hassan Z, Sadon S.K., (2011).** Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on selected foods, *Journal of Food Science*, 76, 493-499.
- ❖ **Müller H.M., (1982).** Decontamination of mycotoxins. I. Physical process. *Übersicht. Tierernähr.* **In :** Alban Gauthier, (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur

---

incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.

- ❖ **Murphy P.A., Hendrich S., Landgren C., Bryant CM. (2006).** Food mycotoxins, an update. *Journal of Food Science*, 71(5), 51–65.
- ❖ **Nakanishi K., Tokuda H., Ando, T., Yajima M., Nakajima, T., Tanaka, O., & Ohmomo, S., (2002).** Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 13, 37–45.
- ❖ **Nazareth TM, Luz C, Torrijos R, et al., (2019)** .Potential Application of Lactic Acid Bacteria to Reduce Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> Occurrence on Corn Kernels and Corn Ears. *Toxins (Basel)*;12(1):21.
- ❖ **Ndagano D., Lamoureux T., Dortu C., Vandermoten S., Thonart P., (2011).**Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the Weissella Genus Isolated from Food. *J. Food Sci.* 76, M305–M311.
- ❖ **Neergaard P., (1977).** Seed pathol (11). MacMillan. P: 1187. **In :** Mahideb Nesrine Merrouche Hadjer, (2015). Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités). Mémoire de fin d'étude. Université des Frères Mentouri – Constantine.
- ❖ **Niku-Paavola M.L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A., (1999).** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29–35.
- ❖ **Norholt M.D, Van Egmond H.P, Paulsch W.E., (1979).** Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, pp. 485-490.
- ❖ **Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A., Daeseleire E., (2010).** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1-11. **In :** Mahideb Nesrine et Merrouche Hadjer, (2015). Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités). Mémoire de fin d'étude. Université des Frères Mentouri – Constantine.
- ❖ **Pfohl-Leszkowicz A., (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque Paris ; Tec & Do, 478p. **In :** Alban Gauthier, (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.
- ❖ **Pfohl-leszkowicz A.,(2001).** Définition et origines des mycotoxines. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque p. 3-14. **In :** Fangeat Loïc, (2008). Les mycotoxines chez les bovins. Thèse de doctorat. Université claud-bernard - Lyon I.
- ❖ **Piard J.C., Desmazeaud M., (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525–541.
- ❖ **Piard J.C., Desmazeaud M., (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113–142.
- ❖ **Piotrowska M., Z. Zakowska, (2005).** The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Pol. J. Microbiol.* 54:279–286.

- 
- ❖ **Pitt J.I., Hocking A.D., (1985).** Fungi and food spoilage. Sydney : Academic Press. **In** Alban Gauthier, (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.
  - ❖ **Pitt J.I., Miscamble B.F., (1995).** Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. Journal of Food Protection, 58, 86–90.
  - ❖ **Pitt J.I., Basilico J.C., Abarca M.L et Lopez C, (2000).** Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical Mycology, 38, 41–46.
  - ❖ **Pitt J.I., Hocking A.D., (1991).** Significance of fungi in stored products, Proceedings of an international conference held at Bangkok, Thailand : Fungi and mycotoxins in stored product, 16-21.
  - ❖ **Pohland A.E., Schüller P.L., Steyn P.S., et al. (1982).** Physico-chemical data for selected mycotoxins. Pure Appl. Chem, 54, 2219-2284.
  - ❖ **Quillien J.F., (2002).** Les mycotoxines. FLAIR FLOW EUROPE 4. PMEN°3.
  - ❖ **Reboux G., (2006).** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 46, 208-212.
  - ❖ **Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L., (2010).** Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, Revue française d'allergologie 50 : 611–620.
  - ❖ **Reis J.A., Paul, A.T., Casarott, S.N., Penna A.L.B., (2012).** Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. Food Engineering Reviews, 4, 124-140.
  - ❖ **Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K. et Yamaguchi H., (1998).** Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections, 36, 249–257.
  - ❖ **Riba Amar, (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
  - ❖ **Richard J.L., (2007).** Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. Int. J. Food Microbiol., 119, 3-10.
  - ❖ **Roberts T.A., (2005).** Microorganisms in foods. Microbial Ecology of food Commodities. Second Edition. Springer. P: 776. **In** : Belmehdi Sara et Beddar Ghania, (2019). Étude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de fin d'étude. Université Mohamed el Bachir El Ibrahimi.
  - ❖ **Rodgers S., (2001).** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review. Trends in Food Science & Technology 12, 276-284.
  - ❖ **Roquebert M.F., (1997).** Les moisissures, nature biologie et contamination <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm#Bibliographie>. **In** : Sarah Boudih, (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de doctorat. Université Paris EST.
  - ❖ **Roquebert M.F., (2002).** Moisissures contaminant les biens culturels. Collection Patrimoine. Heritage Series. **In** : Sarah Boudih, (2011). Identification des moisissures

---

et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Thèse de doctorat. Université Paris EST.

- ❖ **Ross R.P., Morgan S., Hill C., (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- ❖ **Roy U., Batish V.K., Grover S., Neelakantan S., (1996).** Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 27–34.
- ❖ **Sadiq F.A., Yan B., Tian F., Zhao J., Zhang H., Chen W., (2019).** Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 1403–1436.
- ❖ **Sathe S.J., Nawani N. N., Dhakephalkar P.K., Kapadnis B.P., (2007).** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622–2628.
- ❖ **Schnürer J., Magnusson J., (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70–78.
- ❖ **Stéphane Firmin, (2011).** Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. *Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II*, 2011. Français
- ❖ **Sudakin D.L., (2003).** Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 41, 195-204.
- ❖ **Tabuc C., (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. *Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest.*, Toulouse.
- ❖ **Tony Basset, Caroline Laffont, (2013).** « Les contaminations fongiques », *La Lettre de l'OCIM*, URL : <http://journals.openedition.org/ocim/994>
- ❖ **Tortora J., Funk B.F., Case Ch.I., (2003).** Introduction à la microbiologie, (edn) Universitaires, 52 pages. **In :** Tikour Senouci, (2018). Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien Kristel et Stidia. Mémoire de fin d'étude. Université Abdelhamid Ibn , Badis-Mostaganem.
- ❖ **Trenk H.L., Butz M.E., Chu F.S., (1991).** Production of ochratoxin in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*.-*Appl. Microbiol.*, 21, 1032-1035.
- ❖ **Trias R., Bañeras L., Badosa E., Montesinos E., (2008).** Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50-60.
- ❖ **Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., et al., (1965).** Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature* 205, 1112-1113.
- ❖ **Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E., (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 187–216.

- 
- ❖ **Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T., Samson R.A., (2014).** Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Studies in Mycologie*, Vol 78 : 343- 371.
  - ❖ **Voss K.A., Bullerman L.B., Bianchini A., Hanna, M.A., Ryu D., ( 2008).** Reduced toxicity of fumonisin B1 in corn grits by single-screw extrusion. *J. Food Prot.*, 71, 2036-2041.
  - ❖ **Watson S.A., Mirocha C.J., Hayes A.W., (1984).** Analysis for Trichothecenes in Samples from Southeast Asia Associated with Yellow Rain. *Fundamental Applied Toxicology* , pp. 700-717.
  - ❖ **Weidenbörner M., (1998).** *Lebensmittel-Mykologie* B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3. **In :** Riba Amar, (2008). Recherches sur les champignons producteurs d'Aflatoxine et d'Ochratoxines A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques. *Université Mouloud Mammeri - Tizi-Ouzou*.
  - ❖ **Weidenbörner M., (2001).** *Encyclopedia of food mycotoxins*. Berlin : Edition Springer, 296p. **In :** Alban Gauthier, (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. U.F.R. des sciences pharmaceutiques - Université de Bordeaux.
  - ❖ **Wicklow D.T., Shotwell O.L., (1983).** Intrafungal distribution of aflatoxins among conidies and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *CAN. J. Microbiol*, 29, p. 135.
  - ❖ **Woolford M.K., (1984a).** The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. *Grass and Forage Science*, 39(1), 75–79.
  - ❖ **Woolford M.K., (1984b).** The antimicrobial spectra of some salts of organic acids and glutaraldehyde in respect to their potential as silage additives. *Grass and Forage Science*, 39, 53–57.
  - ❖ **Yannikouris A., Jouany J.P., (2002).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants ; leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA, Prod.Anim*, 15 (1), 3-16.

# Annexes

---

## Annexe 01

**Table 01** : Activité antifongique évaluée en milieu solide de gélose dextrose de pomme de terre (PDA) et traitée avec *Lactobacillus plantarum* sans cellule surnageant (CFS) à 250 g/l contre les champignons toxigènes d'*Aspergillus* et de *Fusarium*. L'activité antifongique a été exprimée comme suit: (+) signifie 8 mm de zone d'inhibition entre le puits et la croissance fongique, (+ +) signifie 8–10 mm de zone d'inhibition entre le puits et la croissance fongique, (+ + +) signifie > 10 mm de zone d'inhibition entre le puits et la croissance fongique

Souches fongiques	<i>L. plantarum</i>						
	CECT 220	CECT 221	CECT 223	CECT 224	CECT 748	CECT 749	CECT 750
<i>F. graminearum</i> ITEM 126	+	+	+	+	+	+++	+
<i>F. graminearum</i> ITEM 6415	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. cerealis</i> CECT 20488	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. cerealis</i> CECT 20489	+	+	+	++	+	+	+
<i>F. verticilliodes</i> CECT 20926	+	+	+	+	++	+++	+
<i>F. verticilliodes</i> CECT 2152	++	+	++	+	++	+++	++
<i>F. verticilliodes</i> CECT 2982	++	++	++	+	++	+++	+
<i>F. mesoamericanum</i> CECT 20490	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. poae</i> CECT 20165	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. Flavus</i> CECT 8111	+	+	+	+	+	++	+
<i>A. parasiticus</i> CECT 2681	-	-	-	-	+	+	-
<i>A. Niger</i> CECT 2088	-	+	-	-	+	+	+

**Tableau 02** : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale fongicide (MFC) exprimé en g/L de surnageant acellulaires (CFS) de *Lactobacillus plantarum* contre les souches d'*Aspergillus* et de *Fusarium*. (nd = non detected)

Souches fongiques	<i>L. plantarum</i>													
	CECT 220		CECT 221		CECT 223		CECT 224		CECT 748		CECT 749		CECT 750	
	MI	MF	MI	MF	MI	MF	MI	MF	MI	MF	MI	MF	MI	MF
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>F. graminearum</i> ITEM 126	8	8	8	16	8	16	8	16	8	8	8	16	8	16
<i>F. graminearum</i> ITEM 6415	8	16	8	13	8	13	8	13	4	16	4	16	4	16
<i>F. cerealis</i> CECT 20488	8	16	8	31	8	16	8	16	8	8	8	16	8	16
<i>F. cerealis</i> CECT 20489	8	16	16	16	16	31	4	16	4	16	4	16	4	31
<i>F. verticilliodes</i> CECT 20926	16	31	16	31	16	31	16	31	8	16	8	31	16	31
<i>F. verticilliodes</i> CECT 2152	4	31	4	31	4	31	4	31	4	31	4	31	4	31
<i>F. verticilliodes</i> CECT 2982	16	31	16	31	16	31	16	31	16	31	16	31	16	31
<i>F. mesoamericanum</i> CECT 20490	8	16	8	31	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16
<i>F. poae</i> CECT 20165	16	31	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16
<i>B. Flavus</i> CECT 8111	250	nd	250	nd	250	nd	250	nd	125	250	62	125	250	nd
<i>A. parasiticus</i> CECT 2681	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	250	nd	125	250	250	nd
<i>B. Niger</i> CECT 2088	nd	nd	250	nd	nd	nd	nd	nd	250	nd	250	nd	250	nd

**Tableau 03** : Evaluation de la croissance fongique dans les grains de maïs contaminés par *Aspergillus flavus* ITEM 8111 et dans les épis de maïs contaminés par *Fusarium verticillioides* CECT 2982 pendant le stockage. La croissance fongiques exprimée par (+) et l'absence de croissance fongique par (-).

Échantillon	<i>A. Flavus</i> ITEM 8111				<i>F. verticillioides</i> CECT 2882			
	Jours				Jours			
	0	7	15	40	0	5	7	15
Contrôle	-	+	+	+	-	+	+	+
CSF	-	-	+	+	-	-	+	+

## Annexe 02

**Table 01:** Réduction de l'Ochratoxine A dans des milieux de culture inoculé avec différentes bactéries lactiques.

Milieu de culture, souches de LAB	OTA concentration (g/l) <sup>b</sup>	OTA réduction (%)
BM		
Controle	4.62 (0.05)	
<i>L.brevis</i> RM273	4.19 (0.19)	9.31
<i>L.brevis</i> CECT4669	4.02 (0.45)	12.99
<i>L.brevis</i> CECT4121	4.00 (0.06)	13.42
<i>L.plantarum</i> CECT748	4.22 (0.06)	8.66
<i>L.plantarum</i> RM28	4.11 (0.20)	11.04
<i>L.plantarum</i> RM35	4.24 (0.13)	8.23
<i>L.mesenteroides</i> RM54	4.08 (0.09)	11.69
<i>Pediococcus acidilactici</i>	3.99 (0.11)	13.64
RM86		
MLO <sup>d</sup> + OTA	4.69 (0.03)	
Contol	4.17 (0.36)	10.99
<i>O. oeni</i> RM8	4.10 (0.04)	12.48
<i>O. oeni</i> RM11	3.70 (0.06)	21.10
<i>O. oeni</i> RM21	3.37 (0.16)	28.09
<i>O. oeni</i> Uvaferm ALPHA	3.42 (0.17)	27.09
<i>O. oeni</i> Uvaferm MLD	3.41 (0.04)	27.22
<i>O. oeni</i> Viniflora OENOS	3.87 (0.29)	17.35
<i>O. oeni</i> Viniflora CH35 3		

