UNIVERSITE PAUL CEZANNE, AIX MARSEILLE III

Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement

Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A

THESE

Présentée par

Olga DJOSSOU

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE

Faculté des Sciences et Techniques-Saint Jérôme

(Discipline : Biologie des Populations et Ecologie)

Soutenue le 29 Juin 2011

JURY :

Dr Maurice BENSOUSSAN	Professeur- AGROSUP-Dijon	Rapporteur
Dr Patrick BOIRON	Professeur -Université de Lyon	Président
Dr Gilles IACAZIO	Professeur-Université Paul Cézanne	Examinateur
Dr Annie LESKOWICZ	Professeur -ENSAT-Toulouse	Rapporteur
Dr Isabelle PERRAUD-GAIME	CR-IRD, Marseille	Co-directrice de thèse
Dr Sevastianos ROUSSOS	DR-IRD, Marseille	Directeur de thèse

TABLES DES MATIERES

DEDICACE vi
REMERCIEMENTS vii
AVANT-PROPOS viii
LISTE DES ABREVIATIONS ix
LISTE DES TABLEAUX xi
LISTE DES FIGURES xii
RESUME xiii
ABSTRACT xiii
1. INTRODUCTION GENERALE 1
2. Analyses bibliographiques 5
2.1. Le café 5
2.1.1. Production et marché mondial du café 5
Côte d'Ivoire 5
2.1.2. Eléments de botanique et d'écologie du café 6
2.1.2.1. Classification du caféier 6
2.1.2.2. Histologie du péricarpe du fruit du café 7
2.1.2.3. La composition chimique de la pulpe de café fraîche 7
2.1.3. Récolte des cerises du café 7
2.1.4. Traitement post-récolte de cerises du café 8
2.1.4.1 Le traitement par voie sèche 9
2.1.4.2 Le traitement par voie humide 9
2.1.5. La conservation de la pulpe de café par ensilage 12
2.1.6. La flore microbienne du café 12
2.2. Les moisissures 12
2.2.1. Définition des moisissures 12
2.2.2 Spores et cycle de vie des moisissures 13
2.2.3 Les moisissures post-récolte 13
2.2.3.1. Le genre *Aspergillus* 14
2.2.3.1.1 Les *Aspergillus* de la section *Nigri* 14
2.2.3.1.1.1 L'espèce *Aspergillus niger* 15
2.2.3.1.2 Les *Aspergillus* de la section *Fumigati* 15
2.2.4. Les moisissures des grains de café 16

2.2.4.1. Importance des *Aspergillus* dans la contamination des grains de café 16
2.2.5. Critères d'identification des moisissures..... 17
2.2.6.1. Identification morphologique 17
2.2.6.1.1. Identification macroscopique..... 18
2.2.6.1.2. Identification microscopique..... 18
2.2.6.2 Identification moléculaire 20
2.3. Les mycotoxines..... 20
2.3.1. Définition des mycotoxines 20
2.3.2. Importance des mycotoxines 21
2.3.3. Les différentes mycotoxines..... 21
2.3.4. Facteurs de la contamination mycotoxique par les *Aspergillus* 22
2.3.5. Occurrence des mycotoxines 23
2.3.5.1. Présence des mycotoxines dans les aliments 23
2.3.5.2. Présence d'OTA dans le café 24
2.3.6 Mesures préventives de la lutte contre les mycotoxines..... 25
2.3.6.1 Contrôle des mycotoxines avant et après la récolte..... 25
2.3.6.2 Taux d'humidité avant et durant le stockage..... 25
2.3.6.3. Température durant le stockage des grains de café..... 25
2.3.6.4. Les bonnes pratiques agricoles 26
2.3.7. Techniques de mise en évidence du pouvoir mycotoxinogène des moisissures 26
2.3.7.1 La production et l'extraction des mycotoxines sur milieux solides 26
2.4 La FMS (Fermentation en milieu solide) 27
2.4.1. Le stress hydrique 28
2.4.2. Intérêt du stress hydrique en biotechnologie..... 28
2.5. Les bactéries lactiques 28
2.5.1. Définition des bactéries lactiques..... 29
2.5.2. Taxonomie des bactéries lactiques..... 29
2.5.3. Habitat des bactéries lactiques..... 30
2.5.4. Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire..... 30
2.5.4.1. Identification des bactéries lactiques..... 31
2.5.4.1. 1. Caractérisation phenotypique..... 31
2.5.4.1.2. Identification moléculaire 33
2.5.4.1.2.1 Pourcentage d'homologie ADN-ADN 33
2.5.4.1.2.2 Pourcentage de la teneur G+C de l'ADN génomique..... 33
2.5.4.1.2.3 Séquençage du gène ARN16S..... 34
2.5.4.1.2.4. Electrophorèse sur gel de -polyacrylamide des protéines cellulaires (SDS PAGE)..... 34

2.5.5. La biopréservation 34
2.5.5.1 Technique traditionelle de la biopréservation 34
2.5.5.2 Rôle des bactéries lactiques en biopréservation 35
2.5.6. Activité antifongique des bactéries lactiques 35
2.5.6.1. Historique 35
2.5.6.2 Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action 36
2.5.6.3. Les composés antifongiques 36
3. Matériels et Méthodes 39
3.1. Isolement et Identification des moisissures 39
3.1.2. Matériel biologique 39
3.1.2.1. Echantillonnage des cerises de café 39
3.1.2.1.1. Sites d'échantillonnage 39
3.1.2.1.2. Les échantillons de café 40
3.1.2.1.3. Souches de références 40
3.1.3. Méthode d'étude mycologique des cerises de café 41
3.1.3.1. Isolement des moisissures 41
3.1.3.2. Purification et conservation des moisissures 42
3.1.3.3. Identification des moisissures 42
3.1.3.3.1. Etude des caractères culturaux 42
3.1.3.3.2. Etude des caractères morphologiques microscopiques 43
3.2. Méthode de dosage de l'OTA et de l'Aflatoxine 43
3.2.1. Production et extraction des mycotoxines sur milieu synthétique 43
3.2.1.1. Production des mycotoxines 43
3.2.1.2. Extraction des mycotoxines 43
3.2.2. Cinétique de sporulation d'*Aspergillus* DO 127 et production d'OTA en FMS sous stress hydrique 44
3.2.2.1. Les microorganismes 44
3.2.2.2. Les milieux de cultures 44
3.2.2.3 Les conditions de cultures 45
3.2.2.4 Mise en place des FMS 45
3.2.2.5 Echantillonnage 46
3.2.2.6. Analyse de l'Ochratoxine A par l'HPLC 47
3.3. Isolement et identification des bactéries lactiques 47
3.3.2. Méthodes d'isolement et d'identification phenotypique des bactéries lactiques 47
3.3.2.1. Ensilage de la pulpe fraîche de café 47
3.3.2.3 Etude morphologique des bactéries isolées 48

3.3.2.3.1. Etude macroscopique 48
3.3.2.3.2. Etude microscopique 48
3.3.2.4. Caractérisation biochimique et métabolique des bactéries lactiques 48
Les critères biochimiques étudiés sont : 48
3.3.3. Screening des bactéries lactiques antagonistes 49
3.3.3.1. La culture pure des bactéries lactiques sur gélose MRS 49
3.3.3.2 La préparation du milieu CYA inoculé avec des spores de moisissures 49
3.3.3.3 La recherche de bactéries antagonistes par la technique de recouvrement ou de la gélose en double couche 49
3.3.3.4 La lecture des boîtes 49
3.3.4 Les caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques antagonistes 50
3.3.4.1 L'étude de la fermentation des sucres appartenant des bactéries lactiques antifongiques 51
3.3.4.2 Le profil enzymatique des bactéries lactiques antifongiques 51
3.3.4.3. Physiologie des bactéries lactiques antagonistes 52
3.3.5 Le profil fermentaire des bactéries lactiques antagonistes 52
3.3.5.1 La préparation des solutions étalons 52
3.3.5.2 La production d'acide lactique et acétique 52
3.3.5.3 Détection et quantification des acides lactique et acétique par l'HPLC 52
3.3.6. Identification moléculaire des bactéries lactiques 53
3.3.6.1 Prétraitement des bactéries lactiques 53
3.3.6.2 Extraction de l'ADN 53
3.3.6.3. Amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) de l'ADN ribosomal 16S 53
4. Résultats et discussions 58
4.1. Isolement, identification et origine de souches de champignons filamenteux 58
4.1.1. Techniques d'isolement et de purification des moisissures à partir des échantillons de café. 58
4.1.2 Caractéristiques phenotypiques des principaux genres de moisissures 59
4.1.2.1 Caractéristiques des *RhizoMucor* 59
4.1.2.2 Caractéristiques phenotypiques des *Penicillium spp* 60
4.1.2.3 Caractéristiques phenotypiques des *Aspergillus spp* 60
4.1.2.3.1 Les *Aspergillus* de la section *Fumigati* 61
4.1.2.3.2 Les *Aspergillus* de la section *Nigri* 61
4.1.2.3.3 Les souches de références 61
4.1.2.3.4 Les caractéristiques des *Aspergillus* section *Nigri* isolés 63
4.1.2.4 Discussion sur l'identification des souches 64
4.1.3. Origine et distribution des moisissures isolées sur les différents échantillons 65

4.1.3.1 Discussion sur la distribution des souches isolées en 2008 et 2009 71

4. 2. Criblage des souches mycotoxinogènes 73

4.2.1. Souches productrices d'OTA sur milieu synthétique 73

4.2.2 Potentiel de production d'OTA de la souche DO127 sur blé précuit 75

4.2.2.1 Indice de sporulation des souches pour différentes conditions de culture 76

4.2.2.2 Production d'OTA par *Aspergillus* DO127 cultivé en Flacon Erlenmeyer ou en FMS..... 77

4.2.2.3 Culture en FMS sous stress hydrique : suivi respirométrique par le PNEO 78

4.2.3. Themostabilité de l'OTA produite par *Aspergillus* DO127 en FMS sur milieu EBLY^{RaA} 79

4.2.4 Discussion sur l'analyse des mycotoxines 79

4.3. Isolement et identification préliminaire des bactéries lactiques 82

4.3.1. Isolement des bactéries lactiques isolées de la pulpe de café 82

4.3.2. Identification préliminaire des bactéries lactiques 82

4.3.2.1. Caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques des bactéries isolées de la pulpe de café 83

4.3.3 Recherche des bactéries lactiques antagonistes des moisissures 84

4.3.3.1 Screening des bactéries lactiques antifongiques 84

4.3.3.2 Deuxième criblage avec les bactéries lactiques 85

4.3.3.3 Discussion sur l'isolement et le criblage des bactéries lactiques antifongiques 86

4.4 Caractéristiques physiologiques, profil fermentaire, biochimique et étude moléculaire des dix souches de bactéries lactiques isolées et sélectionnées du café 88

4.4.1 Caractéristiques physiologiques 88

4.4.2. Profil biochimique des bactéries lactiques 89

4.4.3. Profil enzymatique des bactéries lactiques 111

4.4.4 Profil fermentaire des bactéries lactiques 112

4.4.5. Identification moléculaire des bactéries lactiques 113

4.4.5.1 Produits des amplifications par PCR 113

4.4.5.2 Séquençages et construction de l'arbre phylogénétique 114

4.4.5.3 Discussion sur l'identification des bactéries lactiques antagonistes 115

DEDICACE

UN Grand hommage à LA VIERGE DE LOURDES qui m'a soutenue dans les dures étapes de cette thèse.

A LA PROMOTION NZRAMAH YELLEN DU LYCEE STE MARIE de Cocody (1996) : « le poids des études s'est envolé enfin !»

A La COMMUNAUTE SAINT FRANCOIS XAVIER (in memorium : Chritiane Demofard, Antoinette Ardouin) du lycée Sainte Marie de Cocody: merci à celles qui ont su donner de leur temps pour fonder en nous les bases de ce que je peux appeler la réussite. Je reprends ici quelque souvenir des conseils que nous avons reçu pendant les séances d'avis : «l'avenir appartient aux audacieux».

A ma FAMILLE, puisse cette œuvre couronner le chemin parcouru ensemble!

Un clin d'œil à ANTOINE DE SAINT EXUPERY : «l'essentiel est invisible aux yeux, on ne voit mieux qu'avec le cœur»

REMERCIEMENTS

Cette thèse a débuté en Octobre 2007 grâce au financement de l'Ambassade de France en Côte d'Ivoire. Je voudrais avant tout remercier sincèrement le Dr Sevastianos ROUSSOS Directeur de recherche à l'IRD de m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis 4 ans et de m'avoir proposé ce sujet de recherche. Grâce à ses impressionnantes qualités humaines et professionnelles, il m'a transmis un savoir faire indispensable en mycologie, ainsi que le goût de la recherche. A Isabelle PERRAUD-GAIME, chargée de recherche à l'IRD, je manifeste une profonde reconnaissance pour son dynamisme, ses encouragements et la qualité de son esprit critique qui ont finalisé en moi les bases de la recherche scientifique. Je leurs suis reconnaissante de s'être dévoués pour la réalisation de ce travail et d'avoir toujours été présents pour soutenir aussi bien moralement que financièrement mes démarches en France.

Une gratitude particulière au directeur de l'IMEP Professeur Thierry TATONI et M. Daniel GUIRAL Directeur de recherche à l'IRD pour leur contribution à l'accomplissement de cette thèse.

Je remercie mes professeurs de l'université de Cocody à Abidjan les Docteurs Alfred Germain Tagro KAROU et le Professeur Sébastien NIAMKE, qui par leur conseils et soutien ont participé à la réalisation de cette thèse surtout pour la collecte des échantillons de café en Côte d'Ivoire.

Je remercie vivement les membres du jury en particulier le Dr Patrick BOIRON, Professeur à l' univeristé de Dr. Maurice BENSOUSSAN, Professeur à l'université de Bourgogne-Dijon, Professeur Annie LESZKOWITCH de l'ENSAT de Toulouse, Professeur Gilles IACAZIO de l'université Paul Cézannne.

Je remercie également tout le personnel de l'IRD : Yoan LABROUSSE, Martine MARTINEZ, Isabelle GIFFARD, Fanny BAROT, Hervé MACARIE, Claude Charpy ROUBAUD, Christopher AUGUR (in memorium), Fatma et Pascal MIRLEAU.

Un vif remerciement à mes collègues étudiants, Hicham LAKHTAR, Roopesh KRISHNANKUTTY, Oswaldo GUZMAN, Gladys PERREZ (in memorium) , Marie-Thérèse TORRES et Fatma MIRLEAU-LAKHAL.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Jules BOKO du Ministère de l'Agriculture en Côte d'Ivoire, à Monsieur YEO Abraham du BNETD (Bureau National d'Etude Techniques et de Développement) et au Dr Louis BAN-KOFFI du CNRA (Centre National de Recherche Agronomique), qui ont contribué à l'acquisition de certaines données et informations utiles à la rédaction de ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mme Juliette N'TAKPE et Monsieur Jacques DELESQUEN de l'Ambassade de France en Côte d'Ivoire, également à Mme Catherine MARCHETTO et Mme Bettina THOMONT de l'Egide-Marseille.

Merci à tous mes amis de Marseille ! Bisou à l'Aumonerie !

Merci à mes amis et frères communautaires : tous ensembles vers les hauteurs!

Avant-Propos

Le travail de thèse a été effectué à l'Institut Méditerrannéen d'Ecologie et de Paléoécologie (IMEP) dans l'équipe « Ecologie microbienne et biotechnologies » à l'Université Paul Cézanne, Marseille, France.

Lors de mes travaux de recherche en Master II réalisé à l'université de Cocody en Côte d'Ivoire, j'ai eu l'occasion de travailler sur la flore lactique des fèves de cacao et de me rendre compte d'après la littérature qu'elles jouent un rôle primordial dans la biopréservation.

D'où est venue l'idée de rechercher d'éventuelles bactéries lactiques capables d'inhiber les moisissures mycotoxinogènes contaminant le café.

Avec Monsieur Sevastianos ROUSSOS et PERRAUD-GAIME Isabelle, nous avons mis en place un projet de recherche à double portée : d'abord constituer une collection de moisissures et de bactéries lactiques à partir d'échantillons de café provenant de la Côte-d'Ivoire et ensuite tester ces bactéries contre les moisissures.

Cette thèse a été financée par l'Ambassade de France en Côte d'Ivoire pour une durée de trois ans.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AAF	Aéro-anaérobie facultatif
Ac	*Aspergillus carbonarius*
An	*Aspergillus niger*
Ar	Article
BNETD	Bureau National d'Etudes Techniques et de Développement
CE	Communauté Européenne
Cb	*Carnobacterium*
CYA	Czapeck Yeast Agar
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
dATP	Désoxy-AdénineTriPhosphate
dCTP	Désoxy CytosineTriPhosphate
dGTP	Désoxy GuanineTriPhosphate
dTTP	DésoxyThimidineTriPhosphate
DMSO	Diméthyl Sulfoxide
DNTP	Désoxyribonucléotide TriPhosphate
DO	Djossou Olga
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food Agricultural Organization
FMS	Fermentation en milieu solide
HPLC	High Performance Length Chromatography
IS	Indice de sporulation
IRD	Institut de Recherche pour le développement
ITS	Internal Transcribed Spacer regions
IMEP	Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie
IARC	International Agency on Research Cancer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LAB	Lactic Acid Bacteria

LabCP	Lactic acid bacteria Coffee Pulp
Lb	*Lactobacillus*
MNHN	Museum National d'Histoire Naturelle
MRS	Man Rogosa Sharp
MSC	Matière de substrat carboné
OIC	Organisation Internationale du Café
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTA	Ochratoxine A
PDA	Potato Dextrose Agar
PMF	Poids de Matière Fraîche
Pc	*Pediococcus*
PS	Poids Sec
rRNA	Ribosomal Ribonucléic Acid
SB	Son de blé
Sc	*Streptococcus*
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymérase Chain Reaction
PS	Poids sec
PM	Poids moléculaire
TAE	Tris Acétate EDTA
Th	*Trichoderma harzianum*
USA	United States
UV	Ultra-Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principaux pays producteurs et exportateurs de café (robusta et arabica) dans le monde pour l'année 2009-2010 en nombre de sac de 60kg exportés (ICO, 2010). 5
Tableau 2 Teneurs maximales autorisées en OTA dans les denrées alimentaires (Règlements (CE) N° 1881/2006; N°105/2010)..... 24
Tableau 3: Principales bactéries lactiques et leurs activités antifongiques vis-à-vis d' un certain nombre de champignons filamenteux selon Schnürer et Magnusson (2005). 37
Tableau 4: Echantillons de café robusta provenant de la Côte d'Ivoire 40
Tableau 5 : Souches de références d'*Aspergillus* section *Nigri* utilisés pour l'identification des moisissures..... 41
Tableau 6: Liste des amorces utilisées pour la PCR. 54
Tableau 7: Composition du mélange réactionnel de 25µl 54
Tableau 8 : Conditions spécifiques des programmes PCR pour le thermocycleur avec trois couples d'amorces. 54
Tableau 9 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des *Aspergillus* section *Fumigati* isolés en 2008. 61
Tableau 10: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches de références d'*Aspergillus s*ection *Nigri* cultivées sur PDA pendant 7 jours..... 62
Tableau 11: Caractéristiques microscopiques des *Aspergillus* section *Nigri* isolés au cours des saisons 2008 et 2009. 63
T**ableau 12**: Répartition des différents genres de moisissures isolées en fonction du site d'échantillonnage, du support de séchagge et de de la nature des cerises. 66
Tableau 13: Pourcentage de moisissures isolées sur les deux années 2008 et 2009. 68
Tableau 14: Prévalence des Aspergillus carbonarius par rapport aux *Aspergillus* section *Nigri* dans le cadre des enquêtes effectuées dans différentes régions en Côte d'Ivoire pour 2008 et 2009..... 69
Tableau 15: Potentiel de production d'OTA sur milieu CYA au bout de 7 jours par les souches identifiées comme *A.carbonarius* isolées des échantillons de café en 2008 et 2009. 74
Tableau 16 : Potentiel de production d'OTA et d'Aflatoxine sur milieu CYA au bout de 7 jours par les souches d'*Aspergillus* section *Nigri* autre que *Aspergillus carbonarius* isolées des échantillons de café en 2008 et 2009 75
Tableau 17: Indices de sporulation (Is) et quantité d'OTA produite par *Aspergillus* DO 127, cultivé sur un milieu solide (Bagasse de canne à sucre +SB+FPT) en Erlenmeyer ou en colonnes de Raimbault avec un stress hydrique à partir de 60 heures pour les colonnes incubées à 25°C pendant 7 jours. 77
Tableau18: Concentration en OTA des échantillons obtenus après 7 jours de FMS en colonne sur milieu blé précuit chauffé (105°C) au four ou non pour *Aspergillus* DO 127 cultivé sur Ebly en FMS..... 79
Colonne 79
Tableau 19: Principales caractéristiques morphologiques des colonies de bactéries lactiques isolées par ensilage de la pulpe de café..... 83
Tableau 20 : Diamètre d'inhibition et reproductibilité de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de la pulpe de café. 86
Tableau 21: Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques, culturales et physiologiques des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café..... 89
Tableau 22 : Profil de fermentation des 49 sucres de la galerie API 50CH par certaines bactéries isolées de la pulpe de café. 90
Tableau 23 : Profil enzymatique des bactéries lactiques (Lb) isolées de la pulpe de café 111
Tableau 24: Bilan du profil fermentaire des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café.... 112

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique des tissus présents dans le fruit Coffea sp. à maturité (200 à 250 jours après fécondation) 7
Figure 2: Opérations successives dans le traitement des cerises de café par voie humide et par voie sèche 11
Figure 3: Photos d'aliments contaminés par des moisissures 14
Figure 4: Colonie d'*Aspergillus* section *Nigri* sur grains de café ensemensés en contact direct sur DG18 14
Figure 5 : Conidiophores d'*Aspergillus fumigatus* 16
Figure 6: Caractères morphologiques des *Aspergillus* 19
Figure 7: Microscopie optique de conidies de souches types représentatives des Aspergillus section Nigri 19
Figure 8 : Structure chimique de l'Ochratoxine A 22
Figure 9: Taxonomie des bactéries lactiques..... 30
Figure 10 : Zones de production du café en Côte d'Ivoire..... 39
Figure 11 : Photo des échantillons de café utilisés pour l'étude de la biodiversité microbienne post-récolte. 40
Figure 12 : Schéma d'isolement par contact direct et d'obtention en culture pure des moisissures. 41
Figure 13 : Schéma d'échantillonnage pour l'extraction de mycotoxines en milieu gélosé sur une colonie de moisissures. 44
Figure 14: Photo du dispositif de FMS équipé avec le respiromètre PNEO : 45
Figure 15: Micro-silo de la pulpe fraîche de café à six semaines d'ensilage**.** 48
Figure 16 : Recherche des bactéries lactiques antagonistes par la technique de recouvrement ou de gélose en double couche. 50
Figure 17 : Photo de la technique du contact direct pour l'isolement de moisissures en trois points sur gélose PDA à 25°C..... 59
Figure 18: Photo de structures macroscopiques et microscopiques des *RhizoMucor*..... 60
Figure 19: Photo de structure macroscopique et microscopique de *Penicillium*. 60
Figure 20 : Photo de structure macroscopique et microscopique de *Aspergillus fumigatus*..... 61
Figure 21 : Photo de colonies, spores et tête conidienne d'*Aspergillus* section *Nigri*.. 64
Figure 22 : Diversité des moisissures isolées en 2008 et 2009 à partir des échantillons provenant de café en Côte d'Ivoire..... 67
Figure 23 : Diversité géographique des différents genres de moisissures en 2008 et 2009. 69
Figure 24: Moyenne de contamination en moisissures en fonction de la nature des échantillons en 2008 et 2009. 70
Figure 25 : Distribution des moisissures en fonction des supports de séchage en 2009..... 70
Figure 26 : Indice de sporulation (Is) pour la souche DO 127 cultivé en FMS avec stress hydrique (colonne) et sans stress hydrique (Flacon Erlenmeyer) en fonction du temps d'incubation à 25°C. 76
Figure 27 : Cinétique de production de CO2 par la souche DO 127 cultivée en FMS à 25°C pendant 7 jours avec des débits d'aération différents et application d'un stress hydrique à partir de 60 heures. 78
Figure28 : pH des zones définies sur le micro-silo pour les prélèvements et mesures..... 82
Figure 29 : Morphologie des bactéries isolées de la pulpe de café au microscope optique (x 1000.). 83
Figure30 : Différents types d'inhibition après trois jours d'incubation des souches de bactéries lactiques contre des souches fongiques. 85
Figure 32: arbre phylogénétique présentant la similarité de l'ADN ribosomal 16S des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café et des souches de la base de données..... 115

RESUME

Ce travail de thèse a permis de décrire la contamination importante des grains du café de (*Coffea canephora* variété robusta) par des moisissures au cours des traitements post récolte des cerises de café par la voie sèche, dans une zone tropicale humide. La stratégie d'échantillonnage mise en place à consister à faire des prélèvements durant deux années successives (2008 et 2009) sur des sites localisés dans les principales zones de production du café en Côte d'Ivoire. A partir de 31 échantillons de cerises, grains et coques de café, 218 souches sauvages de moisissures ont été isolées sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) et identifiées. Ces champignons filamenteux sont répartis comme suit : *Aspergillus* section *Nigri* (52%) ; *Aspergillus* section *Fumigati ou Aspergillus* verts (13%), *Penicillium* (10%), *Mucor* (16%), *Fusarium* (4%), autre (5%). Les *Aspergillus* section *Nigri* qui comptent le complexe *Aspergillus niger agreggate* et *Aspergillus carbonarius* représentent un peu plus de la moitié de la population fongique soit 52%, soit 30% en 2008 et 70% en 2009, de la flore fongique totale. Ce groupe a fait l'objet d'une caractérisation morphologique. L'étude du potentiel mycotoxinogène des *Aspergillus* section *Nigri* isolées du café *robusta* a démontré qu'en plus de l'OTA, certaines souches d'*Aspergillus* section *Nigri* produiraient de l'aflatoxine. Cependant l'espèce *Aspergillus carbonarius* reste la plus ochratoxinogène (0,6 µg et 15µg d'OTA/g de milieu gélosé). En plus des moisissures 44 souches de bactéries lactiques (LAB) ont été isolées à partir de la pulpe fraîche de café. Les caractères morphologiques, biochimiques et culturaux ont été étudiés. L'identification moléculaire des bactéries a permis de les classer dans le groupe de *Lactobacillus plantarum sp*. Après un criblage orienté, deux souches de LAB avec un effet important d'inhibition de croissance des moisissures mycotoxinogènes ont été sélectionnées. Les deux souches de *Lactobacillus plantarum* ont démontré une activité antifongique contre les souches d'*Aspergillus carbonarius* hautement ochratoxinogènes. Par conséquent la prévention de la mycotoxinogenèse sur café *robusta*, pourrait passer par l'inhibition de la croissance de certaines moisissures ochratoxinogènes.

Les résultats acquis au cours de ce travail de thèse serviront de base afin de poursuivre cette étude d'une part avec des essais in situ pour tester l'efficacité des LAB sélectionnées et d'autre part, rechercher les biomolécules actives contre la germination des spores contaminants naturels post récolte en particulier des cerises de café en Côte d'Ivoire et des fruits et légumes en général.

Mots clés : Café robusta, moisissures post récolte, Ochratoxine A, Aflatoxine, *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus carbonarius*, Bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, effet antifongique

ABSTRACT

One of the objectives of this thesis was to describe the significant contamination of robusta coffee beans (*Coffea canephora*) by moulds during the post-harvest processing of coffee cherries in the dry process. The sampling strategy was to take samples for two consecutive years (2008 and 2009) from different areas of coffee production in Ivory Coast and on the other hand, from the same area but from coffee producers using different methods of drying of coffee beans. From 31 samples, 218 wild strains of fungi were isolated on Potato Dextrose Agar (PDA) media and identified. These filamentous fungi were as follows: black *Aspergillus*(52%); green *Aspergillus*(13%), *Penicillium* (10%), *Mucor* (16%), *Fusarium* (4%) and others (5%). The black *Aspergillus* were found to include *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* representing 52% of the fungal population, with a proportion of 30% in 2008 and 70% in 2009 of the total fungal flora. This group was selected to study more about their mycotoxin production. Most strains grown on media and at specific incubation conditions, were capable of producing one or more kinds of mycotoxins. Analysis of mycotoxins from fungi isolated from less than a hundred robusta coffee showed that ochratoxin A (OTA) was not the only mycotoxin that may contaminate the robusta coffee in Ivory Coast. Indeed, several strains belonging to the species *Aspergillus* section *Nigri* had shown their ability to produce not only ochratoxin A but also aflatoxin. However, the species *A. carbonarius* remains as the most ochratoxigenic strain but it does not produce aflatoxin.

In parallel to the isolation of fungi, 44 strains of lactic acid bacteria (LAB) were also isolated from fresh coffee cherries, harvested in Ivory Coast in 2009. The morphological, biochemical and growth characteristics were studied. Molecular identification of strains ranked them to be in the group of *Lactobacillus plantarum* sp. After a screening experiment, it was possible to select two strains of LAB with a significant effect of inhibiting fungal growth by producing mycotoxins. The two strains of *Lactobacillus plantarum* showed antifungal activity against strains of *Aspergillus carbonarius* which is highly ochratoxigenic. Therefore the prevention of mycotoxigenicity of robusta coffee could be rised by inhibiting the growth of certain ochratoxigenic fungi. The results achieved in this thesis serve as a basis to continue the study on one hand with field trials to test the effectiveness of selected LAB on the other hand, look for active biomolecules against spore germination of contaminants especially the natural post-harvest coffee beans in Ivory Coast and fruits and vegetables in general.

Keywords: Robusta coffee, post-harvest mould, Ochratoxin A, Aflatoxin, *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus carbonarius*, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, antifungal activity.

INTRODUCTION GENERALE

1. INTRODUCTION GENERALE

Avec une production annuelle de six millions de tonnes, le café se situe au premier rang des denrées agricoles commercialisées à l'échelle mondiale devant les céréales et au deuxième rang des produits échangés sur les marchés mondiaux, juste après le pétrole. Le café *Coffea canephora* variété *robusta* qui reste la variété la plus répandue en Afrique et qui représente environ 30% de la production mondiale de café (ICO, 2007), est essentiellement produit par le Brésil, le Vietnam et la Côte d'Ivoire (ICO, 2011).

Les cerises de café *robusta* subissent après la récolte un procédé de traitement par voie sèche, qui libère une importante quantité de coques (Brand *et al.*, 2000). Très souvent ce résidu, laissé pour compte à l'air libre, constitue une source potentielle de mycotoxine et plus particulièrement d'Ochratoxine A (OTA) (Gopinadhan *et al.*, 2006) ce qui n'est pas sans risque pour les producteurs de café, surtout ceux de la variété *robusta*.

Lorsqu'après séchage la cerise de café est décortiquée, les grains de café se contaminent au contact des coques porteuses de moisissures potentiellement mycotoxinogènes. Du fait de la normalisation liée au taux d'OTA, les paysans s'exposent à plusieurs risques notamment la perte des parts de marché, la baisse des prix au producteur, la baisse de la demande, la hausse du prix à la distribution et surtout la hausse de consommation de café contaminé dans les pays producteurs et dans les pays consommateurs sans règlementation (FAO, 2001).

L'amélioration de la qualité du grain de café sur toute la chaîne de production depuis les cerises jusqu'aux coques en passant par la gestion des grains de café, est l'une des priorités des pays producteurs et exportateurs de café. En particulier ces pays doivent éviter la contamination du café par les mycotoxines.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par des moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxinogène (Andersen et Thrane, 1996).Une mycotoxine peut être biosynthétisée par une diversité d'espèces de champignons filamenteux. La toxinogenèse d'une moisissure peut avoir lieu sur un substrat suivant certains paramètres écologiques (substrat, humidité, température), pendant la période de culture au champ, de traitements-conditionnements post récolte ou bien pendant la longue période de stockage et de transport (Le Bars et Le Bars, 2000).

L'Ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine hautement néphrotoxique et carcinogène (Kuiper-Goodman, 1991). Elle est produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum* dans les grains de céréales en région tempérée, par *Aspergillus carbonarius* dans

les grappes de raisin et le vin, et par *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* dans les grains de café (Pitt, 2000). L'OTA est la mycotoxine la plus souvent citée dans les contaminations de café vert, de café torréfié ou de café soluble (lyophilisé) (Dano Djédjé et *al.,* 2009) .

Au vu donc de ces informations, l'effet toxique des mycotoxines comme l'une des principales causes de contamination post-récolte n'est pas à sous-estimer. La présence accidentelle des moisissures dans les aliments conduit à une production de mycotoxines qui pourraient causer non seulement de nombreux désagréments à la santé humaine, tels les allergies, les démangeaisons, mais aussi des problèmes très grave comme l'immunosuppression et le cancer (Kuiper-Goodman *et al.,* 1991).

Selon les experts de la (FAO, 2006a) il serait plus onéreux et beaucoup moins efficace, de mettre en place un système de contrôle aux points d'entrée que de financer un projet visant à rechercher des mesures de prévention. En effet le coût élevé d'échantillonnage et d'analyse du café vert sont les principales difficultés que l'on rencontre lorsqu'on cherche à mettre en œuvre un programme pour réduire la présence d'OTA fondé sur l'identification et l'élimination des lots contaminés.

Donc réduire le taux d'OTA dans le café à un risque minimal suppose de la part des paysans l'adoption : a) de bonnes pratiques culturales, b) de méthodes optimales de manutention et c) de traitement post-récolte (Le Bars et Le Bars., 2000).

Afin de prévenir la contamination du café par les mycotoxines, il est important de connaître la mycoflore post récolte du café, en particulier celle qui est présente sur les cerises de café, au cours de la longue étape de séchage. Ce travail a donc été orienté vers l'étude de la mycoflore naturelle des cerises de café robusta, prélevés sur différents sites de production et de conditionnement post récolte à l'Est et à l'Ouest de la Côte d'Ivoire. Dans ces régions tropicales humides, le traitement de café par la voie sèche est généralisé. Traditionnellement, les cerises de café sont séchées sur les sites de récolte par les petits producteurs en utilisant différents supports où les cerises de café à sécher sont posées (tissus, rouleau de plastic, aire cimentée, claie de séchage ou à même le sol). Des prélèvements réalisés chez plusieurs paysans de la même région, mais utilisant différents supports pour sécher le grain de café ont également été réalisés pour isoler et identifier les moisissures responsables de la production d'OTA. Parallèlement, des cerises de café fraîches ont été échantillonnées, juste après la récolte et utilisées pour confectionner sur place des microsilos, afin d'isoler des bactéries lactiques en culture pure et étudier par la suite, leur potentiel antagoniste contre les moisissures post récolte de café. Les bactéries lactiques produisent durant leur métabolisme

des composés antifongiques parmi lesquels on distingue l'acide phenyl-lactique et des peptides (Ström *et al.*, 2002). Il y a eu de nombreuses publications sur les propriétés antifongiques et anti mycotoxinogènes des bactéries lactiques, dont *Lactobacillus casei* qui inhibent la croissance de *Penicillium citrinum* et *Penicillium expansum* ainsi que de la production de la patuline et de la citrinine (Gourama and Bullermann, 1995a, b).

L'objectif de ce travail de thèse est de prévenir la prolifération des moisissures ochrtaoxinogènes sur le café afin de réduire la contamination en mycotoxine, par l'utilisation des bactéries lactiques.

Le travail de la thèse a été organisé en cinq parties. Tout d'abord nous avons identifié grâce à des critères morphologiques et étudié la distribution écologique des moisissures post récolte du café. Ensuite nous avons déterminé le potentiel mycotoxinogène des moisissures sur milieu synthétique et par dosage à l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Puis toutes les moisissures ont été identifiées, avant d'aboder l'étude de leur potentiel mycotoxinogène. Par la suite à partir des microsilos de pulpe de café ensilée, 44 souches de bactéries lactiques vont être isolées et identifiées avec des outils classiques et moléculaires. Enfin un criblage des bactéries lactiques isolées va être réalisé pour mettre en évidence le pouvoir antagoniste des souches naturelles contre les moisissures productrices d'OTA. Les résultats sont regroupés en cinq chapitres dont le dernier a été rédigé sous forme d'article, déjà publié dans la revue Anaerobe (Djossou *et al.*, 2011).

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

2. Analyses bibliographiques

2.1. Le café

2.1.1. Production et marché mondial du café

La culture du café occupe environ 10 millions d'hectares, dont 42% en Amérique du Sud (Brésil, Colombie, Venezuela, Équateur), 14% en Amérique centrale (Mexique, Guatemala, République dominicaine), 34% en Afrique (Côte-d'Ivoire, Éthiopie, Angola, Congo et en Indonésie), le reste se répartissant entre les Philippines, Madagascar, l'Inde, Cuba, Haïti (Tableau 1). La variété *Coffea arabica* appelé plus simplement « arabica » représente 60% à 70% de la production mondiale et la variété *Coffea canephora* appelée plus communément « robusta » représente 30% à 40% de cette production (ICO, 2010). Dans le Tableau 1 figurent les 20 principaux pays producteurs et exportateurs de café. Le Brésil est le premier exportateur de café, suivi du Vietnam, deuxième pays exportateur de café. La Côte d'Ivoire a reculé au 11e rang des pays exportateurs de café.

Tableau 1 Principaux pays producteurs et exportateurs de café (robusta et arabica) dans le monde pour l'année 2009-2010 en nombre de sac de 60kg exportés (ICO, 2010).

Pays	**Nombre de sac de 60 kg de café**	**Exportation de café en tonnes**	**Rang mondial**
Brésil	**30.148.932**	**1.808.936**	**1**
Vietnam	**15.780.315**	**946.819**	**2**
Inde	8.045.369	482.722	3
Colombie	7.214.305	432.858	4
Guatemala	3.562.959	213.778	5
Honduras	3.240.113	194.407	6
Indonésie	3.124.960	187.498	7
Peru	3.009.458	180.567	8
Uganda	2.891.342	173.481	9
Mexique	2.824.667	169.480	10
Côte d'Ivoire	**1.971.435**	**118.286**	**11**
Ethiopie	1.898.983	113.939	12
Nicaragua	1.479.193	88.752	13
El Salvador	1.372.904	82.374	14
Costa Rica	1.228.033	73.682	15
Equateur	1.143.284	68.597	16
Tanzanie	1.066.364	63.981	17
Papouasie Nouv. Guinée	1.030.481	61.829	18
Cameroun	651.826	39.110	19
Kenya	498.205	29.892	20

Les exportations mondiales de café se sont élevées à 8,48 millions de sacs en février 2011 par rapport aux 7,39 millions de sacs exportés en février 2010. Les exportations des 5 premiers mois de l'année caféière 2010/11 (octobre/10 à février/11) ont augmenté de 14% pour s'établir à 42,3 millions de sacs par rapport à 37,1 millions de sacs pendant la période correspondante de l'année précédente. Les exportations d'arabica pendant les 12 mois écoulés entre mars 2010 et février 2011 se sont élevées à 66,9 millions de sacs par rapport à 59,9 millions de sacs pendant la période correspondante de l'année précédente, et les exportations de robusta se sont établies à 32,2 millions de sacs par rapport à 34,7 millions de sacs pendant la période correspondante de l'année précédente (ICO, 2010).

2.1.2. Eléments de botanique et d'écologie du café

2.1.2.1. Classification du caféier

Les caféiers est un arbuste appartenant au genre *Coffea*, de la famille des rubiacées, dans l'ordre des rubiales. Le genre *Coffea* comprend près de 70 espèces et plusieurs centaines de variétés. Les espèces de caféiers les plus répandues et commercialisées sont (communément appelée arabica) et variété robusta (Sera *et al.,* 2000).

- **Arabica** : L'Arabica originaire d'Ethiopie est le premier café à avoir été découvert et cultivé. Les principales zones de culture de l'arabica sont les régions montagneuses de l'Amérique centrale et du sud et d'Afrique orientale. Sa culture est délicate et nécessite un climat frais aux environs de 20°C; il requiert un sol riche en minéraux, et une altitude supérieure à 600 m (Lambard, 2003). Cette espèce donne des fruits de très bonne qualité à la forme allongée, plus pointue que celle d'un robusta (Costro *et al.,* 2006). Naturellement peu caféinés, il est riche en magnésium, en fer et en vitamine PP. Produisant un arôme doux et fin, il est considéré comme la meilleure variété pour la dégustation. La production mondiale du café arabica s'estime à 76,4% de la production mondiale (Costro *et al.,* 2006).

-**Robusta** : Le caféier robusta est un arbre de grande taille (pouvant atteindre jusqu'à 10 mètres de haut) croissant à des altitudes moins élevées que l'arabica, donnant des rendements élevés et résistant mieux aux maladies. Il se cultive en plaine dans des conditions plus humides dans les régions d'Afrique centrale et occidentale, dans l'ensemble du sud-est asiatique et dans certaines zones du Brésil (ICO, 2011). Les cerises sont rondes, petites et plus épaisses que celles des arabica (Lambard, 2003). Le café robusta moins fin que l'arabica, possède une teneur en caféine deux fois plus élevée que celle de l'arabica. Il se vend moins cher sur le marché et entre souvent dans la composition des cafés solubles ou pour donner

l'énergie stimulante de la caféine du café boisson (FAO, 2001). Le café robusta représente un peu moins de 23,6% de la production mondiale (Costro *et al.*, 2006).

2.1.2.2. Histologie du péricarpe du fruit du café

Une cerise de café mûre est formée d'une pellicule externe (l'exocarpe), rouge lorsque le fruit est mûr, qui renferme la pulpe. La pulpe de café est la partie charnue qui se trouve entre l'écorce et les grains de café, appelés aussi mésocarpère (Fig.1). Elle est formée d'une couche de cellules spongieuses d'une épaisseur approximative de 5mm (De Castro et Marraccini, 2006). La pulpe renferme en général deux fèves, chacune enveloppée dans un tégument très fin, semblable à du papier (l'endocarpe). Lorsque le fruit est mûr, l'endocarpe est recouvert d'une couche de mucilage fine et visqueuse. Sous l'endocarpe, les grains de café sont enrobés d'une deuxième couche protectrice encore plus fine, appelée pellicule argentée (Coste, 1989).

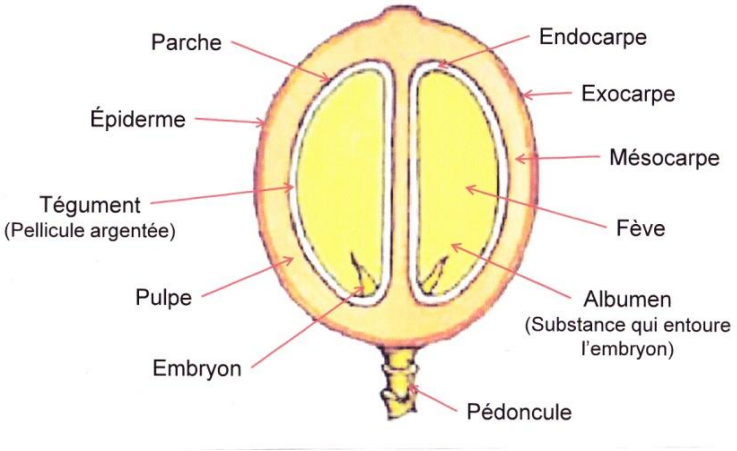


Figure 1: Représentation schématique des tissus présents dans le fruit *Coffea sp*. à maturité (200 à 250 jours après fécondation) (De Castro et Marraccini, 2006).

2.1.2.3. La composition chimique de la pulpe de café fraîche

La pulpe de café contient 80 à 85% d'humidité (Bressani *et al.*, 1972), 0,48% de lipides, 3,4% de fibres, 2,1% de protéines, 1,5% de cendres et 15,80% d'hydrates de carbone (Elias, 1978). Cependant ces valeurs peuvent varier car elles sont soumises à la variété du caféier, la maturité du fruit, le type de traitement appliqué et le lieu de production.

2.1.3. Récolte des cerises du café

Le café est en général récolté une fois par an lorsque les cerises sont mûres c'est-

à-dire bien rouges, brillantes et fermes. L'époque de la récolte varie selon la région mais se déroule de décembre à janvier, dans l'hémisphère nord, et d'avril à mai, dans l'hémisphère sud. Les cerises sont récoltées de trois différentes manières :

- **Le Picking**: il s'agit d'une cueillette très sélective et entièrement manuelle qui consiste à cueillir une à une les cerises mûres, immatures ou déjà fermentées ;
- **Le Stripping** : c'est une méthode manuelle consistant à récolter toutes les cerises d'un même arbre en une seule opération, qu'elles soient mûres, immatures ou déjà fermentées ;
- **La récolte mécanique** : dans ce cas tous les fruits sont récoltés à l'aide d'une machine spéciale

La cueillette manuelle et sélective des cerises mûres donne les meilleurs résultats dans la mesure où les fruits verts sont laissés sur l'arbre jusqu'à maturation alors que les cerises fermentées sont éliminées. On peut déjà ainsi contrôler la qualité du produit : il vaut mieux éviter de récolter les cerises immatures car elles donnent mauvais goût. Il est important d'éliminer les cerises trop mûres qui risquent d'être contaminées par des insectes. De même il ne faut pas récolter les cerises tombées à terre car elles peuvent contenir des spores fongiques, et donc présenter un risque élevé de contamination en mycotoxine.

Les facteurs économiques sont déterminants pour le choix de la méthode de récolte. La cueillette par Picking peut être plus couteuse que le Stripping où tous les fruits sont ramassés d'un seul trait, car elle oblige à plusieurs passages. En fait la cueillette sélective et manuelle est la phase la plus couteuse de la production de café, 5 à 10 passages étant en moyenne nécessaires par récolte. Quelque soit la méthode de récolte, 100 kilos de cerises mûres produisent de 12 à 20 kilos de café vert, prêt à l'exportation (FAO, 2006b).

2.1.4. Traitement post-récolte de cerises du café

Après la cueillette, le café passe par une série d'opérations de traitement dans le pays de production avant d'être exporté sous la forme de « grain vert marchand. On distingue trois principaux traitements qui sont:

- le traitement initial : ce traitement consiste à détacher les grains des enveloppes de la cerise et à les extraire en éliminant ces enveloppes (exocarpe, pulpe, parche et pellicule). Il existe deux méthodes pour libérer le grain de café de tout ce qui l'entoure: la voie humide et la voie sèche (Perraud-Gaime, 1995; Schwan and Wheals, 2003).

- **le décorticage ou déparchage** : Le décorticage ou déparchage conduisent au café vert marchand.

Le décorticage du café consiste à débarrasser la cerise sèche de son enveloppe externe appelée coque. Le grain de café obtenu à l'issu du décorticage est le café vert nature (Lambard, 2003).

Le déparchage du café consiste à débarrasser la cerise fraîche de la pulpe de café. Le grain de café vert obtenu est dit café vert lavé (Lambard, 2003).

Une fois séchée, le café coque ou le café parche peut être stocké et transporté.

- **le stockage ou entreposage:** Très souvent les grains de café vert sont stockés en sacs de jute de 60 kg. Au cours du stockage le café vert se réhydrate partiellement pendant le stockage du fait de l'humidité atmosphérique. C'est pouquoi il est conseillé d'entreposer les sacs dans des atmosphères aérées.

2.1.4.1 Le traitement par voie sèche

Le traitement par voie sèche vise à ramener la teneur en eau du café de 70 à 12% PMF(Poids de matière fraîche).

Il existe deux types de séchage:

- séchage naturel: sur bâche, sur claie ou aire cimentée pendant 2 semaines. Les grains étalés sont régulièrement remués pour empêcher la formation de moisissure.

- séchage artificiel: favorisé par certaines grandes fermes, il s'agit de séchoirs statiques ou rotatifs ou à brassage d'air chaud (Lambard, 2003).

2.1.4.2 Le traitement par voie humide

Le traitement par voie humide se compose des étapes suivantes: cueillette, dépulpage, fermentation, lavage, puis séchage, décorticage et polissage. On obtient alors le café dit *lavé* ou *mild*, ce qui est en général le cas de l'arabica. (Coste, 1989). Ce procédé humide contient les opérations technologiques suivantes (Perraud-Gaime et Roussos, 1997):

- la réception:

Les cerises sont versées dans une cuve munie d'un siphon. Les cerises flottantes, qui représentent généralement 15% des lots, seront récupérées et seront traitées séparément par voie sèche. Les cerises les plus lourdes, passant par le siphon, sont transférées vers les dépulpeurs dans un courant d'eau.

- le dépulpage :

Cette opération a pour but d'éliminer la pulpe. Les cerises fraîches et nettoyées (séparées des débris végétaux et des matières étrangères collectées au moment de la cueillette), sont passées dans des dépulpeurs dont les cylindres ou disques, pourvus d'aspérités, déchiquettent la pulpe et séparent les grains (Zuluaga, 1989).

- la démucilagination:

Une partie du mésocarpe mucilagineux adhère encore à la parche après dépulpage. Le café parche doit en être totalement débarrassé car ce mésocarpe riche en pectines et en sucres pourrait provoquer des fermentations indésirables pendant le séchage. Le mucilage est éliminé par l'une des techniques suivantes :

- *Action biochimique* : c'est l'hydrolyse de la pectine, par les pectinases endogènes du fruit et de la microflore, en acide pectinique, qui conduit à l'élimination des propriétés gélifiantes de la pectfine.

- *Action chimique* : on utilise de l'eau acidifiée avec une agitation mécanique forte.

- *Action mécanique* : par des machines « démucilagineuses » qui nécessitent une grande quantité d'eau et d'énergie.

- le lavage :

Il a pour but d'éliminer les produits formés au cours de la fermentation, les débris de mucilage, une partie des composés phénoliques, etc… Le café est poussé et brassé à contre-courant dans les laveurs, ou traité dans de grandes centrifugeuses.

- le séchage :

Après le lavage, le grain parche contient 50 à 60% d'eau et s'altèrerait s'il était stocké en l'état. Le séchage peut se faire de façon naturelle ou artificielle, jusqu'à l'obtention d'une humidité de 11 à 12% (café parche).

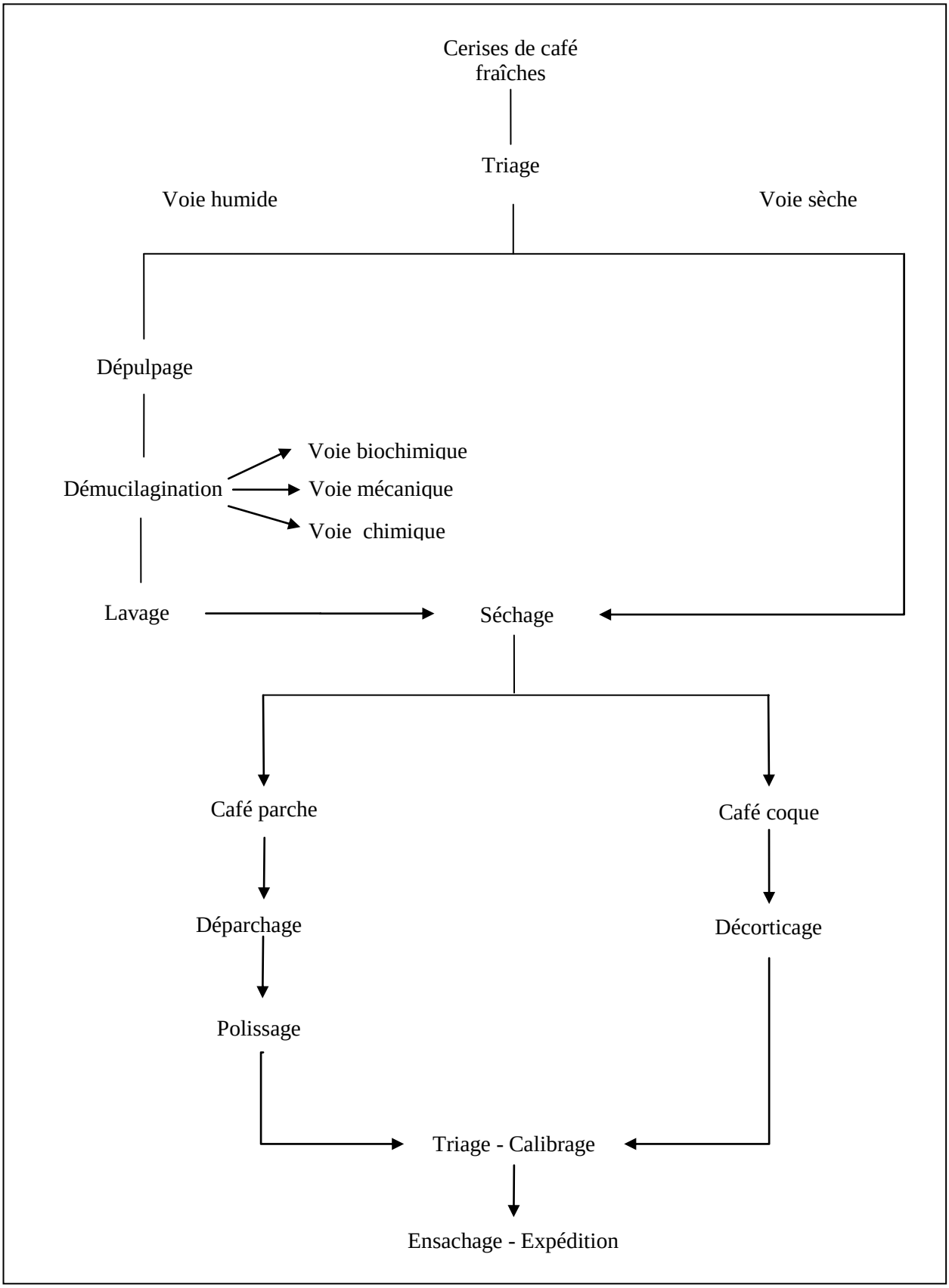


Figure 2: Opérations successives dans le traitement des cerises de café par voie humide et par voie sèche (Wilbaux, 1956).

2.1.5. La conservation de la pulpe de café par ensilage

L'ensilage se définit comme la conservation de la pulpe par une acidification anaérobie due à l'action de microorganismes (Perraud-Gaime and Roussos, 1997). Cette fermentation se réalise à température ambiante et fait intervenir des bactéries lactiques, plus particulièrement des *Lactobacillus plantarum* qui en se développant fermentent les sucres et produisent de l'acide lactique mais aussi des molécules bioactives empêchant la prolifération de microorganismes opportunistes L'acidification rapide du milieu stoppe le développement des microorganismes putréfiants, et l'anaérobiose interdit la croissance des champignons aérobies (Moo-Young *et al.,* 1983; Mc Donald *et al.,* 1991). L'intérêt de l'ensilage de la pulpe de café porte essentiellement sur la conservation de la valeur nutritive de la pulpe. (Perraud-Gaime, 1995).

2.1.6. La flore microbienne du café

Les microorganismes sont naturellement présents sur les cerises de café avant la récolte et au cours des traitements post-récolte. La biodiversité microbienne présente sur les cerises et grains de café dépend de la variété de café, des techniques de traitement post-récolte, des facteurs environnementaux du terroir tels que l'humidité, la température et la flore microbienne du sol entourant les caféiers (Batista *et al.,* 2009). L'évaluation de la flore microbienne présente sur la pulpe et les coques de café a révélé la présence de bactéries, de moisissures et de levures à des taux différents du fait de la différence des traitements post-récolte appliqués (Roussos *et al.,* 1995). Au Brésil des travaux ont rapporté les données suivantes sur la flore microbienne du café: parmi les 754 isolats, 164 sont des bactéries à Gram négatives (*Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacter et Serratia);* 191 sont des bactéries à Gram positives (*Microbacterium, Brochothrix, Dermabacter et Lactobacillus*), 107 sont des levures appartenant au genres *Pichia, Candida, Arxula* et *Saccharomycopsis*; enfin, 292 souches de moisissures ont été trouvées avec les genres *Cladosporium, Fusarium* et *Penicillium* (Silva *et al.,* 2000).

2.2. Les moisissures

2.2.1. Définition des moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs,…), à l'aide de leur structure mycélienne comportant des filaments ramifiés appelés hyphes, d'où le terme Hyphomycètes (Peberdy, 1990). Ce sont des micro-organismes eucaryotes, sporogènes, non chlorophylliens, formant une structure

mycélienne et des thalles constitués par de nombreux filaments ramifiés (Cooney & Emerson 1965; Bocquet 1993; Hassouni, 2007). Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes (Botton *et al.,* 1990).

Il existe différents groupes de champignons filamenteux : les zygomycètes les ascomycètes et les deutéromycètes. Ces derniers regroupent les différents contaminants post récolte (*Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria*) ce sont des champignons imparfaits car seul leur forme anamorphe (asexuée) est connue. Leur différentiation se fait alors à l'aide de leurs formations conidiennes. On va pouvoir trouver dans ce groupe de nombreux contaminants des matières premières alimentaires telles que les céréales, le café ou les fruits (Samson *et al.*,1996).

2.2.2 Spores et cycle de vie des moisissures

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

2.2.3 Les moisissures post-récolte

Les moisissures présentes sur les aliments se classent en deux groupes:

les moississures bénéfiques impliquées dans la fermentation (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camenberti*), la production d'antibiotiques et les condiments.

les moisissures nuisibles responsables d'altération des denrées (*Alternaria solani* (Fig.3a) sur la tomate, *Fusarium* (Fig.3b) sur le mais), d'allergies et produisant des mycotoxines.

Ces moisissures sont présentes dans l'environnement direct de la plante (air, sol, …) et colonisent les plantes depuis le champ puis prolifèrent sur l'aliment au cours du traitement post-récolte durant la période de stockage. Le développement des moisissures sur les aliments a des conséquences économiques telles que la baisse de la qualité marchande des grains et des fruits, la diminution de la performance du bétail au niveau de la reproduction, l'altération de la qualité organoleptique des aliments dans l'industrie agro-alimentaire (Girardin, 1997; Botton et al., 1990).

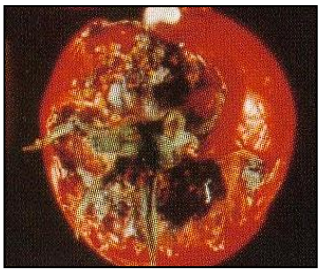


Figure 3a: Tomate

Figure 3b: Grains de maïs

Figure 3: Photos d'aliments contaminés par des moisissures

2.2.3.1. Le genre *Aspergillus*

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

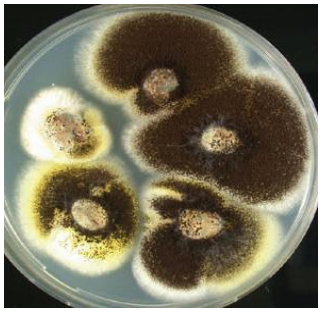


Figure 4: Colonie d'*Aspergillus* section *Nigri* sur grains de café ensemensés en contact direct sur DG18 (Dichloran Glycérol) (Perrone *et al.,* 2007)

2.2.3.1.1 Les *Aspergillus* de la section *Nigri*

Les *Aspergillus* de la section *Nigri* (*A.* section *Nigri*) comprenant deux sous-groupes qui sont :

- le complexe A.niger aggregate (A. niger, A. tubingensis, A. foetidus, A. piperis, A. brasiliensis, A. ibericus, A. costaricensis, A. uvarum, A.vadensis and A. lacticoffeatus) (Samson et al., 2004).

- les autres *Aspergillus* de la section *Nigri* qui sont *A. japonicus, A.aculeatus, A.carbonarius, A. heteromorphus, A. ellipticus, A.sclerotioniger, A. homomorphus* (Samson *et al.,* 2004). Couramment retrouvés dans le sol et sur les végétaux (Kozakiewicz 1989; Abarca *et al.,* 2004; Samson *et al.,* 2004), ils sont responsables d'altération des aliments et jouent un important rôle en industrie fermentaire grâce à la production d'acides organiques tels que

l'acide citrique et l'acide gluconique, mais aussi d'enzymes hydrolytiques comme l'amylase et la lipase (Varga *et al.,* 2000). Cependant ils revêtent une importance particulière car ce sont des producteurs potentiels d'Ochratoxine A (OTA) dans le raisin et ses dérivés (Belli *et al.,* 2006; Dachoupakan, 2008; Chiotta *et al.,* 2010) également dans le café et le cacao (Cabañes *et al.,* 2002; Batista *et al.,* 2009; Moslem *et al.,* 2010).

2.2.3.1.1.1 L'espèce *Aspergillus niger*

L'espèce *Aspergillus niger* est considéré comme GRAS par la Food Etats-Unis and Drug Administration et elle fut choisie par M. Raimbault pour les premières études de FMS sur le manioc protéiné. (Schuster *et al.,* 2002). En effet seul 3-10% des souches est considérée comme potentiellement productrices d'OTA (Albarca *et al.,* 1994). Mais dès 2001, cela a été remis en cause par des taxonomistes du CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) qui ont parlé de mauvaise identification. L'espèce *Aspergillus niger* est l'un des microorganismes les plus importants utilisés dans la biotechnologie. Couramment utilisé pour produire de nombreuses enzymes notamment des enzymes alimentaires et de l'acide citrique il intervient aussi en biotransformation pour le traitement des déchets (Schuster *et al.,* 2002).

2.2.3.1.2 Les *Aspergillus* de la section *Fumigati*

Les *Aspergillus* de la section *Fumigati* (*A.* section *Fumigati*) est bien souvent représentée par l'espèce *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) qui synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, des dérivés quinoniques et des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle (Bauer, 1989 ; Gareis and Wernery, 1994). La variabilité des espèces au niveau de la section *Fumigati* est mis en évidence par les analyses macroscopiques, microscopiques, la croissance à différentes températures, la production d'extrolites et l'analyse de séquences génétiques incluant la β-tubuline, la calmoduline et l'actine (Rinyu *et al.,* 1995 ; Hong *et al.,* 2005) . Quatre groupes d'espèces se distinguent dans cette section, il s'agit de : *A. fumigatus* (Fig.5a), *A. lentulus, A. novofumigatus* (Fig.5b), *A. fumigatiaffinis.* Morphologiquement *A. fumigatus* se distingue par sa vésicule claviforme de *A. lentulus, A. novofumigatis, A. fumigatiaffinis* qui présentent tous une vésicule subglobuleuse et qui contrairement à *A. fumigatus* sporulent moins (Hong *et al.,* 2005). Les espèces *A. novofumigatis, A. fumigatiaffinis* (Samson *et al.,* 2006) et *A. lentulus* (Hong *et al.,* 2005) croissent très bien à 10°C, mais pas à 50°C qui est la température caractéristique de croissance de *A. fumigatus* (Hong *et al.,* 2005 ; Samson *et al.,* 2006). Sur la base des critères phenotypiques, excepté leur profiles extrolites *A. lentulus* ressemble

étroitement *A. novofumigatis* et *A. fumigatiaffinis*. Six familles d'extrolites sont spécifiques à *A. lentulus* tandis que neuf jamais détectées chez *A. lentulus* ont été mis en évidence chez à *A. fumigatus* (Hong *et al.,* 2005) . Les souches de la section *Fumigati*, isolées à 45°C seraient des *A. fumigati* (Rapper et Fennell 1965 ; Samson *et al.,* 2006). Leurs caractéristiques microscopiques et macroscopiques sont conformes à la description donnée par Samson *et al.,* (2006).

Figure 5a: Conidiophores d'*Aspergillus fumigatus*

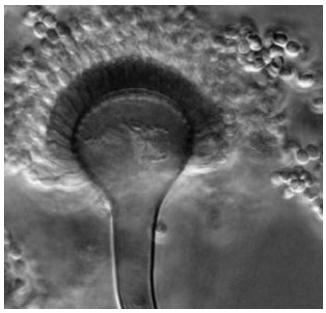


Figure 5b: Conidiophore d'*Aspergillus novofumigatus*

Figure 5 : Conidiophores d'*Aspergillus fumigatus* (Samson *et al.,* 2006).

2.2.4. Les moisissures des grains de café

Les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, constituent les principaux contaminants détectés dans les cerises de café depuis la récolte jusqu'au stockage (Steigmeier and Schlatter, 1991). Sur le café, la flore dominante est le genre *Aspergillus* (Samson *et al.,* 2006; Perrone *et al.,* 2007). L'espèce *Aspergillus ochraceus* et des isolats de la section *Nigri* dont *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger* ont été aussi signalés comme producteurs d'OTA (Samson *et al.,* 2006). Les espèces *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius* sont associés à la production de l'OTA dans les régions tropicales alors que la production d'OTA dans les zones tempérées est liée à la présence de *Penicillium*. (FAO, 2001). Deux espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum et P. nordicum*) sont aujourd'hui reconnues comme des producteurs d'OTA. La présence d'OTA est typiquement associée à la conservation des grains dans les climats tempérés d'Europe et d'Amérique du Nord (Steyn., 1995)

2.2.4.1. Importance des *Aspergillus* dans la contamination des grains de café

Trois espèces ou groupes d'espèces de moisissures peuvent jouer un rôle important dans la contamination des grains de café du fait de leur capacité à produire l'OTA :

- l'espèce *A. ochraceus* appartenant aux *Aspergillus* section *Circumdati* (Samson *et al.,* 2006; Perrone *et al.,* 2007)

- l'espèce *A.carbonarius* appartenant aux *Aspergillus* section *Nigri* (Samson *et al.,* 2006)

- l'espèce *A. niger* faisant partie du complexe *A. niger aggregate*, un sous-groupe des *Aspergillus* section *Nigri* (Samson *et al.,* 2006).

Tout d'abord, environ 75% des souches de *A.ochraceus* isolées à partir des grains de café au Brésil, sont productrices d'OTA (Taniwaki *et al.,* 2003). Ensuite, le pourcentage de *A.carbonarius* isolés de grains de café produisant de l'OTA varie entre 70- 100% (Heenan *et al.,* 1998 ; Taniwaki *et al.,* 2003; Pardo *et al.,* 2004 ; Battilani *et al.,* 2003; Perrone *et al.,* 2007; Leong *et al.,* 2007). Enfin pour l'espèce *Aspergillus niger*, seul un faible pourcentage d'isolats (2-20%) est responsable de la production d'OTA (Heenan *et al.,* 1998; Battilani *et al.,* 2003; Perrone *et al.,* 2007) et il en produit en très faible concentration. Cependant pour ce qui est de la prédominance de ces espèces sur le café, elle varie selon les origines des échantillons de café mais aussi de la variété du café. Ainsi dans plusieurs travaux, différents pourcentages d'*A. niger,* d'*A.carbonarius* et d'*A.ochraceus* ont été isolés sur le café. Sur du café arabica provenant du Brésil, Taniwaki *et al.* (2003) ont isolé 63% d'*A.niger*, 31% *A.ochraceus*, et 6% *A.carbonarius*. Au Vietnam, *A.carbonarius* domine la flore d'échantillons de café arabica et robusta (Leong *et al.,* 2007). De même en Thailande, *A.carbonarius* représente 50% de la flore fongique présente sur le café (Joosten *et al.,* 2001).

2.2.5. Critères d'identification des moisissures

L'identification de très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturaux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Botton *et al.,* 1990).

2.2.6.1. Identification morphologique

L'identification morphologique d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturaux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et

microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,…) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

2.2.6.1.1. Identification macroscopique

Le thalle : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium; le thalle peut être siphonné ou septé.

L'aspect des colonies : représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor, Rhizopus*, bombées).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*), (Botton *et al.*, 1990).

2.2.6.1.2. Identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Cahagnier et Richard-Molard, 1998) :

Le conidiophore : il s'agit de l'organe qui porte les celulles conidiogènes. Il se présente différemment chez *Aspergillus* (conidiophore à l'extrémité dilatée, formant une tête) (Fig.6a) et *Penicillium* (conidiophore en verticille formant un pinceau) (Fig.6b) (De Hoog et Guarro, 1995).

Les cellules conidiogènes : les cellules conidiogènes sont les structures de fructification des conidies.On distingue les phialides et les métules (Fig.6). Leur mode d'implantation est utilisée pour l'identification de genres et d'espèces (De Hoog et Guarro, 1995).

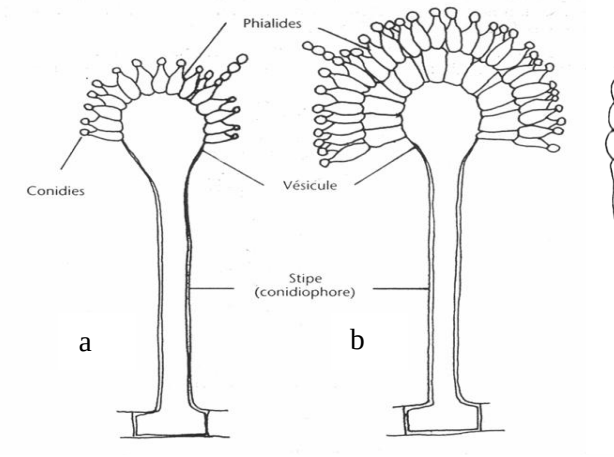


Figure 6 a : Caractères morphologiques des *Aspergillus* (a) monosérié (b) bisérié

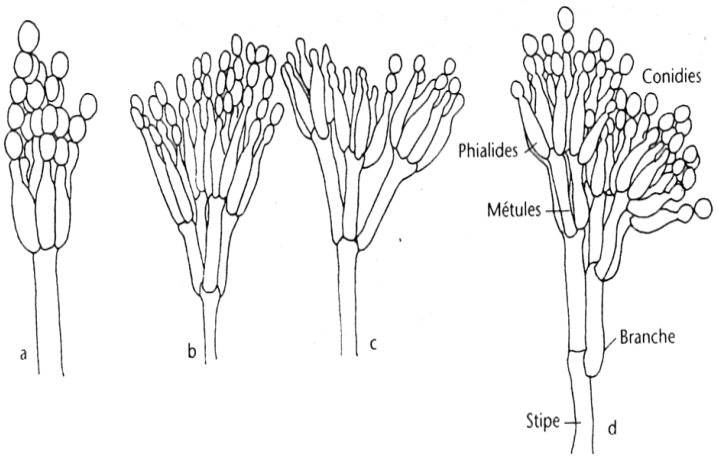


Figure 6b : Caractères morphologiques des *Penicillium* (a) Pinceau monoverticillé (b) biverticillé (c) biverticillé fourchu (furcatum) (d) terverticillé.

Figure 6: Caractères morphologiques des *Aspergillus* (6a) (Samson *et al.*, 1996) et *Penicillium* (6b) (Pitt and Hocking, 1999) .

Les conidiospores : les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes. L'examen de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Botton *et al.*, 1990).

L'ornementation de la paroi externe des spores et leur taille permet de différencier certaines espèces. Dans la section *Nigri* Samson *et al.*, (2007) distinguent deux catégories de souches en fonction de l'enveloppe externe des spores:

Les espèces à spores échinulées: *A.ibericus* (Fig. 7a), *A.homomorphus* (Fig. 7b), *A.heteromorphus*…) (Samson *et al.*, 2007)

Les espèces à spores verruqueuses : *A. carbonarius* (Fig. 7c), *A.costaricaensis*, *A.japonicus*, *A. aculeatinus* (Fig. 7d), *A.aculeatus*, (Samson *et al.*, 2007).

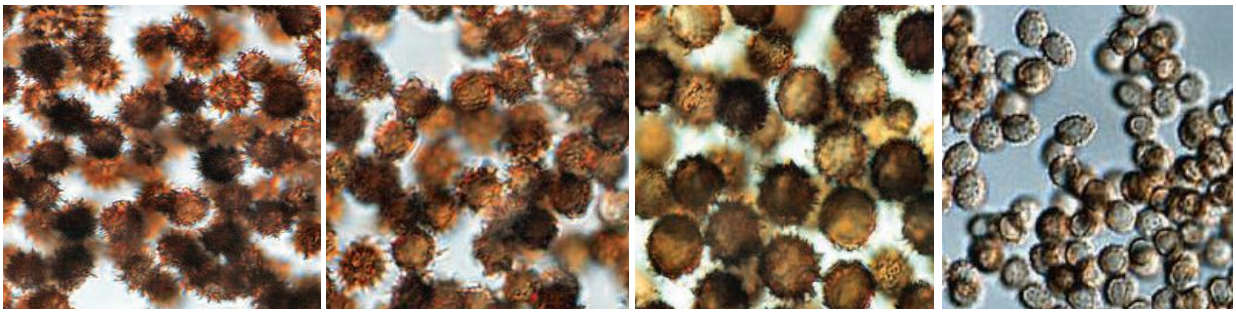


Figure 7a : *A. ibericus* Figure 7b : *A. homomorphus* Figure 7c : *A. carbonarius* Figure7d: *A. aculeatinus*

Figure 7: Microscopie optique de conidies de souches types représentatives des *Aspergillus* section *Nigri* (Samson *et al.*, 2007).

L'identification phenotypique des *A.* section *Nigri* peut être complétée par d'autres paramètres physiologiques tels que les caractéristiques de la croissance sur des milieux spécifiques comme la creatine agar et boscalide agar, la croissance à différentes températures et la caractérisation des extrolites produits par chaque souche (Samson *et al.,* 2007). Le milieu Boscalid agar peut être utilisé pour la sélection des *A. carbonarius, A. sclerotioniger, A. homomorphus* et *A. sclerotiicarbonarius,* tandis que le milieu CREA aide à séparer *A. sclerotiicarbonarius* d'autres espèces qui lui sont apparentées à savoir *A. carbonarius* et *A. ibericus* (Samson *et al.,* 2007). Les extrolites qui peuvent aider à l'identification des *A.* section *Nigri* sont: la pyranonigrine A, l'asperazine et l'acide secalonic D (Samson *et al.,* 2007).

2.2.6.2 Identification moléculaire

Chez une espèce donnée la variation des caractères physiologiques ou l'absence d'un métabolite d'une souche à une autre. D'où l'intérêt d'associer l'identification moléculaire qui offre une plus grande variabilité de caractères génétiques utiles à la taxonomie des champignons, grâce au séquençage de l'ADN ribosomal et de gènes codant pour certaines protéines (Geiser *et al.,* 2007). Certaines espèces du groupe *A.niger aggregate* (*A. niger, A. tubingensis, A. foetidus, A. piperis, A. brasiliensis, A. vadensis, A. costaricensis* et *A. lacticoffeatus*) se distinguent les unes des autres par le séquençage des gènes de la calmoduline (Samson *et al.,* 2004), et de la β-tubuline excepté *A. lacticoffeatus* qui présente la même séquence que les autres isolats d' *A. niger* (Samson *et al.,* 2004; Varga *et al.,* 2007). Le séquençage des gènes de la région ITS permet de distinguer les quatre groupes suivants : 1 (*A.niger, A.lacticoffeatus spp),* 2 (*A.brasiliensis*), 3 (*A. costaricaensis*), 4 (*A. tubingensis, A. foetidus, A. piperis, A. vadensis*) (Varga *et al.,* 2007).

2.3. Les mycotoxines

2.3.1. Définition des mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec «*mycos*» qui signifie champignon et du latin «*toxicum*» qui signifie poison. Il désigne les substances chimiques issues du métabolisme secondaire des champignons filamenteux ou moisissures et qui causent une mycotoxicose lorsqu'ils sont ingérés par l'homme ou l'animal (Bhatnagar *et al.,* 2004). Ces molécules toxiques, produites naturellement ne sont pas nécessaires au développement du champignon, mais pourraient constituer un système de défense contre les autres microorganismes présents

dans l'environnement de la moisissure. Les principaux genres de moisissures mycotoxinogènes sont: *Aspergillus, Claviceps, Penicillium, Fusarium* (Le Bars et le Bars, 1998).

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

2.3.2. Importance des mycotoxines

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

Les mycotoxines couramment retrouvées dans les aliments sont: les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichotécènes, la zéaralénone, la citrinine et la patuline (Castegnaro et Pofhl-Leszkowicz, 2002).

2.3.3. Les différentes mycotoxines

Il existe de nombreuses mycotoxines produites par différentes moisissures contaminants les matières premières en général. Pour le cas des grains de café on rencontre essentiellement l'Ochratoxine et plus rarement les Aflatoxines . Nous développerons uniquement ces deux mycotoxines.

Les Aflatoxines

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

L'Ochratoxine A

L'Ochratoxine A est constitué d'un squelette dihydroisocoumarine dérivée de polyketide lié à la phenylalanine par une liaison amide (Fig.8). Il existe plusieurs analogues de l'OTA, tel que l'Ochratoxine B dont la structure diffère de l'OTA par l'absence de l'atome de chlore.

L'occurrence de l'OTA dans plusieurs plantes et produits animaliers a été largement rapportée. Les céréales, les raisins frais, les raisins secs, le vin, la bière, le café et le cacao sont souvent sources d'OTA dans le régime alimentaire (Steyn et *al.*, 1995). Dans certaines régions tempérées (Europe Occidentale, Canada, certaines zones d'Amérique du Sud), l'OTA est produite par *Penicillium verrucosum*, moisissure qui se développe fréquemment au cours du stockage des céréales (Le Bar et le Bars, 2000). Par contre en zone tropicale, *Aspergillus ochraceus et Aspergillus carbonarius* sont les principaux producteurs (Le Bar et le Bars, 2000).

L'OTA est catégorisée cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B). Elle est signalée comme un puissant néphrotoxique et cancérigène rénal auquel les porcins sont particulièrement sensibles (IARC, 1993). Cette toxine affecte surtout les reins et peut provoquer des lésions aiguës et chroniques (Le Bars et le Bars, 2000).

L'OTA est également un puissant tératogène chez les souris, les rats, les hamsters et les poulets. Des effets néphrotoxique, génotoxique, et cancérigène lui sont reconnus (Pfohl-Leszkowiz, 1999). Elle est par ailleurs immunotoxique (Pohland *et al.*, 1992) et a été classée par « The Internationnal Agency for Research on Cancer » (IARC, 1982) comme une substance potentiellement cancérogène pour l'homme (groupe 2B).

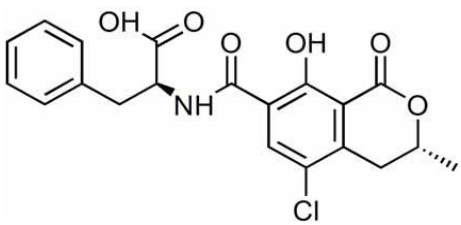


Figure 8 : Structure chimique de l'Ochratoxine A (Pohland, 1992)

2.3.4. Facteurs de la contamination mycotoxique par les *Aspergillus*

La production des mycotoxines est consécutive ou couplée à la croissance fongique dans certaines limites de variations de certains paramètres qui sont l'activité en eau (A_w), la

température, le pH, la pression d'oxygène, la teneur en eau de l'aliment , la nutrition, etc. (Steyn, 1998).

En terme de A_w, on peut considérer que les seuils nécessaires à la croissance des champignons filamenteux se situent à environ 0,95 et 0,68 respectivement pour les organismes hydrophiles et xérophiles (Le Bars et Le Bars, 2000).

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

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

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

2.3.5. Occurrence des mycotoxines

Les mycotoxines sont présentes généralement sur des aliments avariés contaminés par des moisissures. Dans le café les mycotoxines sont produites par des moisissures durant les longues périodes de stockage et de transport.

2.3.5.1. Présence des mycotoxines dans les aliments

Le type de mycotoxines rencontrées dans les aliments est fonction de la denrée alimentaire (céréale, fruit,…) et de l'endroit de la contamination (champ, stockage, transformation,…). Elle dépend aussi des espèces fongiques présentes et des facteurs extrinsèques, physiques, physico-chimiques et chimiques, influençant également la toxinogenèse : disponibilité de l'eau, nature du substrat, température et composition gazeuse de l'air ambiant (Le Bars et Le Bars, 2000).

Tableau 2 Teneurs maximales autorisées en OTA dans les denrées alimentaires (*Règlements (CE) N° 1881/2006; N°105/2010).*

Denrées	**Produits**	**Teneurs maximales en OTA (µg/kg)**
Céréales	Grains de céréales (y compris riz brut et sarrasin)	5
	Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinées à la consommation humaine directe)	3
	Préparation à base de céréales et aliments pour bébé destinés aux nourrissons en bas âge	0,5
Raisins	Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	3
	Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué	2
	Vin (rouge et rosé) et autres boissons à base de vin et ou de moût de raisins	2
Café	Grains de café torréfié et café moulu à l'exception du café soluble	5
	Café soluble (instantané)	10
Epices et autres	Epices	
	Fruits séchés dérivés, piments, poivre de Cayenne, paprika	30µg/kg du 1er juillet 2010 au 30 juin 2012
	Noix de muscade, gingembre, safran des Indes	15µg/kg du 1er juillet
	Bois de réglisse, ingrédients pour infusion	20µg/kg
	Extrait de réglisse, pour utilisation dans des produits alimentaires, en particulier les boissons et les confiseries	80µg/kg

L'OTA contamine les aliments de base à savoir les céréales, les oléagineux, les légumineuses, le café, la bière, le jus de raisin, les fruits de la vigne séchées et le vin, ainsi que les produits cacaotés, les fruits à coque et les épices (EFSA, 2006). Afin de protéger la santé publique, la commission européenne à fixer des teneurs maximales d'OTA dans certaines denrées alimentaires (Tableau 3).

2.3.5.2. Présence d'OTA dans le café

La présence d'OTA dans le café vert a été signalée pour la première fois par Levi *et al.*, (1974) et dans le café infusé par Tsubouchi (1988).

Il a été montré que l'OTA dans le café se développe surtout durant les opérations post-récolte. Le meilleur moyen de prévenir le risque de contamination est de maîtriser le niveau d'humidité du café afin d'éviter la croissance des moisissures et le développement de mycotoxines au cours de la phase post-récolte (FAO, 2001). Les moisissures se développent sur le café parce que les cerises de café contiennent beaucoup d'eau (85% d'eau) et le séchage du café nécessite plusieurs semaines d'expositions à l'air libre. Pendant cette période il ya une contamination par les moisissures qui se développent à la surface des cerises de café. Certains composés des cerises de café (caféine, tanin condensés, tanins hydrolysable acide chlorogénique, et autre composés phénoliques) pourraient empêcher la prolifération des moisissures en particulier pendant la période de séchage. Cependant aussi bien les café arabica que les café robusta riches en caféine sont fréquemment contaminés par l'OTA.

2.3.6 Mesures préventives de la lutte contre les mycotoxines

En ce qui concerne le café, le coût élevé d'échantillonnage et d'analyse du café vert sont les principales difficultés que l'on rencontre lorsqu'on cherche à mettre en œuvre un programme pour réduire la présence d'OTA fondé sur l'identification et l'élimination des lots contaminés. Pour aider les planteurs à lutter contre l'OTA, le projet FAO/OIC a privilégié l'élaboration de stratégies de prévention, plus que la réglementation (FAO, 2001).

2.3.6.1 Contrôle des mycotoxines avant et après la récolte

La période et le mode de récolte (manuelle ou mécanique) pourraient avoir une conséquence directe sur le niveau final de la contamination mycotoxique. Généralement une récolte faite à la main en cueillant des cerises mûres contribue à limiter la concentration de mycotoxines (Le Bars et le Bars, 1998).

2.3.6.2 Taux d'humidité avant et durant le stockage

La quantité totale de l'eau contenue ou de l'eau disponible dans les grains de café est un facteur important influençant la croissance des moisissures et la production de mycotoxines. Certaines espèces telles que *Aspergillus sp*. peuvent se développer à de faibles niveaux d'activité d'eau entre 13,5% et 18% (Le Bars et le Bars, 1998). Par ailleurs il a été démontré que le stress hydrique favorise la production d'OTA et la sporulation des moisissures (Roussos *et al.,* 2008).

2.3.6.3. Température durant le stockage des grains de café

La température durant le stockage des grains de café a une influence sur la croissance et l'activité métabolique des moisissures. En effet les spores des moisissures sont très sensibles à des températures élevées, leur viabilité diminue à partir de 40°C. Par conséquent la nécessité d'un système de ventilation associant chaleur et air sec sont nécessaires pour éviter une aggravation de la contamination des grains durant leur stockage. Aussi retourner les grains de temps en temps réduirait la présence d'endroit humide dans le silo (Jouany, 2007).

2.3.6.4. Les bonnes pratiques agricoles

Afin d'éviter la contamination des grains de café par des moisissures et des mycotoxines tout au long des procédés post-récolte, il est important de recommander l'usage des bonnes pratiques agricoles. Ces pratiques s'inscrivent dans le grand ensemble des pratiques vulgarisées par la production du café de bonne qualité marchande. Elle consiste en quelques règles de bon usage à appliquer par le paysan au cours du traitement post-récolte :

- cueillir des cerises bien rouges
- utiliser des claies et des bâches comme support de séchage
- brasser le café 4 fois par jour au cours du séchage
- protéger le café contre l'humidité nocturne
- stocker le café dans des sacs de jute propre

2.3.7. Techniques de mise en évidence du pouvoir mycotoxinogène des moisissures

Il existe plusieurs techniques de culture et d'extraction des mycotoxines à partir de différentes matrices à savoir des substrats naturels humidifiés (son de blé, grain de céréales) et les milieux synthétiques tels que le CYA (Quiroz, 2004).

2.3.7.1 La production et l'extraction des mycotoxines sur milieux solides

La production et l'extraction des mycotoxines sur milieux solides consiste à faire pousser les moisissures pendant sept jours sur le milieu CYA (Czapeck Yeast Agar), réparti en boîte de Petri (Bragulat *et al.,* 2001). Sur ce milieu, les moisissures sont inoculées au centre de la boîte de Petri et elles sont maintenues en condition de stress ce qui favorise la production de mycotoxines. L'extraction de l'OTA se fait ensuite en utilisant un mélange de solvant méthanol/acide formique 25:1, v/v (Quiroz-Suarez *et al.,* 2004). Pour cela trois échantillons de la culture (colonie et milieu gélosé) sont prélevés sous forme de disques de 6mm de diamètre d'abord au centre, puis à différents endroits de la colonie. Ces échantillons

sont broyés dans 900 µl de méthanol. Le mélange est incubé à 4°C pendant 60 mn, puis centrifugé, filtré et analysé en HPLC (Sanchez-Hervas *et al.*, 2008).

2.4 La FMS (Fermentation en milieu solide)

Les fermentations en milieux solides (FMS) sont définies comme étant un procédé de culture de microorganismes sur des substrats solides poreux en absence totale ou presque d'eau libre (Raimbault et Alazard, 1980; Roussos, 1985). Les FMS sont utilisées pour la production d'enzymes (pectinases, cellulases, lipases…), de spores (biocatalyse, starters, lutte biologique) et de métabolites secondaires (mycotoxines, substances aromatiques). D'après Lonsane *et al*,. 1992; Oriol, 1987 ; Sarhy-Mangin Bagnon 1999), la FMS est définie comme « un procédé de culture où le microorganisme se développe à la surface et à l'intérieur d'une matrice poreuse solide sans écoulement libre de liquide. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat solide ou d'un support inerte capable d'absorber des nutriments dissous en solution. Les substrats solides peuvent être des produits fragmentés contenant de l'eau, mais les espaces libres à l'intérieur de la matrice ne doivent pas être occupés par de l'eau. C'est la phase gazeuse qui en passant par ces espaces fournit l'oxygène, élimine le dioxyde de carbone et la chaleur. En fin de culture, dans ces espaces libres prennent place les formes de reproduction asexuée (métule, phialide, conidies).

Deux types de fermentations sont distinguables suivant la nature de la phase solide:

-Milieu de culture imprégné sur un support inerte: La phase solide n'est pas une source de substrat pour les microorganismes, une solution nutritive imprègne les supports tel que la bagasse de canne à sucre, le polyuréthane, l'écorce de bois, l'éponge, l'amberlite, la vermiculite (Roussos 1985; Barrios-Gonzalez *et al.*, 1990; Saucedo-Castaneda, 1991; Trejo-Hernandez, 1992; Kabbaj *et al.*, 1996).

-Culture solide sur un substrat/support: La phase solide est constituée à partir d'un matériel assurant à la fois la fonction de support solide et de source de nutriments. Les substrats utilisés sont principalement le manioc, la pulpe de betterave, la pulpe de café, les résidus de caroubes et le blé précuit (Raimbault et Alazard, 1980; Lambraki *et al.*, 1995; Roussos, 1995; Perraud-Gaime, 1995; Durand *et al.*, 1997).

Les avantages des FMS peuvent être résumées par l'utilisation directe des matières premières ou des sous produits agricoles (céréales, son de blé, grignons d'olive, pulpe de café etc). Parfois il suffit juste d'humidifier le substrat avec une suspension de spores et la culture peut démarrer. L'aération des milieux de culture avec de l'air humide ou sec permet soit de maintenir les conditions optimales de croissance en apportant de l'oxygène et de l'eau, soit

d'appliquer un stress hydrique. pour favoriser la production de mycotoxines et des spores des champignons filamenteux (Roussos *et al.,* 2007).

2.4.1. Le stress hydrique

Le manque d'eau, ou stress hydrique, qu'un champignon filamenteux affronte dans son environnement direct exerce une pression qui oriente le métabolisme du champignon vers la reproduction asexuée (Roussos *et al.,* 2007). Il est possible au cours de la FMS d'utiliser le stress hydrique pour piloter la croissance et le métabolisme secondaire des champignons filamenteux pour :

(1) déclencher, dans une étape précoce, la phase de conidiogenèse des champignons ;

(2) maintenir active, pendant plusieurs jours, la phase de production des spores ;

(3) assurer la viabilité élevée des spores pendant le séchage du produit fermenté;

(4) obtenir un produit final sec, pouvant être conservé plusieurs mois sans pertes de viabilité;

(5) éviter la dispersion incontrôlée des spores à l'extérieur des bioréacteurs, et la contamination de l'environnement.

(6) augmenter la production des métabolites secondaires comme les mycotoxines.

2.4.2. Intérêt du stress hydrique en biotechnologie

Lorsque le stress hydrique est appliqué sur les champignons filamenteux cultivés en FMS, leur métabolisme est modifié, et leur croissance est dirigée vers, soit la production de formes unicellulaires de reproduction asexuée (conidiospores), soit la production de métabolites secondaires comme les mycotoxines. Sur ce principe, l'IRD a déposé un brevet d'invention pour la production de biomasse et de métabolites de microorganismes cultivés en FMS (Roussos *et al.,* 2007). Cette technique de culture sera utilisée au cours de ce travail pour démontrer la capacité des *Aspergillus* à produire des mycotoxines au cours de la FMS sur céréales et en condition de stress hydrique.

2.5. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes procaryotes qui sont naturellement présents sur des fruits et légumes. Ces microorganismes ont des propriétés antifongiques importantes et de ce fait ils sont utilisés pour la conservation des aliments et des fourrages (produits lactés, choucroutes, ensilages).

2.5.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène, composé de coques et de bacilles, Gram positive, catalase négative, asporulée, aéro-anaérobie facultative. Leur principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Kandler and Weiss 1986; Axelsson, 2004).

2.5.2. Taxonomie des bactéries lactiques

Il existe deux grands groupes morphologiques : les coques et les bacilles.

Les **coques** (*cocci*) sont des sphères plus ou moins ovoïdes, de 0,5 à 1,5µm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades, des chaînettes ou des amas. Ce sont des bactéries non sporulées et immobiles.

Les **bacilles** sont des bâtonnets qui peuvent avoir différents aspects : des bâtonnets droits qui sont des formes classiques, des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles. Le bâtonnet peut s'incurver dans certains cas ou s'allonger en filament. Ils ont de 0,5µm à 2µm de diamètre, et de 1,5 à environ 10 µm de long. Les Lactobacillus, à de rares excepetions près sont immobiles et aciliés (Desmazeaud, 1992).

La classification des bactéries lactiques est basée sur le pourcentage en base G+C de l'ADN génomique, inférieur à 50%. Ce qui permet de les classer dans la branche des *Clostridium* à Gram positive. De nos jours les bactéries lactiques comptent vingt genres dont les plus importants sont: *Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Vagococcus, Oenococcus, Tetragenococcus* (Fig. 9) (Leveau *et al.*, 1991; Axelsson, 2004) , *Weissella* (Axelsson, 2004).

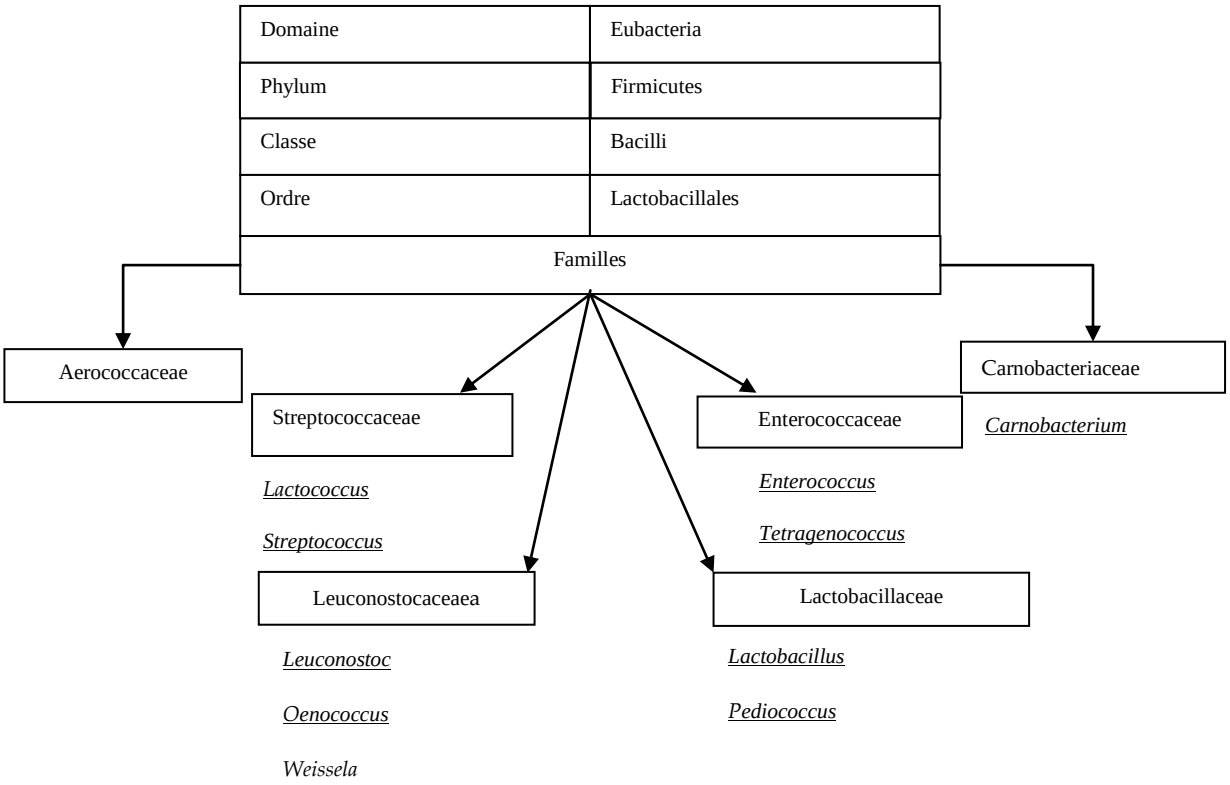


Figure 9: Taxonomie des bactéries lactiques selon le J.P. Euzéby (2005)

2.5.3. Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très présentes dans les habitats riches en nutriments tels que le sol, l'eau, le fumier, les eaux usées, la matière végétale et l'ensilage et les grains, la peau des animaux, les matières fécales, les poussières (Desmazeaud, 1992). Certaines de ces bactéries colonisent la bouche, les muqueuses des intestins, le tractus urogenital, aussi bien des hommes que des animaux, où elles contribuent à leur protection contre les microorganismes pathogènes (Björkroth *et al*., 2003; Devriese *et al*., 2000; Hammes et Hertel, 2003).

2.5.4. Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire

Non pathogènes, les bactéries lactiques constituent un important groupe dans la culture des ferments industriels et sont utilisées pour la production d'aliments fermentés comme les yaourts, le fromage, la choucroute, les boissons fermentées, le pain, du levain, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages etc,… (Chagnaud *et al.*, 2001). Dans ces divers milieux de vie, les bactéries lactiques participent : (i) à la mise en place des caractéristiques organoleptiques de certains aliments, (ii) à leur conservation (iii) à la qualité sanitaire de ces aliments (Caplice and Fitzgerald, 1999). Les bactéries lactiques produisent des bactériocines

ou des substances inhibitrices d'autres microorganismes comme les moisissures et sont utiles à la biopréservation des aliments (Schillinger and Lücke, 1989 ; Brillet *et al.*, 2005).

Cependant, les bactéries lactiques appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Carnobacterium* constituent parfois une flore d'altération dans les aliments tels que la viande et les produits marins (Björkroth *et al.*, 2000; Jones, 2004).

2.5.4.1. Identification des bactéries lactiques

2.5.4.1. 1. Caractérisation phenotypique

L'identification phenotypique des bactéries lactiques est basée sur l'étude morphologique, physiologique et biochimique des différents genres.

Le genre *Lactobacillus* (*Lb*) est caractérisé par des cellules en forme de bâtonnets (dits bacilles réguliers), une acidification intense du milieu de culture (Leveau and Bouix, 1993) La variabilité de la voie de synthèse de l'acide lactique a conduit les divers auteurs à les classer en trois sous-genres selon Orla-Jensen (1919), ou en trois sous-groupes selon Kandler and Weiss (1986):

- *Lactobacillus* du groupe I ou *Thermobacterium*

Ils sont dit homofermentaires obligatoires car ils produisent exclusivement l'acide lactique par fermentation du glucose; ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate (Kandler and Weiss, 1986).Très acidophiles ces bactéries se distinguent aussi par une production intense d'acide lactique, jusqu'à 18g/l qui peut modifier le pH du milieu à 3,5 (Leveau and Bouix, 1993).

- *Lactobacillus* du groupe II ou *Streptobacterium*

Ils sont dits homofermentaires facultatifs ou hétérofermentaires facultatifs, les produits formés étant l'acide lactique et l'acide acétique; la fermentation des hexoses est homolactique, celle des pentoses et du gluconate est hétérolactique (Kandler and Weiss, 1986) : *Lb.casei* , *Lb. plantarum*.

Ces bactéries incapables de croître à 45°C, se développent très bien à 15°C. Elles produisent généralement peu d'acide lactique: 3 à 13g/l (Leveau et Bouix, 1993).

- *Lactobacillus* du groupe III ou *Betabacterium*

Ils sont hétérofermentaires obligatoires. La fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique et du CO_2 dans un rapport 1:1:1. Celle des pentoses produit de l'acide lactique et de l'acide acétique (Kandler and Weiss, 1986).

Ces espèces se développent à une température optimale de croissance entre 20-30°C (Leveau et *al.*, 1991)**.** Leur production d'acide lactique est faible : 5g/l (Leveau et Bouix, 1993).

Les *Streptococcus (Sc)* sont des *cocci* présentant un groupement typique en longue chaînette. *Sc thermophilus* est la seule espèce du genre dans le groupe des bactéries lactiques. Son métabolisme est homofermentaire obligatoire. Préférentiellement, il se cultive entre 42°C et 43°C avec une thermorésistance allant de 60°C à 65°C pendant 30 minutes. Cette espèce se différencie des autres streptocoques par son caractère non pathogène (Leveau et Bouix, 1993).

Le groupe des lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. Les cellules de ces bactéries normalement sphériques peuvent quelque fois s'allonger; elles sont très souvent regroupées en chaîne de cellules par pair (streptodiplocoques) et se développent à une température d'au moins 10°C (Leveau et Bouix, 1993). Ces germes homofermentaires obligatoires produisent l'acide lactique L (+).

Leveau and Bouix (1993), décrivent les *Leuconostoc* (*Ln)* comme des cellules sphériques souvent lenticulaires, associées par pair et rarement enchaînées (ce qui les différencie des lactocoques et des streptocoques).

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires obligatoires produisant de l'acide lactique (D-) en très faible quantité, de l'éthanol et du CO_2. Ils se cultivent à des températures comprises entre 20 et 30°C et tolèrent une température minimale de 10°C.

Les espèces du genre *Enterrocoque* sont caractérisées par des cellules de forme ovale qui s'apparentent aux cocobacilles disposés en courtes chaînes contrairement aux streptocoques. Ces germes homofermentaires obligatoires se caractérisent par leur développement entre10 et 45 °C. Ils sont capables de croître en présence de 6,5% de NaCl, tolèrent les pH basique jusqu'à (9,6) et possèdent une grande résistance aux facteurs de l'environnement.

Les *Pediococcus (Pc)* sont des *cocci* souvent associés aux bacilles et qui ont la particularité de se regrouper en tétrade caractéristique et en paire (Pederson, 1949). Ils sont homofermentaires obligatoires produisant de l'acide lactique DL ou L(+). Bien qu'ils soient mésophiles (Pilet *et* a*l.*, 1995) certaines espèces de *Pc* se différencient des autres par leur tolérance à la température (jusqu'à 50°C), au pH et à la concentration en NaCl (Pederson, 1949). Ainsi *Pc halophilus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl se retrouve dans les anchois salés (Pilet *et al.*, 1995).

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leurs formes très irrégulières, présentant des bifurcations avec des extrémités spatulées souvent rangés en V ou en palissades (Leveau and Bouix, 1993).

Ils se différencient des autres bactéries lactiques par la présence d'une enzyme: la fructose-6-phosphatephosphocétolase qui leur permet de dégrader les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique dans un rapport 3/2, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et de l'acide formique. Toutefois il est difficile de caractériser leur fermentation d'hétérolactique dans la mesure où ce métabolisme ne dégage pas de CO_2 (Pilet *et al.,* 1995). Ces bactéries anaérobies strictes ne supportent pas les pH inférieur à 5.

Les *Carnobacterium(Cb)* sont des Lactobacilles atypiques: constitués de bacilles minces, (gros bacilles pour les *Lactobacillus*), droits ou légèrement incurvés, ils sont parfois mobiles; incapables de croître sur gélose à l'acétate de Rogosa (MRS), elles développent des tendances psychrotrophes en cultivant entre 10 C et 0 C; les *Cb* ne poussent ni en présence de 8% de sel (NaCl), ni à 45°C ; toutefois ils tolèrent des pH élevés (jusqu'à 9,1) contrairement aux *Lactobacillus sp*. Les *Carnobacteriaceae* sont hétérofermentaires produisant principalement de l'acide L-lactique (+) (Euzéby, 2005).

2.5.4.1.2. Identification moléculaire

La caractérisation moléculaire des bactéries nécessite plusieurs techniques qui sont:

l'homologie ADN-ADN, la détermination du pourcentage de base G+C de l'ADN génomique, le séquençage du gène codant pour le ARN16S ribosomal, et la caractérisation du plasmide (Staley and Krieg, 1987) et le séquençage partiel ou complet des protéines cellulaires (Vandamme *et al.,* 1996; Dicks & van Vuuren, 1987).

2.5.4.1.2.1 Pourcentage d'homologie ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN est la technique officielle de base pour séparer les espèces au sein des bactéries. Chez certaines bactéries la limite d'homologie fixée à 70% peut être insuffisante quand il s'agit de distinguer des souches phenotypiquement identiques. (Vandamme et *al.,* 1996).

2.5.4.1.2.2 Pourcentage de la teneur G+C de l'ADN génomique

La détermination du pourcentage G+C, est considérée comme la première méthode utilisée pour la taxonomie des procaryotes. La teneur en G+C% varie entre 24% et 76% selon les espèces (Vandamme *et al.,* 1996). Les bactéries lactiques ont en général un pourcentage

G+C inférieur à 50% quoique certaines espèces de *Lactobacillus* ont une valeur supérieure à 55% (Axelsson, 2004). De façon générale, la variation de la teneur G+C n'excède pas 5% au sein d'une espèce et 10% au sein d'un genre (Schleifer & Stackebrandt, 1983). Le pourcentage de la teneur G+C peut être donc utilisé uiquement pour distinguer des souches au sein d'une même espèce (Marmur & Doty, 1962; Xu *et al*., 2000).

2.5.4.1.2.3 Séquençage du gène ARN16S

Le gène codant pour l'ARN16S est un gène très conservé chez les bactéries. Il sert donc de marqueur phylogénétique pour déterminer la relation entre des espèces. Il peut également servir à l'identification des espèces (Stackebrandt and Goebel, 1994).Toutefois chez les bactéries lactiques, il existe différentes espèces présentant une séquence 16S identique ou presque identique (Björkroth *et al.,* 2002; Cachat and Priest, 2005; Kim *et al,* 2003; Leisner *et al.,* 2002; Svec *et al.,* 2001; Vancanneyt *et al.,* 2001; Yoon *et al.,* 2000).

2.5.4.1.2.4. Electrophorèse sur gel de -polyacrylamide des protéines cellulaires (SDS PAGE)

L'analyse numérique des profils protéiques par SDS-PAGE est une méthode efficace pour rechercher l'origine d'une bactérie et particulièrement au niveau des bactéries lactiques étudier l'appartenance d'une souche à un genre ou une espèce (Dicks, 1995; Dicks & van Vuuren, 1987; Pot *et al.,* 1994; Schleifer & Stackebrandt, 1983; Vandamme *et al*., 1996). L'analyse numérique des protéines cellulaires peut être utlisée pour identifier les espèces ou sous espèces dans le groupe des bactéries lactiques (Björkroth & Holzapfel, 2003; Hammes & Hertel, 2003). Aujourd'hui les espèces des genres *Lactobacillus, Enterrococcus* et *Streptococcus* sont très étudiées par cette technique (Lawson *et al*., 2004, 2005; Mukai *et al*., 2003; Roos *et al*., 2005; Teixeira *et al*., 2001; Vancanneyt *et al*., 2004, 2005b).

2.5.5. La biopréservation

2.5.5.1 Technique traditionelle de la biopréservation

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

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

2.5.5.2 Rôle des bactéries lactiques en biopréservation

Les bactéries lactiques sont naturellement présentes dans les aliments ou intentionellement ajoutées en tant que probiotiques dans divers produits alimentaires.

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

2.5.6. Activité antifongique des bactéries lactiques

2.5.6.1. Historique

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

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

2.5.6.2 Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action

Les bactéries lactiques recensées dans la littérature comme présentant des propriétés antifongiques sont listées dans le Tableau 4. Elles appartiennent fréquemment au genre *Lactobacillus* et quelque rares fois aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus*. Parmi les *Lactobacillus*, l'espèce *Lactobacillus plantarum* revient souvent, suivie de *Lactobacillus casei* variante *rhamnosus* et de *Lactobacillus lactis*.

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

2.5.6.3. Les composés antifongiques

Le Tableau 3 recense les bactéries lactiques antifongiques avec leur spectre d'activité et la nature des composés antifongiques produits par ces bactéries. Les tout premiers composés antifongiques identifiés chez les bactéries lactiques sont des métabolites primaires, souvent des acides organiques, produits au cours de la croissance du microorganisme. Il s'agit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène (Lindgren & Dobrogosz, 1990). D'autres acides ont

été mis en évidence chez *Lactobacillus plantrum*: ce sont l'acide benzoïque, l'acide 3-

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

Tableau 3: Principales bactéries lactiques et leurs activités antifongiques vis-à-vis d' un certain nombre de champignons filamenteux selon Schnürer et Magnusson (2005).

LAB isolate[a]	Activity spectrum	Compound(s)	Reference
Lactococcus lactis C10	*Aspergillus parasiticus*	ND	Wiseman and Marth (1981)
Lactobacillus casei ATCC 393	*Aspergillus parasiticus*	ND	El-Gendy and Marth (1981)
L. lactis	*Aspergillus flavus*	ND	Coallier-Ascah and Idziak (1985)
L. casei var. *rhamnosus*	Broad spectrum	King, Fowler, and Vandenbergh (1986)	King, Fowler, and Vandenbergh (1986)
L. casei var. *rhamnosus*	Broad spectrum	Vandenbergh and King (1988)	Vandenbergh and King (1988)
Lactobacillus reuteri	Broad spectrum	3-HPA (reuterin)	Chung et al. (1989), Talarico et al. (1988)
Lactobacillus plantarum	Unspecified spoilage mould	ND	Hill (1989)
L. lactis subsp. *diacetylactis* DRC1	*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus stolonifer*	Possibly proteinaceous	Batish et al. (1989)
Pediococcus acidilactici	*Saccharomyces cerevesiae*	Possibly proteinaceous	Vandenbergh and Kanka (1989)
Lactobacillus acidophilus R	*Aspergillus fumigatus*	Batish, Lal, and Grover (1990)	Batish, Lal, and Grover (1990)
Lactococcus lactis	*Aspergillus parasiticus*	ND	Luchese and Harrigan (1990)
L. casei subsp. *rhamnosus*, *L. plantarum*, *Leuconocstoc mesenteroides*	*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.	ND	Suzuki, Nomura, and Morichi (1991)
L. plantarum	*Saccharomyces cerevisiae*	ND	Makanjuola, Thymon, and Springham (1992)
L. casei subsp. *Rhamnosus* LC-705	*Candida lusitaniae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp.	ND	Mäyrä-Mäkinen, Kristianinkatu, and Suomalainen (1994)
L. lactis subsp. *lactis* CHD 28.3	*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium* spp.	Possibly proteinaceous	Roy et al. (1996)
L. casei	*Penicillium* spp.	Possibly proteinaceous	Gourama (1997)
Lactobacillus casei subsp. *pseudoplantarum*	*Aspergillus flavus*	Possibly proteinaceous, < 1 kDa	Gourama and Bullerman (1995, 1997)
Lactobacillus sanfrancisensis CB1	*Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Monilia* spp.	Caproic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid	Corsetti et al. (1998)
L. plantarum VTT E78076	*Fusarium avenaceum*	Benzoic acid, methylhydantoin, mevalonolactone, cyclo(Gly-ι-Leu),	Niku-Paavola et al. (1999)
Lactobacillus pentosus	*Candida albicans*	Pentocin TV35b	Okkers et al. (1999)
L. casei, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*	*Penicillium expansum*	ND	Florianowicz (2001)
L. plantarum	Broad spectrum	Phenyllactic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid	Lavermicocca et al. (2000)
L. rhamnosus	*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp.	Sodium acetate[b]	Stiles et al. (2002)
L. plantarum MiLAB 393	Broad spectrum	3-Phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro)	Ström et al. (2002)
Lactobacillus coryniformis Si3	Broad spectrum	Peptide, phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro), reuterin	Magnusson (2003), Magnusson and Schnürer (2001), Magnusson et al. (2003)
L. plantarum MiLAB14	Broad spectrum	Hydroxy fatty acids, phenyllactic acid, cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro),	Magnusson et al. (2003), Sjögren et al. (2003), unpublished results
Pediococcus pentosaceus MiLAB 24	Broad spectrum	Cyclo(phe-OH-Pro)	Unpublished results Atanassova et al. (2003)
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* M3	*Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*	proteinaceous	

ND: not determined.
[a] Some species may have received new names through taxonomic revisions.
[b] Sodium acetate from the MRS substrate was involved in the inhibitory action of lactic acid bacteria towards several moulds; the additional effect of other compounds was not determined.

MATERIELS ET METHODES

3. Matériels et Méthodes

Dans le matériel et méthodes, nous présentons l'origine des échantillons, les milieux de culture, et les stratégies d'isolement des souches de moisissures et de bactéries lactiques et enfin les techniques de production, d'extraction et d'analyses de mycotoxines.

3.1. Isolement et Identification des moisissures

L'objectif de ce travail est d'étudier la biodiversité fongique post-récolte du café robusta en Côte d'Ivoire et de définir par rapport à une population donnée le niveau de contamination en moisissures mycotoxinogènes. Pour cela les moisissures sont isolées par contact direct sur gélose PDA (Pereira et *al.*, 2003).

3.1.2. Matériel biologique

3.1.2.1. Echantillonnage des cerises de café

3.1.2.1.1. Sites d'échantillonnage

L'échantillonnage a porté sur deux préfectures de la Côte d'Ivoire: Daloa, Issia et Abengourou appartenant aux principales zones de production du café (Fig.10).

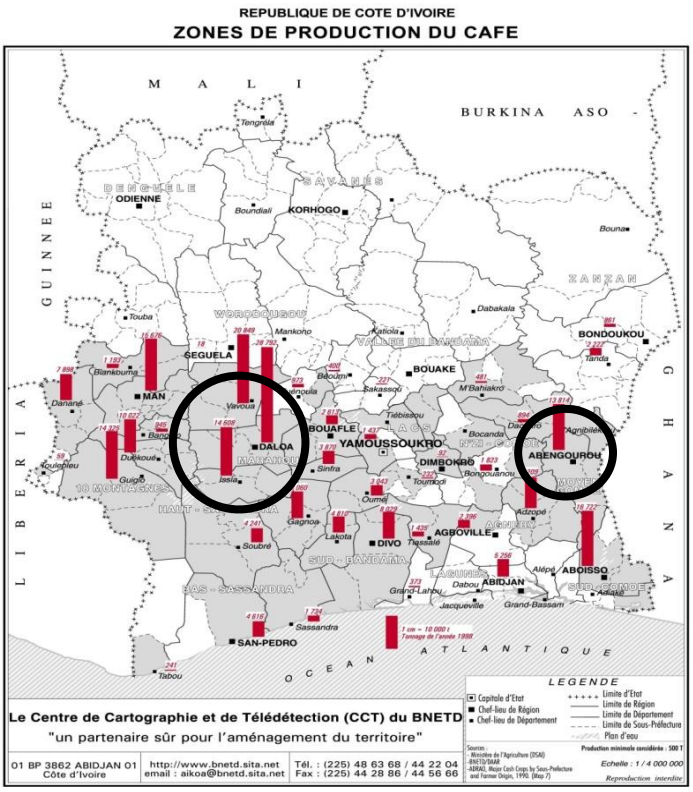


Figure 10 : Zones de production du café en Côte d'Ivoire (BNETD, 1998)

3.1.2.1.2. Les échantillons de café

Le Tableau 4 recense les différents échantillons en provenance de la Côte d'Ivoire. Les enquêtes et prélèvements ont été effectués au cours de la campagne caféière 2008 et 2009.

Tous sont de la variété robusta. Les échantillons collectés au cours de nos enquêtes en 2008 sont au nombre de 16 et sont très variés : cerises de café séchées au sol, grains de café vert en stockage, coques de café humides et sèches (Fig. 11). Seize échantillons dont un de cerises fraîches et 15 de cerises séchées ont été prélevés en 2009. Tous ont subi la même technique de séchage naturelle, mais sur des supports différents: dalle, terre ferme, films plastiques. Ils sont échantillonnés dans des sacs plastiques stériles et conservés à température ambiante (30°C), puis transportés par avion au laboratoire.

Tableau 4: Echantillons de café robusta provenant de la Côte d'Ivoire

Période de récolte	Cerises fraîches	Cerises séchées	Grains de café verts	Coques de café sèches	Coques de café humides
Aôut 2008		7	6	2	1
Avril 2009	1	15	0	0	0

Figure 11a: Cerises fraîches de café robusta

Figure 11b : Cerises sèches de café robusta

Figure 11c: Coques humides de café robusta

Figure 11d: Grain de café vert robusta

Figure 11 : Photo des échantillons de café utilisés pour l'étude de la biodiversité microbienne post-récolte.

3.1.2.1.3. Souches de références

Les souches de références ont été fournies par le Muséum National d'Histoire Naturel de France (MNHN) et le Département d'Agriculture du Centre Régional de Recherche de la Louisiane aux Etats-Unis. Elles sont mentionnées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Souches de références d'*Aspergillus* section *Nigri* utilisés pour l'identification des moisissures.

Souches	**Origine**
Aspergillus carbonarius 16	Louisiana, USA
Aspergillus carbonarius 2131	Louisiana, USA
Aspergillus niger (type) 2318	Louisiana, USA
Aspergillus aculeatus 168	Louisiana, USA
Aspergillus aculeatus CBS172.66 T	MNHN, FRANCE
Aspergillus niger CBS 554.65NT	MNHN, FRANCE

3.1.3. Méthode d'étude mycologique des cerises de café

3.1.3.1. Isolement des moisissures

La stratégie d'isolement des moisissures (Figure 12) est décrite comme suit : dans chaque échantillon de café trois cerises ou grains de café sont choisis au hasard et appliqués sur une gélose PDA. Les boites de Pétri inoculées sont placées dans une étuve à 25°C pendant 2 à 5 jours pour l'isolement des moisissures mésophiles et à 45°C pendant 48h, pour l'isolement des moisissures thermophiles.

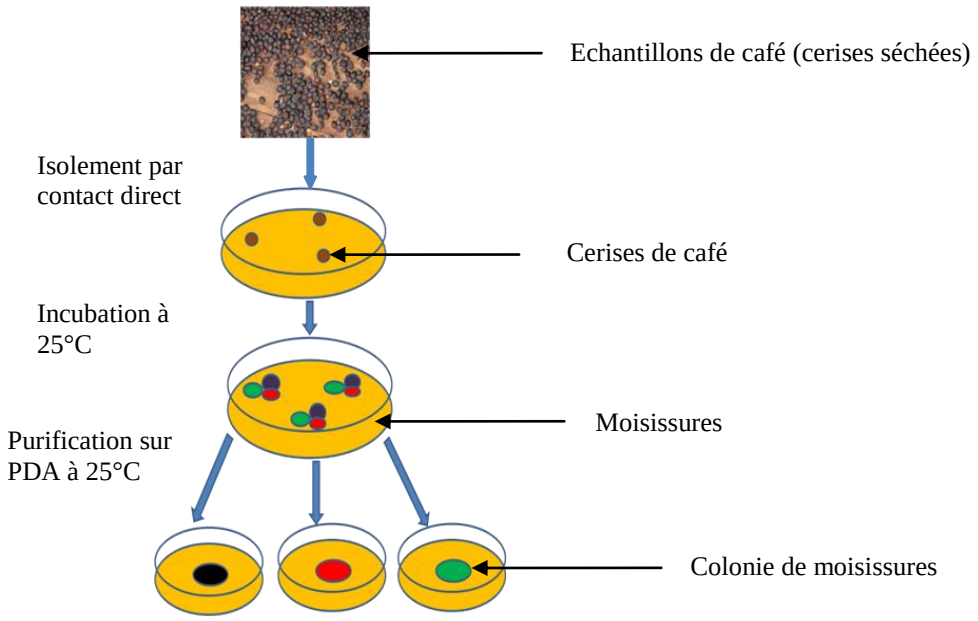


Figure 12 : Schéma d'isolement par contact direct et d'obtention en culture pure des moisissures.

3.1.3.2. Purification et conservation des moisissures

Pour obtenir une souche pure, plusieurs repiquages sur milieu PDA sont effectués. Le choix des espèces à prélever est fait à l'œil nu, en tenant compte de la ressemblance des thalles et des spores. Une fois celles-ci isolées en culture pure, elles sont repiquées sur milieu PDA pour mesurer leur vitesse de croissance apicale et observer les caractères macroscopiques et microscopiques.

La conservation se fait à +4°C dans des piluliers sur gélose PDA inclinée.

3.1.3.3. Identification des moisissures

Dans le but d'identifier les différentes moisissures, plusieurs caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques ont été pris en compte en utilisant des clés d'identification (Botton et *al.*, 1990; Samson, 2007). Ces critères d'identification portent sur les deux grandes structures des moisissures: le mycélium ou thalle et les spores. La description des colonies se fait de la manière suivante. Tout d'abord on réalise une suspension de spores à partir d'une culture en pilulier. A l'aide d'une pipette Pasteur on prélève une aliquote et on dépose une microgoutte au centre de la boîte de Petri, à la surface du PDA. On laisse incuber pendant 7 jours. Chaque jour à heure fixe les boîtes sont observées pour décrire la croissance apicale, l'aspect et la couleur de la colonie. Souvent on utilise directement une öse pour inoculer la surface des milieux gélosés. Malheureusement le fait d'utiliser cette technique, présente un risque de dispersion des spores à la surface de la boîte de Petri, de telle sorte qu'il ya apparition de plusieurs colonies à la surface du milieu, ce qui empêche une étude précise de description des caractères morphologiques.

Le milieu PDA permet de distinguer clairement chaque espèce d'*Aspergillus* section *Nigri* provenant de collections internationales. Les colonies d'*A. carbonarius* sont nettement différentes des colonies d'*A. niger*. De la même façon on arrive à distinguer facilement les *A. aculeatus* des *A. niger*.

3.1.3.3.1. Etude des caractères culturaux

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures isolés à savoir les *Penicillium*, les *Aspergillus* section *Fumigati* et les *Aspergillus* section *Nigri*. Les caractères étudiés sont:

au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle, la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie, la présence des stries, le diamètre de la colonie, la vitesse de croissance apicale

au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible, l'odeur, les exsudats.

3.1.3.3.2. Etude des caractères morphologiques microscopiques

L'examen microscopique est effectué à l'état frais aux objectifs x 10 et x 40. Le mycélium est septé ou cloisonné. Les structures observées sont: la nature du conidiophore (pinceau ou tête aspergillaire), les cellules conidiogènes (bisériée ou unisériée), l'ornementation de la paroi des spores (verruqueux, echinulé, lisse, granuleux, taille des spores, présence ou absence de zygospore (Botton *et al.*, 1990; Samson *et al.*, 2007).

3.2. Méthode de dosage de l'OTA et de l'Aflatoxine

3.2.1. Production et extraction des mycotoxines sur milieu synthétique

3.2.1.1. Production des mycotoxines

Les champignons filamenteux ont été cultivés sur un milieu synthétique. Il s'agit du milieu de Czapek et Dox additionné d'extraits de levure (Pitt and Hocking, 1997). Ce milieu a été réparti en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, inoculées au centre par un frottis de spores de champignon et incubées pendant 7 jours à 25°C. L'échantillonnage dans le milieu gélosé pour analyser les mycotoxines produites par la biomasse du champignon a été réalisé selon la technique décrite ci-après en utilisant les tubes en verre de 5 mm de diamètre.

3.2.1.2. Extraction des mycotoxines

L'OTA a été extraite au méthanol (Bragulat et *al.*, 2001). La prise d'échantillons représentatifs dans le milieu de culture a été réalisée selon la technique des trois points et en triplicat pour chaque boite contenant une culture de champignons filamenteux (Figure13). Le matériel de prélèvement (une pince en inox) a été stérilisé avec de l'éthanol à 70%. Chaque prélèvement comprend trois spots gélosés (de 5 mm de diamètre) de la colonie, respectivement pris au centre, au milieu et à l'extrémité de la colonie (Figure 13). Les ont été pesés et broyés dans un flacon contenant 900µl de méthanol. Après 24 heures de conservation à l'obscurité, l'extrait est centrifugé à 1300 rpm (15min), et filtré à 0, 45µm à l'aide d'un filtre

d'acétate de cellulose de marque Whatman . Le filtrat est stocké à -20°C jusqu'à l'analyse HPLC (Sanchez-Hervas *et al.*, 2008).

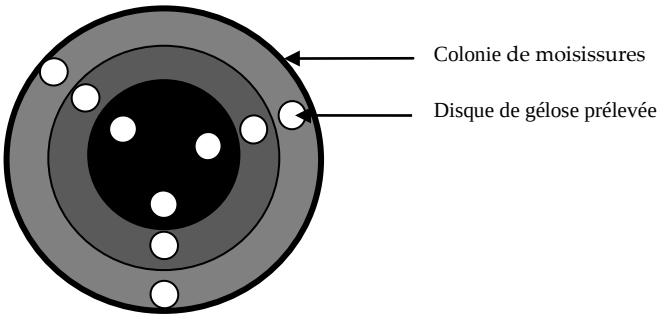


Figure 13 : Schéma d'échantillonnage pour l'extraction de mycotoxines en milieu gélosé sur une colonie de moisissures.

3.2.2. Cinétique de sporulation d'*Aspergillus* DO 127 et production d'OTA en FMS sous stress hydrique

3.2.2.1. Les microorganismes

La souche étudiée est un *Aspergillus niger* (DO 127) appartenant à la collection isolée sur les cerises de café au cours des campagnes 2008 et 2009.

3.2.2.2. Les milieux de cultures

-Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) : marque Fluka Analytical (composition : 4g/L d'extrait de pomme de terre, 20g/L de dextrose et 15g/L d'agar), 39 g de milieu en poudre pour 1L d'eau distillé puis stérilisation à 110°C, 30 mn sous une pression de 1atm.

-Milieu blé précuit: marque Ebly^{R} disponible dans les supermarchés, ajout du double de la masse de blé en eau chaude (humidité théorique 50%) puis cuisson du mélange au micro-onde 7mn. Le blé est laissé gonfler à l'air libre puis égoutté et stérilisé dans une autoclave à 110°C pendant 30 mn sous une pression de 1atm.

-Milieu bagasse de canne à sucre : il s'agit d'un mélange de bagasse de canne à sucre (70%) (provenant d'une usine au Mexique) , son de blé (20%) (disponible sur le marché), flocon de purée de pomme de terre (10%) (disponible en supermarché) ajout d'une solution minérale composée de sels minéraux suivants : urée (2,4g) ; KH_2PO_4 (5,0g) et $NH_4)_2SO_4$ (9,7g) pour 100 g de substrat solide. Le mélange à 50% d'humidité a été stérilisé à 120°C pendant 20 mn. L'inoculation du milieu solide stérilisé a été réalisé avec une suspension de $2x10^7$ spores par gramme de substrat poids humide en suspension dans 200 ml d'eau (humidité théorique 75%), puis le milieu inoculé a été introduit à l'aide d'une pince dans des colonnes de Raimbault, de grande capacité.

Pour les milieux EBLY^R et bagasse de canne à sucre, il est fait un Poids Sec (Ps), en prélevant et pesant une masse fraîche de milieu inoculé ; elle est ensuite placée durant une nuit dans une étuve à 105°C et repesé après séchage.

3.2.2.3 Les conditions de cultures

- Flacons **Erlenmeyer** : avec le milieu PDA (25 mL/flacon) permet de réaliser des cinétiques de sporulation et des inoculums pour les milieux bagasse et blé précuit. Avec le milieu bagasse, permet les cinétiques de sporulation et les prélèvements pour le PS et l'analyse en HPLC des mycotoxines.

- **Colonne de Raimbault**: avec les milieux EBLY^R (blé précuit) et bagasse, permet d'exercer un stress hydrique, d'analyser la réspirométrie, de faire une cinétique de sporulation et des prélèvements pour le PS et l'analyse en HPLC des mycotoxines.

3.2.2.4 Mise en place des FMS

Des colonnes de Raimbault, de 30 mn de diamètre et 27.5 cm de long ont été utilisées respectivement pour le milieu EBLY^R et bagasse de canne à sucre. Les colonnes équipées de coton cardé et de papier filtres à leurs extrémités ont été stérilisées (autoclave, 120°C pendant 30 mn sous une pression de 1atm) ont été remplies sur environ 20 cm de hauteur suivant le compactage du milieu avec des masses de blé précuit inoculé ou 37g de mélange (bagasse de canne à sucre, son de blé et flocons de purée de pomme de terre) inoculé avec 2.10^7 spores/g de poids sec du milieu solide. Les colonnes ont été pesées avant et après leur remplissage. Une fois préparées, les colonnes ont été connectées à un humidificateur (en bas) et au PNEO (en haut), elles ont été alourdies par un anneau de plomb puis plongées dans un bain thermostaté à 25°C (Fig.14).

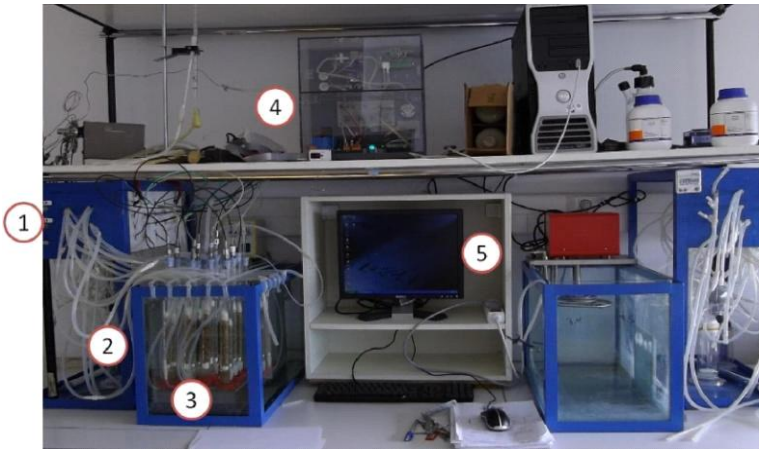


Figure 14: Photo du dispositif de FMS équipé avec le respiromètre PNEO :

1) Entrée d'air, 2) Bain-marie thermostaté, 3) Colonnes de fermentation, 4) PNEO, 5) ordinateur de commande d'échantillonnage pour l'analyse des effluents gazeux et d'acquisition des données.

La respirométrie a été suivie en temps réel grâce au PNEO affichant sur écran d'ordinateur les différents paramètres : température, % CO_2, débit d'aération, et humidité relative (Lakhtar, 2009).

Le débit d'aération a été réglé manuellement pour chaque colonne à l'aide de micro-vannes à pointeau. Le débit a été modifié au cours des expériences :

-FMS avec EBLY^R : 15 mL/mn d'air humide pendant 24h, 50 mL/mn d'air humide de 24 à 72h puis 100 mL/mn d'air sec a partir de 72h jusqu'à l'arrêt de la FMS (7 jours).

-FMS avec mélange de bagasse : 50 mL/mn d'air humide pendant 48h puis 160 mL/mn d'air sec de 48h à l'arrêt de la FMS.

Les valeurs des paramètres ont été relevées de manière automatique (par l'ordinateur) et pour certains points manuellement (pour plus de sécurité).

Les résultats ont été enregistrés sous la forme de tableau excel, à partir desquels les courbes de respirométrie ont été tracées.

3.2.2.5 Echantillonnage

Pour les différentes méthodes de culture, il a été réalisé des échantillonnages afin de réaliser différentes analyses (PS, cinétique de sporulation, analyse mycotoxine, respirométrie):

Flacons Erlenmeyer, milieu PDA : ajout de 100mL d'eau tweenée (50 µL de tween 80 pour 100 mL d'eau distillée) dans l'erlen puis agitation magnétique 10 mn, comptage des spores à l'aide d'une cellule de Malassez (lame micro quadrillée). Des dilutions ont été réalisées (1/5ème ou 1/20ème) lorsque cela était nécessaire (Roussos et *al.*, 2006 ; Salih, 2004).

Colonne, milieu EBLY^R précuit ou bagasse de canne à sucre : après que la colonne ait été vidée dans un bocal, le produit fermenté a été mélangé et homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule, puis prélevé et réparti dans un erlen, deux pots en verre et deux tubes Falcon^R de 25 mL. Les échantillons placés dans les erlens pour le comptage des spores ont été traités comme dans le cas du milieu PDA. Les échantillons des produits fermentés placés dans des tubes Falcon^R ont été conservés au frais jusqu'à l'extraction et l'analyse des mycotoxines en HPLC. Les échantillons placés dans les pots ont servi pour la mesure du poids sec des produits fermentés (105°C, pendant une nuit). Ces échantillons séchés vont également servir

pour l'analyse des mycotoxines en HPLC. Dans la partie résultats - analyse de mycotoxines, on les appellera échantillons chauffés.

3.2.2.6. Analyse de l'Ochratoxine A par l'HPLC

Solutions étalon d'OTA

Nous avons utilisé une solution standard diluée à partir d'une solution mère commerciale d'Ochratoxine A à 100 ng/ml (produit par *Petromyces albertensis* assay ≥98%, Sigma Aldrich). Les solvants acétonitrile, et méthanol, de qualité analytique (HPLC chromasolv), proviennent de Sigma Aldrich, l'acide acétique glacial, de qualité analytique, provient de Carlo Erba.

Conditions opératoires et Dosage

L'analyse des mycotoxines est réalisée grâce à une unité HPLC Agilent Technologies 1200 séries équipée d'un détecteur UV et d'un fluorimètre Agilent Technologies 1200 séries. Les mycotoxines sont analysées grâce à une colonne RP-18 Waters (Atlantis C18, 5µm, 4,6 x 250 nm), munie d'une précolonne (Nomura chemical)**.** Le solvant d'élution est un mélange eau/acétonitrile/acide organique (57/41/2). L'élution est réalisée de manière isocratique à un débit de 1mL/min. le temps d'élution de l'OTA est de l'ordre de 9,7 min. La détection se réalise par spectrofluorimètrie (excitation 335nm; émission 460nm). La répétabilité de l'analyse est vérifiée par les solutions standards d'OTA de concentration et la quantification par comparaison avec une courbe d'étalonnage (Annexe 3).

3.3. Isolement et identification des bactéries lactiques

3.3.2. Méthodes d'isolement et d'identification phenotypique des bactéries lactiques

3.3.2.1. Ensilage de la pulpe fraîche de café

Après dépulpage des cerises fraîches de café, la pulpe est réhumidifiée avec de l'eau à saturation et tassée dans des colonnes en verre de façon à créer des conditions d'anaérobiose (Fig.15a). Le taux d'humidité initial enregistré au début de l'ensilage pour 160 g de pulpe fraîche de café est de 54,73% avec un pH de 4,5. Aucun starter biologique, ni additif chimique n'ont été ajoutés. Les micros silos enroulés de papier aluminium et de sac plastique noir, sont incubés à la température ambiante de 25°C dans l'obscurité, pendant six semaines. Au désilage du micro-silo, il n'ya aucun champignon, ce qui prouve que les conditions d'anaérobiose ont été respectées. La couleur du substrat s'est éclairci et présente une

homogénéïté sur l'ensemble de la colonne (Fig.15). L'humidité du produit final est de 51,1%, et le pH de 4,3.

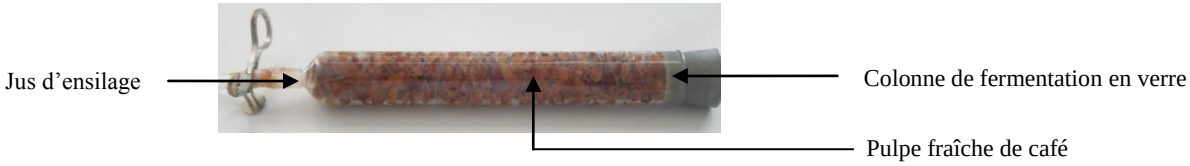


Figure 15: Micro-silo de la pulpe fraîche de café à six semaines d'ensilage.

3.3.2.3 Etude morphologique des bactéries isolées

3.3.2.3.1. Etude macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est étudié à la loupe binoculaire. Les caractères pris en compte sont : le relief, la taille, la couleur, l'aspect (collant, filamenteux, muqueux, ...), l'odeur, la transparence et l'allure des contours.

3.3.2.3.2. Etude microscopique

L'étude microscopique des bactéries lactiques prend en compte les tests suivants:

l'état frais :

A l'aide d'une pipette Pasteur une goutte de culture bactérienne de 24 h est montée entre lame et lamelle et observée à l'objectif x 10 et x 40. La mobilité des bactéries est ainsi mise en évidence.

la coloration de Gram :

Un frottis séché de chaque bactérie est réalisé, puis coloré à la fuschine, décoloré au lugol et coloré ensuite au violet de gentiane. La préparation est observée à l'objectif x 100 pour mettre en évidence la forme, le mode de groupement et la sporulation des bactéries.

3.3.2.4. Caractérisation biochimique et métabolique des bactéries lactiques

Les critères biochimiques étudiés sont :

la catalase :

Dans un premier temps les bactéries isolées ont été criblées grâce à un test à la catalase afin de ne retenir que les bactéries lactiques (catalase -). Pour cela une öse de colonie est barbotée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. L'apparition de bulles confirme la présence d'une catalase chez la bactérie étudiée.

Les bactéries catalase négative, Gram positive, aéro-anaérobie facultatives sont considérées comme des bactéries lactiques et conservées dans du glycérol à -20°C pour être ensuite testée contre des moisissures productrices d'OTA.

Les bactéries lactiques isolées sont ensuite testées pour leur activité antifongique.

3.3.3. Screening des bactéries lactiques antagonistes

La stratégie utilisée pour le criblage des bactéries lactiques ayant un pouvoir antagoniste vis-à-vis des moisissures est celle de la technique de recouvrement ou de la gélose en double couche (Cabo *et al.,* 2002) qui se déroule en quatre étapes (Fig.16) qui sont : la culture pure des bactéries lactiques, la culture des moisissures, la recherche des bactéries lactiques antagonistes par la technique de recouvrement et la lecture des résultats.

3.3.3.1. La culture pure des bactéries lactiques sur gélose MRS

Chaque bactérie à tester est mise en culture dans un bouillon MRS, 24h à 30°C. À partir de ce bouillon de culture, nous avons ensemencé en trois spots de 5 µl chacun, les géloses MRS séchées à l'avance, puis incubées 24h à 30°C.

3.3.3.2 La préparation du milieu CYA inoculé avec des spores de moisissures

Une suspension de spores de la moisissure à tester est préparée dans de l'eau physiologique. La concentration de la suspension est déterminée à la cellule de Malassez. Ensuite à l'aide de cette suspenssion nous avons préparé une gélose CYA (référence milieu) à 0,8% d'agar et ramené sa concentration en spores de moisissures à 10^4 spores/ml.

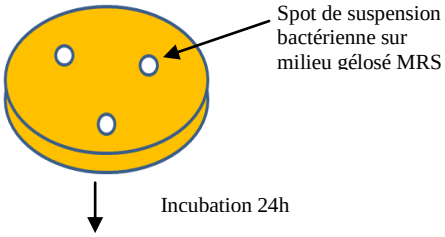
3.3.3.3 Recherche de bactéries antagonistes par la technique de recouvrement ou de la gélose en double couche

Les géloses MRS portant les bactéries ont été recouvertes avec le milieu CYA inoculé de spores de moisissures et incubées 3 à 4 jours à 25°C avec : un témoin (MRS plus bactérie), un contrôle positif (MRS plus bactérie plus CYA sans moisissure), un contrôle négatif (MRS sans bactérie plus CYA avec moisissure). Les expériences sont réalisées en triplicat.

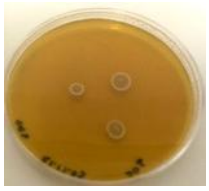
3.3.3.4 La lecture des boîtes

Nous avons effectué la lecture des boîtes à 72 heures et 96 heures. Les critères relevés au cours de la coculture bactéries-moisissures sont : l'inhibition de la germination des spores et la présence d'un halo clair d'inhibition autour des colonies de la bactérie.

1a Culture des bactéries lactiques



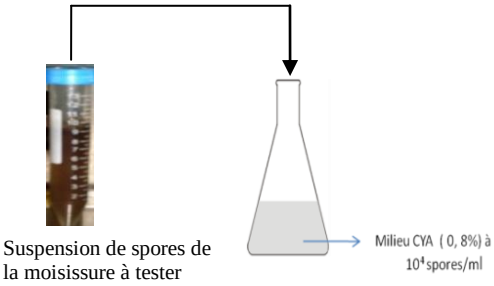
2a Colonie bactérienne de 24h sur gélose MRS



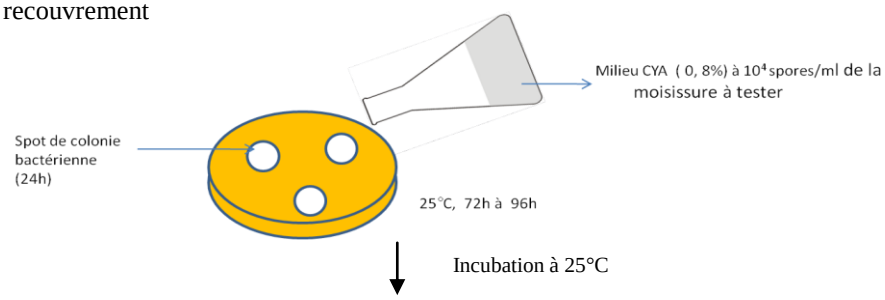
1b Culture des moisissures

Colonie de moisissure de 7 jours

2b Milieu CYA inoculé en spores de moisissures



3 Technique de recouvrement



4 Lecture des résultats : coculture des bactéries lactiques et des moisissures

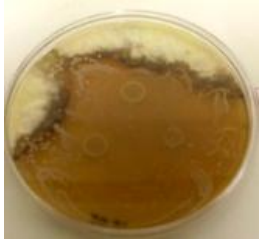


Figure 16 : Recherche des bactéries lactiques antagonistes par la technique de recouvrement ou de gélose en double couche.

Nous avons continué l'identification des bactéries lactiques antifongiques avec l'étude de leur caractère biochimique et physiologique.

3.3.4 Les caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques antagonistes

3.3.4.1 L'étude de la fermentation des sucres appartenant des bactéries lactiques antifongiques

L'étude de la fermentation des sucres des bactéries lactiques a été faite à l'aide des galeries API50CH (Ref 50300, Biomérieux). C'est un système standardisé qui comprend 49 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. Le milieu API50CHL de couleur pourpre qui a été utilisé pour l'identification des *Lactobacillus* est un milieu de base pour la croissance des *Lactobacillus* mais qui ne contient pas de sucre. Chaque puits de la galerie contient un sucre à fermenter. Le premier puits qui sert de témoin ne contient pas de sucre. Le principe de la galerie API est qu'au cours de l'incubation le sucre assimilé par la bactérie est métabolisé par cette dernière.

Les souches sélectionnées pour ce test ont été cultivées en anaérobiose sur une gélose MRS pendant 36h pour vérifier leur pureté. Puis à l'aide d'une colonie bactérienne nous avons préparé une suspension dans 2ml de Suspension Medium (Ref. 20070, Biomérieux) afin d'obtenir une densité bactérienne égale à 2 Mc Farland (Ref. 70900, Biomérieux). bactérienne avec un milieu API50CHL. La suspension bactérienne a été répartie à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 puits de la galerie. Chaque puits a été ensuite recouvert d'huile de paraffine afin de créer les conditions d'anaérobiose. Les galeries ont été ensuites incubées à 30°C pendant 48h. La fermentation des sucres est mise en évidence par l'acidification due à la croissance bactérienne. La lecture a été faite après 48 heures selon les critères suivants : l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du bromocrésol pourpre contenu dans le milieu ; dans ce cas le résultat est noté positif. Mais pour le test de l'esculine (tube 25) on observe un virage du pourpre au noir. Les différents profils obtenus ont été identifiés par la société Biomérieux à l'aide du logiciel APIweb.

3.3.4.2 Le profil enzymatique des bactéries lactiques antifongiques

L'étude du profil enzymatique consiste à détecter chez chaque bactérie19 activités enzymatiques. Elle a été réalisée grâce au système standardisé APIZYM (Ref. 25200, Biomérieux). Chaque puits de la galerie APIZYM comprend une enzyme dont l'activité est à détecter chez la bactérie à tester. A partir de chaque souche pure nous avons récolté une colonie bactérienne et préparé dans 2mL d'eau distillée stérile une suspension bactérienne de densité équivalente 5-6 sur l'échelle de MacFarland (Ref.70900, Biomérieux) . Cette suspension a été répartie dans la galerie à raison de 65µL par puits. La galerie a été ensuite incubée à 37°C, pendant 4h. Après incubation, une goutte de réactif ZYM A (Ref. 70494, Biomérieux), puis une goutte de réactif ZYM B (Réf.70493) ont été ajoutées pour développer

les colorations révélant les activités enzymatiques. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la lecture des galeries a pu être effectuée : les activiés enzymatiques positives ont été révélées par une coloration violette, orange, bleue ou marron selon les puits.

3.3.4.3. Physiologie des bactéries lactiques antagonistes

Les tests physiologiques réalisés sur les bactéries lactiques sont : la température d'incubation, la concentration en NaCl du milieu de culture et la production de CO_2 au cours de la croissance en conditions aérobie facultative :

- la température d'incubation : les bactéries sont cultivées à 4°C, 37°C et 45°C
- la concentration en NaCl du milieu de culture : les bactéries sont cultivées dans un bouillon MRS (4% de NaCl) et un bouillon MRS (6,5% de NaCl) pendant 24 heures à 30°C
- la production de CO_2 : les bactéries sont cultivées dans un bouillon MRS sans citrate, contenant des cloches de Durham.

3.3.5 Le profil fermentaire des bactéries lactiques antagonistes

L'étude du profil fermentaire des bactéries lactiques consiste à détecter et quantifier la production d'acide lactique et acétique chez ces bactéries.

3.3.5.1 La préparation des solutions étalons

Les étalons sont préparés à partir de standards d'acide lactique (Fluka 69775), d'acide acétique (Acros organique 124040010) et de D-glucose (Sigma Aldrich G-7528) suivant une gamme étalon de 0,1g/l ;0,5g/l ;1g/l ;5g/l ;10g/l; 20g/l.

3.3.5.2 La production d'acide lactique et acétique

La production d'acide lactique et d'acide acétique est réalisée après la culture des bactéries sur milieu MRS. A partir d'une colonie fraîche de bactérie lactique, nous avons réalisé une préculture de 24h dans 5mL de MRS. Un millilitre de cette préculture a été centrifugée et le surnageant (LabS1) a été filtré à 0,45µm puis conservé à -20°C. Cette préculture de bactéries lactiques a permis d'inoculer à 10% un milieu MRS de 9 mL qui a été incubé à 30°C pendant 18h. Un millilitre de cette culture bactérienne a été centrifugée et le surnageant (LabS2) obtenu a été filtré à 0,45µm. Pour l'analyse à l'HPLC, des dilutions demi des surnageants ont été réalisés et conservés à 4°C.

3.3.5.3 Détection et quantification des acides lactique et acétique par l'HPLC

Le matériel utilisé est une plate forme HPLC composée d'un dégazeur (1200 Series Degasser, Agilent Technologies), d'une pompe quaternaire (1200 Series Quaternary Pump, Agilent Technologies), d'un échantillonneur liquide automatique (1200 Series Automatic Liquid Sampler, Agilents Technologies) et d'un détecteur à barette de diodes (1200 Series Diode-Array Detector, Agilent Technologies) paramétré à 210 nm d'absorbance. La colonne utilisée est une Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) Biorad gardée à une température constante de 30°C.

La détection des acides organiques a été réalisée par UV à 210 nm. La phase mobile est constituée d'une solution d'acide sulfurique à 0,005mol/L. L'élution est réalisée de manière isocratique à un débit de 0,6 mL/min. La répétabilité de l'analyse chromatographique a été vérifiée sur des solutions de références : acide lactique (Fluka 69775), acide acétique (Acros organique 124040010) et de D-glucose (Sigma Aldrich G-7528) (Annexe 5) Les différents temps d'élution enregistrés pour les composés analysés sont 11,10.et 11,84 pour l'acide lactique, 14,25 pour l'acide acétique, 8,20 pour le gluocse. La quantification des acides est faite par comparaison à un courbe étalonnage (Annexe 5).

3.3.6. Identification moléculaire des bactéries lactiques

3.3.6.1 Prétraitement des bactéries lactiques

Une colonie bactérienne est ensemencée dans 5ml de MRS pendant18h à 20h, à 30°C. 1,5 ml de cette culture est prélevée et centrifugée 10 min à 5500 g. Le culot est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

3.3.6.2 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à l'aide du Kit QIAGEN (Annexe 2) dans un volume final de 100µl. Il est ensuite quantifié dans l'UV visible entre 220 nm et 750 nm par spectrophotométrie au Nanodrope (2000C, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA).

3.3.6.3. Amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) de l'ADN ribosomal 16S

L'étude moléculaire des bactéries lactiques a porté uniquement sur les onze bactéries retenues à l'issu du test antifongique.

Les amplifications par PCR ont été réalisées en utilisant séparément les couples d'amorces fd1/rd1, Firm350/Firm814r, rpoA-F2/rpoA-R2 fournies par Eurofins MWG Opéron (Tableau 6), dans un mélange réactionnel de 25µl (voir Tableau 7):

Tableau 6: Liste des amorces utilisées pour la PCR.

primer	**Designé pour**	**Sequences (5' to 3')**	**(Température d'hybridation)**	**Références**
Fd1	Eubactérie	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55°C	(Weisburg *et al.*, 1991)
Rd1	Eubactérie	AAGGAGGTGATCCAGCC	55°C	(Weisburg *et al.*, 1991)
Firm 350	Firmicute	GGCAGCAGTRGGAATCTTC	53°C	(Mühling *et al.*, 2008)
Firm 814r	Firmicute	ACACYTAGYACTCATCGTTT	53°C	(Mühling *et al.*, 2008)
rpoA-F2	*Lactobacillus*	GTGGATGGCGTYGTWGARGA	48°C	(Shiou *et al.*, 2009)
rpoA-R2	*Lactobacillus*	TTGATTGAACCRTTWGTCCAAA	48°C	(Shiou *et al.*, 2009)

Tableau 7: Composition du mélange réactionnel de 25µl

Composants	**Quantité (µL)**
Eau ultrapure stérile	13
Tampon Gotaq sans $MgCl_2$	5
$MgCl_2$ (25mM)	1,25
DNTP* (10mM)	1
DMSO	0,5
Primer forward (10 mM)	1
Primer reverse (10 mM)	1
Taq polymerase	0,25
ADN matrice	2

*Quatre désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Les amplifications PCR sont réalisées avec le thermocycleur Thermal Cycler 578BR0545 (BIORAD, USA) dans les conditions suivantes (Tableau 8) :

Tableau 8 : Conditions spécifiques des programmes PCR pour le thermocycleur avec trois couples d'amorces.

Programme PCR	**Amorces**		
	fd1/rd1	**Firm350/Firm814r**	**rpoA-F2/rpoA-R2**
Dénaturation initiale	94°C (5min)	94°C (5min)	94° C (2min)
Nombre de cycles	35	30	35
Dénaturation pendant le cycle	94°C (30s)	96°C (60s)	94°C (30s)
Hybridation	55°C (30s)	53°C (60s)	52°C (30s)
Elongation	72°C (2 min)	72°C (60 s)	72°C (60s)
Elongation finale	72°C (10 min)	72°C (10 min)	72°C (5 min)
Température finale	4°C	4°C	4°C

RESULTATS ET DISCUSSIONS

4. Résultats et discussions

La structure de ce chapitre résultats et discussions sera basée sur quatre sous-chapitres. Le premier sous-chapitre des résultats présentera l'isolement et l'identification des souches de champignons filamenteux à partir des échantillons prélevés en Côte d'Ivoire au cours des périodes 2008 et 2009. Le deuxième sous-chapitre regroupera toutes les informations sur le pouvoir mycotoxinogène des souches cultivées, soit sur des milieux synthétiques PDA ou CYA, soit sur des substrats naturels (blé précuit, bagasse de canne à sucre, son de blé). Le troisième sous-chapitre présente les bactéries lactiques isolées à partir de cerises de café en provenance de Côte d'Ivoire. Enfin le dernier sous-chapitre, qui a fait l'objet d'un article publié dans la revue Anaérobe (Djossou et *al.*, 2011) et qui est donné en annexe 1, développera une technique de criblage de bactéries lactiques antagonistes vis-à-vis de différentes souches mycotoxinogènes d'*A. carbonarius* isolées au cours de ce travail.

4.1. Isolement, identification et origine de souches de champignons filamenteux

Cette étude sur l'isolement, l'origine et la description des souches de champignons filamenteux isolés à partir des échantillons de café provenant de Côte d'Ivoire a été entreprise pour évaluer et identifier la flore fongique qui se développe sur les grains de café robusta au cours du traitement post-récolte par voie sèche. La stratégie d'isolement des moisissures qui a été utilisée est celle du contact direct (Figure:17) proposée par Pereira *et al.* (2003) et reprise par Perrone *et al.* (2007).

4.1.1. Techniques d'isolement et de purification des moisissures à partir des échantillons de café.

Cette technique permet de cultiver la plupart des moisissures présentes sur la cerise de café. A partir de chaque échantillon, trois cerises de café ont été prélevées au hasard et appliquées à la surface du milieu gélosé PDA. Les cultures ont été incubées à 25°C pendant au moins trois jours au terme desquels on a pu voir apparaître sur la surface du milieu gélosé et sur les grains de café, plusieurs colonies de moisissures de divers genres (Figure.17).

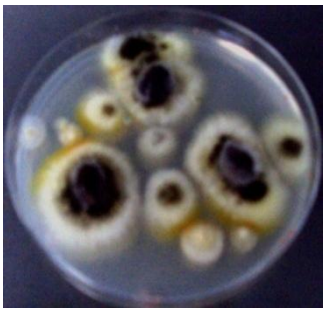


Figure 17 : Photo de la technique du contact direct pour l'isolement de moisissures en trois points sur gélose PDA à 25°C.

Les spores de moisissures viables, présentes sur les échantillons de café, donnent naissance à une colonie visible. La Figure 17 met en évidence une multicontamination des échantillons car les colonies qui apparaissent sur les géloses ne sont pas identiques.

Une fois les souches purifiées sur gélose PDA, la détermination des genres a été faite en étudiant les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques, des moisissures.

4.1.2 Caractéristiques phenotypiques des principaux genres de moisissures

L'identification des différents genres de moisissures passe par leur description morphologique, macroscopique et microscopique. L'étude macroscopique prend en compte les caractérisques du thalle (couleur, texture) et des spores (taille, couleur, densité). Par contre au niveau morphologique les caractéristiques étudiées sont celles des cellules conidiogènes (phialides et métules), des conidies (taille, ornementation externe). Les principaux genres isolés ont été les *RhizoMucor* (Fig.18), les *Penicillium* (Fig.19) et les *Aspergillus* (Fig.20).

4.1.2.1 Caractéristiques des *RhizoMucor*

Toutes les souches de *Rhizomucor* qui ont été isolées lors de cette étude semblent appartenir à la même espèce. Les *Rhizomucor* donnent des colonies très envahissantes à la surface des milieux gélosés. Leur caractéristiques morphologiques macroscopiques se présentent comme suit : le thalle est blanc, filamenteux et aérien ; les spores sont rondes, lisses, et noires (Fig. 18a). Au niveau microscopique les spores appelées sporangiospores sont enfermées dans des structures dites *Sporangium* (Fig.18b).

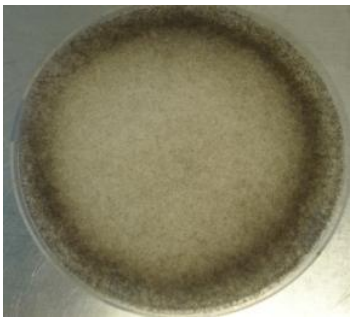


Figure 18a : Photo de la colonie purifiée de *RhizoMucor* sur PDA.

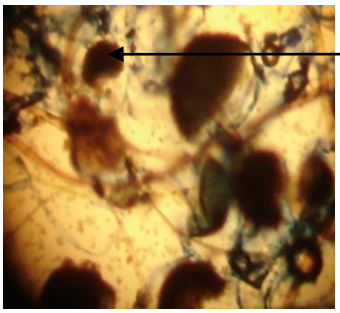


Figure 18b : Aspect microscopique des *RhizoMucor* (X400).

Figure 18: Photo de structures macroscopiques et microscopiques des *RhizoMucor*.

4.1.2.2 Caractéristiques phenotypiques des *Penicillium spp*

Les souches de *Penicillium* isolées ont un thalle poudreux allant du bleu au vert, entouré d'une partie blanche légèrement duveteuse (Figure 19a). Les structures de reproduction asexuée des *Penicillium* se présentent sous forme de pinceau, parfois biverticillé (Fig. 19b).

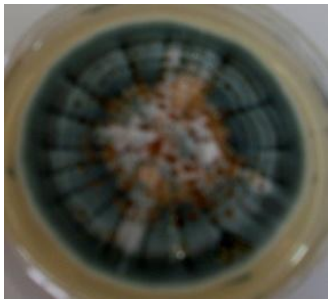


Figure 19a:Colonie purifiée de *Penicillium* sur PDA.

Figure 19b: Structure en pinceau biverticillé de *Penicillium* (x400).

Figure 19: Photo de structure macroscopique et microscopique de *Penicillium.*

4.1.2.3 Caractéristiques phenotypiques des *Aspergillus spp*

Dans ce chapitre nous présentons les *Aspergillus* isolés au cours de nos travaux. La principale caractéristique microscopique permettant d'identifier les *Aspergillus* est la vésicule globuleuse (Fig.19b) ou claviforme (Fig.20) qui peut être unisériée ou bisériée.

L'identification des champignons filamenteux est essentiellement basée d'une part sur la description des caractères morphologiques de la colonie obtenue sur le milieu PDA et d'autre part, sur la description des caractéristiques microscopiques: le mycélium septé ou non septé, la forme des différentes structures de reproduction asexuée (*Aspergillus*), la taille, la forme et la couleur des conidies.

4.1.2.3.1 Les *Aspergillus* de la section *Fumigati*

A. fumigatus est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 50°C. Le Tableau 9 présente les caractéristiques des souches des *Aspergillus* de la section *Fumigati* isolées des échantilllons de café.

Tableau 9 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des *Aspergillus* section *Fumigati* isolés en 2008.

Caractéristiques macroscopiques				**Caractéristiques microscopiques**		
Couleur du thalle	**Revers du thalle**	**Caractéristiques du revers du thalle**	**Caractéristiques des spores**	**Vésicules**	**Cellules conidiogènes**	**Caractéristiques des conidies**
Blanc	Incolore à brun	Blanc, strié	Vert foncé, poudreux	claviforme	unisériées	Petites

Les colonies sont blanches et les spores sont vertes foncées et poudreuses sur l'ensemble du thalle (Tableau 9; Fig.20a). Au microscope optique les cellules conidiogènes constituées uniquement de phialides recouvrent à un tiers la vésicule qui est claviforme (Fig.20).

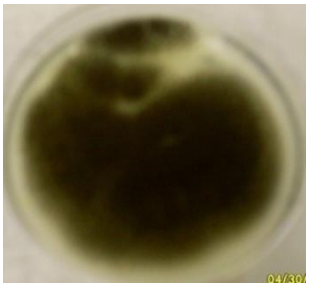


Figure 20a: Thalle vert fumé de *Aspergillus fumigatus* isolé sur PDA à 25°C.

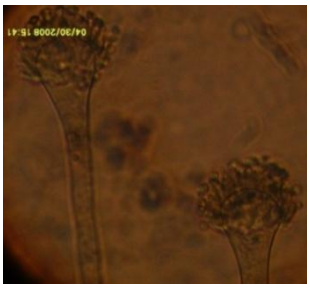


Figure 20b: Conidiophores de *Aspergillus fumigatus* au microscope (x400).

Figure 20 : Photo de structure macroscopique et microscopique de *Aspergillus fumigatus.*

4.1.2.3.2 Les *Aspergillus* de la section *Nigri*

4.1.2.3.3 Les souches de références

Nous avons utilisé six souches d'*Aspergillus* section *Nigri* provenant de collections internationales appartenant à trois espèces différentes : *A. carbonarius* (Ac16, Ac 2131); *A niger* (An 2318, An 65N); *A. aculeatus* (Ac 168 et Ac 66T) pour les utiliser comme des souches de références afin de les décrire et de regrouper les souches isolées autour de ces

espèces. La description des caractères morphologiques de ces souches de référence est présentée dans le Tableau 10. Pour les trois espèces décrites *A. carbonarius*, *A. niger* et *A. aculeatus* deux souches différentes de chacune de ces espèces ont été cultivées sur milieu PDA pendant 7 jours à 25°C: deux *A. carbonarius*, deux *A.niger* et deux *A. aculeatus* en se basant sur la densité du conidiophore observé sur des colonies obtenues sur PDA après 7 jours d'incubation à 25°C.

Tableau 10: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches de références d'*Aspergillus* section *Nigri* cultivées sur PDA pendant 7 jours..

Morphologie		**Souches de références**					
		***A. carbonarius* 16**	***A. carbonarius* 2131**	***A. niger* 2318**	***A. niger* CBS554.65NT**	***A. aculeatus* 168**	***A. aculeatus* CBS172.66T**
Caractéristiques macroscopiques	**Couleur du thalle**	Blanc, Stipe long	Blanc, Stipe long	Blanc	Blanc	Marron	Marron
	Couleur de l'envers du thalle	Blanc	Beige	Jaune	Jaune	Transparent	Transparent
	Couleur spore	Noire	Noire	Marron	Marron	Marron	Marron
	Densité	+	+	++	++	+++	+++
Caractéristiques	**Cellules conidiogènes**	Bisériée	Bisériée	Bisériée	Bisériée	Unisériée	Unisériée
	Spores	Grosse, Verruqueuse	Grosse, Verruqueuse	Moyen, Echinulé	Moyen, Echinulé	Petite, Ovoïde	Petite, Ovoïde

Les critères morphologiques qui ont été utilisés pour distinguer les trois espèces sont :

- la couleur de l'envers du thalle
- la densité des spores
- la densité des conidiospores
- les structures conidiogènes bisériées avec présence de métule pour porter les phialides et unisériées où les phialides sont directement des spores (verruqueux, echinulées, lisse)

D'autres parts la taille des conidies distingue nettement l'espèce *A. carbonarius* avec des spores de grosses tailles et l'espèce *A. niger* avec des spores de petites tailles. D'autres caractéristiques peuvent aussi venir en aide pour cette description, par exemple les

caractéristiques de la surface des conidiospores qui peuvent être verruqueuses, échinulées ou ovoïdes.

4.1.2.3.4 Les caractéristiques des *Aspergillus* section *Nigri* isolés lors des deux campagnes d'échantillonnage

Les *Aspergillus* section *Nigri* ont été retenus pour réaliser une analyse plus fine de leurs caractères macroscopiques et microscopiques afin de tenter d'identifier les différentes espèces. Cette description morphologique est basée sur la couleur du thalle, la densité des conidies et la formation des structures unisériée ou bisériée du conidiophore (Tableau 11). Par contre six souches bisériées n'ont pu être classées.

Tableau 11: Caractéristiques microscopiques des *Aspergillus* section *Nigri* isolés au cours des saisons 2008 et 2009.

Moisissures bisériées	**Spore verruqueuse**				**Spore echinulée**				**Spore lisse**	
	Grosse		Moyenne		Petite		Moyenne		Moyenne	Petite
	Thalle jaune	Thalle blanc	Thalle jaune	Thalle blanc	Thalle jaune	Thalle blanc	Thalle jaune	Thalle blanc	Thalle jaune	Thalle blanc
	0	14	22	0	11	0	39	0	5	0
Moisissures unisériées	0	0	11	4	6	0	0	0	0	0

Les moisissures ont été isolées par contact direct à partir des échantillons de café sur gélose PDA (Patate Dextrose agar). L'étude phénotypique a également été réalisée sur gélose PDA.

Les caractéristiques morphologiques ont d'abord permis de distinguer les *A. carbonarius* des autres espèces de la section *Nigri* (Fig. 19a et b) (Samson et *al.*, 2004). Ensuite l'examen à l'état frais a permis de mettre en évidence les caractéristiques des cellules conidiogènes et des spores pour confirmer l'appartenance des souches aux différents groupes.

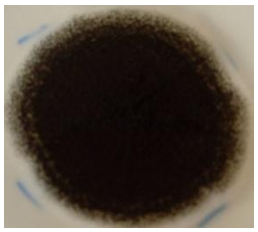


Figure 21 a : Colonie d'*Aspergillus* section *Nigr*i sur PDA.

Figure 21 b : Colonie d'*Aspergillus carbonarius* sur PDA.

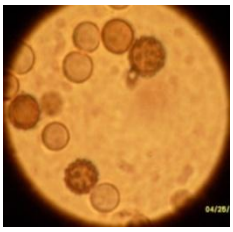


Figure 21 c : Spore verruqueuse d'*Aspergillus carbonarius* (x400).

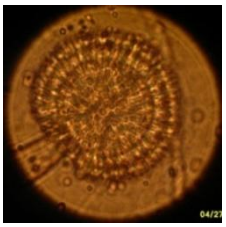


Figure 21 d : Tête conidienne d'*Aspergillus carbonarius* (x400).

Figure 21 : Photo de colonies, spores et tête conidienne d'*Aspergillus* section *Nigri.*

Les *A. carbonarius* présentent un thalle blanc, légèrement bombé recouvert de spores noires peu denses, granuleuses, portées par de longs stipes. Au microscope optique les conidies sont grossses et verruqueuses (Fig.21c et d). Les colonies d'*A. niger* aggregate sont noires mais avec un thalle blanc, jaune foncé ou clair. Les spores sont de couleur noire ou marron foncé ou clair et dense. Parfois sur le même thalle, la couleur n'est pas uniforme. L'examen à l'état frais révèle des conidies de petite taille ou moyenne, à l'enveloppe echinulée ou lisse, parfois verruqueuse.

4.1.2.4 Discussion sur l'identification des souches

L'identification des espèces d'*Aspergillus* a été faite sur des critères morphologiques à savoir l'aspect des colonies, la forme de la tête conidienne, la couleur des conidies, la texture du mycélium, la taille du conidiophore, la couleur et l'ornementation des conidies. Nous avons identifié deux groupes : les *Aspergillus* de la section *Fumigati* et les *Aspergillus* de la section *Nigri.*

Les *Aspergillus* section *Nigri* sont très largement répandus dans le monde. Bien que leur principale source soit le sol, ils figurent parmi les contaminants majeurs des aliments et de leur matière première (blé, café, cacao) (Perrone *et al.*, 2007). Plusieurs espèces comme *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus* et quelques variantes du groupe *niger* aggregate sont responsables de l'altération post-récolte des fruits (pomme, pêches, raisin, figue, tomates, melons, …), des végétaux (oignons, ail, igname), et des fruits secs (arachides, noix de pécans, pistaches, …) (JECFA, 2001). Sur le café, la présence de moisissures du genre *Aspergillus* notamment *A. carbonarius* et *A. niger*, a été signalé dans plusieurs pays (Perrone *et al.*, 2007).

Les clés de détermination de Botton *et al.* (1990) ne permettent pas d'identifier avec précision les espèces d'*Aspergillus* section *Nigri* isolés au cours de nos travaux. En effet les champignons filamenteux imparfaits tels que les *Aspergillus* section *Nigri* présentent une

grande variabilité morphologique et physiologique (Raper and Fennell, 1965 ; Al-Mussallam 1980). Or plus de 80% de nos souches sont de ce groupe, d'où la difficulté à les nommer. De façon générale, la taxonomie des *Aspergillus* section *Nigri* du point de vue morphologique présente de grandes difficultés. L'utilisation des souches de références pour l'identification des souches de la section *Nigri* hormis l'espèce *A. carbonarius* n'a pas été très bénéfique surtout dans le groupe *niger* aggregate du fait de la grande similarité phénotypique entre les espèces. Cette difficulté a conduit différents auteurs à les classer différemment (Al-Mussallam (1980); Kozakiewicz (1989). Donc les souches unisériées feraient parties des trois souches unisériées à savoir *A.aculeatus*, *A.japonicus*, *A.uvarum* (Perrone *et al.*, 2007). L'espèce *A.carbonarius* fait l'objet d'un intérêt particulier car elle demeure le contaminant majeur de certaines denrées tropicales et subtropicales (Pitt, 2000 ; Varga et Kozakiewicz, 2006). Elle se distingue le plus aisément des autres espèces dans le groupe *Aspergillus* section *Nigri* d'abord par son aspect macroscopique : le thalle est blanc, avec des stipes longs dispersés sur l'ensemble du thalle et qui portent de grosses spores de couleur noire anthracite (Figure21b). Au microscope la tête conidienne d'*A. carbonarius* est globuleuse et bisériée (Figure 21d) et les spores sont grosses et verruqueuses (Figure 21c). Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques ont permis de définir un groupe de moisissures appartenant à l'espèce *A. carbonarius*.

La taxonomie des champignons filamenteux, en particulier celle des *Aspergillus*, s'établit sur la base des caractères phenotypiques (aspect macroscopique et microscopique, physiologie de croissance à différentes températures ou sur milieux spécifiques) et le séquençage multigénique de l'ADN (calmoduline, β-tubuline, ITS, actine). A celà est venu s'ajouter ces dernières décennies le profil d'extrolites qui semble être spécifique à chaque taxon. De même les progrès en biologie moléculaire proposent l'exploration d'autres régions de l'ADN génomique tel que le séquençage du gène *cox.1* qui serait plus précis pour l'identification et l'étude phylogénique des espèces (Perrone *et al.*, 2007). Dans le cadre de cette thèse malheureusement je n'ai pas pu faire l'identification moléculaire de toutes les souches de moisissures.

4.1.3. Origine et distribution des moisissures isolées sur les différents échantillons

Le Tableau 12 rapporte les résultats obtenus lors de l'isolement et l'identification partielle des souches à partir des 31 échantillons de café.

Tableau 12: Répartition des différents genres de moisissures isolées en fonction du site d'échantillonnage, du support de séchagge et de de la nature des cerises.

Nature des échantillons	**Suppport de séchage**	**Nombre de moisissures isolées**	**Principaux genres de moisissures isolées**	**Sites d'échantillonnage**	**Date de prélèvement**
Cerises séchées	ND*	17	*A.* section *Nigri* *A.* section *Fumigati* *Penicillium* *RhizoMucor* *Fusarium*	Abengourou	Août-2008
Cerises séchées	Terre ferme	46	*A.* section *Nigri* *A.* section *Fumigati* *Penicillium* *RhizoMucor* *Fusarium*	Daloa-Ouest	Août-2008
Cerises séchées	Dalle	22	*Penicillium* *A.* section *Nigri* *Fusarium*	Issia-Ouest	Avril-2009
Cerises séchées	Film plastique	41	*A.* section *Nigri* *Penicillium* *RhizoMucor*	Issia-Ouest	Avril-2009
Cerises séchées	Terre ferme	39	*A.* section *Nigri* *RhizoMucor*	Issia-Ouest	Avril-2009
Grains de café vert	ND*	20	*A.* section *Nigri* *A.* section *Fumigati* Autres *RhizoMucor*	Daloa-Ouest	Août-2008
Grains de café vert	ND*	2	*Penicillium*	Abengourou –Est	Août-2008
Coques	ND*	31	*A.* section *Nigri* *Penicillium* *A.* section *Fumigati* Autres *RhizoMucor*	Abengourou –Est	Août-2008
ND* : Non déterminé					

Tous les échantillons sont contaminés en moisissures quelque soit leur nature en 2008 et le type de séchage en 2009. Comme le présente le Tableau 12, les échantillons de café

étudiés sont très diversifiés. En 2008, ils sont constitués de grains de café vert issus des entrepôts, de cerises séchées et de coques. La situation est toute différente en 2009 avec un échantillonnage constitué uniquement de cerises séchées prélevées chez cinq paysans issus du même village. Mais en revanche pour le même type de séchage naturel, les supports sont différents : dalle, film plastique, terre ferme.

De façon générale la diversité de la flore fongique sur l'ensemble des échantillons semble être spécifique d'une année à une autre. En effet en 2008 on retrouve à peu près les mêmes moisissures sur tous les échantillons de café quelques soit leur nature : *A.* section *Nigri*, *A.* section *Fumigati*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*. En 2009, *A.* section *Nigri* et *Penicillium* sont les plus fréquents quelque soit le support de séchage.

La Figure 22 présente la diversité des moisissures isolées au cours des années 2008 et 2009.

Au total deux cent dix huit moisissures post-récolte ont été isolées en culture pure et sont numérotées de DO1 à DO218. Elles se répartissent comme suit : *Aspergillus* section *Nigri* (53%), *Aspergillus* section *Fumigati* (13%), *Penicillium* (10%), *Mucor* (16%), *Fusarium* (4%) et autres (4%).

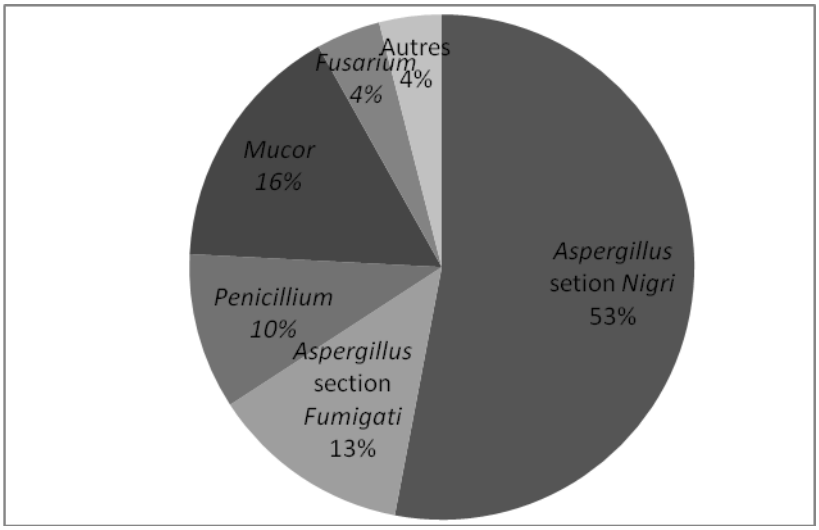


Figure 22 : Diversité des moisissures isolées en 2008 et 2009 à partir des échantillons provenant de café en Côte d'Ivoire.

Ce graphique met bien en évidence la multicontamination des échantillons de café analysés et montre que la flore fongique post-récolte du café robusta en Côte d'Ivoire est constituée de moisissures de divers genres. Le genre *Aspergillus* cumule 66% des isolats dont 53% des isolats reviennent à la section *Nigri* et 13% à la section *Fumigati*. Les *Aspergillus* de

la section *Nigri* constituent donc la flore dominante post-récolte du café robusta en Côte d'Ivoire.

Le Tableau 13 résume les différents genres de moisissures isolées à partir des 31 échantillons de café collectés en 2008 et de 2009. Il s'agit: d'*Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Penicillium*, *RhizoMucor* et *Fusarium*.

Tableau 13: Pourcentage de moisissures isolées sur les deux années 2008 et 2009.

Genres de moisissures isolées	**Pourcentage de moisissures isolées (%)**	
	2008	**2009**
Aspergillus* section *Nigri	33	84
Aspergillus* section *Fumigati	24	0
Penicillium	16	8
RhizoMucor	20	7
Fusarium	3	0
Autres	4	1
Total (%)	100	100

Les *Aspergillus* ont été majoritaires aussi bien la première année que la deuxième année. En 2008 les *Aspergillus* représentent 60% des souches isolées dont 33% d'*Aspergillus* section *Nigri*. En 2009, les souches d'*Aspergillus* appartenant à la section *Nigri* représentent plus de 84% des isolats, alors que les *Penicillium* et les *RhizoMucor* ne représentent que 8 et 7% des moisissures isolées en culture pure.

La répartition géographique des principaux genres de moisissures en fonction des principaux sites d'échantillonnage est illustrée par la Figure 23.

En 2008, tous les groupes fongiques sont présents aussi bien à l'Ouest qu'à l'Est de la Côte d'Ivoire, mais à des taux différents. Ainsi à l'Ouest les genres les plus importants sont *Rhizopus* (33%), *A.* section *Nigri* (30%), suivis de *Aspergillus* section *Fumigati* (18%), *Penicillium* (12%) et *Fusarium* (4%) et les autres genres qui s'évaluent à 3%. Tandis qu'à l'Est la flore est dominée par *Aspergillus* section *Fumigati* (32%), suivi de près par *A.*section *Nigri* (26%). Les autres groupes secondaires sont *Penicillium* (20%) et *Rhizopus* (12%). Le genre *Fusarium* (4%) et les autres genres (6%) sont en plus faible proportion mais plus important à l'Est qu'à l'Ouest. Au cours de la saison 2009, la diversité des groupes fongique

est moins grande. La flore est dominée par des *Aspergillus* de la section *Nigri* (84%), qui sont suivis de loin par *Penicillium* (8%) et *Rhizopus* (7%). Les autres genres sont rares.

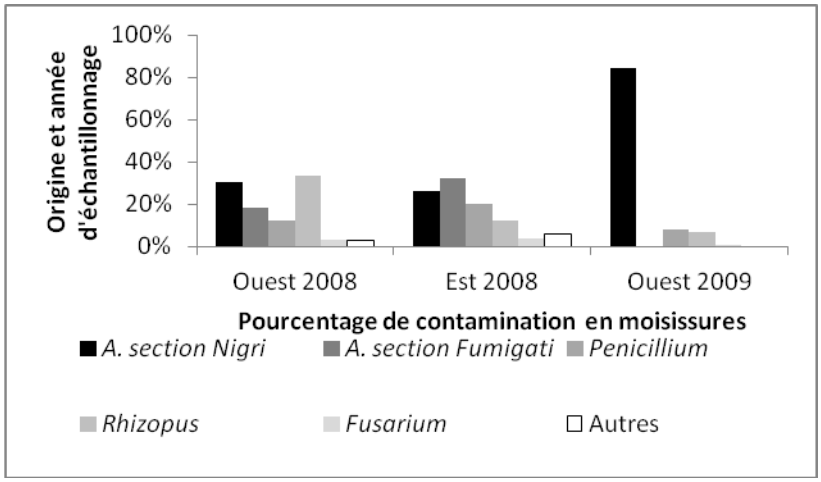


Figure 23 : Diversité géographique des différents genres de moisissures en 2008 et 2009.

Le Tableau 14 rapporte la prévalence des *Aspergillus carbonarius* par rapport au groupe *Nigri*. En effet *Aspergillus carbonarius* est la principale espèce responsable de la production de l'Ochratoxine A dans le café (Kouadio *et al.*, 2010).

Tableau 14: Prévalence des *Aspergillus carbonarius* par rapport aux *Aspergillus* section *Nigri* dans le cadre des enquêtes effectuées dans différentes régions en Côte d'Ivoire pour 2008 et 2009.

Régions d'échantillonnage	**Ouest 2008**	**Est 2008**	**Ouest 2009**	**Total**
Nombre d'*A.* section *Nigri*	20	13	86	119
Nombre d'*A.carbonarius*	3	1	10	14
Taux de prévalence des *A. carbonarius*	15	7,7	11,6	11,8

La prévalence de *A. carbonarius* est relativement faible dans chaque région considérée, mais plus importante à l'Ouest qu'à l'Est. De plus dans la région de l'ouest, la prévalence des *Aspergillus carbonarius* est plus importante en 2008 qu'en 2009.

La Figure 24 présente la moyenne de contamination en moisissures des échantillons de café en fonction de leur nature.

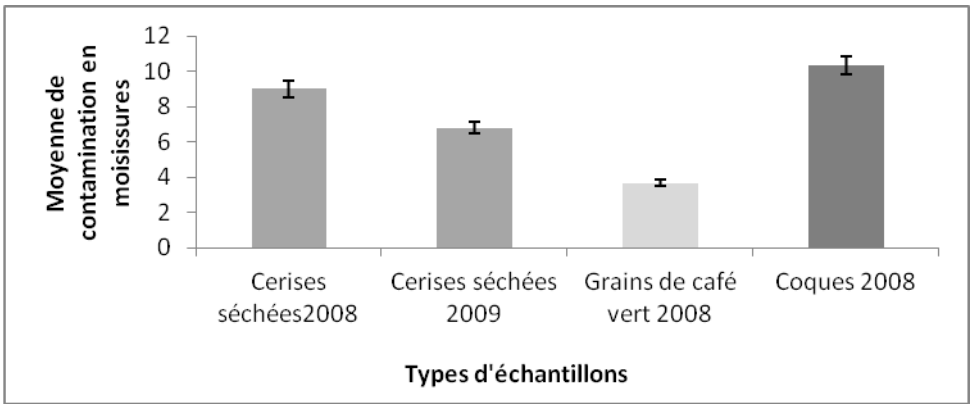


Figure 24: Moyenne de contamination en moisissures en fonction de la nature des échantillons en 2008 et 2009.

Les coques de café en 2008 sont plus contaminées en moisissures que les cerises séchées quelque soit l'année de prélèvement. Entre les deux années, les cerises séchées sont plus contaminées en 2008. Les grains de café vert sont les moins contaminés parmi tous les échantillons.

La Figure 25 présente le niveau de contamination des moisissures en fonction des supports de séchage en 2009.

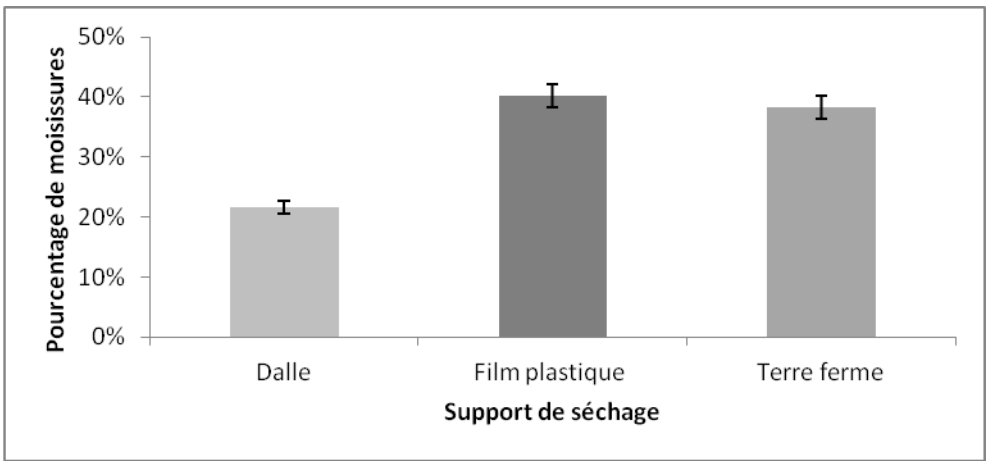


Figure 25 : Distribution des moisissures en fonction des supports de séchage en 2009.

La différence de contamination en moisissures entre le film plastique (40%) et la terre ferme (38%) est de 2%. La dalle offre moins de contamination en moisissures que le film plastique et la terre ferme. En effet elle présente une différence de 18% avec le film plastique et 16% avec la terre ferme.

4.1.3.1 Discussion sur la distribution des souches isolées en 2008 et 2009

Tout comme les autres denrées alimentaires, les cerises de café, les grains de café vert et les coques sont sujets à des contaminations fongiques au cours du traitement post-récolte du café. Deux cent dix-huit souches de champignons post-récolte ont été isolées sur les cerises de café séchées au cours des deux campagnes dont 116 souches en 2008 et 102 souches en 2009. La première identification des souches isolées a été faite sur milieu PDA, à l'œil nu pour distinguer les principaux genres *Aspergillus* (Figure 20), *Penicillium* (Figure19), *RhizoMucor* (Figure18), *Fusarium* et autre. Les principaux types de moisissures post-récolte contaminant le café robusta en Côte-d'Ivoire sur les deux années sont: *A. carbonarius* (7%), *Aspergillus* section *Nigri* autre que *A.carbonarius* (45,4%), *Aspergillus* section *Fumigati* (13 %), *Penicillium* (10%), *Rhizomucor* (16%), *Fusarium* (4%), autres (4,6%). Les mêmes genres ont été isolés sur des échantillons de café robusta de différentes origines par Pardo *et al.*, (2004) avec une prédominance des *Aspergillus* section *Nigri* à un taux de 65,4%. Le pourcentage d'*A. carbonarius* (7%) est comparable aux résultats de Kouadio *et al,*. (2010) qui ont isolé environ 8,8% d'*A.carbonarius* sur des cerises de café robusta sèches directement récoltées sur le caféier de Côte d'Ivoire. Cette légère différence peut être due au fait que nos cerises ont été échantillonnées au cours du séchage au soleil. On peut donc supposer que la charge fongique augmente avec l'activité de l'eau dans les cerises. Cette hypothèse est vérifiée en comparant le taux de contamination en moisissures en fonction des supports de séchage. Comme on peut le voir sur la Figure 25, le séchage sur film plastique expose à plus de contamination en moisissures (40%) que le séchage sur terre ferme (38%) et le séchage sur dalle (20%). En effet le climat de la Côte d'Ivoire est de type tropical humide. Le film plastique qui est imperméable, au contact de l'air humide, condense la vapeur d'eau et entretien par conséquent l'humidité des cerises en cours de séchage. Par contre la terre ferme absorbe directement une bonne partie de l'humidité contenue dans l'air, mais moins que la dalle faite de ciment. D'où la faible contamination en moisissures sur la dalle.

La Figure 24 met en évidence que les cerises séchées et les coques de café sont plus contaminées en moisissures que les grains de café vert. En effet l'enveloppe externe qu'on retrouve dans les coques de café et dans les cerises séchées est en permanence en contact avec avec l'environnement c'est-à-dire le sol et l'air (Perrone *et al.*, 2007), principales sources de contamination en spores de moisissures. Ceci montre bien que la flore fongique naturelle du café se propage de l'enveloppe externe vers l'enveloppe interne.

D'après le Tableau 13 le pourcentage de la flore fongique en 2008 (54%) est supérieur à celui de l'année 2009 (46%) d'un facteur de 1,17. Ce même facteur est mis en évidence dans les prélèvements de 2008 (16) et 2009 (15). Ceci exprime bien qu'à taux égal de moisissures nous avons un nombre de prélèvement presque identique. Donc le niveau de contamination en moisissures de façon générale reste stable d'une saison à une autre. La flore fongique en 2008 présente la même diversité à l'Ouest qu'à l'Est de la Côte d'Ivoire. Ceci traduit bien que le site d'échantillonnage ne semble pas avoir d'influence significative sur la biodiversité fongique, mais que le taux des différentes moisissures varie d'un site à l'autre (Fig.23). Par contre la différence de diversité fongique observée en 2008 par rapport à 2009 signifie que la biodiversité des moisissures dans les échantillons de café en Côte d'Ivoire serait soumise aux saisons et pourrait varier d'une année à l'autre. En effet, en 2008 l'échantillonnage a été réalisé en fin Aôut, la fin de la grande saison des pluies.Tandis qu'en 2009, les prélèvements sont effectués en Avril, ce qui correspond à la fin de la grande saison sèche.

Le genre *Aspergillus* constitue le contaminant majeur des échantillons de café chaque année soit 28% en 2008 et 84% en 2009 (Tableau 13). Ces résultats sont en accord avec le fait que les *Aspergillus* sont responsables de plusieurs maladies au niveau des plantes et produits agricoles depuis la récolte jusqu'au process de transformation en passsant par les traitements post-récolte (Perrone *et al.,* 2007) et la période de stockage (Kozakiewicz, 1989). Dans des études menées au Brésil ce sont principalement les *Aspergillus* section *Nigri* qui sont les contaminants du café et en particuliers *A. niger* (83,3%) (Martins *et al.,* 2003) et *Aspergillus carbonarius* (Magnani *et al.,* 2005). De la même manière Pardo *et al.* (2004) ont isolés majoritairement 65,4% d'*A.* section *Nigri* sur des échantillons de café. Au Vietnam, Leong *et al.* (2007) ont isolé, à partir des cerises de café robusta et arabica, des souches d'*A. carbonarius*. Des résultats présentant les *Aspergillus* section *Nigri* comme dominant ont été publiés pour des échantillons de grains de café arabica collectés au Brésil (Batista *et al.,* 2009). Le Tableau 14 montre bien que l'espèce *A. carbonarius* est présente dans les échantillons ramenés de la Côte d'Ivoire. Mais sa présence n'implique pas directement la contamination du café en Ochratoxine A puisque la production de mycotoxine n'est pas simultanée à la croissance mais dépend des conditions de stockage.

Nous venons de voir dans ce chapitre que la flore fongique post-récolte du café robusta en Côte d'Ivoire est constituée d'une diversité de champignons filamenteux couramment rencontrés sur le café. Cette mycoflore est essentiellement constituée d'*Aspergillus* avec une prédominance de la section *Nigri*. La contamination en moisissures

des échantillons de café varie en fonction de la nature des échantillons, de l'environnement géographique et des supports de séchage utilisés.

4. 2. Criblage des souches mycotoxinogènes

4.2.1. Souches productrices d'OTA sur milieu synthétique

Cette étape de notre étude concerne uniquement le groupe des *A.* section *Nigri* qui sont les moisissures majoritaires sur les 31 échantillons de café prélevés. Sur les 119 souches d'*A.* section *Nigri* nous avons étudié le potentiel ochratoxinogène de 76 souches dont les 14 souches identifiées comme *A.carbonarius*.

Les échantillons analysés par HPLC proviennent de cultures réalisées sur milieu CYA. La répétabilité de la procédure d'extraction a été déterminée en réalisant trois extractions différentes de la même souche (voir Matériel et Méthodes chapître 3.2.1.2).

La linéarité de la réponse du détecteur UV-visible employé, en fonction de la concentration en OTA a été établie pour des concentrations comprises entre 35.10^{-7} g.L et 35.10^{-3} $g.L^{-1}$. Le pic de l'OTA a été détecté entre 13,4 min et 14,5 min. La quantification des mycotoxines se fait par la mesure des aires des pics chromatographiques des échantillons par rapport à une courbe d'étalonnage (Annexe 5).

Les résultats d'analyses sont donnés dans le Tableau 15 pour les souches identifiées comme *Aspergillus carbonarius* et dans le Tableau 16 pour les autres espèces d'*Aspergillus* de la section *Nigri*. Toutes les souches d'*A.carbonarius* testées produisent des mycotoxines et sont classées par ordre décroissant en fonction de leur potentiel de production en OTA (Tableau 15).

Tableau 15: Potentiel de production d'OTA sur milieu CYA au bout de 7 jours par les souches identifiées comme *A.carbonarius* isolées des échantillons de café en 2008 et 2009.

Groupes	Concentration (µg/g) milieu gélosé	Echantillons	Nombre	Origine souches
I	56,4 ± 0,5	14	1	Cerises sèches
II	40,5 ± 0	29	1	Cerises sèches
	35,4 ± 0,1	20	1	Cerises sèches
III	27,6 ± 0	29	1	Cerises sèches
	20,8 ± 2,2	31	1	Cerises sèches
IV	11,3 ± 1,4	31	1	Cerises sèches
	10,3 ± 0	13	1	Cerises sèches
V	9,4± 2,1	24	1	Cerises sèches
	9,3 ± 0	30	1	Cerises sèches
	9,1 ± 0	30	1	Cerises sèches
VI	8,3 ± 0	13	1	Cerises sèches
VII	6,6 ± 0	13	1	Cerises sèches
VIII	4,2 ± 0	29	1	Cerises sèches

L'analyse du Tableau 15 montre que toutes les souches de *A. carbonarius spp.* proviennent de cerises sèches. Elles sont classées en 8 groupes dans l'ordre décroissantde leur potentiel de production en OTA. Les potentiels de production d'OTA sont très variables et vont de 4,2 µg/g à 56,4 µg/g de gélose. 43% des souches produisent entre 4 µg/g et 10µg/g de gélose. 28,5% des souches produisent entre 10 µg/g et 30 µg/g de gélose et 28,5% en produisent entre 10 µg/g et 4 µg/g de gélose, des souches. Nous remarquons que les souches isolées sur le même échantillon n'ont pas le même potentiel ochratoxinogène, exceptées deux souches du groupe V ayant presque le même potentiel mycotoxinogène et isolées sur l'échantillon 30.

Dans le Tableau 16 les espèces d'*A.* section *Nigri* sont classées en fonction de leur potentiel de production d'OTA. Neuf groupes ont été constitués dont quatre pour distinguer les souches produisant uniquement de l'OTA.

Tableau 16 : Potentiel de production d'OTA et d'Aflatoxine sur milieu CYA au bout de 7 jours par les souches d'*Aspergillus* section *Nigri* autre que *Aspergillus carbonarius* isolées des échantillons de café en 2008 et 2009

Groupes	Concentration (µg/g) milieu gélosé	Echantillons	Nombre	Origine souches
IX	45,4 ± 0,34	14	1	Cerises sèches
	39 ± 3,08	14	1	Cerises sèches
X	32,5 ± 2,06	18	1	Cerises sèches
XI	18,6 ± 0,90	31	1	Cerises sèches
XII	12 ± 0,31	31	1	Cerises sèches
	11 ± 0,19	30	1	Cerises sèches
XIII	8 ± 0,54	18	1	Cerises sèches
XIV	2 ± 00	28	1	Cerises sèches
XV	1,3 ± 1,5	31	1	Cerises sèches
XVI	0,3 ± 0,01	27	1	Cerises sèches

L'analyse du Tableau 16, montre également que toutes les souches d'*Aspergillus.* section *Nigri* (Groupe IX) proviennent de cerises sèches. Certaines souches du groupe *Aspergillus* section *Nigri* non typées *A. carbonarius,* ont un potentiel de production en OTA aussi important que certaines souches d'*A. carbonarius* (Groupe IX). Cependant il y en a qui produisent de l'OTA en très faible quantité (0,3µg/g de gélose). De la même manière que précédemment (Tableau 15) des souches isolées sur le même échantillon n'ont pas le même potentiel ochratoxinogène. Par exemple pour l'échantillon 31 nous avons isolé trois souches qui ont des potentiels ochratoxinogènes très différents.

4.2.2 Potentiel de production d'OTA de la souche DO127 sur blé précuit

L'étude précédentebnde criblage de souches cultivées en boîtes de Petri sur un milieu gélosé CYA ppour explorer leur pouvoir mycotoxinogène (production d'OTA) a clairement démontré que l'ensemble des souches d'*A. carbonarius* sont productrices. Par contre seulement 50% de souches d'*A. carbonarius* sont productrices. Par contre seulement 50% de souches d'*A.* section *Nigri* sont capables de produire l'OTA à des concentrations variables (Tableau 18). Afin de confirmer ces résultats, une nouvelle série d'expéreinces a été réalisée avec aspergillus DO 127 appartenant à la collection d'*Aspergillus* section *Nigri* isolée du café en 2009 et cultivée sur un milieu solide amylacé pour suivre la cinétique d'évolution du mycélium, la production de spores et de l'OTA. Cette souche a été cultivée en erlens ou en colonnes de Raimbault sur un milieu solide (mélange bagasse de canne à sucre, son de blé,

flocon de pomme de terre) avec une aération contrôlée. Pour les cultures en erlens il n'ya pas eu d'aération forcée, alors que les FMS en colonnes de Raimbault ont été aérées. Au démarrage de la culture (0-72heures) l'aération des incubateurs a été réalisée avec de l'air humide (4litres/heure/colonne), à partir de 48 heures jusqu'à la fin de la FMS, l'aération a été réalisée avec de l'air sec et à un débit variable (de 1 à 50 litres/heure/colonne) afin d'exercer un stress hydrique et suivre l'effet du stress hydrisue d'une part sur la sporulation et d'autre part sur la production de mycotoxines par la souche DO 127.

4.2.2.1 Indice de sporulation des souches pour différentes conditions de culture

Afin de mettre en évidence l'effet du stress hydrique sur la sporulation et la production de mycotoxines par *Aspergillus* DO 127 appartenant à la collection d'*Aspergillus* section *Nigri* isolé du café en 2008 et 2009, deux dispositifs d'incubation contenant environ la même quantité de substrat inoculé ont été utilisés (Flacons Erlenmeyer de 250 mL et colonnes de Raimbault, de 250 mL). Cette souche est cultivée sur un mélange bagasse de canne à sucre, son de blé, flocon de pomme de terre en FMS. L'incubation des cultures à 25°C a duré 7 jours et les résultats comparés ont été regroupés dans la Figure 26.

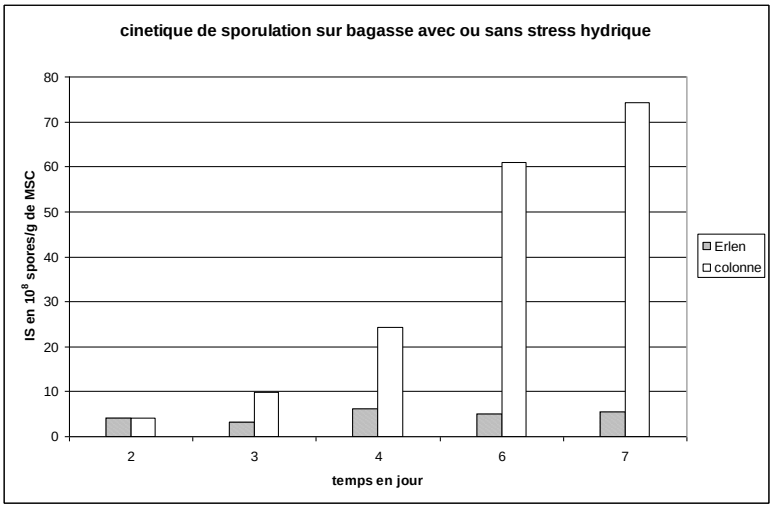


Figure 26 : Indice de sporulation (Is) pour la souche DO 127 cultivé en FMS avec stress hydrique (colonne) et sans stress hydrique (Flacon Erlenmeyer) en fonction du temps d'incubation à 25°C.

A partir d'un milieu de culture contenant un mélange de bagasse de canne à sucre, de son de blé et des flocons de pomme de terre (70 : 20 : 10) , autoclavé à 120°C et inoculé avec 2 x 10^7 spores par gSPS ; les Flacons Erlenmeyer et les colonnes de Raimbault ont été préparés. Alors que la même quantité d'inoculum a été utilisée dans les Flacons Erlenmeyer et dans les colonnes de Raimbault, on constate que la production de conidiospores se réalise

avec des rendements importants pour les cultures en colonnes, ayant subi un stress hydrique. La Figure 26 représente l'Is de *A carbonarius* en fonction du temps de culture. Au contraire, pour les cultures en erlen, la sporulation a été beaucoup plus faible (de 7 à 10 fois inférieure). Il a été observé dans les deux conditions de culture, une augmentation de l'Is avec le temps. Cette expérience met en évidence l'impact du stress hydrique sur la sporulation d'*Aspergillus* DO127, en particulier pour des cultures en FMS incubées à 25°C pendant une semaine.

4.2.2.2 Production d'OTA par *Aspergillus* DO127 cultivé en Flacon Erlenmeyer ou en FMS

Suite à l'expérience précédente, des échantillons des produits fermentés ont été prélevés chaque jour, pendant 7 jours afin de suivre l'évolution quantitative de production d'une part des spores (Is) et d'autre part la quantité d'OTA libérée dans le milieu pour les cultures d'*Aspergillus* DO127 réalisées en Flacon Erlenmeyer (sans aération forcée) ou en colonnes de Raimbault (avec une aération forcée). Les résultats de cette expérience. ont été regroupés dans le Tableau 17.

Tableau 17: Indices de sporulation (Is) et quantité d'OTA produite par *Aspergillus* DO 127, cultivé sur un milieu solide (Bagasse de canne à sucre +SB+FPT) en Erlenmeyer ou en colonnes de Raimbault avec un stress hydrique à partir de 60 heures pour les colonnes incubées à 25°C pendant 7 jours.

Conditions	Erlen		Colonne FMS	
Temps (jours)	Is (10^8 spores/g de MSC)	OTA (mg/g d'échantillon sec MSC)	Is (10^8 spore/g de MSC)	OTA (mg/g d'échantillon sec MSC)
0	0	0	0	0
2	4,10	0,0277	4,10	0,0410
3	3,26	0,0287	9,83	0,0353
4	6,10	0,0393	24,40	0,0370
6	5,03	0,0380	61,00	0,0317
7	5,53	0,0267	74,33	0,0350

Des prélèvements ont été régulièrement réalisés au cours de cette cinétique afin de suivre l'évolution de l'inoculum au cours de la culture d'*Aspergillus* DO127 en Erlenmeyer ou en colonnes FMS. Après 48 heures de culture, les premières formes de reproduction asexuée apparaissent dans le milieu qui a été uniformément envahi par le champignon. A ce stade de la culture, il n'a pas été constaté de différences morphologiques concernant l'évolution du mycélium cultivé en Flacon Erlenmeyer ou en colonne. Cependant, la couleur du milieu de culture devient grise dans les colonnes FMS. Le stress hydrique a été appliqué avec des débits différents d'air sec pour les colonnes étudiées.

Les valeurs d'Is et la concentration d'OTA pour la culture en Flacon Erlenmeyer ont une très légère tendance à augmenter avec le temps de culture. Dans le cas de la culture en

colonne, l'Is augmente fortement au cours du temps, mais ce n'est pas le cas de la concentration en OTA qui est maintenue à peu près constant aux environs de 0,035mg/g de MSC. Il n'y aurait donc pas de lien apparent entre la quantité de spores libérées et la quantité d'OTA produite, mais cela reste à certifier par la répétition des expériences et une optimisation du milieu de culture et des techniques d'échantillonnages et d'extractions de l'OTA.

4.2.2.3 Culture en FMS sous stress hydrique : suivi respirométrique par le PNEO

Pour les cultures d'*Aspergillus* DO127 en colonne de Raimbault sur le mélange (bagasse de canne à sucre + son de blé + flocon de pomme de terre) (50:30:20), un suivi respirométrique a été réalisé grâce au dispositif PNEO. Ce dispositif permet de suivre en continue et de manière non destructive les paramètres suivants : température d'incubation des cultures, débit d'aération, pourcentage d'humidité relative de l'air à la sortie des colonnes et concentration en CO_2 (Lakhtar, 2009). Dans la Figure 27, est présentée l'évolution de la concentration de CO_2 pendant 7 jours pour 5 cultures de quoi en FMS.

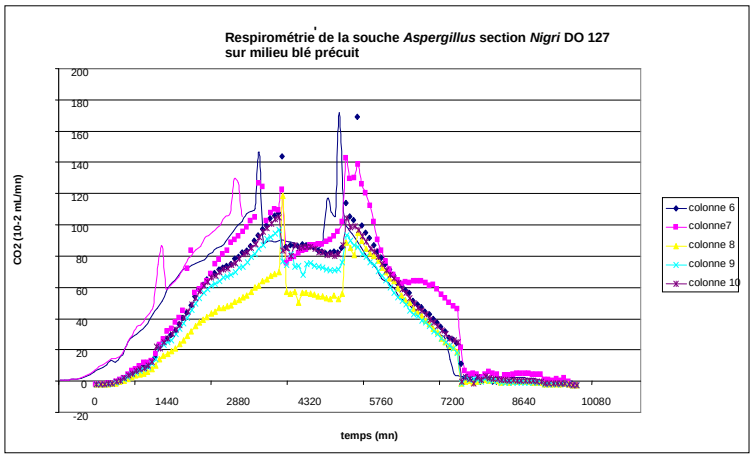


Figure 27 : Cinétique de production de CO2 par la souche DO 127 cultivée en FMS à 25°C pendant 7 jours avec des débits d'aération différents et application d'un stress hydrique à partir de 60 heures.

La Figure 27 montre la quantité de CO_2 dans les effluents gazeux récoltés à la sortie des colonnes de FMS en fonction du temps. Les brusques variations observées sont dues aux changements de débit effectués, et à la latence de détection des capteurs de CO_2 et du débitmètre. La quantité de CO_2 augmente régulièrement les deux premiers jours, car l'aération se fait avec de l'air humide ce qui favorise l'activité métabolique d'*Aspergillus* DO127 (croissance du mycélium, synthèse de métabolites primaires ou secondaires) puis les valeurs

de CO_2 diminuent jusqu'à devenir nulles, car le métabolisme diminue et s'arrête à cause du stress hydrique et des conditions très défavorable pour le mycélium (moisissures sèches).

4.2.3. Themostabilité de l'OTA produite par *Aspergillus* DO127 en FMS sur milieu EBLY^{RaA}

Afin de mettre en évidence la stabilité de l'OTA vis-à-vis des traitements thermiques des produits fermentés, une expérience a été mise en œuvre. Elle a consisté à utiliser cinq colonnes FMS sur milieu EBLY après 7 jours de culture. Le produit fermenté a été divisé en 2 lots. Le premier lot a été placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. Le deuxième lot n'a pas subi de traitement thermique. L'extrait de l'OTA a été obtenu avec ajout de 2 mL méthanol sur des échantillons de1g de milieu de culture PS et les résultats des analyses de l'OTA sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau18: Concentration en OTA des échantillons obtenus après 7 jours de FMS en colonne sur milieu blé précuit chauffé (105°C) au four ou non pour *Aspergillus* DO 127 cultivé sur Ebly en FMS

Colonne	OTA (*) mg/g d'échantillon sec (MSC)	OTA (*) mg/g d'échantillons sec chauffée (MSC)
6	0,182	0,148
7	0,059	0,006
8	0,089	0,131
9	0,244	0,119
10	0,338	0,105
(*) La concentration (C) OTA pour l'échantillon frais est divisé par le PS x 100 pour donner les valeurs de ce tableau		

Le Tableau 18 permet de comparer les teneurs en OTA dans des échantillons frais et des échantillons chauffés pendant une nuit à 105°C. On peut donc constater que les *Aspergillus* produisent bien de l'OTA. Les valeurs de concentration en OTA pour les échantillons chauffés sont en majorité plus basses que celles des échantillons non chauffés. Il y a donc une dégradation partielle de l'OTA. Mais d'autres expériences doivent être menées pour définir d'une manière beaucoup plus fine la température minimale et la durée d'exposition à cette température minimale pour observer une dégradation de l'OTA.

4.2.4 Discussion sur l'analyse des mycotoxines

L'analyse des mycotoxines a mis en évidence que certains isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* isolés sur le café robusta en Côte d'Ivoire sont capables de produire de l'OTA. La technique des spots gélosés utilisée à cet effet pour l'extraction des mycotoxines est fiable et a déjà fait ses preuves dans d'autres travaux (Filtenborg and Frisvad, 1980; Sanchez-Hervas et *al.*, 2008).

L'OTA est l'une des mycotoxines les plus dangereuses et importantes produites par certains champignons filamenteux tels qu'*A. ochraceus* (Van Der Merve *et al.,* 1965), *A. carbonarius* (Teren *et al.,* 1996), par quelques isolats d'*A. niger* (Abarca *et al.,* 2001) et de *Penicillium verrucosum* (Schmidt-Heydt *et al.,* 2010). De nombreux travaux de recherche ont prouvé que les espèces des genres *Aspergillus* sont des contaminants naturels du café en mycotoxines et sont présents sur le café depuis la plantation jusqu'au stockage (Nakajima *et al.,* 1997; Silva *et al.,* 2000; FAO, 2006). La conservation post-récolte des fruits et légumes occupe une place importante dans la gestion des produits alimentaires vivriers et commerciaux tel que le café. En effet, les champignons comme *Aspergillus* o*chraceus* et les *Aspergillus* section *Nigri spp*. sont responsables de la production d'OTA sur le café au cours du séchage et du stockage (Belli et *al.,* 2005).

L'étude du potentiel mycotoxinogène des souches fongiques isolées des échantillons de café en 2008 et en 2009 a prouvé que les *Aspergillus* section *Nigri* sont potentiellement ochratoxinogènes. Toutefois il convient de souligner que le potentiel mycotoxinogène des souches fongiques n'est pas étroitement lié à la contamination mycotoxique du café. Pour en vérifier la certitude, il faudrait procéder au dosage de l'OTA dans les échantillons de café. Cette analyse aurait permis de détecter les points critiques de contamination du café en OTA, au cours du traitement post-récolte. Car la production d'OTA et de toutes les mycotoxines est dépendante de la variation de facteurs physico-chimiques (température, activité en eau, humidité atmosphérique) au cours du séchage, du stockage et du transport des cerises ou grains de café.

Selon les analyses des mycotoxines par HPLC, le pourcentage des moisissures potentiellement mycotoxinogènes isolées en 2008 et 2009 sur les échantillons de café s'estime à 11% pour l'OTA sur l'ensemble de la flore fongique. Dans le groupe *Aspergillus* section *Nigri* les producteurs de mycotoxines représentent environ 20%. Comme l'a prouvé Taniwaki et *al.,(*2003) dans le groupe *Aspergillus* section *Nigri* l'espèce *Aspergillus carbonarius* reste peu fréquente sur les échantillons de café (11,8%), mais 100% des isolats produisent de l'OTA. En revanche pour ce qui est des autres espèces d'*Aspergillus* section *Nigri,* elles sont majoritaires (88,2%) mais un faible pourcentage d'isolats (16%) produisent de l'OTA. Les isolats d'*Aspergillus* produisant de l'OTA diffèrent les uns des autres de par leur potentiel ochratoxinogène qui varie de 0,5µg/g à 40µg/g de gélose. Selon Albarca et *al.,* (2001*)* les espèces *Aspergillus* de la section *Nigri* produisant de l'OTA sont *Aspergillus niger aggregate* et *Aspergillus carbonarius.* Donc hormis les souches identifiées comme *Aspergillus carbonarius* il est probable que les autres espèces produisant de l'OTA appartiennent au

complexe *Aspergillus niger aggregate* (*A. niger, A. tubingensis, A. foetidus, A. piperis, A. brasiliensis, A. ibericus, A. costaricensis, A. uvarum, A.vadensis et A. lacticoffeatus*) et aux espèces non communes que sont : *A. japonicus* et *A.aculeatus.* En effet ces espèces ont été reconnues comme des producteurs potentiels d'OTA sur le café (Nakajima et *al.,* 1997; Heenan et *al.,* 1998; Pitt, 2000; Joosten et *al.,* 2001).

En ce qui concerne la FMS nous remarquons que la souche *Aspergillus* DO127 est une souche qui produit peu de spores, en comparaison avec d'autres moisissures comme *Trichoderma harzianum* ou *Aspergillus fumigatus*. Ceci pourrait être du à la taille des conidiospores. En effet les conidiospores d'Aspergillus niger ont un diamètre de 3,5 à 5µ alors que les conidiospores d'*Aspergillus fumigatus* sont beaucoup plus petite avec un diamètre de 2,5 à 3µ. Et les conidiospores de Trichoderma harzianum ont un diamètre de 2,8 à 3,2µ (Samson et al., 1996 ; Roussos, 1985). Il y aurait donc une relation entre le nombre de spores produites et leurs tailles.

Le stress hydrique permet de produire des spores plus tôt et en plus grande quantité. En effet les cultures réalisées en flacons Erlenmeyer montrent un décalage de la phase de sporulation par rapport aux cultures en colonnes aérées pour lesquelles le stress hydrique a été appliqué après 60 heures de FMS. Les *Aspergillus* produisent de l'Ochratoxine A en FMS avec ou sans stress hydrique, sur milieu bagasse et blé précuit. L'Ochratoxine A est thermostable, mais une petite fraction peut être détruite par la chaleur (105°C durant une nuit).

Il n'y a pas de lien apparent entre 'indice de sporulation et la quantité d'Ochratoxine A, mais les expériences doivent être répétées et améliorées afin de le confirmer. Les intérêts de la mise en évidence d'un tel lien serait l'application industrielle de procédés de culture favorisant la sporulation des moisissures dans le but de leur faire produire plus de métabolites secondaires d' intérêt.

L'utilisation du PNEO, un nouveau dispositif prototype, a permis de suivre en ligne et de manière non destructive l'évolution du CO_2, le débit et l'humidité relative de l'air à la sortie des bioréacteurs, d'identifier les différentes phases de croissance du champignon filamenteux (Lakhtar, 2009) et de mettre en évidence la relation entre la production de l'OTA et la sporulation d'*Aspergillus* DO 127.

4.3. Isolement et identification préliminaire des bactéries lactiques isolées de la pulpe de café

Les bactéries lactiques étudiées dans ce chapitre ont été isolées de la pulpe fraîche de café ensilée. La pulpe de café est le principal sous produit issu de l'exploitation industrielle du café. Fraîchement générée, elle contient 80 à 85% d'humidité (Bressani *et al.,* 1972), auquel s'ajoutent une importante quantité de sucres, de protéines, d'amino-acides et d'autres nutriments. Tous ces facteurs physico-chimiques et nutritionnels vont favoriser le développement d'une microflore constituée à 95% de bactéries et 5% de champignons filamenteux et de levures entraînant la putréfaction de la pulpe (Gaime-Perraud *et al.,* 1993; Roussos *et al.,* 1995).

4.3.1. Isolement des bactéries lactiques isolées de la pulpe de café

Les bactéries lactiques ont été isolées de la pulpe de café mise en fermentation anaérobie dans une colonne. La colonne de silo a été divisée en quatre zones (Figure 28) et le pH de chaque zone est mesuré. 2g de pulpe de café a été ajouté à 5 ml de MRS liquide, puis incubé à 30°C pendant 24 h pour permettre l'enrichissement des bactéries. A partir du bouillon de culture MRS préenrichi, des dilutions décimales ont été réalisées et les bactéries sont isolées sur gélose MRS par étalement. Après 48h d'incubation à 30°C en aérobiose, les bactéries ont été sélectionnées au hasard et purifiées par stries d'épuisement sur une gélose MRS et conservées en bouillon MRS de 3 ml à 4°C. Quarante quatre bactéries ont été isolées à partir de la pulpe de café ensilée, sur la gélose MRS. Ces bactéries ont été purifiées sur la gélose MRS par des stries d'épuisement et conservées en pilulier dans du bouillon MRS à + 4°C, et à -80°C dans du glycérol.

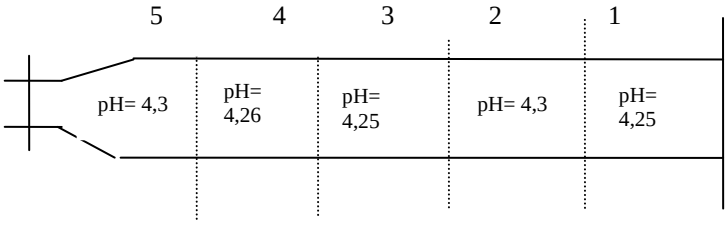


Figure28 : pH des zones définies sur le micro-silo pour les prélèvements et mesures.

4.3.2. Identification préliminaire des bactéries lactiques

L'étude préliminaire des bactéries prend en compte les caractères morphologiques macroscopiques (aspect de la colonie sur gélose MRS), les caractères morphologiques

microscopiques (Coloration de Gram, forme, mobilité, sporulation), les caractères culturaux (type de respiratoire), les caractères physiologiques (la croissance à diiférentes température, à différentes concentrations de NaCl, la production de CO_2) et les caractères biochimiques qui sont : le profil fermentaire (production d'acide lactique et d'acide acétique), le métabolisme des sucres mis en évidence par le test API 50CH et la production d'enzymes détectées par la galerie APIZYM.

4.3.2.1. Caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques des bactéries isolées de la pulpe de café

- *- Etude des caractères morphologiques macroscopiques*

Après purification sur gélose MRS, l'étude macroscopique des quarante quatre souches bactériennes a permis de définir quatre types de colonies bactériennes selon 5 critères (Tableau 19) qui sont les suivants: la couleur, le contour, l'aspect, le relief et le diamètre de la colonie.

- *Etude des caractères morphologiques microscopiques*

L'étude microscopique des bactéries a révélé que toutes les bactéries sont des cocobacilles Gram positifs associés en chaîne (Figure 29a) ou par paire (Figure 29b), immobiles et qui ne sporulent pas.

Tableau 19: Principales caractéristiques morphologiques des colonies de bactéries lactiques isolées par ensilage de la pulpe de café.

Couleur	Contour	Aspect	Relief	Diamètre (mm)
Blanchâtre	lisse	mate	Peu bombé	0,5
Blanche	lisse	mate	plat	2,5
Jaunâtre	lisse	coulante	Peu bombé	2,5
Jaunâtre	lisse	crémeux	Peu bombé	3

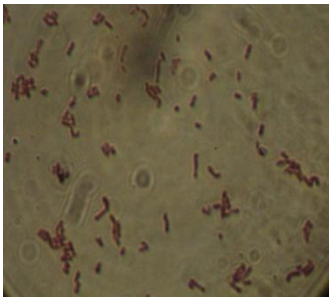


Figure 29a : Cocobacilles Gram positifs en courte chaîne (X1000).

Figure 29b : Cococbacilles Gram positifs en paire (X1000).

Figure 29 : Morphologie des bactéries isolées de la pulpe de café au microscope optique (x 1000.).

Cette étude morphologique est complétée par l'étude du type respiratoire et le test de la catalase. Les bactéries étudiées à cette occasion sont aéro-anaérobie facultative (AAF) et catalase négative.

Au terme de cette étude partielle, quarante quatre bactéries Gram positive, catalase négative, AAF ont été conservées dans du glycérol à -20°C et à -80°C.

4.3.3 Recherche des bactéries lactiques antagonistes des moisissures

L'objectif de cette étude est de cribler les quarante quatre souches de bactéries lactiques endogènes isolées sur la pulpe de café, afin de mettre en évidence leur acticvité antifongique contre la germination des conidies et la croissance du mycélium d'*Aspergillus carbonarius*. Les deux souches fongiques d'*Aspergillus carbonarius* (Ac162 et Ac164) utilisées à cette occasion ont été sélectionnées en raison de leur capacité à produire de fortes quantités d'OTA : 40,5 µg/g de milieu gélosé pour DO 162 et 27,6 µg/g pour DO 164.

4.3.3.1 Screening des bactéries lactiques antifongiques

Toutes les souches de bactéries lactiques (LAB) ont été testées contre les deux souches fongiques de *A. carbonarius* (Ac 162 et Ac 164). A partir du premier essai, nous avons défini une classification de bactéries lactiques en fonction des halos d'inhibition. Un premier groupe présente une inhibition totale (halo d'activité + diffusion) (Figure 30a) (30 souches de LAB dans le test contre la souche fongique Ac 162; 31 souches de LAB contre la souche fongique Ac 164) ; un second groupe présente une inhibition partielle (halo d'activité + croissance du mycelium autour des halos) (Figure 30b) (dix souches de LAB contre la souche fongique de Ac 162 ; douze souches de LAB contre la souche fongique de Ac 164) ; et enfin un troisième groupe ne présente aucune inhibition (pas de zone d'activité) (Figure 30c) (quatre souches de LAB contre la souche fongique Ac162 et une souche de LAB contre la souche fongique Ac164).

A l'issu de ces tests (cf. chapître 3.3.3 Matériels et méthodes) nous avons retenu 10 bactéries lactiques parmi lesquelles 9 présentent une activité antifongique avec un diamètre d'inhibition compris entre 13 mm et 25 mm (LabCP2, LabCP15, LabCP19, LabCP20, LabCP28, LabCP19, LabCP37, LabCP21, LabCP22) et une n'ayant aucune activité antifongique a été retenue comme témoin négatif (LabCP28).

Figure 30a : Inhibition totale de LabCP15Z42 contre Ac 162

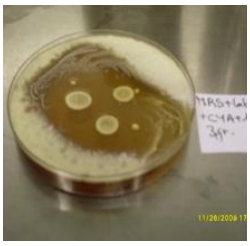


Figure 30b : Inhibition partielle de LABCP20Z31 contre Ac 162

Figure 30c : Absence d'inhibition de LabCP28Z21 contre Ac 162

Figure30: Différents types d'inhibition après trois jours d'incubation des souches de bactéries lactiques contre des souches fongiques.

Deux autres essais ont été conduits afin de déterminer le facteur de reproductibilité de l'action antifongique des LAB testées. La même expérience a été reproduite en déterminant la dimension des halos d'inhibition (Tableau 17).

4.3.3.2 Deuxième criblage avec les bactéries lactiques

Sept souches de LAB ont montré un diamètre d'inhibition supérieur à 20 mm. Pour quelques unes on a observé la diffusion de l'action antifongique au-delà du halo d'inhibition et pour certaines à l'ensemble de la superficie de la boîte de Petri. Mais une même bactérie a montré parfois des profils d'inhibition différents d'une souche fongique à l'autre (Tableau 18). La zone d'inhibition apparait entre 48 heures et 72 heures d'incubation à 30°C. Au troisième jour d'incubation on a observé sur certaines boîtes de Petri une croissance mycélienne autour des halos d'inbibition. (Figure.30). L'effet fongistatique a été temporaire pour certaines souches de LAB alors que d'autres LAB démontrent cet effet pendant plus de cinq jours.

L'activité antifongique de chaque bactérie a été testée sur trois essais, ce qui a permis de définir un facteur de reproductibilité. Comme on peut le voir dans le Tableau 20 pour une bactérie ayant un pouvoir antifongique, le facteur de reproductibilité et le diamètre d'inhibition varie d'une souche fongique à l'autre. D'autre part, les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches de LAB ont été très variables; cela démontre que les bactéries n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis des moisissures. A la fin de ces expériences, seulement deux souches (LabCP15Z42 et LabCP37Z12) ont montré une inhibition avec un halo entre 20 et 30 mm de diamètre pour les trois tests contre la souche fongique *A. carbonarius* Ac 162.

Tableau 20 : Diamètre d'inhibition et reproductibilité de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de la pulpe de café.

Souche LAB	*A. carbonarius* Ac162		*A. carbonarius* Ac164	
	reproductibilité	Ø (mm)	reproductibilité	Ø (mm)
LabCP2Z52	3/3	0	2/3	9
LabCP15Z42	3/3	30	2/3	30
LabCP16Z42	2/3	24 ± 0,2	1/3	19 ± 0,2
LabCP19Z31	2/3	20	1/3	19 ± 0,2
LabCP20Z31	1/3	25 ± 0,1	2/3	20
LabCP21Z32	2/3	20 ± 0,12	3/3	19 ± 0,3
LabCP22Z32	2/3	18 ± 0,1	1/3	21 ± 0,2
LabCP28Z21	3/3	0	3/3	0
LabCP30Z22	2/3	13 ± 0,3	0/3	19 ± 0,1
LabCP37Z12	3/3	25 ± 0,06	1/3	23 ± 0,2

4.3.3.3 Discussion sur l'isolement et le criblage des bactéries lactiques antifongiques

L'ensilage de la pulpe de café réalisé par Perraud-Gaime (1995), a mis en évidence une amplification de la flore lactique endogène. Afin donc de constituer une collection de bactéries lactiques endogènes de la pulpe de café robusta nous avons confectionné de micro-silos en colonne à partir de pulpe fraîche de café. Les paramètres physico-chimiques enregistrés à la fin de notre ensilage (Figure.28) prouvent que notre ensilage est réussi. En effet tout comme Perraud-Gaime (1995) nous avons remarqué une baisse du pH au cours de l'ensilage. Nous avons constaté une dimunition de la population fongique au profit d'une flore bactérienne anaérobie. La caractérisation de cette flore bactérienne anaérobie a révélé des *Lactobacillus plantarum*, même espèce isolée sur l'ensilage de la coque de café (Pagnoncelli *et al.,* 2003) et du même genre que sur la pulpe de café d'un travail précédent (Perraud-Gaime *et al.,* 2000).

Toutes les 44 bactéries lactiques ont été testées contre deux souches de *A. carbonarius* (Ac162 et Ac164). Nous avons choisi de tester les bactéries lactiques contre des souches d'*Aspergillus carbonarius*, parce que dans notre collection, c'est l'espèce qui produit essentiellement de l'OTA sur le café.

Ces résultats montrent qu'il existe des bactéries lactiques endogènes à la pulpe de café, capables d'inhiber la croissance d'*Aspergillus carbonarius* ochratoxinogène.

Après le premier essai les bactéries antagonistes ont été classées en trois groupes d'inhibition: inhibition totale (superficie de la zone claire + diffusion) (Fig: 30a) (trente

souches LAB contre l'Ac 162; trente et un souches LAB contre l'Ac 164); inhibition partielle (zone claire + mycélium en croissance sur boîte de Pétri) (Fig: 30b) (dix souches LAB contre l'Ac 162, douze souches LAB contre l'Ac 164), et aucune inhibition (pas de zone claire) (Fig: 30c) (quatre LAB souches contre Ac 162; une souche LAB contre Ac 164).

Deux autres essais effectués ont permis de définir un facteur de reproductibilité du test de l'antagonisme. A l'issue de ces deux essais nous avons sélectionné dix souches de bactéries qui ont montré un facteur de reproductibilité plus grand ou égale à 2 / 3 sur au moins l'un des deux champignons et qui présentaient un diamètre d'inhibition entre 13 mm et 30 mm (Tableau 20). Des valeurs allant de 13 à 24 mm de diamètre d'inhibition ont été obtenues par Gourama *et al.,* (1997) avec des bactéries lactiques testées contre *Penicillium expansum*. La différence au niveau des diamètres d'inhibition révèle que les bactéries ne présentent pas le même degré d'inhibition et que par conséquent elles sont différentes les unes des autres. Ce qui est confirmé par la biologie moléculaire (Figure 32) et les tests APIZYM (Tableau 23). La présence d'un halo d'inhibition met en évidence la résistance des bactéries à la germination des spores de moisissures.

Par contre une bactérie donnée ne présente pas le même diamètre d'inhibition et le même facteur de reproductibilité contre les deux moisissures testées, ce qui signifie que la bactérie n'a pas la même snsibilité vis-à-vis des moisissures (Table 2 article) (Djossou *et al.,* 2011).

La définition d'un facteur de reproductibilité a permis de confirmer l'activité antifongique des bactéries sélectionnées contre Ac162 souche et Ac164.

À la fin de ces expériences, 2 souches (LabCP15Z42 et LabCP37Z12) ont montré une inhibition de superficie de la zone claire entre 20 et 30 mm de diamètre pour les trois tests contre l'une des moisissures testées (Ac 162). La plus active contre l'Ac 164 est LabCP15Z42.

Lactobacillus plantarum est souvent citée dans la littérature comme une bactérie antagoniste de moisissures même si ce ne sont pas des *Aspergillus carbonarius*. C'est le cas pour la souche *Lactobacillus plantarum* 21B isolé du levain, qui présente un large spectre d'inhibition contre la croissance de moisissures (Rocken, 1996). Par contre une autre souche *Lactobacillus plantarum* LMG 6907 présente un spectre d'inhibition plus restrictif contre des moisissures des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus* (De Muynck, *et al.,* 2004). Des travaux similaires au notre, entrepris dans le cadre du projet Cocoqual (2007), ont démontré l'activité antagoniste de souches de *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus plantarum* contre la croissance de moisissures produisant de l'OTA. D'autres souches de bactéries lactiques comme *L.coryniformis subsp. coryniformis* Si3 ont démontré avec la même

technique une activité antifongique contre des moisissures et des levures (Magnusson and Schnürer, 2001).

En ce qui concerne la technique utilisée, celle de Cabo *et al.* (2002), elle permet de mettre en évidence l'activité antifongique de la fraction entière de la bactérie. La même technique a été reprise et validée dans plusieurs travaux de recherches (Magnusson et Schnürer, 2001; Magnusson *et al.,* 2003; Yousef *et al.,* 2008). Cependant il est possible de tester séparement la fraction cellulaire et le surnageant directement sur la moisissure (Corsetti *et al.,* 1998 ; Vina *et al.,* 2005 ; Valeirio *et al.,* 2009). Cette technique a l'avantage de localiser d'avance les substances inhibitrices de la bactérie.

Les études se sont poursuivies sur dix souches de bactéries lactiques dont le facteur de reproductibilité était égal ou supérieur à 2/3 sur au moins une des deux souches fongiques.

4.4 Caractéristiques physiologiques, profil fermentaire, biochimique et étude moléculaire des dix souches de bactéries lactiques isolées et sélectionnées du café

Afin de spécifier la taxonomie des bactéries antifongiques, nous avons poursuivi leur identification avec les dix bactéries retenues lors du premier criblage en réalisant les tests suivants : étude physiologique (Tableau 21), profil fermentaire (production d'acide lactique et acide acétique), profil biochimique (fermentation des hydrates de mise en évidence par les galeries API50CH) (Tableau 22) détection de certaines enzymes par les galeries APIZYM (Tableau 23) et identification moléculaire des bactéries sélectionnées.

4.4.1 Caractéristiques physiologiques

Toutes les bactéries lactiques étudiées présentent les mêmes caractéristiques physiologiques (Tableau 21). Elles ne produisent pas de CO_2 et sont donc toutes homofermentaires ; elles ne sont pas thermtolérantes (ne croissent pas à 45°C), mais se développent à 37°C, donc ces bactéries sont mésophiles. Nous pouvons à la suite de ces analyses conclure que ces bactéries sont homofermentaires facultatifs.

Tableau 21: Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques, culturales et physiologiques des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café.

Souches de bactéries lactique	**LabCP2**	**LabCP15**	**LabCP16Z**	**LabCP19**	**LabCP20**	**LabCP21**	**LabCP22**	**LabCP28**	**LabCP30**	**LabCP37**
NaCl 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de CO_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croisssance à 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+°	+°	+°	+°	+°	+°	+°	+°	+°	+°
Mobilité	Immobile									
Catalase	Négative									
Spore	Asporulée									
Morphologie	Coccobacilles en paire ou courtes chaînes									

4.4.2. Profil biochimique des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café

Le Tableau 22 confirme que les souches de bactéries lactiques étudiées semblent avoir le même profil biochimique. Elles fermentent toutes les mêmes hydrates de carbones. Les résultats des tests sur galerie API CH 50 ont révélé que ces bactéries sont des *Lactobacillus plantarum*. Les dix souches de bactéries lactiques isolées et sélectionnées à partir des cerises de café robusta en Côte d'Ivoire fermentent un grand nombre de sucres : D-Cellulose, D-Maltose, D-lactose, D-Melibiose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Raffinose, etc (Tableau 22). Pour les dix souches retenues, les résultats sont identiques. Elles utilisent toutes les mêmes sucres comme source de carbone. Les résultats de la galerie API révèlent que ces bactéries sont des *Lactobacillus plantarum*. Pour confirmer l'identité des souches révélée par la galerie API50CH nous proposons de décrire leur profil enzymatique

Tableau 22 : Profil de fermentation des 49 sucres de la galerie API 50CH par certaines bactéries isolées de la pulpe de café.

Substrat	Glycérol	Erythritol	D-arabinose	L-arabinose	D-ribose	D-xylose	D-adonitol	Methyl-ßD- xylopyranoside	D-galactose	D-glucose	D-fructose	D-mannose	L-sorbose	L-rhamnose	Dulcitol	Inositol	D-Mannitol	D-sorbitol	Methyl-αD-Mannopyranoside	Methyl-αD-glucopyranoside	N-Acetylglucosamine	Amygdaline	Arbutine	Esculine citrate de fer	Salicine	D-cellobiose	D-Maltose	D-Lactose	D-Melibiose	D-Saccharose	D-Trehalose	Inuline	D-Melezitose	D-Raffinose	Amidon	Glycogene	Xyliotol	Gentiobiose	D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	D-Arabitol	L-Arabitol	Potassium Gluconate	Potassium2- Cetogluconate	Potassium5-Cetogluconate
LabCP2Z52	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP15Z42	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP16Z42	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP19Z31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP20Z31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP21Z32	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP22Z32	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP28Z21	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP30Z22	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LabCP37Z12	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

4.4.3. Profil enzymatique des bactéries lactiques sélectionnées

L'analyse du profil enzymatique des bactéries isolées du café est présentée dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Profil enzymatique des bactéries lactiques (Lb) isolées de la pulpe de café

	Bactéries lactiques									
Enzymes	**LabCP2**	**LabCP15**	**LabCP16**	**LabCP19**	**LabCP19**	**LabCP21**	**LabCP22**	**LabCP28**	**LabCP30**	**LabCP37**
Phosphatase alcaline	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Esterase (C4)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Esterase lipase C8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lipase C14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Leucine arylamidase	+++	++	–	+	++	–	–	++	++	–
Valine arylamidase	++	+	++	±	+	++	+++	+	+	++
Cystine arylamidase	–	–	+	–	–	+	++	–	–	+
Trypsine	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α-chymotrypsine	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Phosphatase acide	++	±	±	±	±	±	–	±	±	–
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	±	±	±	±	±	–	±	±	±
α-Galactosidase	–	–	–	–	–	–	+	±	±	±
ß-Galactosidase	+++	+++	++	++	+++	++	±	+++	+++	-
ß-Glucuronisidase	–	–	++	–	–	–	–	–	–	+++
α-Glucosidase	+++	+++	+++	±	++	±	++	+	+	–
ß-Glucosidase	+++	+++	±	+	+++	+	+	++	++	+++
N-acétyl-ß-glucosaminidase	+++	++	–	±	+	+	±	+++	+++	++
α-Mannosidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α-Fucosidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Le Tableau 23 indique que que les bactéries étudiées ne sont pas strictement identiques Cependant elles présentent des points communs à savoir l'absence totale de certaines enzymes telles que la phosphatase alcaline, l'estérase, l'estérase lipase, la lipase, l'alpha-chymotrypsine, la trypsine, l'alpha-mannosidase et l'alpha-fucosidase. En revanche elles produisent toutes la N-acétyl-bêta-glucosidase, la bêta- glucosidase et la valine arylamidase. A l'exception de la souche LabCP37Z12, toutes les autres bactéries produisent l'alpha-glucosidase et la bêta-galactosidase.

4.4.4 Profil fermentaire des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café

Le profil fermentaire des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café a porté sur l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont des métabolites primaires et secondaires des bactéries lactiques. Le Tableau 24 présente le bilan fermentaire des bactéries lactiques étudiées. Toutes les bactéries sont productrices d'acide lactique et d'acide acétique, ce qui confirme leur appartenance au groupe des bactéries lactiques homofermentaire facultative.

Tableau 24: Bilan du profil fermentaire des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café

LAB	**Concentration Acide lactique (g/L) (24h)**	**Concentration Acide acétique (g/L) (24h)**
LabCP21Z32	19,2 ± 0,01	1,46 ± 0
LabCP2Z52	18 ± 2,65	3,4 ± 1,9
LabCP28Z21	17,4 ± 5,16	3,8 ± 4,4
LabCP30Z22	17,1 ± 0	3,33 ± 1,9
LabCP16Z42	12,1 ± 4,41	4,8 ± 1,3
LabCP19Z31	11 ± 1,03	5,9 ± 1,9
LabCP22Z32	8,8 ± 4,71	5,6 ± 0,72
LabCP20Z31	7 ± 2,73	2,3 ± 0,25
LabCP15Z42	6,5 ± 0	4,87 ± 2,3
LabCP37Z12	3,2 ± 0	2,1 ± 2,6

Au vu du Tableau 24 les bactéries étudiées peuvent être classées en 6 groupes qui sont : deux groupes acidophiles dont un composé de LabCP21Z32 produisant 19,2 g/L d'acide lactique, presque 10 fois la concentration d'acide acétique, et l'autre composé de LabCP2Z52, LabCP28Z21 et LabCP30Z22 produisant entre 17 et 18g/L d'acide lactique ce qui représente à peu près 6 fois la concentration d'acide acétique; un troisième groupe produisant entre 11 et 12g/L d'acide lactique soit 3 fois la concentration d'acide acétique est composé de (LabCP16Z42 et de LabCP19Z31) ; le quatrième groupe (LabCP22Z32) comprend une seule souche qui produit entre 8 et 9g/L d'acide lactique presqu'en proportion égale à celle de l'acide acétique; le cinquième groupe (LabCP15Z42 et LabCP20Z31) similaire au troisième, produit de l'acide lactique trois fois plus que l'acide acétique mais en plus faible quantité soit 7g/L d'acide lactique . Et enfin le sixième groupe représenté par l'unique souche LabCP37Z12 ne produit que 3,2g/L d'acide lactique, presqu'en proportion égale à celle de l'acide acétique.

L'étude des caractères morphologiques, des caractères biochimiques et de la fermentation des hydrates de carbone a mis en évidence la similarité des dix souches de bactéries lactiques au niveau phenotypique. Cependant le profil enzymatique de ces bactéries a montré que ces souches ne sont pas strictement identiques. Nous avons donc poursuivi leur identification avec l'étude moléculaire de ces souches de bactéries lactiques sélectionnées après le test antifongiques.

4.4.5. Identification moléculaire des bactéries lactiques

4.4.5.1 Produits des amplifications par PCR

Les couples d'amorces suivants ont servi à l'identification moléculaire des bactéries lactiques: (fd1/rd1), (firm350f/firm814r), (rpoA-F_2/rpoA-R_2). L'ADN des souches LabCP2Z52, LabCP15Z42, LabCP16Z42, LabCP19Z31, LabCP20Z31, LabCP21Z32, LabCP28Z21 ont hybridé avec le couple d'amorce (fd1/rd1). Tandis que le couple d'amorce (firm350f/firm814r) hybride bien avec l' ADN de LabCP15Z42, LabCP22Z32, LabCP30Z22 et LabCP37Z12. Aucun ADN n'a hybridé avec le couple (rpoA-F_2/rpoA-R_2). La migration sur gel d'agarose a mis en évidence des bandes confirmant l'amplification de l'ADN ribosomal 16S (Figure 31a et 31b) avec les différentes amorces.

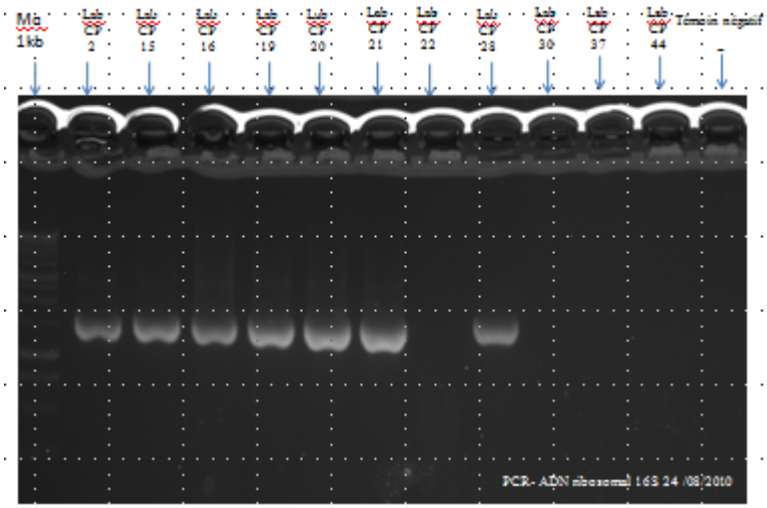


Figure 31a : Bande d'amplification d'ADN ribosomal 16S avec le couple d'amorces (fd1/rd1).

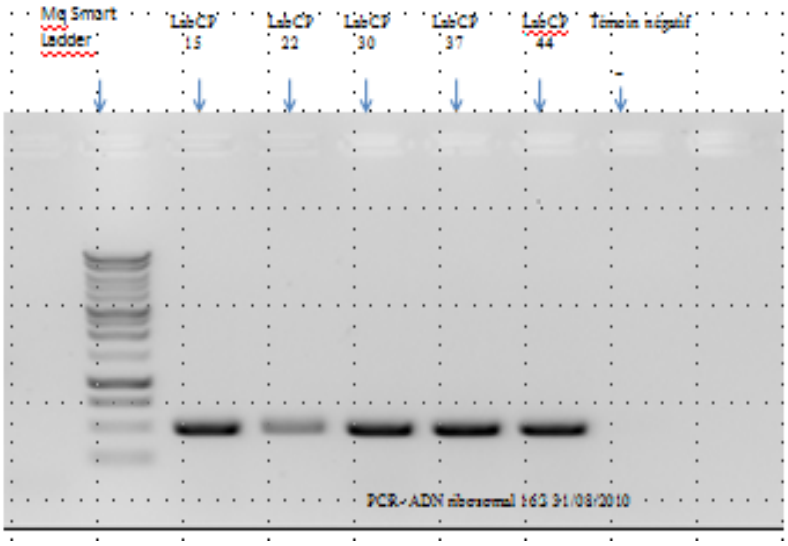


Figure 31b : Bande d'amplification d'ADN ribosomal 16S avec le couple d'amorces (firm350f/firm814r).

4.4.5.2 Séquençages et construction de l'arbre phylogénétique

Les produits d'amplification ont été séquencés par Eurofins (nous ne disposons pas des séquences pour la souche LabCP44). Les résultats des séquences de nos échantillons sont donnés dans l'annexe 7. L'alignement des séquences a été faite manuellement sur le logiciel MEGA5. L'ajustement a été effectué sur le logiciel BIOEDIT (Hall *et al.*, 1999). Par la suite un Blast nucléotidique (Basic Local Alignement), entre les séquences de nos échantillons et celle de la base de données (*Lactobacillus brevis* n157907343, *Lactobacillus plantarum subs. plantrum* n313747340, *Lactobacillus plantrum* n129307189, *Lactobacillus pentosus* n332100267), est réalisée sur le site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). A partir des séquences obtenues dans cette étude et des séquences de la base de données avec lesquelles nous avons obtenu le meilleur BLAST, on a construit un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel en ligne Phylogeny Tree (www.phylogeny.fr) (Figure 32).

Figure 32: arbre phylogénétique présentant la similarité de l'ADN ribosomal 16S des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café et des souches de la base de données

La construction de l'arbre phylogénétique prend en compte les changements survenus au cours de l'évolution. Il établit des liens de parenté entre les espèces, à partir de l'analyse de séquences, par l'intermédiaire d'un alignement multiple contrairement au BLAST qui est basé sur un alignement local. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, basée sur la recherche de l'arbre optimal en attribuant une probalité à chaque changement dans les séquences («Neighbor-Joining») (Saitou and Nei, 1987). La fiabilité et la robustesse de la topologie obtenue a été évaluée par la méthode du Bootstrap pour laquelle on a choisi une valeur de 500 (construction de 500 arbres et choix du plus fiable) (Felsenstein, 1985). Le «Bootstrap» obtenu et déduit de 500 repliques, met en évidence la proximité entre les différents taxons (Felsenstein, 1985). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées dans MEGA 4 (Tamura et *al.*, 2007). Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode du Likelihood qui compose le maximum de similarité entre les souches (Tamura *et al.*, 2004).

Selon l'arbre phylogénétique les bactéries peuvent être classées en deux grands groupes qui sont : un premier groupe composé de l'unique souche LabCP37Z12 présentant une proximité de 88% avec la souche *Lactobacillus brevis ;* le second groupe est constitué des neuf autres souches (LabCP20Z31, LabCP22Z32, LabCP30Z22, LabCP28Z21, LabCP15Z42, LabCP16Z42, LabCP2Z52, LabCP21Z32, Labcp19Z31) relativement similaires les unes aux autres et très proches de *Lactobacillus plantarum*-nl29307189. Cependant nous remarquons que la souche Labcp19Z31 est étroitement liée à *Lactobacillus pentosus*.

4.4.5.3 Discussion sur l'identification des bactéries lactiques antagonistes

Selon le “Bergey’s manual”, tous les bacilles Gram positifs, catalase negative et non sporulant appartiennent au genre *Lactobacillus* (Kandler and Weiss, 1996).

A partir des cerises fraîches de café robusta il a été possible d’isoler un grand nombre de bacillus Gram positifs, catalase négative et non sporulant. De ce fait ces souches appartiennent au genre *Lactobacillus* (Kandler and Weiss, 1996). Ces souches anaérobies facultatives sont capables de se développer en conditions anaérobies et utilisent comme source de carbone et d’énergie une large gamme de sucres. Elles présentent des profils biochimiques très similaires car elles utilisent presque les mêmes sucres. Donc d’autres tests notamment les galeries APIZYM (Tableau 23), le profil fermentaire (Tableau24) et la biologie moléculaire (Figure 32) ont été utiles pour distinguer ces souches.

L’étude du profil fermentaire (production d’acide lactique et acétique) a permis de classer les bactéries en six groupes. Par contre les galeries API-ZYM ont mis en évidence des caractères plus discriminants, mettant en évidence que les souches sont phenotypiquement distinctes les unes des autres.

L’appartenance des bactéries lactiques au groupe homofermentaire facultatif est confirmé par l’absence de production de CO_2 dans le (Tableau 21), car seules les bactéries lactiques strictement homofermentaires produisent ce gaz.

L'identification moléculaire des LAB isolées et sélectionnées de la pulpe de café a mis en évidence une similitude de 99% à 100% avec des souches étroitement proches de *L. plantarum*. En effet l’étude de la fermentation des sucres (Tableau 22) a permis de conclure que les bactéries sont des *L. plantarum,* et l’étude physiologique (Tableau 21) montre que ces bactéries sont à priori identiques. Par contre le profil fermentaire (Tableau 22) et l’étude moléculaire (arbre phylogénétique) démontre que les bactéries peuvent être classées en plusieurs groupes dont six selon le profil fermentaire et cinq selon l’étude moléculaire (Figure 32). Nous avons donc à faire à des espèces apparentées à *L. plantarum*. Comme l’indique bien l’arbre phylogénétique. Toutefois il apparaît clairement que la souche LABCP37 se démarque des autres souches aussi bien dans le profil fermentaire que dans l’étude moléculaire. (Tabeau 22 et Figure 32). Selon l’arbre elle est phylogénétiquement très proche de *Lactobacillus brevis.*

Par ailleurs *L. plantarum* est un microorganisme prédominant dans les ensilages (Rossi and Dellaglio, 2007), donc en appui à l’étude moléculaire (Figure 32) et au profil biochimique (Tableau 23) nous sommes certains que les bactéries isolées et sélectionnées de la pulpe de café robusta sont des espèces phylogénétiquement proches et apparentées à *Lactobacillus plantarum* (Lee *et al.,* 1986). Cependant il demeure que *Lactobacillus pentosus* et

Lactobacillus paraplantarum des espèces étroitement liées *Lactobacillus plantarum,* sont très présentes dans tous les végétaux fermentés (Tamang *et al.,* 2007; Herreros *et al.,* 2003; Williams *et al.,* 1997) et dans tous les ensilages (Rossi and Dellaglio, 2007), où est présent *Lactobacillus plantarum*. On y retrouve également les autres hétérofermentaires homofermentaires facultatifs appartenant au genre *Lactobacillu*s (Menendez *et al.,* 2001).

Les espèces *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus paraplantarum* sont très proches phenotypiquement et présente une grande proximité génotypique car la similitude de l'ADN 16S dépasse les 99% d'identité (Rossi, 2007 ; Berthier and Ehrlich, 1998; El-Soda, 1992 ; Requena, 1991). Par conséquent le séquençage du 16S rDNA n'est pas la meilleur option pour distinguer ces souches (Rossi *et al.,* 2007). L'analyse du Tableau 20, nous pouvons dire que les bactéries isolées et sélectionnées de la pulpe de café ne sont pas des *Lactobacillus pentosus* car ils fermentent le glycerol et le xylose contrairement à *L. plantarum* (Lu *et al,* 2003). Cependant il existe quelques exceptions telles des souches de *L. plantarum* capables de métaboliser le glycérol aussi bien que *L. pentosus* et quelques souches de *L. pentosus* qui ne peuvent pas métaboliser le xylose (Perrez *et al.,* 2007). Il en est de même pour les *Lactobacillus plantarum* isolés de la pulpe de café au cours de nos travaux (qui ne fermentent pas le manitol) qui ne sont pas strictement identiques à ceux étudiés par exemple par Ghotbi et *al.,* (2011) (fermentent le manitol).

L'analyse du BLAST et de l'arbre phylogénétique ont confirmé l'identification des souches de bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* et des souches apparentées. Cependant cette méthode présente des limitations car les souches sont très proches. L'amplification de l'ADN 16S ribosomal n'est pas suffisante pour différencier les espèces *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus paraplantarum.*

CONCLUSION GENERALE

5. Conclusion générale

L'objectif général de ce travail porte d'une part sur l'étude de la microflore post récolte du café robusta en Côte d'Ivoire au cours du procédé du séchage afin de mettre en évidence la présence des moisissures et de décrire le pouvoir mycotoxinogène des principales souches isolées. D'autre part cev travail à consister à isoler des bactéries lactiques à partir des mêmes sites de production de café robusta et démontrer le pouvoir antifongique de ces souches sauvages. A long terme cette étude devrait contribuer à l'amélioration de la qualité du café robusta.

En synthèse de ce travail de thèse on peut affirmer que les échantillons de café robusta provenant de la Côte d'Ivoire sont contaminés par des moisissures, essentiellement des *Aspergillus* section *Nigri*, mais aussi la section *Fumigati*, des *Penicillium*, des *Fusarium* et des *Rhizopus*. Le support de séchage n'a pas de réel impact sur la charge fongique des échantillons étudiés, de même le site d'échantillonnage importe peu et n'influence pas la charge fongique sur les échantillons. Cependant le niveau de contamination en moisissures varie en fonction de la nature de l'échantillon dans l'ordre suivant : les grains de café verts, les cerises séchées de café et les coques. La contamination en moisissures reste élevée sur les cerises séchées et sur les coques puisque celle-ci constitue la partie en contact avec l'environnement c'est-à-dire le sol et l'air, qui sont les principales sources de contamination. De même la contamination fongique varie en fonction des supports de séchage. Ce projet de thèse a permis de dégager des pistes intéressantes pour améliorer la qualité du café en Côte d'Ivoire.Toutefois, afin de préciser les points critiques de contamination fongique au cours du traitement post-récolte du café en Côte d'Ivoire, il serait recommandable d'entreprendre d'autres enquêtes, d'abord pour vérifier les résultats obtenus, et ensuite pour effectuer un dosage de l'OTA dans les échantillons de café.

Le dosage des mycotoxines a mis en évidence que toutes les souches identifiées comme *A. carbonarius* sont potentiellement ochratoxinogènes.

Toutefois il faudrait attirer l'attention sur le fait que la présence de moisissures mycotoxinogènes sur le café ne signifie pas que les échantillons de café échantillonnés sont contaminés en mycotoxines, car aucun dosage de mycotoxine n'a été entrepris sur ces échantillons.

Les *Aspergillus* appartenant à la section *Nigri* comme la souche DO127 produisent de l'ochratoxine A en FMS avec ou sans stress hydrique, sur milieu bagasse et blé précuit. Il n'y a pas de lien apparent entre le nombre de spores et la quantité d'ochratoxine A, mais les expériences doivent être répétées et améliorées afin de le confirmer. Les intérêts de la mise en

évidence d'un tel lien serait l'application industrielle de procédés de culture favorisant la sporulation des moisissures dans le but de leur faire produire plus de métabolites secondaires d' intérêt .

L'activité antifongique potentielle de *Lactobacillus plantarum* contre la germination et la croissance mycélienne d'*Aspergillus carbonarius* a été confirmée. Les résultats de cette étude ont été publiées dans la revue Anaérobe (Djossou *et al.,* 2011). Il serait désormais intéressant d'étudier les composés antifongiques produits par ces souches de bactéries lactiques. Parmi les bactéries lactiques isolées à partir de cerises fraîches de café robusta au cours de ce travail, *Lactobacillus plantarum* a démontré une activité antifongique contre des souches d'*Aspergillus carbonarius* hautement ochratoxinogènes. Par conséquent la prévention de la mycotoxinogenèse sur le café robusta pourrait passer par le biocontrôle des moisissures ochratoxinogènes par l'utilisation de bactéries lactiques. L'étude entreprise dans ce chapitre s'inscrit dans le cadre de la lutte biologique dont l'objectif est de pallier aux insuffisances de la lutte chimique et physique tout en préservant les intérêts de la nature et ceux de l'homme. Le choix délibéré de bactéries lactiques endogènes permettra de limiter les problèmes liés à la spécificité des substrats, l'objectif étant de traiter les cerises de café post-récolte avec des bactéries lactiques antagonistes des moisissures post-récolte. Par ailleurs les bactéries lactiques sont connues pour leur innocuité sur la santé de l'homme. De ce fait la découverte d'une bactérie qui inhibe la croissance des moisissures ochratoxigéniques peut être considérée comme une approche de décontamination des aliments en sécurité sanitaire en prévenant la prolifération des moisissures sur le café mais aussi pour les céréales, les olives et le raisin.

L'identification des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café sont de l'espèce *Lactobacillus plantarum spp.* Mais pour spécifier ces souches, il serait convenable de procéder à une étude moléculaire plus fine en utilisant des gènes tel que le gène *Rec A.*

Les résultats acquis au cours de ce travail de thèse serviront de base à des études plus approfondies d'abord pour mieux définir les paramètres de l'action antifongiques des bactéries, ensuite pour délimiter leur spectre d'action et enfin pour procéder à des tests *in vivo* sur du café ou d'autres denrées alimentaires contaminées par des moisissures . Par ailleurs il peut être envisagé de procéder à l'identification des biomolécules actives produitses par ces bactéries antifongiques et qui sont impliquées contre la germination des spores de moisissures qui sont des contaminants naturels post récolte de denrées alimentaires.

6. Références bibliographiques

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J. (2001) Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. Journal of Food Protection 64: 903– 906.

Abarca, M.L., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J. (2004) Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Mcrobiology, 60: 2650-2652.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) **(**2009) Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final.

Al-Musallam, A. (1980) Revision of the black *Aspergillus* species. Ph.D. Thesis, State University Utrecht, The Netherlands

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

Andersen, B., Thrane, U. (1996). Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Research*., **12,** 54–60.

Anonyme (2004): « Le CNRA en 2003». Revue annuelle des programmes de recherche. CNRA. DSI et DPRAD. Juin 2004.

AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (2000) Ochratoxin A in Corn and Barely: Liquid Chromatography Method, 17th ed., Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA; Vol II, Sec. 991.44.

Atanossova, M., Choiset, Y., Dalgalarrondo, M., Chobert, J.-M., Dousset, X., Ivanova, I., & Haertle´, T. (2003) Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous antibacterial and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* strain M3. International Journal of Food Microbiology, 87, 63–73.

Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. pp. 1-66. Edited by S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand. New York: Marcel Dekker, Inc.

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

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

Barrios-Gonzalez, J., Rodriguez, G.M. and Tomasini, A. 1(990). Environmental and nutritional factors controling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. J. Ferment. Bioeng. 70 : 329-333.

Batish, V. K., Grover, S., & Lal, R. (1989) Screening lactic starter cultures for antifungal activity. Cultured Dairy Products Journal, 24, 21–25.

Batish, V. K., Lal, R., & Grover, S. (1990) Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. Food Microbiology, 7, 199–206.

Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Ferreira Silva, C., Cirillo M., Varga E. A., Schwan, R. F. (2009) Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. Food Control 20: 784–790.

Battilani P, Pietri A, Bertuzzi T, Languasco L, Giorni P, Kozakiewicz Z (2003) Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. Journal of Food Protection 66: 633–636.

Bauer J., Gareis M., Bott A., Gedek B., (1989) Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. Medical Mycology 27(1) p 45-50.

Belli N., Bau M., Marin S., Abarca M.L., Ramos A.J., Bragulat M.R. (2006) Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. International Journal of Food Microbiology 111, S40-S45.

Belli, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchos, V., Marin, S. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. Journal of Applied Microbiology, 98, 839-844.

Berthier F, Ehrlich DS (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNAspacer region. FEMS. Microbiol. Lett. 161: 97-106.

Bhatnagar, D., Payne, G.A., Cleveland, T.E. & Robens, J.F. (2004) Mycotoxins: current issue in USA. In H. Barug, H.P. van Egmond, R. Lopez-Garcia, W.A. van Osenbruggen and A. Visconti (eds). Meeting the mycotoxin menace, pp. 17–47. Wageningen, the Netherlands, Wageningen Academic Publisher.

Björkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J. Vandamme, P. (2000) Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. Appl Environ Microbiol 66, 3764-3772

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J. &Vandamme, P. (2002) Taxonomic study of Weissella confusa and description of *Weissella cibaria sp.* nov.,detected in food and clinical samples. Int J Syst Evol Microbiol 52, 141-148.

Björkroth, J. & Holzapfel, W. (2003) Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella. In TheProkaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M. Dworkin. New York, http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/: Springer-Verlag.

BNETD (Bureau National d'Etude Technique et de Développement) (1998) Centre de Cartographie et de Télédétection. http://www.bnetd.sita.net

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

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

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

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabanes, F.J. (2001) An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International journal of Food Microbiology, 71: 139-144.

Brand, D., Pandey, A., Roussos S., Brand, I., Soccol, C.R. (2000) Microbial degradation of caffeine and tanins from coffee husk. In: Coffee Biotechnology and Quality, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academis Publishers, Dordrecht, pp. 393-400.

Bressani, R., Estrada, E., Jarquin, R. (1972) Pulpa y pergamino de café. Composicion quimica y contenido de aminoacidos de la proteina de la pulpa. Turrialba 22: 299-304.

Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M. & Leroi, F. (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens V41*, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology 104, 309-324.

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S., Dellaglio, F. (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis subsp. nov*., isolated from vegetable matrices. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1629–1634.

Bringel, F., Curk, M., Chubert, J.C. (1996) Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. International Journal Systematic of Bacteriology 46: 588–594.

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

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

Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castella G, Minguez S, Pons A (2002) What is the source of ochratoxin A in wine? International Journal of Food Microbiology 79: 213–215.

Cabo, M.L., Braber, A.F., Koenraad, P.M.F.J., (2002) Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium* discolor is due to acetic acid in the medium. Journal of Food Protection 65: 1309–1316.

Cachat, E. & Priest, F. G. (2005) *Lactobacillus suntoryeus sp*. nov., isolated from malt whisky distilleries. Int J Syst Evol Microbiol 55, 31-34.

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

Campabadal, C. (1979) Utilizacion Integral de los Subproductos del Cafe, Memoria del Tercer Simposio Internacional, ANACAFE-ICAITT, Guatemala, pp. 37–44.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbioly. 50, 131– 149.

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

Chagnaud, G., Machinis, K., Coutte, L., Marecat, A., & Mercenier, A. (2001) Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: Application to six common *Lactobacillus* species. Journal of Microbiological Methods, 44: 139–148.

Chiotta M.L., Reynoso M.M., Torres A.M., Combina M., Chulze S.N. (2010) Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina. Journal of Applied Microbiology 110, 445-454.

Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2: 137–144.

Cocoqual (2007) Developing biochemical and molecular markers as indices for improving quality assurance in the primary processing of cocoa in West Africa. Final Report. Analysis of the mycological status of cocoa beans with emphasis on ochratoxigenic fungi. Project No.ICA4-CT-2002-10040 (EU 5th FP INCO-DEV Project) http://cordis.europa.eu/data/PROJ_FP

Cooney G.D. & Emerson R. (1965) Thermophilic fungi. W. H. FREEMAN AND COMPANY. San Francisco et London. 3-28.

Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl Microbiol Biotechnol. 50: 253-256

Coste, R. (1989) Caféiers et Cafés. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. (Eds), Paris, 373 p.

Costro, L., Mourad, A.L., Oliveira, P.A.P.L.V., Braddini, J.P.O.A., Kletecke, R.M. (2006) Environmental profile of Brazilian green coffee. International Journal J.L.C.A. 11, 16-21.

Dachoupakan Cheewanun (2008) Contaminants ochratoxinogènes du raisin : biodiversité et facteurs de toxinogenèse. Thèse nouveau doctorat, Université de Montpellier 2, 264p.

Daeschel, M. (Eds), Food biopreservatives of microbial origin. Ann Arbor: CRC Press, pp. 1–23.

Dano Djédjé. S., Manda P., Kouadio J. H., Diakité A., Droh K. J., Kouassi K. S., Dembélé A. (2009) Etude de L'incidence de la Torréfaction Appliquée au Café Vert Sur la Réduction du Taux de L'Ochratoxine a (OTA) dans le Produit Fini. European Journal of Scientific Research 26 (3) pp.393-401.

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

De Castro, R.D., Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. Brazilian Journal Plant Physiology. 18: 175-199.

De Hoog, G.S., Guarro, J. (1995) Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas

De Muynck, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire S., Arnaut F., Soetaert W., Vandamme E.,J. (2004) Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. Microbiological Research 159: 339-346.

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

D'Enfert, C. (1997) Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 21: 163-172.

Desmazeaud M. (1992) Les bactéries lactiques. Indu lait: Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Hermier J., Lenoir J., Weber F. (Eds) Centre de formation permanente et de perfectionnement des cadres des industries du lait. pp 9-60.

Devriese, L.A., Baele, M. & Butaye, P. (2000). The genus *Enterococcus*. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M.

Dworkin. New York, http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/: Springer-Verlag.

Dicks, L. M. & van Vuuren, H. J. J. (1987) Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. Int J Syst Bacteriol 37: 437-440

Djossou O., Perraud-Gaime I., Lakhal Mirleau F., Rodriguez-Serrano G., Karou G., Niamke S., Ouzari I., Boudabous A., Roussos S. (2011). Robusta coffee beans post harvest microflora: *Lactobacillus plantarum sp.* as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius.* Anaerobe, 30: 1-6

Durand, A., Renaud, R., Maratray J. and Almanza, S. (1997) The INRA-DIJON biorectors: Designs and applications. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), Advances in solid state fermentation, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p 72-92.

Dykes, G.A., Britz, T.J., von Holy, A. (1994) Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum packaged vienna sausages. J. Appl. Bacteriol. 76: 246–252.

EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to Ochratoxin A in food.http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf

El-Gendy, S. M., & Marth, E. H. (1981) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. Journal of Food Protection, 44, 211–212.

El Soda, M., Desmazeaud, M.J. (1982) Les peptide-hydrolases des Lactobacilles du groupe *Thermobacterium I*, Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus* , *L. acidophilus, L. lactis* et *L. bulgaricus*. Canadian Journal of Microbiology 28: 1181-1188.

Elias, L.G. (1978) Composicion quimica de la pulpa de café y ostros subproductos. In pulpa de café : composicion, tecnologia y utilization. BrahamJ.E.& Bressani R. (Eds), INCAP, 19-29.

Euzéby, J.P. (2005) List of procariotic names with standing in nomenclature, Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. http://www.bacteriologie.net

FAO (Food and Agriculture Organisation) (2001). Manual on the application of the HACCPsystem in mycotoxin prevention and control. Food and Nutrition Paper 73. ISSN 0254-4725.

FAO (2006a) Enhancement of coffee quality through the prevention of mould formation. *Final Technical Report*. Final Management Report, Julius Jackson (Project Officer, FAO). http:// faostat.fao.org

FAO (2006b) Reducing Ochratoxin A in coffee. Available source: http://www.coffee-ota.org, February 3, 2006.

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

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

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

Filtenborg, O., Frisvad, J.C., 1980. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 13, 128–130.

Fleming, H.P., Etchells, J.L., Costilow, R.L. (1985) Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Applied Microbiology. 30: 1040-1042.

Florianowicz, T. (2001). Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum.* European Food Research and Technology, 212, 282–286.

Gareis M., Wernery U. (1994) Determination of Gliotoxin in samples associated with cases of intoxication in camels. Mycotoxins Research, 10(1) p. 2-8.

Gaime-Perraud, I., Roussos, S., Martinez-Carrera, D. (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. Micol. Neotrop. Apl. 6: 95-103.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus.* Studies in Mycology 59: 1–10.

Ghotbi M., Soleimanian-Zad S. and Sheikh-Zeinoddin M. (2011) Identification of *Lactobacillus pentosus, Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus plantarum* in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of recA gene sequence analysis. African Journal of Biotechnology Vol. 10(10), pp. 1902-1906.

Girardin H. (1997) Detection of filamentous fungi in foods. Sciences des aliments 17: 3-19.

Gopinandhan, T.N., Keshamma, E., Velmourougane, K., Raghuramulu, Y. (2006) Coffee husk - A potential source of ochratoxin A contamination. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 43: 488-490.

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

Gourama, H., Bullerman, L.B., (1995a) Antimycotic and antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 57: 1275-1280.

Gourama, H., Bullerman, L.B. (1995b) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species. Journal of Food Protection, 58: 1249-1256.

Gourama, H. (1997) Inhibition of growth and mycotoxin production of Penicillium by Lactobacillus species. Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie, 30, 279–283.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp. Ser. 41: 95-98.

Hammes, W. P. & Hertel, C. (2003). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M.Dworkin. NewYork. http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/: Springer-Verlag.

Harazima, T., Seki, T. (2002) Experimental methods of biotechnology. In: The society for biotechnology. Tokyo: Baihuukan Press; p. 100–01.

Hassouni, H. (2007) Physiologie de la sporulation des champignons filamenteux pour la production de spores et d'enzymes en fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, 165 pages.

Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. Journal of Food Mycology 1: 67-72.

Herreros, M.A., Fresno, J.M., Gonzalez-Prieto, M.J., Tornadijo, M.E (2003) Technological characterization of lactic acid basteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese), International Dairy Journal 13: 469-479.

Hill, J. E. (1989) Method and inoculant for preserving agricultural products for animal feed. US Patent Application 4: 842-871.

Holt, M.E., J.G. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1071–1075.

Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson RA (2005). Polyhphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia 97: 1316–1329.

Huet, M., (1972) Textbook of Fish Culture, Fishing News Books Ltd., Surrey 436 pp.

I.A.R.C. (International Agency for Research on Cancer) (1982) Environmental carcinogens selected methods of analysis. 5. Some Mycotoxins. IARC Scient. Pub, 44

I.A.R.C. (International Agency for Research on Cancer) (1993) Monograph on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human: Some Naturally Occuring Substances. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins (Lyon: IARC), 1993, pp. 397-444.

I.C.O (International Coffee Organization) (2007) Letter from the executive director, Coffee market report.www.dev.ico.org

I.C.O (2010) http://www.ico.org/ **:** International Coffee Organization, 22 Berners Street, London, W1T 3DD, England.

I.C.O (2011) http://www.ico.org/prices/m1.htm

Jarquin, R. (1979) Utilizacion integral de los subproductos del café, Memoria del Tercer Simposio Internacional, ANACAFE-ICAITI, Guatemala, , pp. 45–53.

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

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2007) JECFA/68/SC. Summary and Conclusions. Geneva, 19-28 June, 2007. 18p.

Jones, R. J. (2004) Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chillstored vacuum-packaged beef. Int J Food Microbiol 90, 273-282.

Joosten H.M.L.J, Goetz J, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P (2001) Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. International Journal of Food Microbiology 65: 39–44.

Jouany, P.J., (2007) Methods for preventing, decontaminating and minimising the toxicity of mycotoxins in feeds, Animal Feed Science and Technology 137:342-362, www.scicencedirect.com

Kabbaj, W., Bensoussan, M. and Roussos, S. (1996) Factors affecting physiology of mycelial growth and arorna production in solid state fermentation of mushrooms. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez. G Advances in Solid State fermentation., Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, chap.36, pp. 437-448.

Kandler O, Weiss N (1996). Genus *Lactobacillus*, Bergey's manual of systematic Bacteriology, USA, pp. 1208-1234.

Kandler, O., Weiss, N. (1986) Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, 212AL. In: Sneath, PHA; Mair, NS; Sharpe, ME and Holt, JG (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. 2 : 1209-1234.

Kim, B., Lee, J., Jang, J., Kim, J. & Han, H. (2003) *Leuconostoc inhae sp*. nov., a lactic acid *bacterium* isolated from kimchi. Int J Syst Evol Microbiol 53, 1123-1126.

King, S.W., Fowler, G. G., & Vandenbergh, P. A. (1986) Method for inhibiting fungi. European Patent Application EP 0, 221, 499, A2.

Kouadio, A.I., Agbo, N.G., Dosso, B.M. (2010) Diagnostic de la contamination des cerises de café Robusta (*Coffea canephora* P.) par les espèces fongiques productrices de l'Ochratoxine A en zone tropicale humide (Côte D'Ivoire). Annuaire Botanique de l'Afrique Ouest. 6: 14-26.

Kozakiewicz, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers, 161:1-188.

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

Kuiper-Goodman, T. (1991) Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. Veterinary and Human. Toxicology. 33(4), 325-333.

Lakhtar H. (2009) Culture du Lentinula edodes (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide: Transformation des polyphénols des margines. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne, 170p, Réf. 2009AIX30048.

Lambard, Ch. (2003) « Le café de la terre à la tasse». Centre de Caféologie. Bordeaux (France). Mars 2003.

Lambraki, M., Marakis, S., Roussos, S. (1995) Effect of temperature and aeration flow on carob tannin degradation by *Aspergillus carbonarius* in solid state fermentation system. Micol. Neotrop. Apl. 7: 23-34.

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

Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Davison, N. & Collins, M. D. (2004) *Streptococcus halichoeri sp.nov*., isolated from grey seals (*Halichoerus grypus*). Int J Syst Evol Microbiol 54, 1753-1756.

Le Bars, J., Le Bars, P. (1998) Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing in Mycotoxins in Food chain, (Le Bars, J., Galtier, P., eds), Revue Méditerranéene Vétérinaire.149: 493-500.

Le Bars, J., Le Bars, P. (2000) Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: Coffee Biotechnology and Quality, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academis Publishers, Dordrecht, pp. 355-368.

Lee, B.H., Hach, S., Simard, R.E. (1986) A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems, Journal of Industrial Microbiology 1: 209-217.

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

Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Lefebvre, K., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Vilalta, N. E., Rusul, G. & Swings, J. (2002) *Lactobacillus durianis sp*. nov., isolated from an

acid-fermented condiment (tempoyak) in Malaysia. Int J Syst Evol Microbiol 52, 927-931.

Leong SL, Hocking AD, Pitt JI, Kazi BA, Emmett RW, Scott ES (2006) Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. International Journal of Food Microbiology 111F: S10–S17.

Leong, S.L., Hien, L.T., An, T.V., Trang, N.T., Hocking, A.D., Scott, E.S. (2007) Ochratoxin-A producing *Aspergillus* in Vietnamese green coffee beans. Letters in Applied Microbiology, 45: 301-306.

Leveau, J.Y., Bouix, M., De Roissart, H. (1991) La flore lactique, in Technique d'Analyse et de contrôle des industries agroalimentaires, (Bourgeois, CM & Leveau, JY.Lavoisier) Vol.3, 2e Ed Tec&Doc.Apria.Paris:152-186.C.M,..

Leveau, J-Y, Bouix, M., (1993) Les Microorganismes d'Intérêts Industriels. p.171-329, V575.

Levi CP, Trenk HL, Mohr HK (1974). Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. Journal of Association of Official Analytical Chemists 57: 866–870.

Lindgren, S. E., & Dobrogosz,W. J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149–164.

Lonsane, B.K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzales, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. and. Krishnaiah, M.M. 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. Process Biochem. 27 : 259–273.

Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. Food Research International, 33, 247–256.

Lu, Z., Breidt, F. Jr., Fleming, H.P., Altermann, E., Klaenhammer, T.R. (2003) Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. International Journal Food of Microbiology 84: 225–235.

Luchese, R. H., & Harrigan, W. F. (1990) Growth of, and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values. Journal of Applied Bacteriology, 69, 512–519.

Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C.S.E.C., Homechim, M., Ono, E.Y.S., Vilas-Boas, L.A., Sartori, D., Furlaneto, M.C., Fungaro, M.H.P., (2005) Molecular identification of *Aspergillus spp*. isolated from coffee beans. Scientia Agricola 62: 45–49.

Magnusson, J., & Schnurer, J. (2001) *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1–5.

Magnusson, J. (2003) Antifungal activity of lactic acid bacteria. PhD thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., & Schnurer, J. (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 219, 129–135.

Makanjuola, D. B., Tymon, A., & Springham, D. G. (1992) Some effects of lactic-acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations.Enzyme and Microbial Technology, 14, 350–357.

Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J Mol Biol 5, 109-118.

Martins, M.L., Martins, H.M., Gimeno, A., (2003) Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (Coffea arabica). Food Additives and Contaminants 20: 1127–1131.

Mayra-Makinen, A. K., Kristianinkatu. A., & Suomalainen, T. V. (1994) A novel microorganism strain, bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeasts and moulds. European Patent Application 0, 576, 780, A2.

Menendez, S., Centeno, J.A., Godmez, R., Rodriguez-Otero, J.L., (2001) Actividades enzimaticas de algunas cepas con ionteres tecnologico aisladas del queso Tetilla elaborado con leche cruda, Alimentaria 326: 49-55.

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

Moo-Young, M., Moreira, A.R., Tengerdy, R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation. In The Filamentous Fungi. Fungal technology. Smith, J.E., Berry, D.R., Kristiansen, B. (Eds), Edward Arnold Publisher, London, 4: 117-144.

Moslem M. A., Mashraqi A., Abd-Elsalam K.A., Bahkali A.H., Elnagaer M.A. (2010) Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. Genetics and Molecular Research 9 (4), 2292-2299.

Muhling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C., Joint, I. (2008) Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. International Society Microbiology Ecology 2: 379–392.

Mukai, T., Arihara, K., Ikeda, A., Nomura, K., Suzuki, F. & Ohori, H. (2003) *Lactobacillus kitasatonis* sp. nov., from chicken intestine. Int J Syst Evol Microbiol 53, 2055-2059.

Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., Ueno, Y. (1997) Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food and Agricultural Immunology 9: 77–83.

Nelson, P.E., Tousson, T.A., Marasas, W.F.O. (1983) In: *Fusarium* Species- An Illustrated Manual for Identification Pennsylvania State University Press, Philadelphia, PA, p.193.

Nguyen, M.T., (2007) Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse Institut National Polytechnique De Toulouse.

Nguyen, M.T., Tozlovanu, M., Tran, T.,L., Pfohl-Leszkowicz., Annie (2007) Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. Food Chemistry, 30

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

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

Okkers, D. J.,Dicks, L.M. T., Silvester, M., Joubert, J. J.,&Odendaal, H. J. (1999) Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocinlike peptide isolated from

Lactobacillus pentosus with a fungistatic effect on Candida albicans. Journal of Applied Microbiology, 87, 726–734.

Oriol, E. 1987. Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité d'eau. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 115 pages.

Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. Fleischwirtschaft, 47: 397-402.

Ozaki, M., Utimura, Y., Okada, S., (1992) In: Ozaki, M, (editor). Manuals of the experiments for *Lactobacillus*. Tokyo: Asakura-bibliopole Press; p. 71.

Pagnoncelli, M.G.P., Brand, D., Roussos, S., Gaime-Perraud, I., Augur, C., Soccol, C.R. (2003) Isolation and identification of lactic acid bactteria from mature coffee cherries : potential application in coffee husk ensiling. In Coffee Biotechnology and Quality, Sera, T., Soccol, C.R., Pandey A., Roussos, S. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 321-333.

Pardo, E, Marin, S, Ramos, A, Sanchis, V. (2004) Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. Food science and technology international 10 (1): 45-49.

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

Pederson, C.S. (1949) The Genus *Pediococus*, Journal Paper No. 780 New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York.

Pereira, R.T.G., Frank, J.M., Pfenning, L.H. (2003) Método para análise de comunidade de fungos associados a frutos e graos de cafeeiro. In 3° Simposio de pesquisa dos cafés do Brasil (pp. 177-178)

Pérez-Pulido, R., Ben-Omar, N., Abriouel, H., Lucas-López, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J.P., Gálvez A., (2007) Characterization of *Lactobacilli* isolated from caper berry fermentations. Journal of Applied Microbiology 102: 583–590.

Perraud-Gaime, I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse nouveau doctorat, Univ.Montpellier 2, 238p. (bibl :361 ref. N : 95 MON20033)

Perraud-Gaime, I., Roussos, S. (1997) Preservation of coffee pulp by ensilage: influence of biological additives. In Advances in solid state fermentation; Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 193-208 p.

Perraud-Gaime, I., Saucedo-Castaneda, G., Augur, C., Roussos, S., (2000) Adding value to coffee solid by-broducts through biotechnology. In: Coffee Biotechnology and Quality. Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, chapter 41 pp.437-446.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Studies in Mycology 59: 53–66.

Pfohl-Leszkowicz A.,Guerre P., Galtier P. Métabolisme des mycotoxines. In: Les mycotoxicoses dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, CSHP Ed, Tec & Doc, Paris 1999, pp. 37-68.

Pilet, M.F, Magras, C., Federighi, M. (1995) Bactéries Lactiques, Mannuel de Batériologie alimentaire Journal of Food Protein, 3: 256-262.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997) Fungi and Food Spoilage, 2nd Edition. Chapman and Hall, Cambridge, P. 593.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1999) Fungi and food spoilage. New York, Chapman & Hall,

Pitt, J.I. (2000) Toxigenic fungi: which are important? Medical Mycology 38: 17-22 Suppl. 1

Pohland, A.E., S. Nesheim, and Friedman L. (1992) Ochratoxin A, a review. Pure and Appl. Chem. 64, 1029-1046

Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., (1986) "The conversion of Procyanidins and Prodelphinidins and to cyaniding and Delphinidin." Phytochemistry 25 (1): 223-230.

Quiroz Suarez, M.L, Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud J.P. (2004) Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxinogenesis in green coffee. Food Microbiology. 21: 629-634.

Raimbault, M., Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. European Journal Applied Microbiology Biotechnology. 9: 199-09.

Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Requena, T., Pelaez, C., Desmazeaud, M.J., (1991) Characterization of *Lactococci* and *Lactobacilli* isolated from semi-hard goats' cheese. Journal of Dairy Research 58: 137-145.

Rinyu E., Varga J., Ferenczy L. (1995) Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. Journal of Clinical Microbiology. 33 (10) p. 2567–2575

Rocken, W. (1996) Applied aspects of sourdough fermentation. Advenced Food Science. 18:212–216.

Roos, S., Engstrand, L. & Jonsson , H. (2005) *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp.nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. International Journal System Evolutionary Microbiology 82 55, 77-82.

Rossi F., Dellaglio F. (2007) Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. Journal of Applied Microbiology 103: 707–1715.

Roussos, S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation, et production de cellulases. PhD, Université de Provence, Marseille. 1985. 193p.

Roussos, S., Aquihauatl, A., Cassaigne, J., Favela, E., Gutierrez, M., Hannibal, L., Huerta, S., Nava G., Raimbault, M., Rodriguez, W., Salas, J-A., Sanchez, R., Trejo, M., Viniegra-Gonzalez, G. (1989) Détoxificacion de la pulpa de café por fermentacion solida, in Roussos S., Licona-Franco R., Gutierrez-Rojas M. (Eds). Biotecnologia en la Agroindustria Cafetalera. UAM-Iztapalapa , Mexico DF. ISBN 968-840-776-3 ; pages 121-143.

Roussos, S., Aquiahuatl, M.A., Trejo-Hernandez, M., Gaime-Perraud, I., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp - Isolation, screening, characterization, selection of caffein degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 756-762.

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

Roussos S., Hassouni H., Ismaïli-Alaoui M. (2008) Procédé de production de spores et de métabolites provenant de microorganismes d'origine fongique et leurs utilisations. Brevet N° FR 07/05519; PCT FR 2008/001064.

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.

Royas, J.B.U., Verreth, J.A.J, Amato, S., Huisman, E.A. (2003) Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp." Bioresource Technology 89(3): 267-274.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Salih G. (2004) Mycoflore des maâsra marocaines: Toxinogenèse des souches isolées d'*Aspergillus flavus* et d' *Aspergillus niger*, détection et analyse des mycotoxines dans l'huile d'olive. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. 153p.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., (1996) Introduction to food borne fungi. 4e édition, Centraalbureau voor Schimmelcutures, Netherlands, 1-232p.

Samson R.A., Houbraken J., Summerbell R.C., Flannigan B., Miller J.D. (2001) Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microogranisms in Home and Indoor Work Environments. New York: Taylor & Francis. pp. 287–292.

Samson, R.A, Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C. (2004) New ochratoxin A or *sclerotium* producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology 50: 45–61.

Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. (2007) Diagnostic tools to identify black *Aspergillus*. Study Mycology.; 59: 129–145.

Samson, R.A., Beom-Hongs, S., Frisvad, J.C. (2006) Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus* . Medical Mycology September 44:133-148

Sanchez-Hervas, M., Gil, J.V., Bisal, F., Ramon, D., Martinez-Culebras, P.V. (2008) Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. International Journal of Food Microbiology 125: 336-340.

Sanglard, D. (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Current Opinion in Microbiology, 5: 379–385.

Sarhy-Mangin, Bagnon, V. (1999) Production de 6-pentyl-α-pyrone par *Trichoderma harzianum* cultivé sur support solide.Thèse Doctorat, Université de Montpellier II Science et Techniques du Languedoc. 248p.

Saucedo-Castañeda, G. (1991). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelli* cultivé sur support solide. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 212 pages.

Schillinger., U., Lucke, F.K., (1987) Identification of *Lactobacillus* from meat and meat products. Food Microbiology. 4: 199-208.

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

Schillinger, U., Kaya, M., Liicke, K., (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sakei*. International Applied Bacteriology. 70: 473-478

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

Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. Ann Rev Microbiol 37,143-187.

Schmidt-Heydt, M., Bode, H., Raupp, F., Geisen, R. (2010) Influence of light on ochratoxin biosynthesis by. *Penicillium* Mycotoxin Research, 26: 1-8.

Schnu¨rer Johan and Magnusson Jesper (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science & Technology 16, 70–78

Schnurer, J., Magnusson, J., (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, Trend in Food Science and Technology. 16: 70–78.

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P.W. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* -a review. Applied microbiology and biotechnology 59 : 426–35.

Schwan, R.F., Wheals A.E., (2003) Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout,T., Robert, V. (Eds.). Yeasts in Food. Behr's Verlag, Hamburg, pp.426-459.

Sera, T., Soccol, C.R., Pandey A., Roussos, S. (2000) Coffee Biotechnology and Quality. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 538 p.

Seseña, S., Palop, M.L., (2007) An ecological study of lactic acid bacteria from Almagro eggplant fermentation brines. Journal of Applied Microbiology 103: 1553–1561.

Shiou-Huei Chao, Ruei-Jie Wu, Koichi Watanabe, Ying-Chieh Tsai (2009) Diversity of lactic acid bacteria in *suan-tsai and fu-tsai*, traditional fermented mustard products of Taiwan. International Journal of Food Microbiology 135, 203-210.

Shoji,T., Masumoto, S., Morichi, N., Kanda, T., Ohtake, Y. (2006) Apple (Maluspumila) procyanidins fractionated accordin to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPlC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS." Journal of Chromatography A 1102(1-2): 206-213.

Silva, C.F., Schwan, R.F., Dias, E.S., Wheals, A.E. (2000) Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. International Journal of Food Microbiology 60: 251–260.

Sjögren, J., Magnusson, A. Broberg, J. Schnurer , Kenne L., (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* milab 14. Applied Environmental Microbiology, 69: 7554-7557.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16SrRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 44, 846-849.

Staley,J. and Krieg,N.R. (1987) Bacterial classification I. Classification of procaryotic organisms: an overwiev.

Steyn, P.S., (1995), Mycotoxins, general view, chemistry and structure Toxicology Letters 82/83 p.843-851.

Steyn, P.S., (1998) The biosynthesis of mycotoxins. Rev. Med. Vet., 149: 469-478.

Steigmeier M.E.& Schlatter C. (1991). Mycotoxines in Coffee. In 14e *Colloque ASIC*, San Francisco. 57-63.

Stiles, J., Penkar, S., Plockova, N., Chumchalova, J., & Bullerman, L. B. (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. Journal of Food Protection, 65, 1188–1191.

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

Stro¨m, K., Sjo¨gren, J., Broberg, A., & Schnu¨ rer, J. (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4- OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4322–4327.

Suzuki, I., Nomura, M., & Morichi, T. (1991) Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. Milchwissenschaft, 46, 635–639.

Švec, P., Devriese, L. A., Sedlacek, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J. & Doskar, J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus sp.* nov. and *Enterococcus moraviensis sp.* nov., isolated from water. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1567-1574.

Tamang, J.P., Dewan, S., Tamang, B., Rai, A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2007) Lactic acid bacteria in Hamei and Marcha of North East India, Indian Journal of Microbiology 47: 119-125.

Tamura K, Nei M , Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Texeira A., A., Iamanaka, B.T. (2003) The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. International Journal of Food Microbiology 82: 173– 179.

Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Espinola, M. M. B., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J.& Facklam, R. R. (2001) *Enterococcus porcinus sp*. nov. and

Enterococcus ratti sp. nov., associated with enteric disorders in animals. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1737-1743.

Teren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevel, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. Mycopathologia, 134: 171-176.

Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., Kersters, K. (2001a) Differentiation of *Lactobacillus plantarum. L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. Systematic and Applied Microbiology 24: 554–560.

Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. (2001b) Differentiation of *Lactobacillus plantarum, L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. Applied and Environmental Microbiology 67: 3450–3454.

Trejo-Hernadez, M. (1992) Physiologie de croissance de souches de Claviceps : Production d'alcaloides par fermentation en milieu solide Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille, 164p.

Tsubouchi H, Yamamoto K., Terada H., Hisada K. & Sakabe Y. (1988) Ochratoxin A found in commercial roast coffee.

Union Européenne (1995) European Directive 95/2/CE of European Parliament and Council of European Community, 20 February 1995.

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

Valerio F.,P.DeBellis, S.L.Lonigro, A.Visconti, Lavermicocca P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation productsinbread-makingtoprevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage,Int.J.FoodMicrobiol.122 328–332.

Valerio F., Favilla M., De Bellis P., Sisto A., De Candia S., Lavermicocca P., (2009) Antifungal activityofstrainsoflacticacidbacteriaisolatedfroma semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. Systematic and Applied Microbiology 32, 438–448.

Van der Merve, K. J., Steyn, P.S., Fourie, L. (1965) Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A; B and C; metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. Journal of the Chemical Society, 36: 7083 -7088.

Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F. & Devriese, L. A. (2001). *Enterococcus villorum sp. nov*., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. International Journal System Evolutionary Microbiology 51, 393-400.

Vancanneyt, M., Devriese, L. A., De Graef, E. M., Baele, M., Lefebvre, K., Snauwaert, C., Vandamme, P., Swings, J. & Haesebrouck, F. (2004) *Streptococcus minor sp*. nov., from faecal samples and tonsils of domestic animals. Int J Syst Evol Microbiol 54, 449-452.

Vancanneyt, M., Neysens, P., De Wachter, M., Engelbeen, K., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Van der Meulen, R., Hoste, B., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. & Swings, J. (2005b). *Lactobacillus acidifarinae sp. nov.* and *Lactobacillus zymae sp*. nov., from wheat sourdoughs. Int J Syst Evol Microbiol 55, 615-620.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Revue 60 : 407-438

Vandenbergh, P. A., & King, S. W. (1988) Process for producing novel yeast and mold inhibiting products. EP 0, 302, 300, B1.

Vandenbergh, P. A., & Kanka, B. S. (1989) Antifungal product. United States Patent Number 4,877,615.

Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape derived products.

Trends in Food Science & Technology, 17, 72-81.

Varga J., Kocsubé S., Tóth B., Frisvad J.C., Perrone G., Susca A., Meijer M., Samson R.A. (2007) *Aspergillus brasiliensis sp.* nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world–wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1925–1932.

Viljoen, B.C. (2001) The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. International Journal of Food Microbiology. 69: 37- 44.

Vina W., Yang and Carol A., Clausen (2005) Determining the suitability of Lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 977–981.

Waterman, P.G., Mole S. (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites Oxford, Blackwell Scientific Publication ISBN 0-632-02969-2

Weisburg, W.J., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of Bacteriology. 173: 697-703.

Wilbaux R. (1956) Les caféiers au Congo Belge. Technologie du café, arabica et robusta. Publication de la direction de l'agriculture, des forêts et de l'élevage, Bruxelles, 213 p.

Williams, A.G., Banks J.M. (1997) Proteolytic and other hydrolytic anzyme activities in non starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. International of Dairy Journal 7: 763-774.

Wiseman, D. W., & Marth, E. H. (1981) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis.* Mycopathologia, 73: 49–56.

Woiciechowski, A.L., Pandey, A., Machado, C.M.M., Cardoso, E.B., Soccol, C.R. (2000) Hydrolysis of coffee husk: process optimization to recover its fermentable sugar, In: Coffee Biotechnology and Quality, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academis Publishers, Dordrecht, chapter 38 p.409-417.

Xu, H., Kawamura, Y., Li, N., Zhao, L., Li, T., Li, Z., Shu, S. & Ezaki, T. (2000). A Rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in capillary tube. Intenational Journal System Evolutionary Microbiology 50, 1463-1469.

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

Yoon, J. H., Kang, S. S., Mheen, T. I., Ahn, J. S., Lee, H. J., Kim, T. K., Park, C. S., Kho Y. H., Kang, K. H. & Park, Y. H. (2000) *Lactobacillus kimchii sp.* nov., a new species from kimchi. International Journal Systematic Evolution Microbiology 50, 1789-1795.

Yousef I., Hassan, Bullerman Lloyd B. (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei ssp. tolerans* isolated from a sourdough bread culture International Journal of Food Microbiology. 121: 112-115

Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) *Lactobacillus pentosus*. International Journal Systematic of Bacteriology 37: 339–341.

Zuluaga, J. (1989) Utilizacion integral de los subroductos del café, in Memorias I. Sem. Intern.Biotecnol.Café (I SIBAC), Roussos, S., Licona-Franco, R., Gutierrez-Rojas, M. (Eds), Xalapa, Mexico , pp. 63-76.

7 ANNEXES

Annexe 1: Valorisation des résultats par des communications

Annexe 2: Protocole d'extraction d'ADN – Qiagen

Annexe 3: Chromatogramme standard et courbes étalons OTA

Annexe 4: Coinjection des extraits de moisissures avec OTA

Annexe 5: Chromatogramme standard et courbes étalons d'acide lactique et d'acide acétique

Annexe 6: Coinjection des extraits de suranageants des bactéries lactiques avec l'acide lactique et l'acide acétique

Annexe 7: séquences des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la pulpe de café

Annexe 8: Article déjà publié Djossou *et al.*, 2011, dans la revue Anaerobe, Avril 2011

Annexe 1 : Valorisation des résultats par des communications

A. - Article

Djossou O., Perraud-Gaime I., Lakhal-Mirleau F., Rodriguez-Serrano G., Karou A.G.T., Niamke S., Ouzari I., Boudabous A., Roussos S. 2011. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum sp*. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. (Anaerobe, 30 : 1-6).

B. - Présentations des communications orales dans des Séminaires et congrès

Djossou O. 2008. Microflore post récolte de café robusta en Côte d'Ivoire : utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures et des mycotoxines. Journée des doctorants de l'IMEP, FST de St Jérôme, Marseille le 20 juin 2008 (conférence)

Roussos S., Lakhtar H., **Djossou O.,** Giffard I., Labrousse Y., Perraud-Gaime I., Panou E. 2008. Post harvest contamination of Mediterranean fruits and vegetables by filamentous fungi: management and biological control. In Actes du 1er Symposium de la société savante grecque Mikrobiokosmos. Athèness 12-14 décembre 2008. P. 14-15 (conférence)

Djossou O. 2009. Mycoflore post-récolte de café robusta en Côte d'Ivoire et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes. Journée des doctorants de l'IMEP, FST de St Jérôme, Marseille le 20 juin 2008 (conférence).

Roussos S., Belkacem N., **Djossou O.,** Efire-Nguema A., Labrousse Y., Perraud-Gaime I., Bezirtzoglou E. 2010. Biological control strategy to protect foodstuffs from post harvest moulds and producing mycotoxins. In Proceedings of XXXIII International Congress on Microbial Ecology and Disease, Greece, 6-10 september 2010 (conférence page 126),

Roussos S., Lamrani K., **Djossou O.,** Lakhtar H., Giffard I., Labrousse Y., Perraud-Gaime I. 2010. Post harvest aerial contamination of fruits, coffee, cereals and vegetables by filamentous fungi : management and biological control. Proceedings International Congress on Bioprocess in Food Industries, Curitiba 05-08 octobre 2010. (Brésil).

Roussos S., Molina L., **Djossou O**., Labrousse Y., Lakhtar H. 2011. Effet du stress hydrique sur la sporulation et la production de mycotoxines par les moisissures cultives en milieu slide. Congrès de Mycotoxines 2011, organisé par la Société Française de Microbiologie, à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, le 18 janvier 2011 (conférence).

C. - Présentations des posters dans des Séminaires et congrès

Djossou O., Perraud-Gaime I., Karou A.G.T., Niamke S., Rodriguez-Serrano G.M., Roussos S. 2010. Robusta coffee berries post harvest microflora : moulds, mycotoxin and lactic acid bacteria. International Mycological Congress n°9, Edinbourg UK, 8-12 août 2010 (poster)

Djossou O. Perraud-Gaime I., Karou A.G.T. , Niamke S., Roussos S. 2010. Natural microflora of coffee beans: *Aspergillus ochraceus* OTA production and selection of Lactic acid bacteria to control mould contamination. In Proceedings of XXXIII International Congress on Microbial Ecology and Disease, Greece, 6-10 september 2010 (Poster page 113).

Djossou O. Perraud-Gaime I., Karou A.G.T. , Niamke S., Roussos S. 2010. Robusta coffee beans post harvest microflora: moulds, mycotoxins and lactic acid bacteria. Proceedings International Congress on Bioprocess in Food Industries, Curitiba 05-08 octobre 2010. Poster (Brésil)

Djossou O., Roussos S., Perraud-Gaime I., Karou A., Niamke S. 2011. Café robusta, mycotoxines, et bactéries lactiques

Annexe 2: Protocole d'extraction de l'ADN

July 2006

DNeasy® Blood & Tissue Handbook

DNeasy Blood & Tissue Kit
DNeasy 96 Blood & Tissue Kit

For purification of total DNA from
- animal blood
- animal tissue
- rodent tails
- ear punches
- cultured cells
- fixed tissue
- bacteria
- insects

QIAGEN

Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-positive bacteria, such as *Corynebacterium* spp. and *B. subtilis*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria and incubation with lysozyme to lyse their cell walls before DNA purification.

Important points before starting

- See "Quantification of starting material", page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Things to do before starting

- Prepare enzymatic lysis buffer as described in "Equipment and Reagents to Be Supplied by User", page 14.
- Preheat a heating block or water bath to 37°C for use in step 3.

Procedure

1. **Harvest cells (maximum 2 x 10⁹ cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). Discard supernatant.**
2. **Resuspend bacterial pellet in 180 µl enzymatic lysis buffer.**
3. **Incubate for at least 30 min at 37°C.**

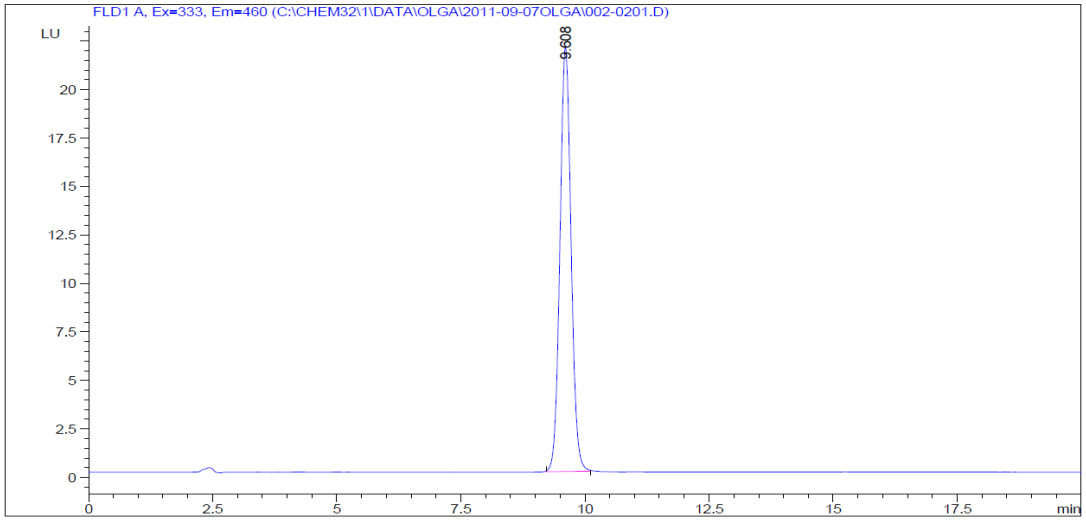
   After incubation, heat the heating block or water bath to 56°C if it is to be used for the incubation in step 5.
4. **Add 25 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL (without ethanol). Mix by vortexing.**

   Note: Do not add proteinase K directly to Buffer AL.

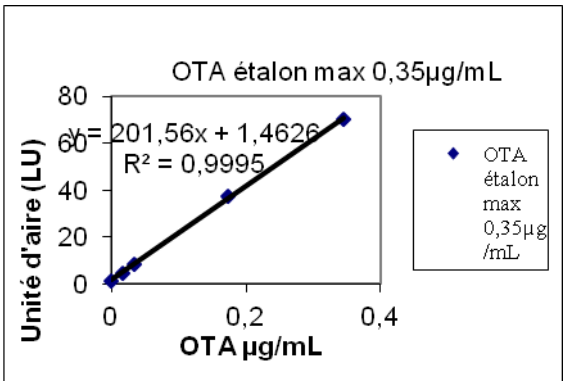
   Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
5. **Incubate at 56°C for 30 min.**

   Optional: If required, incubate at 95°C for 15 min to inactivate pathogens. Note that incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

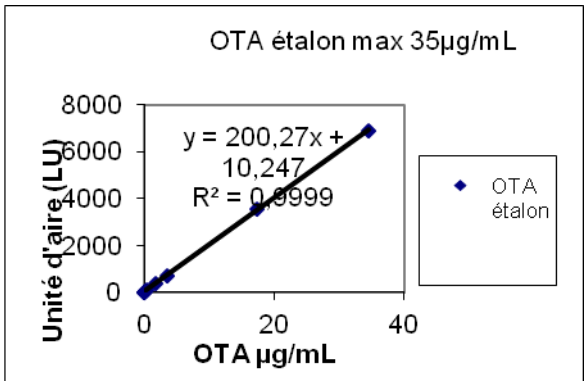
Annexe 3 : Chromatogrammes standard OTA et courbe étalons



Pic du standard OTA à 4,38µg/mL

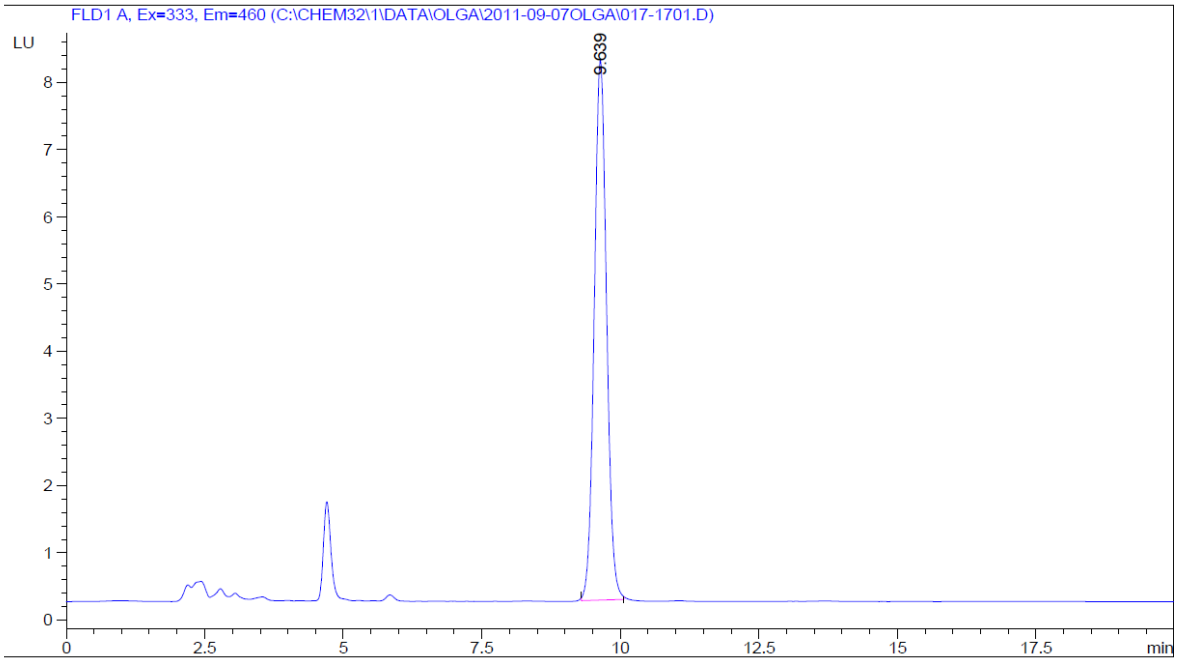


Courbe étalon OTA de 0 à 4µg/mL

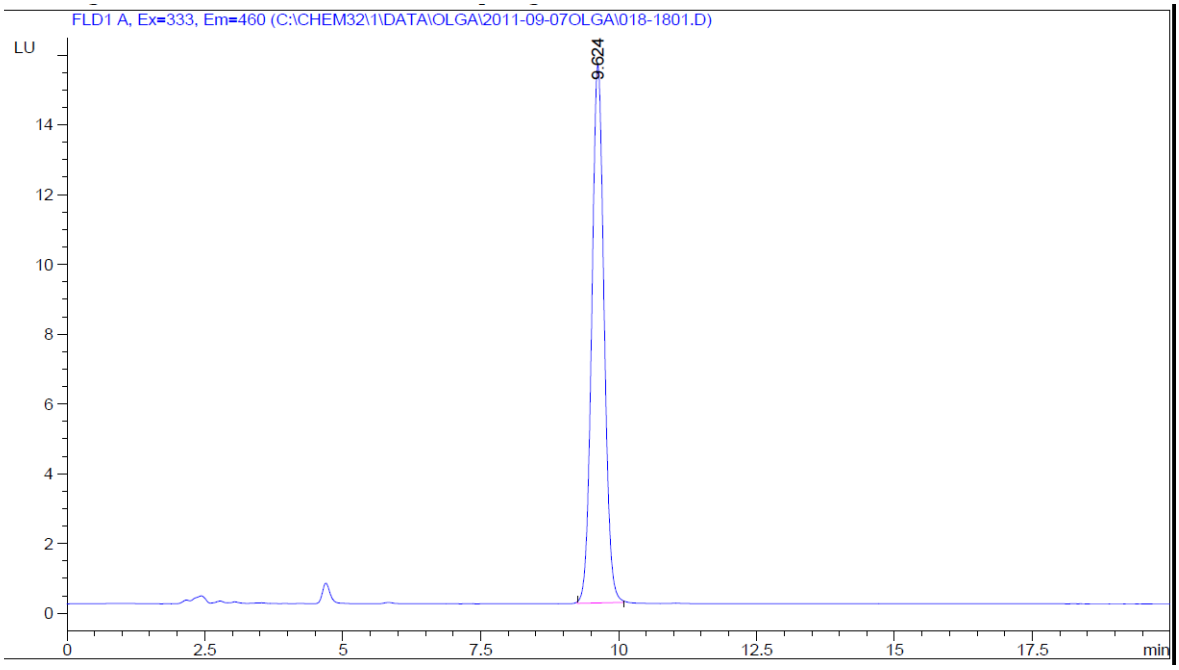


Courbe étalon OTA de 0 à 40µg/mL

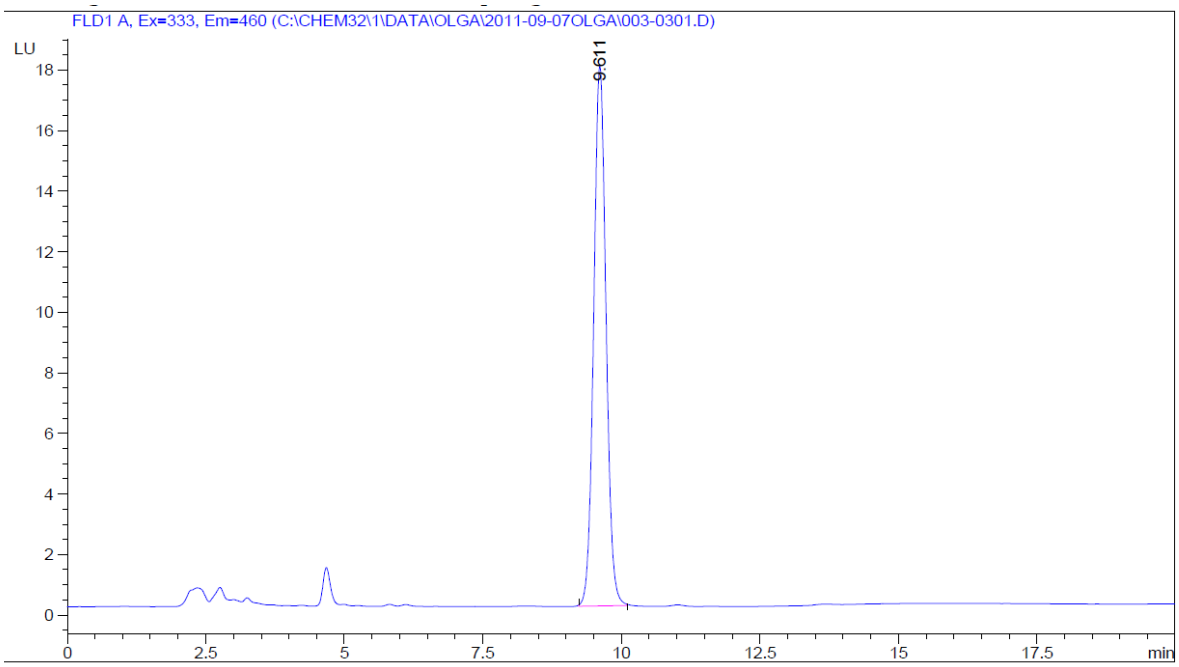
Annexe 4 : Coinjection des pics OTA chez quelques souches par co-injection



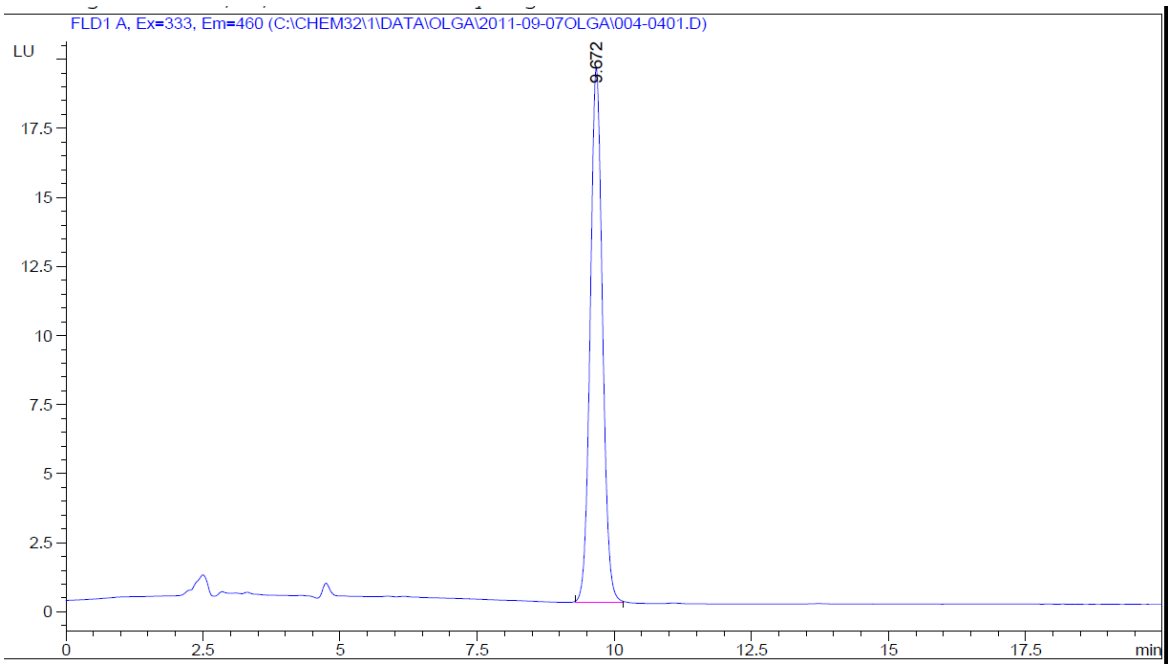
Pic Ochratoxine A de l'extrait de la souche DO 127



Pic Ochratoxine A de l'extrait de la souche DO 127 + standard OTA (4,38µg/mL)

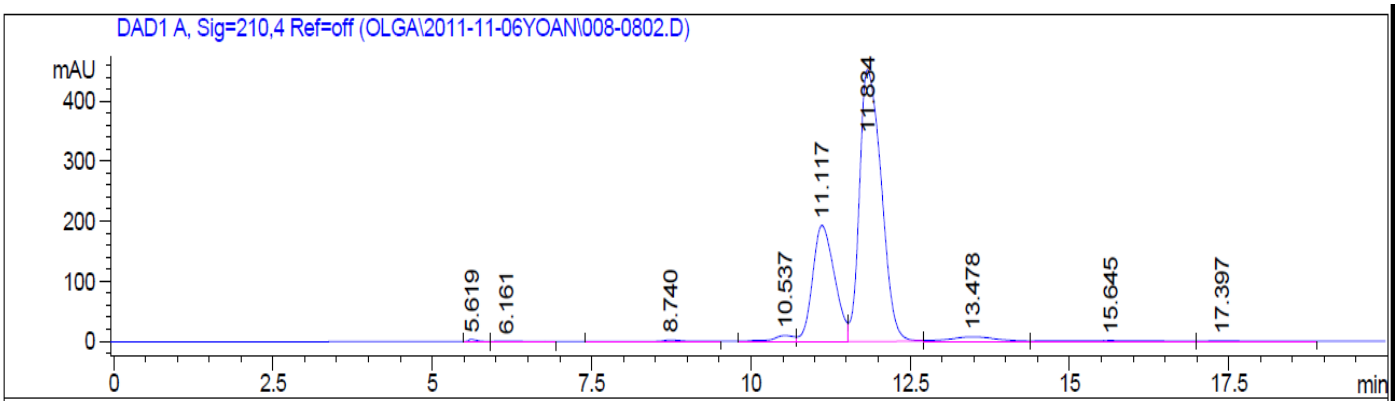


Pic Ochratoxine A de l'extrait de la souche DO 162

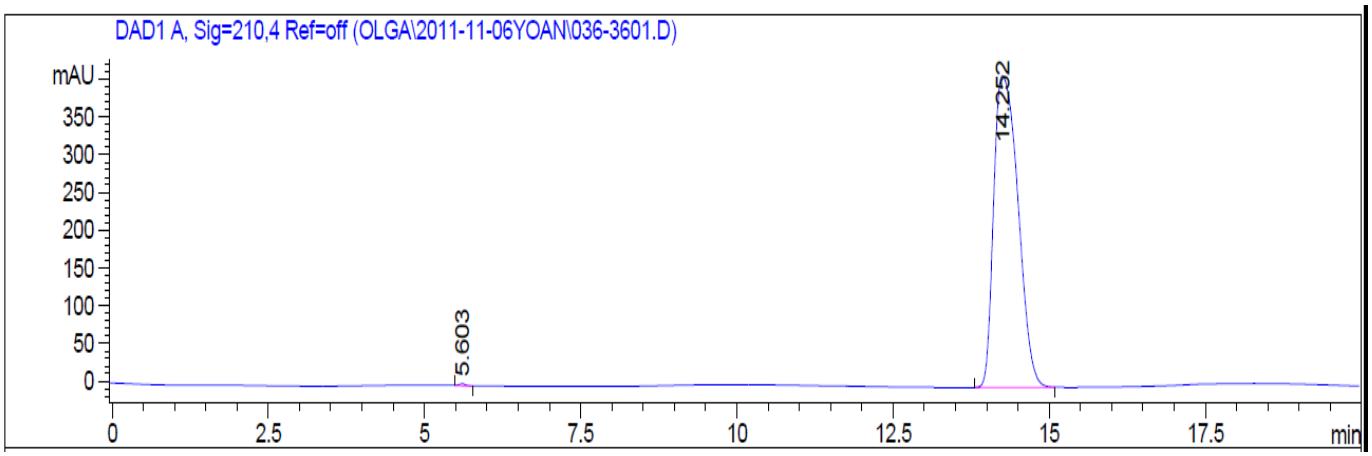


Pic Ochratoxine A de l'extrait de la souche DO162+standard OTA (4,38µg/mL)

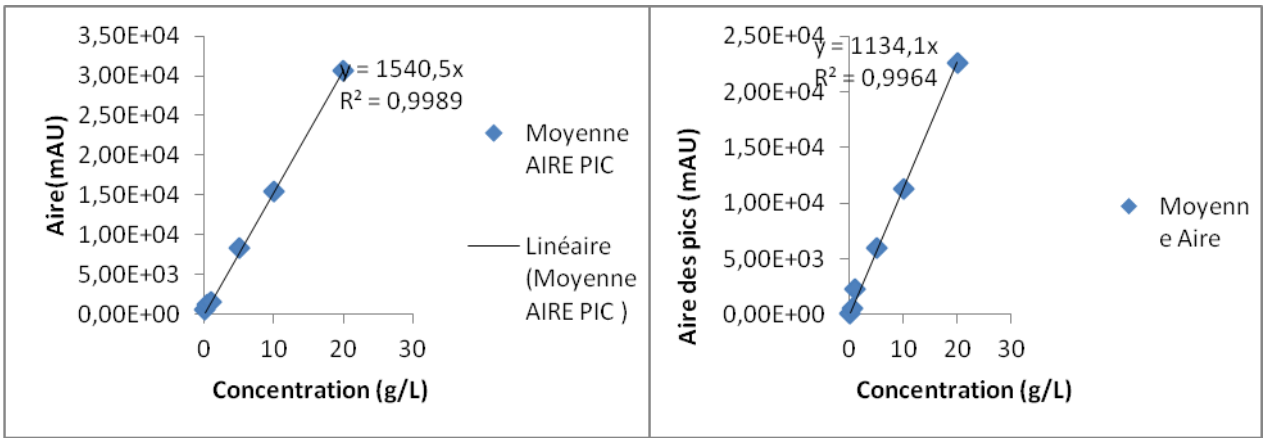
Annexe 5 : Chromatogrammes des standards et courbes étalon de l'Acide lactique et de l'Acide acétique



Pic du standard d'acide lactique (10g/L) au temps de retention 11,83 min



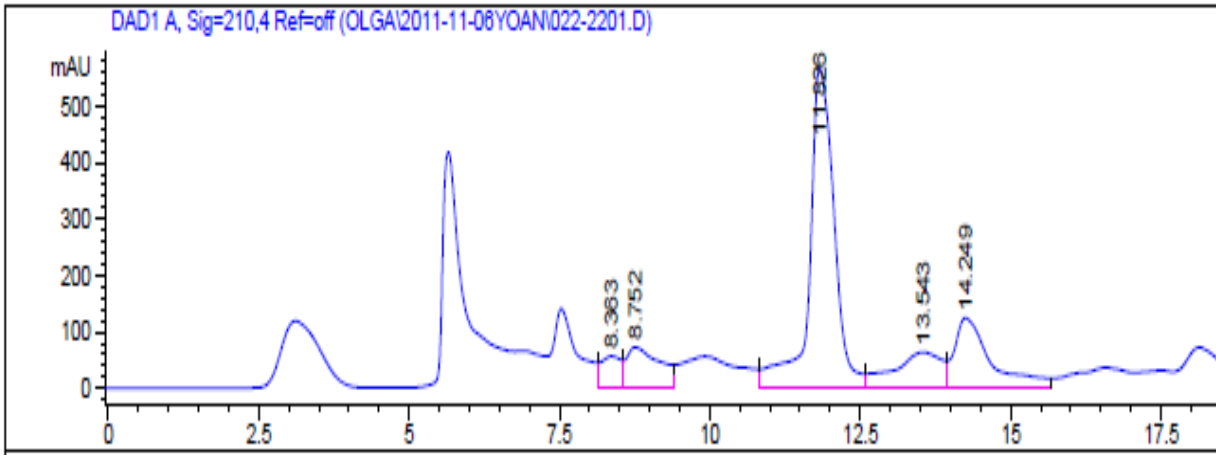
Pic du standard d'acide acétique (10g/L) au temps de retention 14,25 min



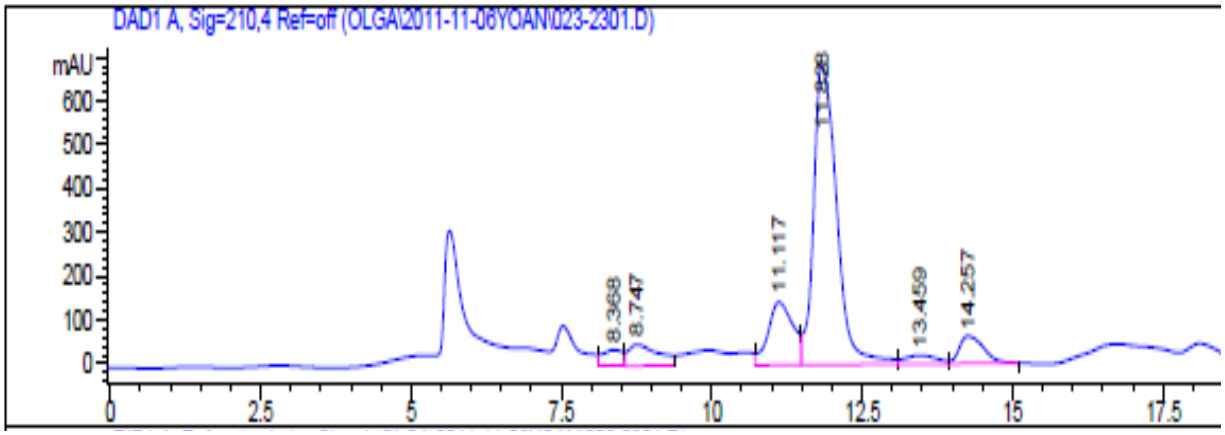
Courbe étalon Acide lactique

Courbe étalon acide acétique

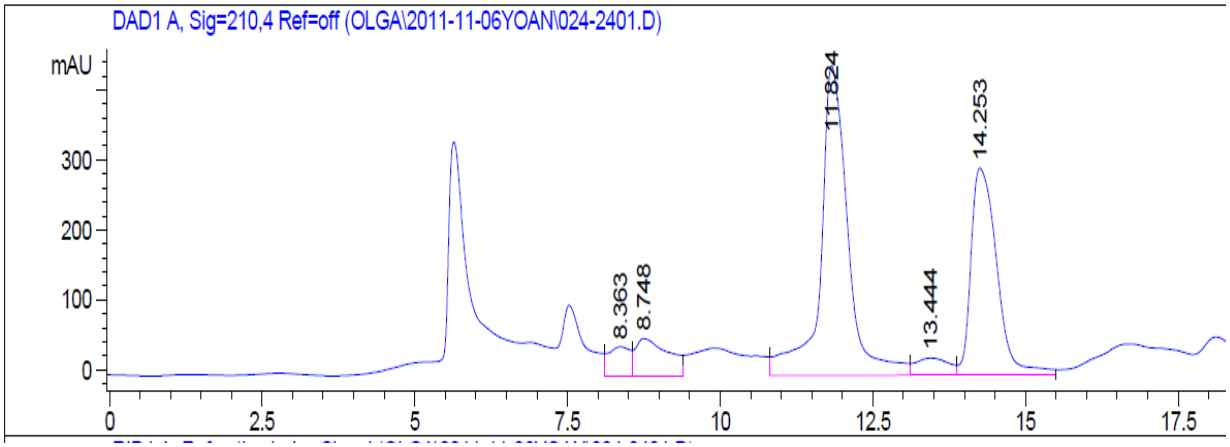
ANNEXE 6 : Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche **LabCP2Z52** et des extraits de surnageant coinjectés respectivement avec l'acide lactique et l'acide acétique



Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche LabCP2Z52



Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche LabCP2Z52 + standard d'acide lactique



Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche LabCP2Z52 + standard d'acide acétique

ANNEXE 7: Séquences des bactéries lactiques testées pour leur activité antifongique et isolées de la pulpe de café

>**LabCP2Z52**
TTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGG
AAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAC
TTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGC
GGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG
AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAG
GTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTG
AGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTAT
GGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGT
GTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATC
TAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCC
AGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
AACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACAC
CCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA

>**LabCP15Z42**
GAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA
GATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGC
TATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAATGGCTCACCATG
GCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAA
CATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGT
GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAC
CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCA
TTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTA
AAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCC
TAAGGTGGGACAGA

>LabCP16Z42
CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
TAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACTTGGACCGCAGGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAATGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT

>LabCP19Z31
CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
TAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT
ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTA
TCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAG
TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG

>LabCP20Z31
CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
TAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT

ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTA
TCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAG
TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG

> LabCP21Z32
CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
TAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT
ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTA
TCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAG
TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG
A

>LabCP28Z21
CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
TAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT
ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTA

TCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAG
TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG
A

>LabCP22Z32
GaGTGAAgAAGGGTTTCGcCTCgtaaaCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATaTCTGAGAGTAACT
GTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT
TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAA
AGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAgTGCT
AAGTGTA

>LabCP30Z22
GCGtGAGTGAgAGGgTTTCGgCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAG
TAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATgagt
g

>LabCP37Z12
ATGCCGCGTGaGTGAGAgGGtTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTT
GAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
GTGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCG
GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAAT
GCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCT
GAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAA
CGATgagt

ANNEXE 7 : ARTICLE (Djossou et *al.*, 2011)

ARTICLE IN PRESS

Anaerobe xxx (2011) 1–6

Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: 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 [a], Isabelle Perraud-Gaime [a], Fatma Lakhal Mirleau [a], Gabriela Rodriguez-Serrano [b], Germain Karou [c], Sebastien Niamke [c], Imene Ouzari [d], Abdellatif Boudabous [d], Sevastianos Roussos [a,*]

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

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

[c] Université de Cocody, UFR Biosciences, 22 B.P. 582, Abidjan 22, Cote d'Ivoire

[d] 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 xxx

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 (O. Djossou), gmrs@xanum.uam.mx (G. Rodriguez-Serrano), s.roussos@univ-cezanne.fr (S. Roussos).

1075-9964/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.006

Please cite this article in press as: Djossou O, et al., Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*, Anaerobe (2011), doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.006